



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS
RECEPTORES ADRENÉRGICOS α QUE MEDIAN EL
EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL EN AORTA
DE RATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA,
PRESENTA:

M.C. y P. ARELLANO MENDOZA MÓNICA
GRISELDA

DIRECTOR:

DR. EN C. IGNACIO VALENCIA
HERNÁNDEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 16 de enero del 2004

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La E.S.M. en su sesión ORDINARIA No. celebrada el día 14 del mes de enero conoció la solicitud presentada por la alumna:

ARELLANO MENDOZA MÓNICA GRISELDA
Apellido paterno materno nombre

Con registro:

B-0	2	1	5	7	5
-----	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de: MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

“ Caracterización farmacológica de los receptores adrenérgicos α que median el efecto relajante del quinpirol en aorta de rata ”

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

RESUMEN (VERSIÓN EN ESPAÑOL E INGLÉS), INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES, HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS, MATERIAL Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA.

2.- Se designa como Director de Tesis al C. DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
EN EL LABORATORIO DE FARMACODINAMÍA DEL EDIFICIO DE POSGRADO DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL I. P. N.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

JEFE DE LA SECCIÓN

DR. JOSÉ GPE. TRUJILLO FERRARA



DIRECTOR DE TESIS

DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

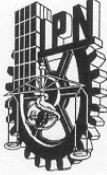
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
IPN
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

El Aspirante

M. C. y P. ARELLANO MENDOZA MONICA GRISELDA

El Presidente del Colegio

DR. JOSÉ GPE. TRUJILLO FERRARA



CGPI-14

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Mayo del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La E. S. M. para examinar la tesis de grado titulada:

" CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α QUE MEDIAN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL EN AORTA DE RATA "

Presentada por la alumna:

ARELLANO
Apellido paterno

MENDOZA
materno

MÓNICA GRISELDA
nombre(s)

Con registro:


B-0	2	1	5	7	5
-----	---	---	---	---	---


aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

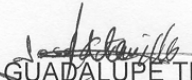
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

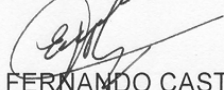
LA COMISIÓN REVISORA

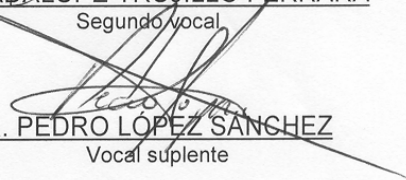

DR. CARLOS CASTILLO HENKEL
Presidente del Jurado


DRA. ROSA AMALIA BOBADILLA LUGO
Secretario del Jurado


DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ
Primer vocal

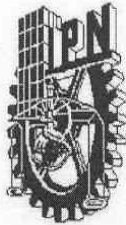

DR. JOSÉ GUADALUPE TRUJILLO FERRARA
Segundo vocal


DR. ENRIQUE FERNANDO CASTILLO HENKEL
Tercer vocal


DR. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ
Vocal suplente

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. CARLOS CASTILLO HENKEL



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día **02** del mes **diciembre** del año **2004**, la que suscribe **MONICA GRISELDA ARELLANO MENDOZA** alumna del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA** con número de registro **B-021575** adscrita a la **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA** manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ**, y cede los derechos al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **monigarellanom@yahoo.com.mx** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. C. y P. MONICA GRISELDA ARELLANO MENDOZA

ÍNDICE

I. GLOSARIO.....	9
II. RESUMEN	10
III. ABSTRACT.....	11
IV. INTRODUCCION.....	12
1. DOPAMINA.....	12
A). <i>Propiedades farmacológicas de la dopamina.....</i>	<i>13</i>
B). <i>Farmacocinética de la dopamina.....</i>	<i>15</i>
V. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.....	15
1. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.....	18
A). <i>Receptores dopaminérgicos periféricos.....</i>	<i>20</i>
B). <i>Receptores dopaminérgicos en vasos sanguíneos.....</i>	<i>22</i>
2. AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.....	25
A). <i>Acciones cardiovasculares del quinpirol.....</i>	<i>27</i>
3. RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_2	31
A). <i>Receptores adrenérgicos α_2 endoteliales.....</i>	<i>35</i>
4. ÓXIDO NÍTRICO.....	37
A). <i>Funciones del NO.....</i>	<i>38</i>
B). <i>Factores que afectan la síntesis o acción del NO.....</i>	<i>38</i>
C). <i>Inhibidores de la síntesis de NO.....</i>	<i>39</i>
D). <i>NO y receptores adrenérgicos α_2.....</i>	<i>40</i>
VI. JUSTIFICACIÓN.....	41
VII. HIPÓTESIS.....	42
VIII. OBJETIVOS.....	42
1. GENERAL.....	42
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
IX. METODOLOGIA.....	43
1. ANIMALES:.....	43
2. PREPARACIÓN DE LOS ANILLOS AÓRTICOS:.....	43
3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	44
A). <i>Papel del endotelio en el efecto relajante del quinpirol.....</i>	<i>44</i>
B). <i>Efecto del raclopride sobre la relajación inducida por quinpirol.....</i>	<i>44</i>
C). <i>Evaluación de la participación de los receptores adrenérgicos α_1 en el efecto relajante inducido por el quinpirol.....</i>	<i>45</i>
D). <i>Efecto de la yohimbina sobre la relajación inducida por quinpirol.....</i>	<i>45</i>
E). <i>Efecto del BRL44408 sobre la relajación inducida por el quinpirol.....</i>	<i>45</i>
F). <i>Efecto de ARC239 sobre la relajación inducida por quinpirol.....</i>	<i>46</i>
G). <i>Efecto del L-NAME sobre la relajación inducida por quinpirol.....</i>	<i>46</i>
H). <i>Determinación de la producción de NO inducida por el quinpirol a través de la cuantificación de nitritos (NO_2^-).....</i>	<i>46</i>

X.	FÁRMACOS EMPLEADOS.	48
XI.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
XII.	RESULTADOS	48
	1. PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN EL EFECTO RELAJANTE INDUCIDO POR QUINPIROL.....	48
	2. EFECTO DEL RACLOPRIDE EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.....	50
	3. PAPEL DE LOS RECEPTORES α_1 EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.....	51
	4. EFECTO DE LA YOHIMBINA EN EL EFECTO RELAJANTE INDUCIDO POR QUINPIROL.....	51
	5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN POR L-NAME EN LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR QUINPIROL.....	54
	6. EFECTO DE BRL44408 SOBRE LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR QUINPIROL.....	55
	7. EFECTO DE ARC239 SOBRE LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR QUINPIROL.....	56
	8. PRODUCCIÓN DE NO INDUCIDA POR EL QUINPIROL A TRAVÉS DE LA CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS (NO ₂).....	57
XIII.	DISCUSIÓN	59
	1. EFECTO DEL QUINPIROL EN LOS ANILLOS NÓRTICOS DE RATA Y EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN DICHO EFECTO.....	59
	2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D ₂ EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.....	60
	3. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.....	63
	4. PARTICIPACIÓN DEL NO EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.....	68
XIV.	CONCLUSIONES:	70
XV.	BIBLIOGRAFÍA:	71

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Estructura química de la dopamina	10
Fig. 2. Estructura química del LY17155 (Quinpirol)	27
Fig. 3. Efecto relajante de quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio (círculos oscuros) y sin endotelio (círculos vacíos) precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio de 6 experimentos \pm error estandar.	46
Fig.4. Efecto relajante del quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio en presencia (círculos vacíos) y en ausencia (círculos oscuros) de raclopride 10^{-5} M (antagonista D_2) en anillos precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio de 6 experimentos \pm error estandar.	47
Fig. 5. Registro típico del experimento de protección de quinpirol (10^{-4} M) a fenoxibenzamina (antagonista irreversible α_1) 10^{-6} M sobre el efecto contráctil de fenilefrina (agonista de receptores α_1) 10^{-6} M, en anillos de aorta de rata con endotelio. En la primera etapa del experimento se valoró el efecto protector del quinpirol a fenoxibenzamina, en una segunda etapa se valoró la acción 49 antagónica de la fenoxibenzamina y finalmente en una tercera etapa se valoró el posible efecto del quinpirol, en las tres etapas se valoró el efecto de quinpirol sobre los receptores α_1 .	
Fig.6. Efecto protector del quinpirol (Q) 10^{-4} M a fenoxibenzamina (FXB) 10^{-6} M, sobre el efecto contráctil (expresado en gramos de tensión) de fenilefrina 10^{-6} M en anillos de aorta de rata con endotelio, valorando el efecto con sus correspondientes vehículos: vehículo de quinpirol (V) y con el vehículo de 50 fenoxibenzamina (VFXB). Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos, con una $p < 0.05$.	
Fig.7. Efecto relajante de quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con 51	

endotelio en ausencia (círculos negros) y presencia (círculos vacíos) de yohimbina 10^{-8} M, precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos, con una $p < 0.05$.

Fig.8 Efecto relajante de quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en ausencia (círculos oscuros) y en presencia de L-NAME (inhibidor de la NOS) a las siguientes concentraciones: 10^{-6} M (círculos vacíos), 3.1×10^{-6} M (triángulos oscuros), y 10^{-5} M (triángulos vacíos) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio de 6 experimentos, \pm error estándar. 52

Fig.9. Efecto relajante de quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con 5-HT (10^{-5} M), en ausencia o presencia de BRL44408 (antagonista selectivo α_{2A}) a las concentraciones de 10^{-9} a 10^{-8} M. Cada barra 53
representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos, con una $p < 0.05$.

Fig.10. Efecto relajante de quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con 5-HT (10^{-5} M), en ausencia o presencia de ARC239 (antagonista selectivo α_{2B}) a las concentraciones de 10^{-7} a 10^{-6} M. Cada barra 54
representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos, con una $p < 0.05$.

Fig. 11. Incremento de la producción de nitritos por el quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio se esquematiza la producción basal (B) de nitritos por parte del tejido y el incremento de éstos por el quinpirol (Q) en presencia y ausencia de prazosina 10^{-9} M (PRZ), raclopride 10^{-5} M (R), ARC239 3.1×10^{-9} M, L-NAME 10^{-5} M, yohimbina 10^{-8} M (Y) y BRL44408 10^{-8} M. 55

Tabla. 1. Agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos. 24

Tabla 2. Características farmacológicas de los receptores adrenérgicos α_2 32

I. GLOSARIO

L-NAME.....	N ^G -nitro-L-arginina metiléster
NO.....	Formula del Óxido Nítrico
GMPC.....	Monofosfato de guanosina 3'5' cíclico
AMPC.....	Monofosfato de adenosina cíclico
DAG.....	Diacilglicerol
IP ₃	1,4,5 Trifosfato de inositol
SNC.....	Sistema nervioso central
5-HT.....	5-Hidroxitriptamina
ACh.....	Acetilcolina
FHDE.....	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
FRDE.....	Factor relajante derivado del endotelio
SON.....	Sintasa de óxido nítrico
NADPH.....	Difosfato reducido del dinucleótido de nicotina y adenina
DA.....	Dopamina
NA.....	Noradrenalina
A.....	Adrenalina
COMT.....	Catecol-O-metil transferasa
AC.....	Adenilciclase
TM.....	Transmembrana

II. RESUMEN

El quinpirol es un agonista de los receptores dopaminérgicos D_2 al cual se le han descrito acciones centrales y periféricas. A nivel del sistema cardiovascular, las acciones periféricas se relacionan con una acción depresora por inhibir principalmente la liberación de catecolaminas. Sin embargo existe información insuficiente en la literatura acerca de los efectos directos del quinpirol sobre los vasos sanguíneos, por lo que el propósito del presente trabajo fue aportar información para determinar las acciones directas del quinpirol en vasos sanguíneos. Con este fin se emplearon anillos aórticos de rata con y sin endotelio y se construyeron curvas concentración respuesta de relajación al quinpirol en anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M), en ausencia o presencia de raclopride (antagonista D_2), L-NAME (inhibidor de la sintasa de NO), yohimbina (antagonista α_2). También, el efecto del quinpirol se valoró en anillos con endotelio precontraídos con 5-HT en ausencia o presencia de ARC239 (antagonista de los receptores α_{2B}) y BRL44408 (antagonista de los receptores α_{2A}). En otra serie experimental, se evaluó la capacidad del quinpirol de proteger el efecto contráctil de la fenilefrina del bloqueo irreversible de la fenoxibenzamina. Por último, se valoró la producción de NO, inducido por el quinpirol, a través de la cuantificación de nitritos (NO_2^-), tanto en ausencia como en la presencia de los antagonistas anteriormente mencionados además de prazosina y L-NAME. Los resultados obtenidos indican que el quinpirol provocó una relajación dependiente de endotelio que no se bloqueó con raclopride, pero sí con yohimbina, ARC239, BRL44408 o L-NAME. Cabe hacer mención que la potencia para inhibir la relajación a quinpirol por el BRL44408 fue de 77.61 veces mayor con respecto al ARC239. En los experimentos de protección, el quinpirol fue incapaz de proteger la contracción con fenilefrina del bloqueo irreversible inducido por fenoxibenzamina. Finalmente, el quinpirol provocó un incremento en la producción de nitritos, la cual fue inhibida con L-NAME, yohimbina y BRL44408. Los resultados obtenidos indican que el quinpirol provocó un efecto vasodilatador dependiente del endotelio por estimular receptores adrenérgicos α_{2A} , los cuales están asociados a la formación y liberación de NO. En el mencionado efecto se descarta la participación de los receptores dopaminérgicos D_2 y adrenérgicos α_1 .

III. ABSTRACT

Quinpirole is a D₂ dopaminergic-receptor agonist which has central and peripheral actions. In the cardiovascular system, peripheral actions are mainly related with depressant effect due to inhibition of the catecholamine release. However, there is not enough information about direct effects of quinpirole in blood vessels, for these reason the aim of the present work was to contribute information to determine such effects. With this aim rat aortic rings with and without endothelium were used and concentration relaxant response curves were constructed by using quinpirole in the absence or in the presence of raclopride (antagonist D₂), prazosin (antagonist α_1), L-NAME (NO synthase inhibitor) or yohimbine (antagonist α_2). Moreover, the quinpirole effect was evaluated on aortic rings of rat with endothelium precontracted with 5-Hydroxytryptamine (10^{-5} M) in the absence or in the presence of ARC239 (antagonist α_{2B}) or BRL44408 (antagonist α_{2A}). In other experimental serie, the capacity of quinpirole to protect the phenylephrine contraction against irreversible blockade with phenoxybenzamine was examined. Finally, the production of NO by aortic rings with endothelium induced by quinpirole was evaluated through the determination of nitrites (NO₂⁻), in the absence or in the presence of antagonist mentionated above and prozosin or L-NAME. Results indicate that quinpirole causes an endothelium dependent vasodilatador effect that was not blocked with raclopride, but it was with yohimbine, ARC239, BRL44408 or L-NAME. Moreover, the relative potency of BRL44408 was 77.6 greater than ARC239. Quinpirole induced an increase in the nitrites concentration which was blocked with L-NAME, yohimbine and BRL44408. Furthermore, quinpirole caused an endothelium dependent vasodilatador effect by stimulate adrenergic α_{2A} receptors, which was associated to the formation and release of NO. In these effect dopaminergic D₂ and adrenergic α_1 receptors were not involved.

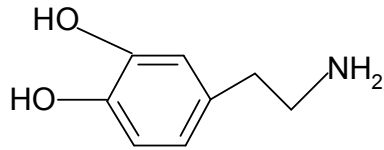
IV. INTRODUCCION DOPAMINA

Leon I. Goldberg cita que la Dopamina (DA) se sintetizó por primera vez en 1910 por Mannich y Jacobsohn, por un lado, y Barger y Ewins por el otro. Y se determinó que tiene efectos vasculares diferentes al de otras catecolaminas. Los primeros estudios en humanos usando dopamina se inician en la década de los 1960's y continúan hoy en día. (Missale et al., 1997; Gibbins & Morris, 2000)

La DA ([3,4 – dihidroxifeniletilamina]) es una amina simpaticomimética de acción mixta. Estructuralmente pertenece al grupo de las catecolaminas, pues está conformada por un grupo catecol y una cadena lateral de etilamina. Es el precursor metabólico inmediato de noradrenalina y adrenalina. Las porciones moleculares que le confieren sus efectos farmacológicos son los grupos hidroxilos del anillo aromático y el grupo amino (Lefkowitz et al., 1997)(Fig.1)

El grupo hidroxilo en posición meta del anillo aromático en relación con el sustituyente etilamina, le confiere propiedades parciales de acción directa sobre receptores adrenérgicos α y β , mientras que el grupo hidroxilo de la posición para, le confiere propiedades de acción indirecta sobre estos receptores adrenérgicos, de ahí que sea una catecolamina de acción mixta (Missale et al., 1997) (Fig.1).

Además, sus grupos hidroxilo y amino, le permiten interactuar y activar a receptores dopaminérgicos (Lefkowitz et al., 1997) (Fig.1).



3, 4 – dihidroxifeniletilamina PM= 153.18

Fig. 1. Estructura química de la dopamina

A). *Propiedades farmacológicas de la dopamina.*

A nivel clínico y farmacológico, se conoce que la infusión de DA (clorhidrato de dopamina) causa:

A dosis bajas (1.0-3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, IV; límite dopaminérgico) actúa a nivel del receptor dopaminérgico D_1 , el cual ha sido identificado postsinápticamente en las células del músculo liso vascular renal, coronario, pulmonar, cerebral, adrenal, mesentérico, cerebral, gástrico y el lecho arterial hepático. La estimulación de este receptor conduce a vasodilatación por estimulación de la adenililciclasa (AC) y aumento del AMPc. La activación de los receptores D_2 presinápticos, (que suprimen la liberación de NA por una inhibición de la actividad de la AC, un aumento de la conductancia del K^+ y una disminución de la entrada de Ca^{2+} , contribuye también a la aparición de un efecto vasodilatador. El efecto clínico más significativo de la actividad de estos receptores dopaminérgicos es el aumento del filtrado glomerular, el aumento del volumen sanguíneo y de la excreción de sodio (Jerome & O'Hara, 2000; Hussain et al, 1998).

A dosis intermedias (3-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, IV; límite dopaminérgico y adrenérgico β) estimula a los receptores adrenérgicos β_1 en el corazón, provocando un efecto inotrópico y cronotrópico positivo (éste último se presenta con un aumento inicial seguido de una

disminución, conforme la velocidad de infusión continúa). Estos efectos son provocados debido a la estimulación de la AC y aumento del AMPc. El efecto clínico más significativo de este efecto de la DA es el aumento del gasto cardíaco, sin producir elevaciones considerables de la frecuencia o de la resistencia periférica. También aumenta la perfusión renal por la estimulación cardíaca que ejerce (Jerome & O'Hara, 2000; Hussain et al, 1998).

A dosis elevadas (5.0-20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; IV límite β y 20-50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, IV; límite α) estimula a los receptores adrenérgicos α_1 , provocando vasoconstricción por formación de 1',4'-5'-trifosfato de inositol (IP_3), de diacilglicerol (DAG) y aumento en el Ca^{2+} intracelular. Estos efectos dan origen a un aumento de la presión capilar pulmonar, aparición de vasoconstricción renal y aumento de las resistencias vasculares sistémicas (Jerome & O'Hara, 2000; Hussain et al, 1998)

La DA es un medicamento de amplio uso en la clínica por su efecto dual a nivel periférico, como por ejemplo, actúa como modulador de la función cardiovascular, de la liberación de las catecolaminas, del tono vascular, de la función renal, además de la secreción hormonal y de la motilidad gastrointestinal. Por ello, ha sido empleada para el tratamiento de afecciones como: en diversos tipos de choque (cardiogénico, hipovolémico, séptico, traumático y postquirúrgico), en la insuficiencia renal aguda, en la insuficiencia cardíaca congestiva, en la hipotensión; ya que su efecto estriba, en general, en aumentar el gasto cardíaco sin alterar considerablemente la frecuencia o las resistencias periféricas y mejorando el flujo sanguíneo del riñón, con lo cual se eleva la formación de orina y la eliminación de sodio (Missale et al., 1997).

B). *Farmacocinética de la dopamina.*

La DA usualmente alcanza sus concentraciones plasmáticas aproximadamente en 5 a 30 minutos después de su infusión. Aproximadamente el 25% de la infusión de la dopamina es convertido a noradrenalina. El metabolismo irreversible de la DA toma lugar en el hígado, riñón, y endotelio pulmonar por la COMT. Después de la administración intravenosa, la DA es rápidamente conjugada con sulfatos y con ácido glucurónico, de tal forma que la catecolamina se elimina con una vida media de 1 a 2 minutos (Standaert & Young, 1997).

V. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.

En 1978 aparece la primera evidencia farmacológica y bioquímica de la existencia de los receptores dopaminérgicos. En estos estudios se muestra la existencia de dos poblaciones discretas de receptores: una positivamente acoplada a la adenilil ciclasa (AC) y la otra independiente de la AC (Spano et al., 1978). En 1979, Kebabian y Calne resumieron estas observaciones y sugirieron llamar D₁ al receptor asociado con la actividad de la AC, y D₂ como al receptor no asociado con la actividad de la AC (Missale et al., 1997).

Pero, con la aplicación de las técnicas de clonación molecular al estudio de los receptores dopaminérgicos desde finales de los 80's, hasta fechas más recientes se ha determinado la presencia de más subtipos de receptores, pudiéndose caracterizar mejor. Así, en 1989, Dan Toso et al., (1989) y Giros et al., (1989) dan a conocer dos formas de receptores D₂: D₂ largo (D_{2L}) y D₂ corto (D_{2S}), según la longitud de una de sus asas intracelulares de su cadena de aminoácidos. En 1990, se clonó un nuevo tipo de receptor dopaminérgico, denominado D₃ al cual, dado que es más semejante al D₂, también se ha propuesto llamar

D_{2B} (Strange, 2002). Y más recientemente, se han descrito los D₄ (similares a los D₂ y D₃) y los D₅ (parecido al D₁) (Missale et al., 1997).

En la actualidad se acepta que los receptores dopaminérgicos sean divididos en dos familias (D₁ y D₂), agrupándose por similitudes estructurales, farmacológicas, bioquímicas y fisiológicas (Missale et al., 1997).

Familia D₁. En mamíferos, los receptores pertenecientes a esta familia son D₁ y D₅, los cuales son conocidos como D_{1A} y D_{1B} en roedores, respectivamente. Estos receptores están vinculados con la estimulación de AC y aumento de AMPc, vía acoplamiento a una proteína Gs (Missale et al., 1997).

Familia D₂. Tres receptores pertenecen a esta familia y son el D₂, D₃ y D₄. Estos están vinculados con la inhibición de la AC y disminución de AMPc vía acoplamiento de proteínas Gi/Go, e inhibición de los canales de Ca²⁺. Todos los receptores de esta familia han mostrado estimular los canales de K⁺ (Missale et al., 1997).

Análisis de la estructura primaria de los receptores dopaminérgicos clonados revelaron que estos son miembros de las proteínas acopladas a un sistema de transducción intracelular que involucra a las proteínas G (Missale et al., 1997).

Estos receptores son proteínas integrales y constan de siete dominios, los cuales están plegados en las 7 α -hélices, por lo que también se les denomina como una familia de receptores serpentinos (Missale et al., 1997).

Esta familia de receptores, estructuralmente presenta 3 regiones: 1) la región extracelular, que posee al grupo amino terminal de la cadena polipeptídica, y está glucosilada; 2) la

región intracelular, quien posee al grupo carboxilo terminal y tiene aminoácidos que pueden ser fosforilados; y, 3) la región central, quien expande a la doble capa de la membrana, conformando el centro hidrófobo del receptor, las localizaciones de unión con los ligandos se encuentran en éste núcleo hidrófobo (Missale et al.,1997).

Las regiones que conectan a cada una de las α -hélices se denominan “asas”, existiendo asas intracelulares y asas extracelulares. Datos bioquímicos indican que la proteína G interactúa con aminoácidos en la tercera asa citoplasmática (Jacobson & Westlind, 1994). Las colas carboxilo terminal pueden regular la capacidad de los receptores para interactuar con la proteína G (Missale et al., 1997).

Todos los subtipos de receptores dopaminérgicos se asemejan entre sí en cuanto a secuencia de aminoácidos y localizaciones de sus regiones transmembranales (TM) hidrofóbicas por lo que, su punto de diferenciación, son las asas hidrofílicas extracelulares e intracelulares y los extremos amino y carboxilo terminal. (Missale et al., 1997; O’Dowd , 1993).

Los dominios TM son el sitio de unión del receptor con la molécula de DA (Missale et al., 1997; O’Dowd, 1993).

La porción amino (NH_2) terminal es común en todos los receptores dopaminérgicos en cuanto a número de aminoácidos, pero existen diferencias en cuanto al número de sitios para N-glucosilación. Por su parte, el grupo carboxilo terminal también presenta diferencias entre los diversos subtipos de receptores dopaminérgicos. (Missale et al., 1997).

La porción carboxilo terminal es alrededor de siete veces más larga para los receptores tipo D₁ que para los receptores tipo D₂. En los receptores D₁, cerca del comienzo del carboxilo terminal se localiza el residuo de cisteína. Mientras que, en los receptores D₂, el carboxilo terminal finaliza con este residuo de cisteína. Como en todos los receptores acoplados a proteína G, los receptores a DA poseen dos residuos de cisteína en el asa extracelular, los cuales forman un puente disulfuro intracelular para estabilizar la estructura del receptor (Missale et al., 1997; O'Dowd, 1993).

En relación con las asas intracelulares. Las asas 1 y 2 son similares en cuanto a longitud, en las dos familias de receptores dopaminérgicos pero, la asa 3 no es de la misma longitud en las dos familias (corta para la familia D₁ y larga para la familia D₂), por lo que marca la diferencia entre las dos familias; de hecho, es el parámetro para clasificar los subtipos de receptores dopaminérgicos, junto con la diferencia de longitud que también muestra el extremo carboxilo terminal entre las dos familias (7 veces más largo para la familia D₁) (Missale et al., 1997; Strange, 2002). Esta característica de longitud en el asa intracelular 3 puede reflejar la interacción selectiva de cada subtipo de receptor con un miembro de la extensa familia de proteínas G, conduciendo a distintas señales intracelulares (Missale et al., 1997; Strange, 2002).

1. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.

Con los fármacos hasta ahora disponibles, se ha llegado a definir algunas propiedades farmacológicas de los distintos receptores dopaminérgicos. En este sentido, se ha determinado que aunque los perfiles farmacológicos de los receptores de la familia D₁ y D₂ son sustancialmente diferentes, la principal diferencia farmacológica descrita hasta ahora

dentro de cada subfamilia de receptor está solamente representada por un cambio variable sobre la afinidad de ciertos agonistas y antagonistas (Velasco & Luchsinger, 1998).

En este sentido, Missale et al. (1997), mencionan que no ha sido posible diferenciar farmacológicamente a los receptores D₁ y D₅. La afinidad de los agonistas a los receptores D₁ y D₅, es casi idéntica. La diferencia más consistente está representada por la propia DA, quien tiene 10 veces más afinidad por el D₅ que por el D₁ (Missale et al., 1997).

El análisis del perfil farmacológico de la familia D₂, muestra que no hay compuestos que discriminen entre la variante larga (D_{2L}) y corta (D_{2S}) del receptor D₂ (Missale et al., 1997).

El perfil farmacológico del receptor D₃ revela que algunos agonistas y antagonistas pueden distinguirlo del receptor D₂; la propia DA muestra 20 veces más afinidad por el receptor D₃ que por el D₂. Entre los agonistas, el quinpirol y el 7-OH-DPAT son los compuestos más discriminantes para el receptor D₃, ya que presentan afinidad 100 y 10 veces más alta, respectivamente para el receptor D₂. Por su parte, los antagonistas Haloperidol y Espiperona, muestran de 10 a 20 veces más afinidad por el D₂ que por el D₃, lo que nos permite discriminar entre uno y otro receptor (Missale et al., 1997).

En cuanto al perfil farmacológico del receptor D₄, este muestra semejanzas muy estrechas con los receptores D₂ y D₃; sin embargo, la característica distintiva más importante del D₄ es su alta afinidad por el antagonista clozapina de acuerdo con lo establecido por Van Tol et al. (1991). Mientras que, Raclopride, Remoxipride y Clorpromazina, exhiben 10 a 20 veces menos afinidad por el D₄ que por el D₂ y D₃ (Missale et al., 1997).

A). Receptores dopaminérgicos periféricos.

La clasificación inicial de los receptores dopaminérgicos se realizó en el SNC, pero pronto se hizo evidente la presencia de estos en la periferia (Goldberg et al, 1978). Hasta ese momento, no se había estudiado si estos efectos duales de la DA también se manifestaban en el hombre. No fue sino hasta que McDonald et al., en 1964, aplicaron una infusión intravenosa de DA en sujetos sanos del género masculino, observándose una marcada reducción de la resistencia vascular a nivel renal. Este hecho provocó que la investigación de la DA a nivel periférico ahora se enfocara en la arteria renal de los animales. De esta forma, se tiene registrado en el estudio de McNay et al. (1965), que la inyección de DA en la arteria renal de los perros anestesiados también causa vasodilatación a dosis bajas, y vasoconstricción a dosis elevadas, y el pretratamiento con fenoxibenzamina, un agente α -bloqueante, suprime solo la vasoconstricción. En forma similar, en el perro anestesiado pretratado con fenoxibenzamina Goldberg et al. (1972), observaron que la inyección de DA en la arteria renal y mesentérica produce una vasodilatación, y mostraron que, bajo estas condiciones, el efecto no es antagonizado por propanolol (antagonista β -adrenérgico), atropina (bloqueador muscarínico) o antagonistas de la histamina pero, sí es selectivamente atenuado por haloperidol, fenotiacinas y bulbocapnina, es decir, por neurolepticos, sustancias con probada acción de antagonistas de los receptores dopaminérgicos centrales. Este hallazgo obviamente reforzó la hipótesis de la existencia de receptores dopaminérgicos específicos en lechos vasculares (Goldberg et al., 1972).

A finales de los años 70's se demostró la existencia de receptores dopaminérgicos periféricos específicos, a través de pruebas funcionales como la medición del flujo sanguíneo renal y la aceleración cardíaca, proponiéndose dos subtipos, los cuales se

mencionó que eran diferentes a los receptores dopaminérgicos del SNC (Missale et al., 1997).

Posteriormente, Goldberg et al. (1985), clasificaron a los receptores dopaminérgicos periféricos en D_{A1} y D_{A2} . Esta clasificación era similar al esquema de clasificación de los receptores dopaminérgicos del SNC, debido a que los D_{A1} comparten propiedades farmacológicas comunes a la familia D_1 , y los D_{A2} a la familia D_2 . Estudios subsecuentes tanto bioquímicos y de biología molecular en tejidos periféricos, demostraron similitudes entre los receptores dopaminérgicos periféricos con los centrales, por lo que la clasificación D_{A1} y D_{A2} fue eliminada (Missale et al., 1997).

Después del hallazgo de estos 2 subtipos de receptores a nivel periférico, las investigaciones para hallar más subtipos y su caracterización tomó auge, para dar como resultado que todos los receptores dopaminérgicos, en mamíferos, inicialmente clonados del cerebro, se encontraban expresados en sitios periféricos como la glándula adrenal, vasos sanguíneos, cuerpo carotídeo, riñón, tracto urinario, corazón, intestinos, y glándula parótida (Missale et al., 1997).

Sin embargo, a pesar de la existencia de los diferentes receptores de la familia D_1 y D_2 , a nivel periférico, estos no han sido investigados sistemáticamente. Así pues, poco se sabe del papel funcional de los receptores dopaminérgicos en vasos sanguíneos, en terminales nerviosas simpáticas postganglionares y en la corteza adrenal. Esta situación se ve limitada por la cantidad tan pobre de agentes con propiedades dopaminérgicas y además los existentes son herramientas imperfectas ya que además poseen otras acciones (Missale et al., 1997).

Para fines del presente trabajo sólo se describirán a los receptores periféricos localizados en los vasos sanguíneos.

B). *Receptores dopaminérgicos en vasos sanguíneos.*

La presencia de los receptores dopaminérgicos específicos en vasos sanguíneos se postuló en base en experimentos hechos en perros anestesiados (Goldberg et al, 1972, 1978). Estos estudios han demostrado que además de producir una vasoconstricción mediada por la activación de los receptores adrenérgicos α , la dopamina también reduce la presión sanguínea en forma dosis dependiente, y los antagonistas β no bloquean dicho efecto (Eble, 1964; Goldberg et al., 1963 y Horwitz et al., 1960), pero sí, los antagonistas con propiedades dopaminérgicas. En estudios posteriores, en que la respuesta vasodilatadora a la dopamina se analizó en el lecho renal y mesentérico del perro anestesiado, dicha respuesta fue dosis dependiente y se bloqueó con metoclopropamida, agente con propiedades dopaminérgicas, (Hahn & Wardell, 1980). Además, se demostró que el haloperidol (un antagonista dopaminérgico), en una dosis que no afecta adrenoceptores α ó β , reduce significativamente la acción vasodilatadora de la dopamina en lecho renal y mesentérico del perro (Yeh et al., 1969). Estos resultados demuestran que los receptores dopaminérgicos estimulados por dopamina inducen vasodilatación en esos lechos vasculares. Posteriormente, se evidenció la existencia de los receptores dopaminérgicos en otros lechos vasculares como el coronario, cerebral, hepático y femoral (Lokhandwala & Barreto, 1982).

En un intento por discernir el tipo de receptores involucrados en la respuesta inducida por la dopamina se determinó la contractilidad cardíaca, la presión arterial el flujo sanguíneo

renal y femoral en el perro anestesiado. En estos estudios y con el empleo de distintos agonistas y antagonistas dopaminérgicos se demostró que la vasodilatación en el lecho renal era consecuencia de la estimulación de los receptores D₁. Y que la disminución del tono femoral y de la contractilidad cardíaca resultaba de la inhibición de la liberación de catecolaminas por la acción de la dopamina sobre receptores del tipo D₂ presinápticos. (Segawa et al., 1998).

En los estudios de Brodde (1982), se demuestra el efecto relajante inducido por la dopamina y algunos dopamiméticos, empleando modelos invitro (vasos mesentéricos y renales perfundidos del perro y rata respectivamente; así como, anillos de arteria renal, mesentérica, esplácnica, coronaria y cerebral del conejo). Este modelo, según Brodde, (1982), proporciona la ventaja de poder realizar una cuantificación más precisa de los efectos de los agonistas y antagonistas, lo que conduce a una mejor caracterización de los receptores involucrados en dichos efectos. En estos modelos estudiados se encontró el siguiente orden de potencia (presentando una relación estructura actividad para la activación del receptor dopaminérgico) de los distintos agonistas empleados: 7-DTN mayor que el N,N-di-n-propil-dopamina (agonista parcial) mayor que apomorfina (agonista parcial). Los antagonistas empleados fueron: (+)-butaclamol, metoclopramida y droperidol encontrando que ambos presentan un antagonismo competitivo sobre el efecto relajante inducido por la dopamina, mostrando de esta manera la existencia de receptores dopaminérgicos postsinápticos que median un efecto vasorrelajante en algunos lechos vasculares.

Estudios subsecuentes usando radioligandos y estudios autorradiográficos o mediciones de la actividad de la adenilil ciclasa (AC) confirman y amplian los resultados de los estudios

fisiológicos. De esta forma, los receptores D₁ que se asocian con la estimulación de AC han sido identificados en la arteria renal, mesentérica, y esplénica, y se encuentran concentrados en la capa media y son insensibles a la simpatectomía química. Los receptores D₂ están localizados en la adventicia así como también en el borde entre la adventicia y la media, y la capa íntima, en las arterias renal, mesentérica y esplénica, estos receptores están asociados con una inhibición de AC. La simpatectomía química reduce la densidad de los receptores D₂ localizados en la adventicia y el borde entre la adventicia y la media pero, no en la íntima, sugiriendo la presencia de receptores dopaminérgicos presinápticos y postsinápticos en estos vasos sanguíneos. El papel funcional de los receptores D₂ postsinápticos aún no ha sido totalmente esclarecido (Strange, 2002).

Los estudios mencionados anteriormente muestran que los receptores dopaminérgicos periféricos no se concentran sólo en una región, sino que se encuentran distribuidos; esto puede significar que la dopamina en la periferia, pudiera ejercer efectos más extensos y complejos de lo que hasta ahora se ha determinado. De hecho, la localización presináptica de los receptores dopaminérgicos, especialmente de los subtipos D₂ y D₃, sugiere que podrían participar, primordialmente, en la regulación de la liberación de NA en las terminales nerviosas. Pero su localización postsináptica también sugiere una acción directa sobre los receptores dopaminérgicos (Missale et al., 1997).

Sin embargo, las herramientas farmacológicas específicas necesarias para lograr avances en la caracterización y estudio de los receptores dopaminérgicos vasculares han sido escasas. En este sentido, por ejemplo, el fenoldopam es un agonista selectivo para la familia D₁ ampliamente empleado en la investigación; pero el SKF- 38393, es otro agonista D₁ que muestra una mayor selectividad y no ha sido empleado suficientemente en estas

investigaciones. Además, en forma general, no se ha logrado definir el papel funcional de los receptores vasculares, tanto de aquellos en músculo liso como de aquellos en el endotelio, en los efectos de los fármacos dopaminérgicos (Missale et al, 1997; Strange, 2002). Tal es el caso del quinpirol, un agonista D₂. Debido a que el quinpirol es el tema de nuestro estudio profundizaremos más adelante en los efectos de esta sustancia sobre el aparato cardiovascular.

2. AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

La dopamina produce diversos efectos sobre el sistema cardiovascular como consecuencia de la interacción con receptores dopaminérgicos y adrenérgicos (Goldberg, 1978). Estudios de Arbilla & Langer (1981) y de Hahn (1980), mostraron que en el núcleo caudado del conejo la liberación del neurotransmisor por estimulación de receptores dopaminérgicos es inhibida por sulpiride (antagonista de receptores D₂) mientras que la metoclopramida inhibió el efecto de la dopamina en la vasculatura renal (vasodilatación) de perros con pretratamiento con fenoxibenzamina, concluyendo que la dopamina estimula receptores tanto presinápticos (neuronal) como postsinápticos (vascular) que median la inhibición neurogénica de norepinefrina y la dilatación de la vasculatura renal, respectivamente.

El Lergotril y el pergolido son derivados ergolínicos, los cuales tienen actividad agonista de los receptores dopaminérgicos, lo cual está fundamentado en la idea de que la porción pirrol-etilamina rígida es la que le confiere la actividad dopaminérgica de esos derivados (Hahn et al, 1983 & Titus et al, 1983).

Como parte del esfuerzo en el desarrollo de agonistas dopaminérgicos como antihipertensivos potentes, se desarrollaron análogos del lergotril y pergolido como el

LY141865 {trans-(±)-4,4^a, 5, 6,7, 8, 8^a, 9-octahidro-5-propyl-2H-pyrazol<3,4-g> quinolina, dihidroclorato}, el cual se demostró posteriormente que posee propiedad agonista sobre los receptores dopaminérgicos (Hahn et al, 1983).

En los estudios de Hahn, 1983, se describen los efectos cardiovasculares del LY141865 en ratas espontáneamente hipertensas tanto anestezias como conscientes y en perros anestezias normotensos. En el estudio se demuestra que el LY141865 produce hipotensión en cada especie, acompañada de bradicardia o ningún cambio en la frecuencia cardiaca. Los efectos hipotensivos y bradicardicos del LY141865 en ratas espontáneamente hipertensas son prevenidos por simpatectomía quirúrgica o farmacológica y por antagonistas de los receptores de dopamina. Estos datos demuestran que los efectos cardiovasculares del LY141865 son mediados, al menos en parte, periféricamente. Además, se evidencia que dichos efectos son mediados por la estimulación de receptores dopaminérgicos del tipo D₂, los cuales se demostró están asociados a un fenómeno de retroalimentación negativa que median la inhibición de la liberación del neurotransmisor de las fibras nerviosas simpáticas periféricas (Hahn et al, 1983).

El quinpirol conocido como LY171555 {trans-(-)-4aR-4, 4^a, 5, 6, 7, 8, 8^a, 9-octahidro, 5-propil-2H-pyrazol <3, 4-g> quinolina, monohidroclorato} es el levo-isómero de LY141865, y presenta una alta selectividad para los receptores D₂ y se ha demostrado en distintos ensayos que la actividad sobre los receptores dopaminérgicos de la mezcla racémica del quinpriol radica exclusivamente en la forma levo (Fig. 2) (Hahn et al, 1983).

Tabla. 1. Agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos.

	Familia D ₁		Familia D ₂		
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Aminoácidos	446(h,r)	477(h) 475(r)	414/443(h) 415/444(r)	400(h) 446(r)	387(h)
Características Farmacológicas (Kd nM)	SCH 23390 (0.35) Dopamina (2340) SKF 38393 (0922)	SCH 23390 (0.30) Dopamina (228)	Spiperone (0.05) Raclopride (1.8) Clozapina (56) Dopamina (1705) Quinpirole (1061)	Spiperone (0.61) Raclopride (3.5) Clozapina (180) Dopamina (27)	Spiperone (0.05) Raclopride (237) Clozapine (9) Dopamine (450)
Localización	Caudado/putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, hipotálamo, corteza frontal	Hipocampo, tálamo, núcleo mamilar lateral, estriado, corteza cerebral	Caudado/putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza cerebral	Núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza cerebral	Corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, retina.
Respuesta Bioquímica	Aumentan la Adenilil ciclasa		Disminuyen la Adenilil ciclasa ⁻		

A). Acciones cardiovasculares del quinpirol.

En los estudios de Hahn (1983), se evaluaron los efectos cardiovasculares de agonistas de los receptores dopaminérgicos, tales como: N, N-di-n-propyldopamine (DPDA) (1-100 g/Kg i.v.) y del LY171555 (1-100µg/Kg i.v.), en el mono rhesus adulto (*Macaca mulatta*), anestesiado con pentobarbital sódico. Los datos obtenidos en estos experimentos indican que con ambas drogas se produce hipotensión arterial en una forma dependiente de la dosis, efecto acompañado de bradicardia y que el pretratamiento con sulpiride (0.5mg/Kg i.v.) antagonizó ambos efectos. El tratamiento con sulpiride no modificó los valores basales

de presión arterial y frecuencia cardíaca. Por otro lado, la infusión intravenosa de 20 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de DPDA, provocaron una disminución de la presión arterial media con efectos relativamente pequeños sobre la frecuencia cardíaca. (Hahn et al, 1983). Estos datos ponen de manifiesto que el LY171555 produce hipotensión por acciones sobre los receptores dopaminérgicos.

Por otro lado, en el modelo de mono rhesus anestesiado en el que se estimula eléctricamente el ganglio estrellado con el objeto de provocar liberación de catecolaminas y estimulación cardíaca, la administración intravenosa de LY171555 (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) provocó disminución de la frecuencia cardíaca, efecto inhibido con sulpiride (0.5 mg/Kg i.v.) (Hahn et al, 1983). En el mismo modelo no estimulado eléctricamente se encontró que el LY171555 no modificaba el incremento de presión arterial y frecuencia cardíaca inducidas por noradrenalina administrada exógenamente. Estos resultados indican que el LY171555 reduce tanto la presión como la frecuencia por un mecanismo que involucra a los receptores dopaminérgicos D₂, los cuales están asociados a un fenómeno de inhibición de la liberación de catecolaminas y que los mencionados efectos no se relacionan con acciones directas sobre receptores adrenérgicos postsinápticos. (Hahn et al, 1983).

En resumen, los estudios de Hahn (1983) y otros como los de Titus et al. (1983) demuestran que el LY171555 produce respuestas cardiovasculares en el primate caracterizadas por hipotensión, bradicardia y reducción del trabajo miocárdico. Efectos que se producen como consecuencia de la estimulación de receptores dopaminérgicos D₂. Como consecuencia de la estimulación se inhibe la liberación neurogénica de norepinefrina y la influencia tónica del sistema nervioso simpático sobre la vasculatura y el miocardio.

Por otro lado, Horn y Kohli (1991), empleando perros adultos machos anestesiados con pentobarbital sódico, evaluaron el flujo sanguíneo en la arteria renal tras la administración de distintos fármacos dopaminérgicos administrados directamente en la arteria renal. En este modelo se observó que el LY171555 provocó un incremento del flujo sanguíneo renal, que no se modificó en presencia de antagonistas de los receptores adrenérgicos α ó β o de los dopaminérgicos del tipo D_2 , pero si por antagonistas de los receptores histaminérgicos H_1 y H_2 . Estos resultados demuestran que en la arteria renal el LY171555 provoca vasodilatación por un mecanismo que no involucra a los receptores dopaminérgicos o adrenérgicos. Y ponen de manifiesto un componente histaminérgico en las acciones vasculares del LY171555.

Adicionalmente, el LY171555 puede conducir a un efecto vasodilatador por un mecanismo que involucra a los receptores adrenérgicos α_2 . Evidencias de la capacidad del LY171555 de estimular receptores adrenérgicos α_2 destacan las siguientes. En vasos deferentes de rata, estimulados eléctricamente para producir contracción por liberación del neurotransmisor adrenérgico; el LY171555 (10^{-7} – 10^{-4} M) redujo la respuesta contráctil, efecto inhibido totalmente con el pretratamiento con yohimbina (antagonista de los receptores adrenérgicos α_2); el sulpiride, provocó una inhibición parcial significativa de dicho efecto. Sin embargo, en el mismo estudio se demuestra que el antagonista dopaminérgico posee una modesta actividad antiadrenérgica. En resumen y además de sus propiedades dopaminérgicas, el LY171555 puede activar tanto a los receptores adrenérgicos α_2 como histaminérgicos. La potencia dopaminérgica de este agonista se ha reportado de aproximadamente 2,250 con respecto a su actividad adrenérgica e histaminérgica. (Cohen et al., 1984).

El efecto de otros agonistas dopaminérgicos sobre los receptores adrenérgicos α también se ha demostrado. Específicamente, en arterias cerebrales aisladas de perro, la DA predominantemente actúa sobre los receptores adrenérgicos α_2 y, en el lecho mesentérico, la DA ejerce su efecto por estimular tanto receptores adrenérgicos α_1 y α_2 . Sin embargo, existen diferencias de las acciones de DA en la arteria y vena mesentérica, mientras que en la primera la DA estimula ambos tipos de receptores, en la segunda sus efectos son explicados por la estimulación de los α_2 . La diferencia en la respuesta vasoconstrictora inducida por la DA puede ser explicada por diferencia de especies, la porción del vaso empleada en los experimentos y la distribución de los receptores adrenérgicos α en arterias y venas (Jerome & O'Hara, 2000; Hussain et al, 1998)

A pesar de la información anterior, existe información insuficiente acerca de las acciones periféricas del quinpirol en los vasos sanguíneos. En particular, no está claro cuáles son sus efectos y si estos son modulados por el endotelio vascular, así como los mecanismos que conducen a tales efectos.

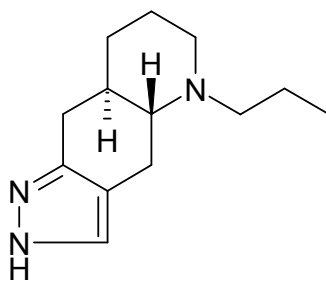


Fig. 2. Estructura química del LY17155 (Quinpirol)

Debido a las propiedades antes mencionadas del LY17155, y con la finalidad de complementar el marco teórico para la discusión de los resultados obtenidos se abordará a

continuación aspectos relacionados con los receptores adrenérgicos α_2 , el NO y el endotelio vascular.

3. RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_2

Los receptores adrenérgicos están localizados en la membrana de los tejidos del cuerpo ya sea nervioso o no nervioso, de esta manera les da la posibilidad de modular la respuesta a las catecolaminas endógenas (adrenalina y noradrenalina). La clasificación de los receptores adrenérgicos comenzó en 1948 cuando Ahlquist propone la existencia de dos tipos, los α y los β , basándose en la observación de que las aminas adrenérgicas podían provocar efectos excitatorios e inhibitorios y que variaban en su potencia para producir ambas clases de efectos. Esta clasificación pronto fue apoyada por el desarrollo de antagonistas potentes que mostraron una alta selectividad por alguno de los tipos de receptores. (Robinson et al., 1998; Guimaraes & Moura, 2001; Lomanesney, 1991).

En la década de los 70, Langer señaló la existencia de dos subtipos de receptores adrenérgicos α : α_1 y α_2 . Los α_1 eran estimulados selectivamente por la fenilefrina y bloqueados por la prazosina, mientras que los α_2 se estimulaban con clonidina y bloqueaban con yohimbina. (Bylund, 1992; Robinson et al, 1998). Estudios subsecuentes, empleando técnicas farmacológicas de unión a radioligandos y de biología molecular han permitido identificar tres subtipos de cada grupo. En el caso de los α_1 : α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} ; y para los α_2 : α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} (Robinson et al., 1998; Guimaraes & Moura, 2001).

Debido a que la respuesta de la estimulación simpática en los vasos sanguíneos esta dada fundamentalmente por los receptores adrenérgicos α y que para los fines de discusión de

los resultados obtenidos en el presente estudio se profundizará en lo referente a los receptores α_2 .

Se han clonado 4 subtipos de receptores adrenérgicos α_2 . El primero, llamado α_{2A} , se aisló de proteínas plaquetarias humanas, se le llama también α_2 -C10 por su localización en el cromosoma 10 de humano. El producto de este gen muestra alta afinidad por el agonista parcial oximetazolina y una baja afinidad por ARC 239 y por la prazosina (antagonista selectivo para los receptores α_1). El producto del gen para el receptor adrenérgico α_{2B} presenta alta afinidad para la prazosina y ACR 239 (Lomasney, 1991). Zeng et al. (1990), describieron, mediante clonación, un homólogo de este receptor en la rata. Por su localización en el cromosoma 2 de humano, también se le denomina α_2 -C2 (Lomasney, 1991). En relación a los dos subtipos restantes, α_{2C} (α_2 -C4) y α_{2D} exhiben un comportamiento farmacológico similar al de los receptores α_{2B} y α_{2A} , respectivamente (Lanier et al., 1991). Las principales diferencias entre los subtipos α_{2A} y α_{2D} se basan en la alta afinidad del segundo y la baja afinidad del primero por el SK&F 104078. Este compuesto se introdujo para diferenciar entre receptores adrenérgicos α_2 presinápticos (baja afinidad), de los postsinápticos (alta afinidad). De este modo, el subtipo α_{2D} puede ser un receptor adrenérgico que se expresa preferencialmente a nivel presináptico (Lanier et al., 1991).

Esta clara la existencia de cuatro subtipos de receptores adrenérgicos llamados α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} y α_{2D} ; sin embargo el α_{2D} es considerado ser el homólogo del subtipo α_{2A} encontrado en otras especies. Los subtipos de receptores adrenérgicos α_2 pueden ser farmacológicamente distinguidos unos de otros porque tienen afinidad variable para el

bloqueo con drogas específicas (Bylund, 1998). Por ejemplo, la afinidad de los subtipos de receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} a la rauwolscina es similar para estos subtipos; sin embargo, la afinidad de la rauwolscina por el receptor adrenérgico α_{2D} es aproximadamente 15 veces menor en comparación con la de los otros receptores adrenérgicos α_2 (Simonneaux et al., 1991). El WB-4101 (2-(2,6-dimetoxifenoxietil) aminometil-1,4-benzodiazano) también tiene una baja afinidad para el subtipo de receptor adrenérgico α_{2D} en comparación con los otros tres subtipos de receptores adrenérgicos α_2 (Bylund, 1992). Por lo tanto, rauwolscina y WB-4101 pueden emplearse para discriminar al subtipo de receptor adrenérgico α_{2D} de los otros tres subtipos.

Señales transmembranales. (Tabla 2.) Las respuestas a la estimulación de los receptores adrenérgicos, involucra la interacción de tres componentes separados: una proteína receptora, que une nucleótidos de guanina (proteína G), y un mecanismo efector (Robinson et al., 1998; Guimaraes & Moura, 2001).

Los receptores adrenérgicos α_2 se acoplan a la adenilil ciclasa o alternativamente a canales iónicos a través de la proteína Gi. De este modo estos receptores alteran la actividad celular por reducir los niveles de AMPc, modificando directamente el antiporte Na^+/H^+ o la actividad de los canales iónicos como los del Ca^{2+} , o los canales de K^+ (Robinson et al., 1998; Guimaraes & Moura, 2001).

Localización y función. (Tabla 2.) Los receptores adrenérgicos α_2 se encuentran en el sistema nervioso central y periférico, tanto presinápticamente, postsinápticamente así como extra-sinápticamente. En el sistema nerviosos central, estos receptores juegan un papel importante en la regulación de la actividad simpática periférica. La estimulación de los

receptores α_2 postsinápticos en el sistema nervioso central, reducen el flujo simpático a la periferia. Adicionalmente, existen receptores α_2 localizados en las terminales nerviosas simpáticas periféricas donde regulan la liberación de neurotransmisores, como noradrenalina, 5-HT, y ACh, entre otras. En los vasos sanguíneos, la estimulación de los receptores α_2 extrasinápticos localizados en el músculo liso produce contracción por un mecanismo distinto a los α_1 . En muchos vasos sanguíneos, la estimulación de los α_2 localizados en el endotelio vascular producen vasodilatación por un mecanismo que involucra la síntesis y liberación de NO. En el caso de la aorta de la rata, este último mecanismo parece estar ausente, debido a la incapacidad de distintos agonistas adrenérgicos α_2 para producir relajación de preparaciones aórticas precontraídas. Por otro lado, debido al papel de los receptores adrenérgicos α_2 en la regulación de la liberación, tanto de noradrenalina como de serotonina, ha traído como consecuencia el desarrollo de antagonistas α_2 , tales como el idazoxan, para el uso en el tratamiento de la depresión (Bylund, 1998; Guimaraes & Moura, 2001).

Dentro de otras funciones de los receptores adrenérgicos α_2 destacan la modulación central de las respuestas cardiovasculares. Evidencia de esto es la hipotensión y bradicardia inducida por los agonistas adrenérgicos α_2 tales como la clonidina. Dentro de los efectos centrales de los receptores adrenérgicos α_2 destacan: la regulación de la presión sanguínea, hipotermia, diámetro pupilar y, un papel en la función cognoscitiva. Las funciones periféricas incluyen contracción del músculo liso vascular e inhibición de la lipólisis a través de receptores adrenérgicos localizados en las células adiposas, entre otras funciones (Robinson et al., 1998; Guimaraes & Moura, 2001).

Tabla 2 Características farmacológicas de los receptores adrenérgicos α_2

Tipo de receptor	Receptor adrenérgico		
	α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}
Agonistas selectivos	Oximetazolina (agonista parcial) guanfacina	ninguno	ninguno
Agonistas no selectivos	UK 14 304 clonidina	UK 14 304, clonidina	UK 14 304, clonidina
Antagonistas selectivos	BRL 44408, BRL 48962	ARC 239, imiloxan	MK 912
Antagonistas no selectivo	Yohimbina	Yohimbina	Yohimbina
Mecanismo de transducción	Activa $G_{i/o}$ inhibe la adenilil ciclasa, disminuye AMPc, inhibe los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes. Activa los canales de Ca^{2+} dependientes de K^+		
Funciones fisiológicas	Hipotensión, sedación analgesia, inhibición de la liberación de neurotransmisores	vasoconstricción	No determinada

A). Receptores adrenérgicos α_2 endoteliales.

Se acepta ampliamente que el endotelio vascular juega un papel importante controlando la función del sistema cardiovascular. Por ejemplo, el endotelio controla el tono de los vasos sanguíneos gracias a su capacidad de sintetizar y liberar sustancias tanto de naturaleza vasocontráctil como vasorelajante. La síntesis y liberación de dichos factores depende de varios estímulos dependientes o no de la estimulación de distintos receptores. En este sentido se conoce que los receptores adrenérgicos α_2 juegan un papel en la fisiología de la vasculatura, como lo reportó Cocks y Angus (1983), quienes mostraron que en arterias

coronarias aisladas de cobayo y perro, la noradrenalina y la clonidina causaron relajación, la cual fue inhibida por antagonistas de los receptores adrenérgicos α_2 y eliminada por la remoción del endotelio. Pronto se hizo evidente que la activación de los receptores adrenérgicos α_2 en el endotelio de esos vasos, estimularon la liberación de NO, acción que tiende a atenuar la vasoconstricción producida por la activación de los receptores adrenérgicos α_1 vasculares postsinápticos (Angus et al., 1986; Vanhoutte and Miller, 1989; Vanhoutte, 2001; Richard et al., 1990). Además se ha sugerido que los receptores adrenérgicos α_2 endoteliales median la liberación del EDRF en microvasos coronarios (Angus et al., 1986). Así, los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 ciertamente tienen la capacidad de modular respuestas vasculares vía estimulación de la liberación de NO tanto en grandes vasos como en la microcirculación. Por otro lado, se ha reportado también que la noradrenalina induce liberación de NO, lo cual es más evidente en la hipertensión inducida por mineralocorticoides, indicando que los receptores adrenérgicos α_2 endoteliales pueden jugar un papel importante en la regulación del tono vascular, no solamente en condiciones fisiológicas sino también en condiciones patológicas (Guimaraes & Moura, 2001).

El primer estudio dirigido a la caracterización de los subtipos de receptores adrenérgicos α_2 presentes en el endotelio vascular fue en las arterias coronarias de cerdo y muestran que el endotelio de **estos** vasos poseen tanto receptores adrenérgicos $\alpha_{2A/D}$ y α_{2C} siendo éste último el más predominante (77% α_{2C} contra 23% $\alpha_{2A/D}$). Sin embargo a pesar de que el subtipo de receptor adrenérgico α_{2C} es el más predominante, el $\alpha_{2A/D}$ es el que media la relajación dependiente de endotelio (Bockman et al., 1993). Interesantemente, se demostró

que en la arteria mesentérica de la rata el receptor adrenérgico α_2 que esta acoplado a una relajación dependiente de endotelio y de NO, es el subtipo $\alpha_{2A/D}$ (Bockman et al., 1996). En los estudios de Bockman et al. (1996), se valoró la relajación provocada por UK14304 en la arteria mesentérica superior de rata en ausencia y presencia de forskolin, el cual estimula directamente la adenilil ciclasa causando formación de AMPc encontrando que el AMPc no está involucrado en el mecanismo de señalización que media la formación de NO por el receptor adrenérgico α_{2D} (Guimaraes & Moura, 2001).

4. ÓXIDO NÍTRICO

El NO es un gas de bajo peso molecular, incoloro e inodoro, soluble en agua con una vida media de 6-30 segundos, lo que contribuye a que su efecto se lleve a cabo básicamente a nivel local. La primera evidencia de un factor relajante derivado del endotelio fue la que presentó Furchgott & Zawadzki (1980), en el endotelio de la aorta de conejo, en donde observaron que la acetilcolina producía relajación en las preparaciones con el endotelio intacto, ellos dedujeron que la relajación era producida por un factor soluble que difundía a las células del músculo liso vascular. Posteriormente, Palmer et al. (1987), determinaron que el FRDE era NO (Moncada et al., 1997).

El NO se sintetiza por la acción de enzimas constitutivas e inducibles, llamadas sintasas de óxido nítrico (SON), que oxidan el nitrógeno guanidino de la L- arginina para formar citrulina y NO (Miranda. et al., 2000). En respuesta a diversos estímulos, el NO se libera de las células endoteliales, uniéndose a la guanilil ciclasa citosólica de las células musculares lisas, dando como resultado la activación de esta enzima y acumulación de GMPc intracelular. El mecanismo vasodilatador inducido por este nucleótido es poco claro, sin

embargo, se conoce que es mediado por una proteína cinasa dependiente de GMPc (proteína cinasa G), la cual se ha sugerido, que provoca reducción de la concentración de Ca^{2+} citosólico a través de varios mecanismos (Richard et al., 1999; Miranda. et al., 2000).

A). *Funciones del NO*

Además de tener un papel importante en el control local del tono vascular, el NO también inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria; así como, el crecimiento de las células del músculo liso. En otros sistemas, posee un papel importante en la neurotransmisión y en la respuesta inmune (Hodgson, 2002).

B). *Factores que afectan la síntesis o acción del NO*

Diversas condiciones fisiológicas o fisiopatológicas pueden asociarse a modificación en la síntesis o acción del NO. Entre las primeras podemos citar como ejemplo al embarazo, el ambiente hormonal y el envejecimiento. El embarazo se caracteriza porque se atenúan las respuestas a los agentes vasoconstrictores, fenómeno que probablemente se relaciona con un incremento en la producción de sustancias vasodilatadoras por el endotelio vascular, entre ellas el NO (Hodgson, 2002). En lo que se refiere al envejecimiento, se ha descrito que se presenta una menor respuesta a los agentes vasodilatadores con actividad dependiente del endotelio, debido a que la producción de factores relajantes por este tejido es menor y/o los factores contráctiles mayor (Ramírez R. et al, 2001). Entre las entidades patológicas que pueden afectar la función endotelial destacan la aterosclerosis, la diabetes y la hipertensión arterial. En el curso de todas ellas, el papel del endotelio en la mediación de respuestas vasodilatadoras disminuye ya que dichas entidades se relacionan con cambios tanto funcionales como morfológicas de la íntima de los vasos sanguíneos (Mattson & Celso, 1998; Uichi & Kazuyuki, 1997).

C). Inhibidores de la síntesis de NO

El NO se produce, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, a través de las SONs. Se conocen a la fecha tres isoformas de la enzima, la SON endotelial, la SON neural, ambas constitutivas; y la SON inducible de la cual se han descrito dos variedades, SON inducible A y SON inducible B. Se han caracterizado como hemoproteínas del tipo del citocromo P450, las cuales dependen de oxígeno molecular, NADPH, flavinas y tetrahidrobiopterina. Las formas constitutivas son dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, y las inducibles son independientes de éstos. Las tres isoformas identificadas a la fecha, se encuentran codificadas en los cromosomas humanos 7,12 y 17, respectivamente (Moncada et al., 1997). En el tejido vascular, la SON endotelial es la principal isoforma, la cual está involucrada en la regulación del tono vascular, en condiciones normales. La producción de NO por esta enzima es responsable de la relajación dependiente del endotelio del músculo liso y su inhibición se asocia con vasoconstricción y ascenso en la presión vascular. La activación de la SON endotelial ocurre cuando los niveles intracelulares de calcio se incrementan en respuesta a un agonista, en este sentido el A23187 (un ionóforo de Ca^{2+}) provoca estimulación de la enzima y vasodilatación dependiente del endotelio (Richard et al., 1999). Aunque también se ha descrito una liberación de NO por un mecanismo independiente de Ca^{2+} y dependiente de la activación de la tirosina cinasa endotelial. La tasa de producción de NO depende de la concentración de dos sustratos: la arginina y el oxígeno. Al conocer la vía sintética para la producción de NO, pronto se desarrollaron inhibidores de su síntesis, principalmente los análogos de la L- arginina. Ejemplos de estos análogos son la L-N γ -monometil arginina o el metil ester de la L- nitroarginina (L-NAME), los cuales compiten con el precursor natural (L-arginina) por el sitio catalítico de la enzima. La infusión continua por vía endovenosa de estos inhibidores, induce un incremento de

larga duración en la presión arterial. Esto sugiere que la liberación basal de NO por el endotelio contribuye a la regulación de las resistencias periféricas. Así, se ha demostrado, por ejemplo, que los ratones que carecen del gen para la isoforma de la SON endotelial muestran altos niveles de presión arterial (Moncada et al., 1997; Miranda. et al., 2000).

D). NO y receptores adrenérgicos α_2

Existe evidencia bibliográfica que respalda la idea de que varias sustancias provocan sus efectos ya sea a través de la estimulación de factores relajantes derivados del endotelio o modulando tales efectos por la liberación de tales factores. En este sentido, Bockman (1992) menciona que la norepinefrina estimula la formación de NO en la arteria mesentérica de ratas hipertensas. Además, se sabía que la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 causan formación y liberación de NO en las células endoteliales de varios lechos vasculares y varias especies (Vanhoutte, 2001). Tomando lo anterior en consideración el mismo grupo (Bockman et al., 1993) describen en el endotelio de la aorta torácica del cerdo la presencia de los receptores adrenérgicos α_{2A} y α_{2C} . La estimulación de dichos receptores condujo a una vasodilatación mediada por NO. Más tarde el mismo grupo (Bockman et al., 1996) describe en la arteria mesentérica de la rata al receptor adrenérgico α_{2D} , analizando la capacidad de distintos antagonistas de bloquear la respuesta vasodilatadora del UK14304.

Por otro lado; la clonidina, un agonista α_2 de acción central con un importante componente de agonista parcial sobre los receptores α_1 , reduce las resistencias periféricas por la disminución de la eferencia simpática neuronal y por reducción de la liberación de norepinefrina desde el neuroefector vascular sináptico. Sin embargo, estudios recientes han

demostrado que en la arteria mesentérica de rata Sprague Dawley la clonidina induce vasodilatación involucrando la participación de NO tras la estimulación de receptores α_2 endoteliales la cual se reduce al inhibir a la sintasa de NO (Figuroa, 2001). Estos estudios refuerzan la hipótesis de que los receptores adrenérgicos α_2 endoteliales pudieran estar involucrados en la acción antihipertensiva de la clonidina y de los análogos estructuralmente relacionados. Y que dichos efectos se encuentran acoplados a la síntesis y liberación de NO. En apoyo con esta idea, se ha demostrado en la arteria mesentérica superior de la rata el guanabenz, la guanfacina y la oximetazolina provocaron relajación, efecto relacionado con la liberación de NO endotelial y con un incremento en la producción de GMPc por las células musculares lisas, nucleótido involucrado en la vasodilatación mediada por NO por las células musculares lisas. Estos datos comprueban un papel del endotelio en la acción antihipertensiva de la clonidina (Figuroa, 2001).

VI. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares se han convertido en las primeras causas de morbimortalidad en nuestro país, por lo que el estudio de fármacos con efectos en el sistema cardiovascular es importante.

Se ha demostrado que los agonistas dopaminérgicos poseen acciones centrales importantes, sin embargo; se ha puesto poca atención sobre sus acciones periféricas.

A nivel periférico se ha demostrado que el quinpirol produce vasodilatación por acciones sobre receptores D_2 , histaminérgicos y adrenérgicos α_2 , además de reducción del trabajo miocárdico.

En particular en la aorta de rata se desconoce si el quinpirol es capaz de estimular además de los receptores dopaminérgicos a otros como los adrenérgicos α_2 .

VII. HIPÓTESIS

El efecto relajante del quinpirol en la aorta de la rata es consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 los cuales están asociados con la producción de NO.

VIII. OBJETIVOS

1. GENERAL

Caracterizar farmacológicamente a los receptores adrenérgicos α que median el efecto relajante del quinpirol en aorta de rata.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la dependencia de endotelio en el efecto relajante del quinpirol.
2. Determinar si el L-NAME inhibe la relajación inducida por el quinpirol.
3. Descartar la participación de los receptores α_1 en el efecto relajante del quinpirol.
4. Investigar si el raclopride (antagonista D_2), ARC239 (antagonista α_{2B}), yohimbina (antagonista α_2) y BRL44408 (antagonista α_{2A}), modifican la respuesta relajante de quinpirol.
5. Determinar si el quinpirol estimula la formación de NO y si esta es modificada por la presencia de raclopride, prazosina, ARC239, yohimbina, L-NAME y BRL44408.

IX. METODOLOGIA

1. ANIMALES:

Se emplearon ratas Wistar machos de 250g de peso, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN. Éstas tuvieron libre acceso a agua y alimento.

2. PREPARACIÓN DE LOS ANILLOS AÓRTICOS:

Previo anestesia con éter, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente se disecó la aorta torácica y se colocó en una caja de Petri que contenía solución de Krebs-Henseleit (de composición mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·2H₂O 1.2, CaCl₂·2H₂O 2.5, NaHCO₃ 25, dextrosa 11.7, la sal disódica cálcica del ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) 0.026, burbujeada con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% de CO₂. A las aortas se les eliminó el exceso de tejido conectivo y de grasa, y se cortaron en anillos de 3-4 mm de longitud. A un grupo de anillos se les removió mecánicamente el endotelio con la ayuda de un alambre de superficie rugosa, introduciendo este por la luz de cada uno de los anillos y frotándolos suavemente sobre papel filtro empapado con solución de Krebs-Henseleit.

Cada anillo se montó en cámaras para órgano aislado de 10 mL, las cuales se llenaron con solución de Krebs-Henseleit a 37 °C y burbujeada continuamente con 95% O₂ y 5% CO₂. Las preparaciones se fijaron a las cámaras con la ayuda de ganchos de nickrom, en forma de "L", uno de los ganchos se fijó a un tensor y el otro se fijó a un transductor de tensión TSD 105 que, acoplado a un amplificador MP100WSW para PC de Sistemas BIOPAC, permitió registrar en forma semiisométrica el desarrollo de tensión.

Bajo una tensión inicial de 4 g, se dejó estabilizar a los anillos por 2 h. Durante la primera hora se determinó su viabilidad al ser estimulados con fenilefrina (10^{-6} M), cada 15 minutos. Al término de esta prueba, se determinó la integridad endotelial administrando acetilcolina (ACh 10^{-6} M) a los anillos precontraídos con fenilefrina, considerándose como anillos con endotelio aquellos en los que la ACh provocó una relajación mayor del 50% de la contracción inducida por fenilefrina, y como anillos sin endotelio aquellos en los que la ACh no provocó una relajación.

Después del periodo de estabilización de 2 horas se procedió a la administración de los fármacos en estudio de acorde al protocolo experimental.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A). Papel del endotelio en el efecto relajante del quinpirol.

Con la finalidad de determinar la participación funcional del endotelio en la relajación provocada por quinpirol, se emplearon preparaciones aórticas con y sin endotelio. A las cuales se les administró fenilefrina (10^{-6} M) lo que provocó una respuesta contráctil en dichos anillos. Al llegar a la máxima respuesta contráctil se les administró diferentes concentraciones de quinpirol en forma acumulativa (10^{-7} M a 10^{-4} M).

B). Efecto del raclopride sobre la relajación inducida por quinpirol.

Con la finalidad de determinar la participación de los receptores dopaminérgicos en la respuesta vasodilatadora del quinpirol, se construyeron curvas concentración respuesta de relajación al quinpirol (10^{-7} M a 10^{-4} M), administrado en forma acumulativa sobre los anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M) en ausencia o

en presencia de raclopride (10^{-5} M), administrado 15 minutos previos a la administración de fenilefrina.

C). Evaluación de la participación de los receptores adrenérgicos α_1 en el efecto relajante inducido por el quinpirol.

Para descartar la participación de los receptores adrenérgicos α_1 , se utilizaron los anillos aórticos con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M; una vez alcanzada la máxima respuesta, las preparaciones se lavaron con la solución de Krebs y posteriormente los anillos se expusieron a quinpirol (10^{-4} M) o el vehículo del quinpirol y a los 15 minutos siguientes se administró fenoxibenzamina (10^{-7} M) o el vehículo de la fenoxibenzamina durante 15 minutos, para enseguida lavar varias veces con solución de Krebs y finalmente agregar fenilefrina (10^{-6} M).

D). Efecto de la yohimbina sobre la relajación inducida por quinpirol.

Se realizaron curvas concentración respuesta de relajación al quinpirol (10^{-7} M a 10^{-4} M) en las preparaciones aórticas con endotelio precontraídas con fenilefrina (10^{-6} M) en la ausencia o en la presencia de yohimbina (10^{-8} M), administrada 15 minutos previos a la administración de fenilefrina. Con la finalidad de descartar la participación de los receptores α_2 , en el efecto relajante del quinpirol.

E). Efecto del BRL44408 sobre la relajación inducida por el quinpirol.

Se emplearon anillos con endotelio precontraídos con 5-HT (10^{-5} M), llegaron a la máxima respuesta, se administró una concentración de quinpirol (10^{-4} M) en la ausencia o en la presencia de diferentes concentraciones del antagonista (10^{-9} a 10^{-8} M), administrado 15 minutos previos a la administración del agente contráctil, de tal forma que se obtuvieron

curvas de inhibición de la relajación inducida por el quinpirol. Con estos datos se calculó el valor $-\log CI_{50}$.

F). Efecto de ARC239 sobre la relajación inducida por quinpirol.

Se realizó el mismo protocolo anterior, pero en lugar de usar BRL44408 se empleó ARC239 (10^{-7} a 10^{-6} M) En este caso también se calculó el valor $-\log CI_{50}$.

G). Efecto del L-NAME sobre la relajación inducida por quinpirol.

Con la finalidad de descartar la participación del NO en el efecto relajante de quinpirol, se hicieron curvas concentración respuesta al quinpirol (10^{-7} M a 10^{-4} M), en anillos de aorta de rata con endotelio, precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M), en ausencia o en presencia de L-NAME a diferentes concentraciones (10^{-6} , 3.1×10^{-6} , 10^{-5} M), administrado 15 minutos previos a la administración de fenilefrina.

H). Determinación de la producción de NO inducida por el quinpirol a través de la cuantificación de nitritos (NO_2^-).

Toma de las muestras. Se colocó la aorta torácica, seccionada en pequeños anillos de aproximadamente 5mm de longitud en un tubo de ensaye con solución de Krebs (3mL) a una temperatura de $37^\circ C$ y con burbujeo continuo con 95% O_2 y 5% CO_2 . Siguiendo el protocolo experimental establecido, de cada tubo se tomó una alícuota de 200 μ L para someterlo a un proceso de reducción a nitritos empleando limaduras de cadmio.

Activación de las limaduras de cadmio. Previo lavado con agua grado I (18.2 M Ω), las limaduras de cadmio se enjuagan en varias ocasiones con HCl (1 N). Posteriormente, se vuelven a lavar las limaduras con agua grado I varias veces. Para enseguida tratar las limaduras con $CuSO_4$ durante 30 minutos. Las limaduras así tratadas son sometidas a un periodo de lavado hasta eliminar los residuos formados.

Reducción de los nitratos a nitritos. Al sobrenadante obtenido de cada una de las muestras (200 μ L) se le agrega 2 limaduras de Cd/Cu para reducir los nitratos a nitritos, agitando las muestras continuamente durante 30 minutos. Al final de este periodo se tomaron de cada muestra 3 alícuotas (de 100 μ L cada una) para el análisis de los nitritos por el método de Griess.

Determinación de nitritos. En una placa de ELISA de 96 pozos se colocaron cada una de las alícuotas de 100 μ L, obtenidas después de la reducción con las limaduras de Cd/Cu, y se les agregó 100 μ L del reactivo de Griess (Naftiletilendiamina, 0.1% en agua y sulfanilamida 1% en ácido fosfórico; relación 1:1), las alícuotas se sometieron durante un periodo de 5 minutos a agitación continua para posteriormente leer en un espectrofotómetro de microplacas de la marca Molecular Devices (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA) a una longitud de onda de 540 nm.

La determinación de la concentración de los nitritos se realiza extrapolando las lecturas de absorbancia en la curva tipo previamente construida, en la que se evaluó la absorbancia obtenida a distintas concentraciones conocidas de nitritos (0.1 a 50 μ M).

Las concentraciones de NO₂ se normalizaron por mg de tejido y en la unidad de tiempo.

Se cuantificó la producción de NO inducido por el quinpirol (10⁻⁴M) en la presencia o en la ausencia de los siguientes antagonistas: raclopride (10⁻⁵M), prazosina (10⁻⁹M), yohimbina (10⁻⁸M), BRL44408 (10⁻⁸ M) y ARC239 (3.1x10⁻⁹M), y en ausencia o presencia de L-NAME (10⁻⁵M). El NO formado por la estimulación con quinpirol se realizó cuantificando los nitritos formados ya que el NO se metaboliza a NO₂⁻ y NO₃⁻. Los NO₃⁻ formados previos a la determinación de los NO₂⁻, fueron reducidos a NO₂⁻ por medio del empleo de

limaduras de Cd/Cu (incubando las muestras obtenidas durante una hora a temperatura ambiente) y posteriormente los NO_2^- totales se cuantifican empleando la reacción de Griess.

X. FÁRMACOS EMPLEADOS.

Los clorhidratos de L-Fenilefrina, de prazosina, de acetilcolina, de (-)-quinpirol, de yohimbina, de histamina, el tartrato de S-(+)-raclopride, y la clonidina, se obtuvieron de SIGMA Chemical Co. (St Louis Mo.USA); L-NAME y el maleato de bromofeniramina, se obtuvieron de ICN Biomedicals Inc. (Aurora OH, USA). Todos los fármacos se diluyeron con agua bidestilada y ambos se prepararon diariamente.

XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para establecer diferencias entre los tratamientos se realizó análisis de varianza de una o dos vías (según corresponda), en caso de existir diferencias estadísticamente significativas y comparaciones de dos grupos mediante una t - student. En todos para establecer diferencias estadísticamente significativas se consideró una $p < 0.05$.

XII. RESULTADOS

1. PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN EL EFECTO RELAJANTE INDUCIDO POR QUINPIROL.

La fig.3 muestra curvas concentración respuesta de relajación provocada por el quinpirol en anillos de aorta de rata con o sin endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M). Como se

aprecia en la fig.3, el quinpirol provocó una relajación dependiente de su concentración (10^{-7} a 10^{-4} M) que fue de menor magnitud en los anillos sin endotelio.

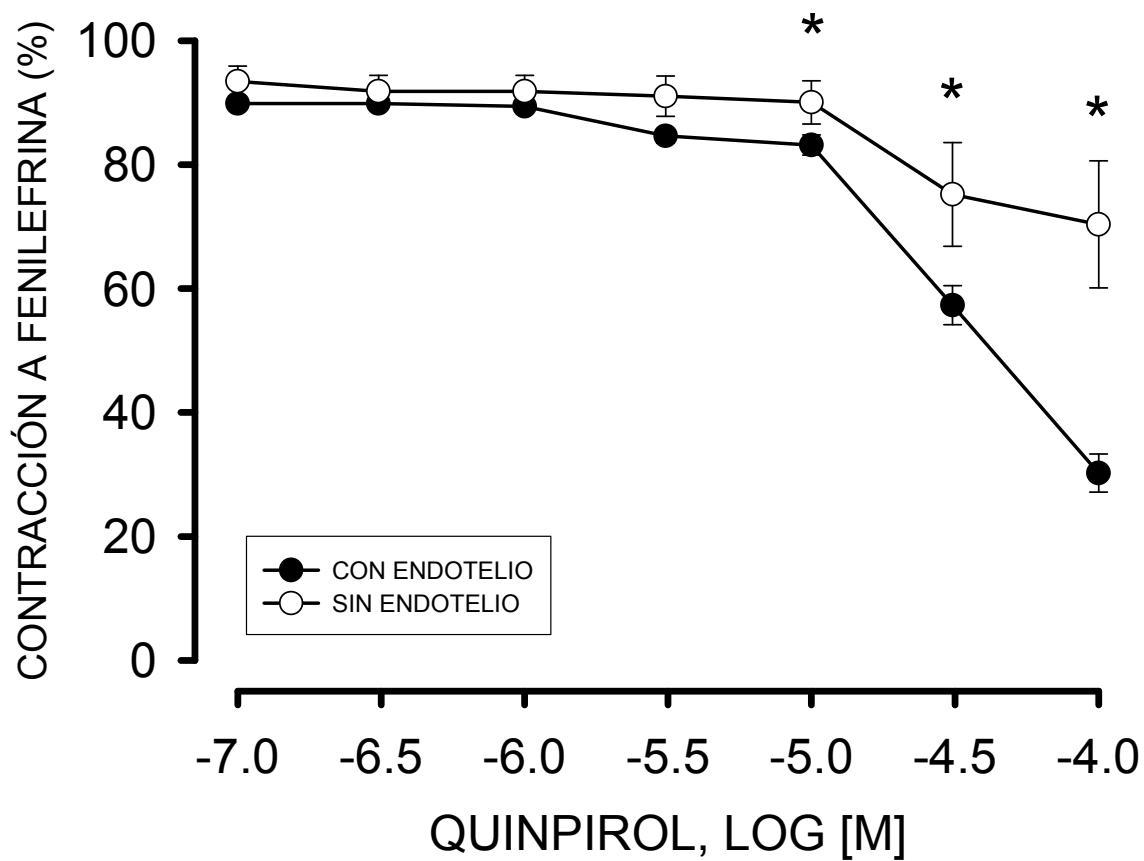


Fig- 3. Efecto relajante de quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio (círculos oscuros) y sin endotelio (círculos vacíos) precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio de 6 experimentos \pm error estándar.

2. EFECTO DEL RACLOPRIDE EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.

En la fig.4 se representan curvas concentración (10⁻⁷ a 10⁻⁴ M) respuesta de relajación al quinpirol en la ausencia o en la presencia de raclopride (10⁻⁵ M) en anillos de aorta de rata con endotelio. Como se aprecia en la fig. 4., el raclopride fue incapaz de modificar la relajación dependiente de la concentración inducida por el quinpirol.

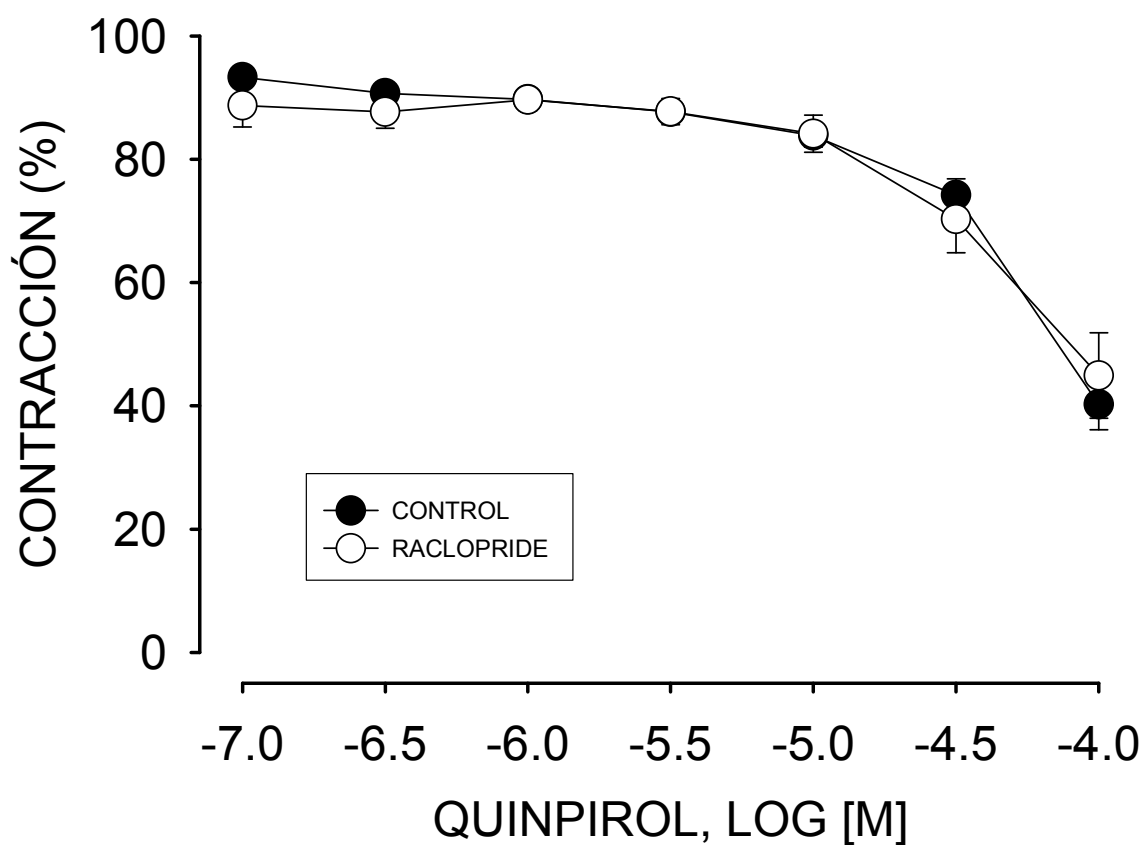


Fig.4 Efecto relajante del quinpirol (10⁻⁷ a 10⁻⁴M) en anillos de aorta de rata con endotelio en presencia (círculos vacíos) y en ausencia (círculos oscuros) de raclopride 10⁻⁵M (antagonista D₂) en anillos precontraídos con fenilefrina 10⁻⁶M. Cada punto representa el promedio de 6 experimentos ± error estandar.

3. PAPEL DE LOS RECEPTORES α_1 EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.

Con la finalidad de confirmar que los receptores adrenérgicos α_1 no parecen estar involucrados en la relajación inducida por el quinpirol se realizaron experimentos de protección del agonista dopaminérgico (quinpirol) al bloqueo irreversible de la fenoxibenzamina (10^{-7} M) sobre la contracción inducida por la fenilefrina. La fig.5 muestra trazos típicos de estos experimentos y la fig.6, representa los valores promedio \pm el error estándar de 6 experimentos. En estas figuras se aprecia que la fenilefrina (10^{-7} M) produce una contracción que fue totalmente inhibida en la presencia de fenoxibenzamina, y, el quinpirol (10^{-4} M), fue incapaz de modificar el bloqueo irreversible del efecto de la fenilefrina por la fenoxibenzamina. Adicionalmente se observa que la administración de quinpirol en ausencia de fenoxibenzamina no provoca cambios en la contracción inducida por la fenilefrina.

4. EFECTO DE LA YOHIMBINA EN EL EFECTO RELAJANTE INDUCIDO POR QUINPIROL.

La fig.7 muestra curvas concentración respuesta de relajación al quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M), tanto en la ausencia como en la presencia de yohimbina (10^{-8} M). Como se aprecia en la fig.7, el efecto relajante del quinpirol en los anillos aórticos se inhibió significativamente con yohimbina (10^{-8} M).

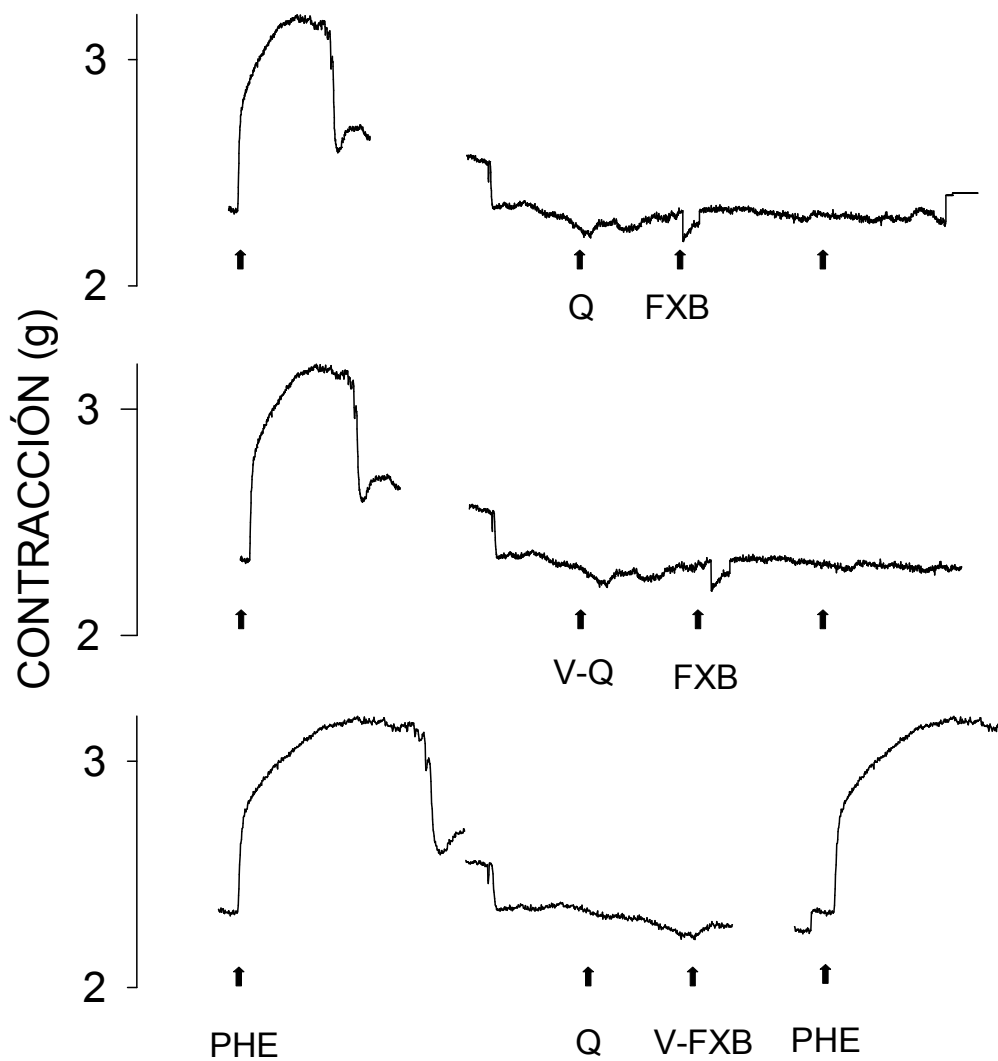


Fig. 5. Registro típico del experimento de protecció de quinpirol ($10^{-4}M$) a fenoxibenzamina (antagonista irreversible α_1) $10^{-7}M$ sobre el efecto contráctil de fenilefrina (agonista de receptores α_1) $10^{-6}M$, en anillos de aorta de rata con endotelio. En la primera etapa del experimento se valoró el efecto protector del quinpirol a fenoxibenzamina, en una segunda etapa se valoró la acción antagonica de la fenoxibenzamina y finalmente en una tercera etapa se valoró el posible efecto del quinpirol, en las tres etapas se valoró el efecto de quinpirol sobre los receptores α_1 .

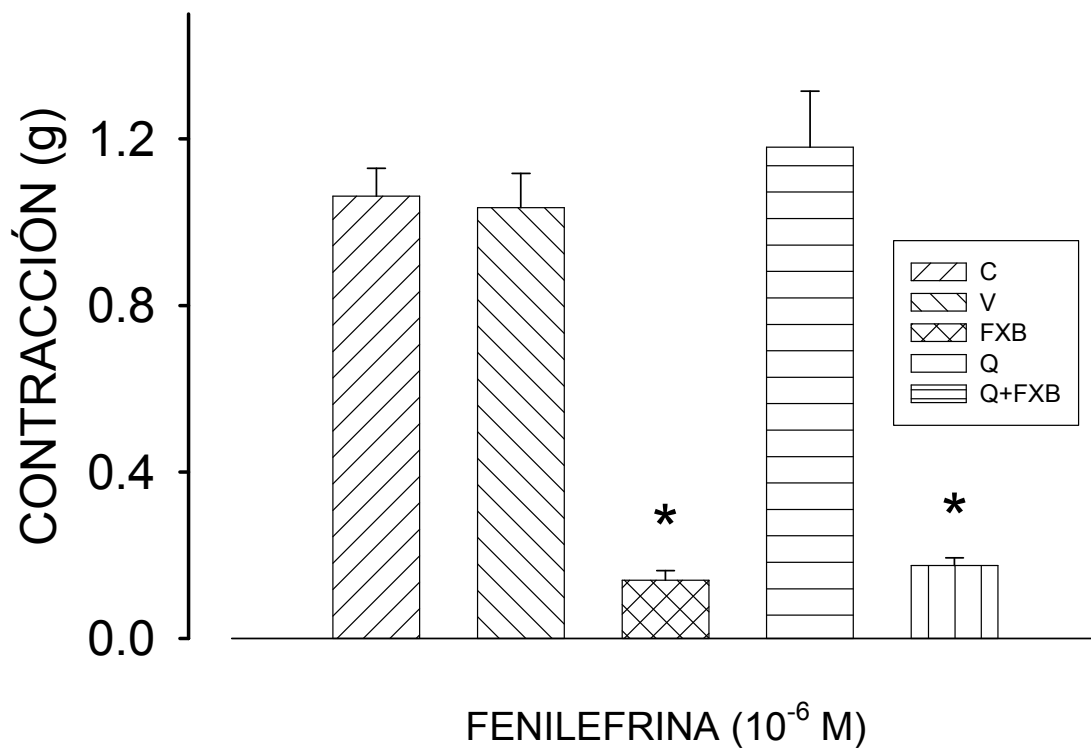


Fig.6. Efecto protector del quinpirol (Q) 10^{-4} M a fenoxibenzamina (FXB) 10^{-7} M, sobre el efecto contráctil (expresado en gramos de tensión) de fenilefrina 10^{-6} M en anillos de aorta de rata con endotelio, valorando el efecto con sus correspondientes vehículos: vehículo de quinpirol (V) y con el vehículo de fenoxibenzamina (VFXB). Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos, con una $p < 0.05$.

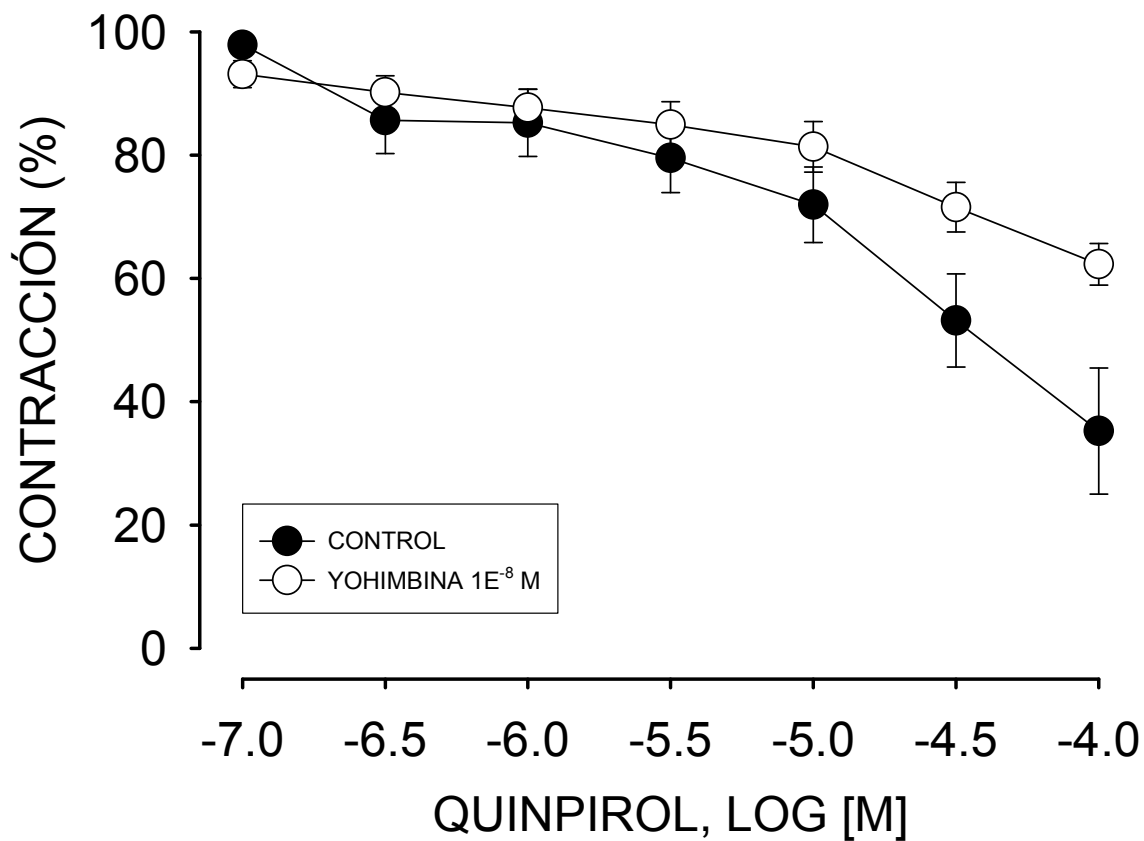


Fig.7. Efecto relajante de quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio en ausencia (círculos negros) y presencia (círculos vacíos) de yohimbina 10^{-8} M, precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos, con una $p < 0.05$.

5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN POR L-NAME EN LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR QUINPIROL.

La fig.8 muestra el efecto del L-NAME (M) sobre la relajación inducida por quinpirol en anillos de aorta de rata con endotelio. En la figura se aprecia que el tratamiento con L-NAME provocó una inhibición dependiente de la concentración y de una manera parcial pero en forma significativa el efecto relajante inducido por quinpirol.

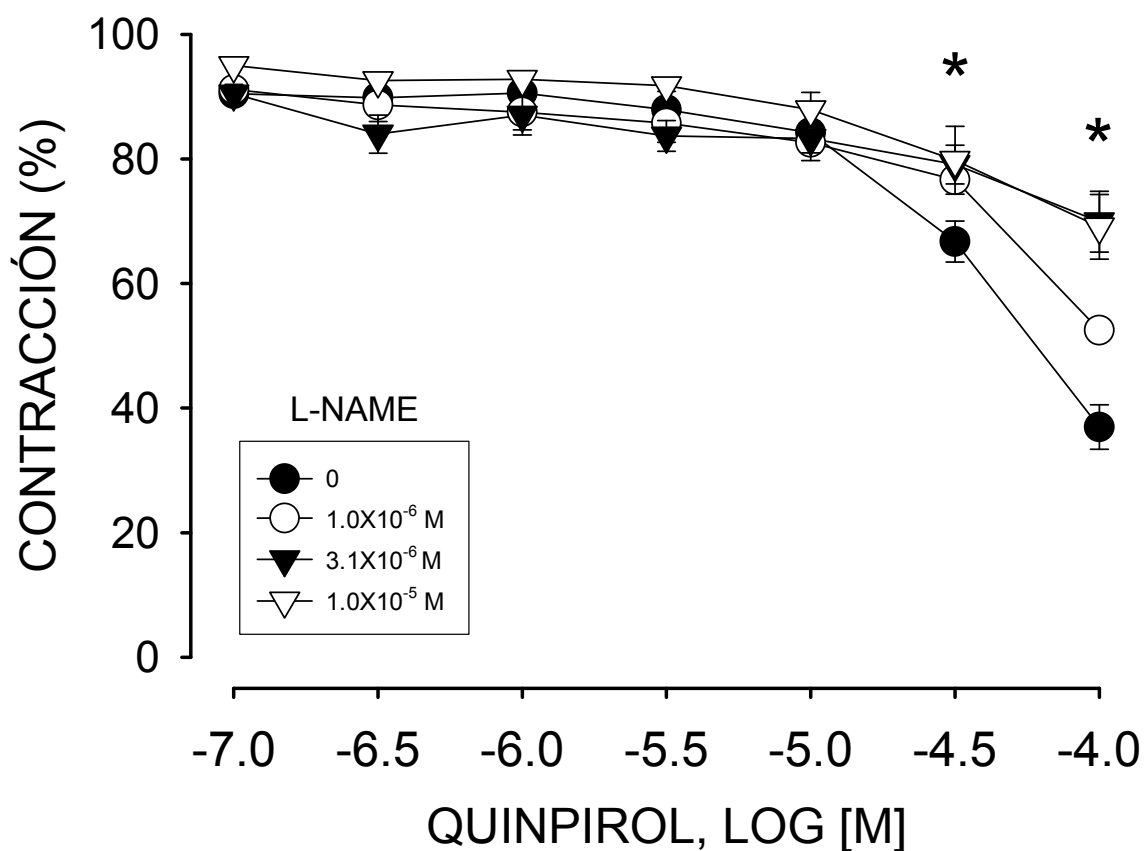


Fig.8 Efecto relajante de quinpirol (10^{-7} a 10^{-4} M) en ausencia (círculos oscuros) y en presencia de L-NAME (inhibidor de la NOS) a las siguientes concentraciones: 10^{-6} M (círculos vacíos), 3.1×10^{-6} M (triángulos oscuros), y 10^{-5} M (triángulos vacíos) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa el promedio de 6 experimentos, \pm error estándar.

6. EFECTO DE BRL44408 SOBRE LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR QUINPIROL

La fig.9 muestra la magnitud de relajación inducida por el quinpirol (10^{-4} M) en anillos aórticos de rata precontraídos con 5-HT (10^{-5} M), las pruebas se realizaron tanto en la ausencia como en la presencia de BRL44408 (10^{-9} a 10^{-8} M). En la fig.9 se aprecia que el quinpirol produjo una relajación que fue bloqueada con el BRL44408 de una manera que

depende de la concentración del antagonista. El valor de $-\log CI_{50}$ para el antagonista fue de 85 ± 0.06 .

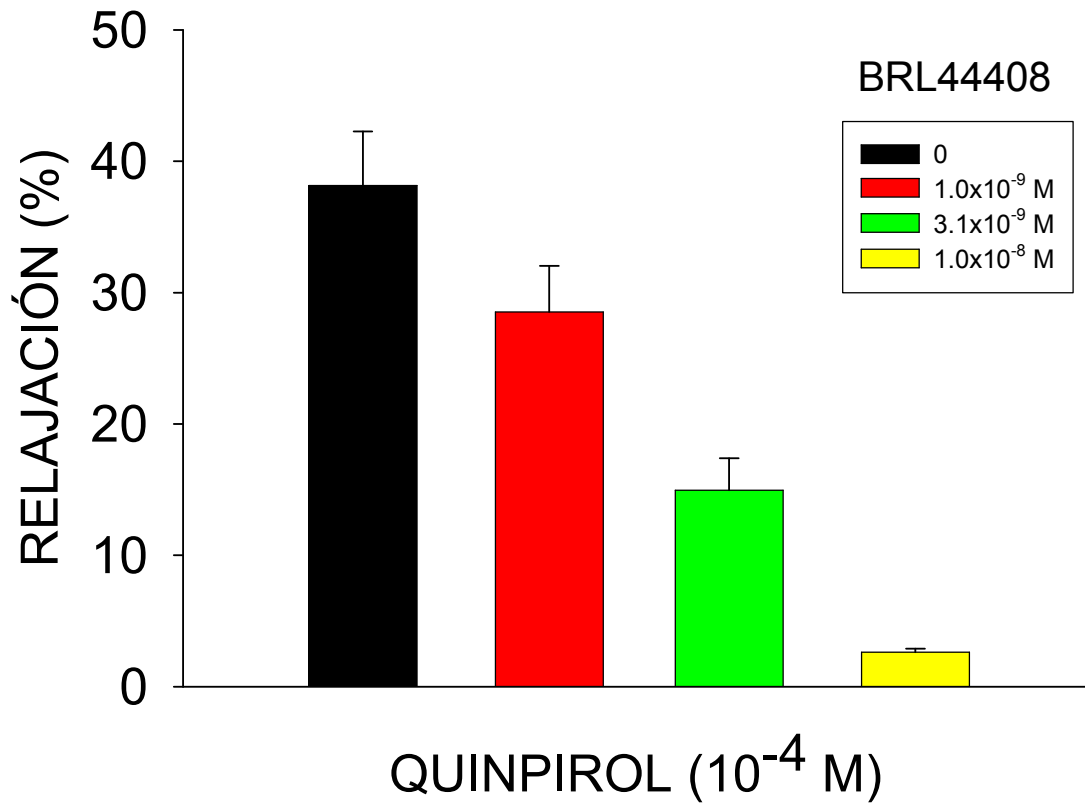


Fig.9. Efecto relajante de quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio precontractados con 5-HT (10^{-5} M), en ausencia o presencia de BRL44408 (antagonista selectivo α_{2A}) a las concentraciones de 10^{-9} a 10^{-8} M. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos, con una $p < 0.05$.

7. EFECTO DE ARC239 SOBRE LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR QUINPIROL

La fig.10 representa la relajación con quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata precontractados con 5-HT (10^{-5} M) en la ausencia o en la presencia de distintas concentraciones de ARC239 (10^{-7} a 10^{-6} M). Se aprecia que el ARC239 reduce de una

manera que depende de su concentración la magnitud de relajación inducida por el quinpirol. El valor de $-\log CI_{50}$ para el antagonista es de 6.6 ± 0.15

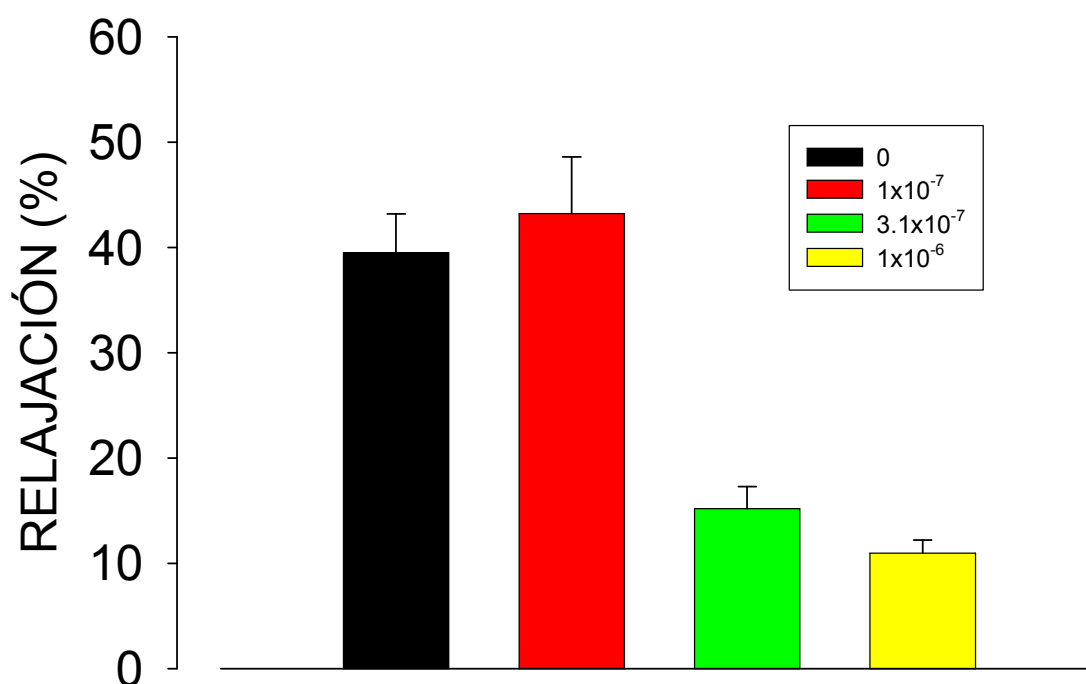


Fig.10. Efecto relajante de quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio precontractados con 5-HT (10^{-5} M), en ausencia o presencia de ARC239 (antagonista selectivo α_{2B}) a las concentraciones de 10^{-7} a 10^{-6} M. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos, con una $p < 0.05$.

8. PRODUCCIÓN DE NO INDUCIDA POR EL QUINPIROL A TRAVÉS DE LA CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS (NO_2^-).

La fig.11 muestra el incremento en la producción de nitritos inducido por quinpirol (10^{-4} M) tanto en la ausencia como en la presencia de prazosina (10^{-9} M), raclopride (10^{-5} M),

ARC239 (3.1×10^{-9} M), L-NAME (10^{-5} M), yohimbina (10^{-8} M) y BRL44408 (10^{-8} M). En forma inserta se incluye la producción basal y la estimulada por quinpirol (10^{-4} M). Como se aprecia en el recuadro de la fig.11 el quinpirol incrementa los valores de nitritos por arriba de los valores basales. El incremento con respecto de la producción basal fue inhibida en la presencia de L-NAME, yohimbina, BRL44408; pero no por prazosina, ARC239 o raclopride, a concentraciones reportadas que bloquean los efectos adrenérgicos α_1 , α_{2B} o dopaminérgicos respectivamente.

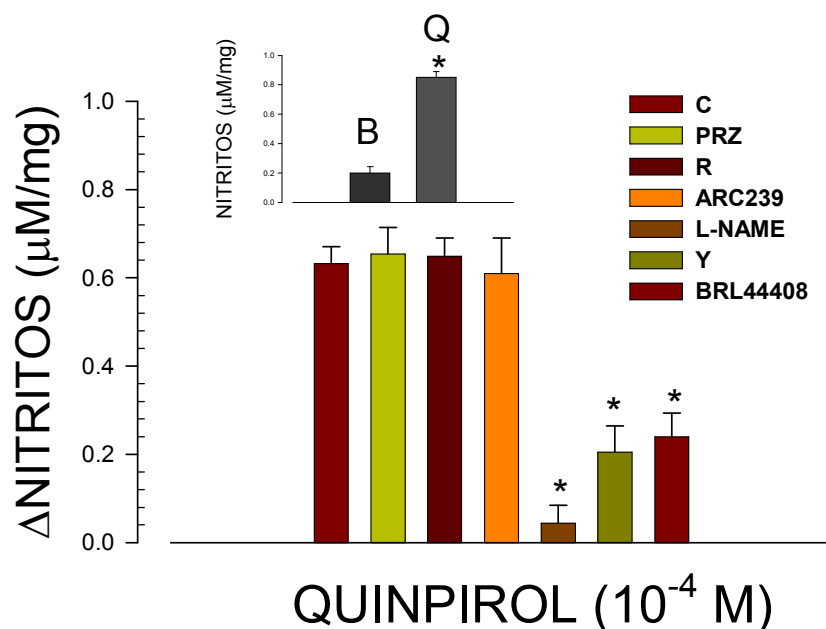


Fig. 11. Incremento de la producción de nitritos por el quinpirol (10^{-4} M) en anillos de aorta de rata con endotelio se esquematiza la producción basal (B) de nitritos por parte del tejido y el incremento de éstos por el quinpirol (Q) en presencia y ausencia de prazosina 10^{-9} M (PRZ), raclopride 10^{-5} M (R), ARC239 3.1×10^{-9} M, L-NAME 10^{-5} M, yohimbina 10^{-8} M (Y) y BRL44408 10^{-8} M.

XIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con la presente Tesis demuestran que el quinpirol, reportado como un agonista de los receptores dopaminérgicos del subtipo D₂, provoca un efecto vasodilatador dependiente del endotelio, el cual es consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{2A/D}$ los cuales se asocian a la liberación de NO.

1. EFECTO DEL QUINPIROL EN LOS ANILLOS NÓRTICOS DE RATA Y EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN DICHO EFECTO.

Es bien sabido que las células endoteliales controlan el tono del músculo liso vascular a través de la liberación de factores contráctiles (aniones superóxido, tromboxano A₂, endoperóxidos y endotelina-1) y por factores relajantes (NO, prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado de endotelio) (Vanhoutte, 2001). Estas sustancias son sintetizadas y liberadas gracias a distintos estímulos de naturaleza química o física. Las primeras lo consiguen al interactuar con receptores propios localizados en el endotelio vascular. Estas sustancias difunden hacia las células musculares lisas para producir sus efectos y de esta manera modular el tono vascular. De esta misma forma, el endotelio participa modulando los efectos de muchos fármacos. Por ejemplo, en condiciones fisiológicas modula el efecto de agentes contráctiles como la clonidina, la serotonina, etc. y también puede ser importante en el efecto vasodilatador de varias sustancias como la acetilcolina, la cual produce relajación vascular de una forma que depende estrictamente del endotelio.

En el presente trabajo se demostró que el quinpirol produce un efecto relajante dependiente de la concentración y en forma parcial de la integridad del endotelio, lo que sugiere que

para producir su efecto, el quinpirol pudiera estimular receptores endoteliales acoplados a la liberación de un factor relajante derivado del endotelio, el cual podría ser responsable de tal efecto. La dependencia del endotelio ya ha sido demostrada con distintas sustancias como con la ACh, la histamina, la adenosina y la clonidina. El efecto vasodilatador de estas sustancias se ha demostrado en algunos lechos vasculares que es consecuencia de la estimulación de la síntesis y liberación de NO (Van de Voorde & Leuden, 1983; Olanrewaju et al., 1995).

Debido a la naturaleza del quinpirol como un agonista de los receptores dopaminérgicos D₂, resultaba natural pensar que la relajación inducida por el agonista podría ser consecuencia de la estimulación de esos receptores localizados en el endotelio. De tal forma que en el siguiente párrafo se discute este punto.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₂ EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.

Esta bien descrito que a nivel periféricos, los receptores dopaminérgicos D₂ se encuentran localizados en las terminales nerviosas presinápticas de los nervios simpáticos postganglionares. La activación de estos receptores origina una disminución de la liberación de norepinefrina. Esto podría explicar un efecto vasodilatador por disminución de una sustancia vasoconstrictora, la noradrenalina. Sin embargo, se descarta una acción del quinpirol a este nivel, debido a que se emplearon vasos sanguíneos aislados, los cuales están libres de la influencia ganglionar. Además, el quinpirol provocó su efecto de una forma que depende del endotelio, por lo que resulta razonable pensar que si se presentara una acción ganglionar, el efecto del agonista en la aorta de la rata fuera igual en los anillos con o sin endotelio. También, se ha encontrado evidencia de la presencia de los receptores

dopaminérgicos postsinápticamente en algunos lechos vasculares como en las arterias coronarias, mesentéricas y femorales de perro y en la arteria pulmonar de conejo (Lokhandwala & Barrett, 1982). Específicamente, el grupo de Ricci et al. (1994), mediante estudios autoradiográficos, evidencian la presencia de receptores D₂-like, pero no D₁-like en la vena porta de la rata, esos receptores fueron identificados en la capa adventicia y en el endotelio. Aunque no se describe el papel funcional de estos receptores, es probable, que aquellos localizados en la adventicia se relacionen con una inhibición del flujo simpático y aquellos localizados en el endotelio con vasodilatación. Además, se ha evidenciado la presencia de los receptores D₂ en las capas endotelial y subendotelial de la aorta, la arteria carótida común, arteria vertebral, arteria pulmonar y la vena cava superior de la rata Sprague Dawley (Kim et al., 1999). En el caso de los resultados obtenidos en el presente trabajo, el quinpirol produjo una relajación que no se inhibió con raclopride, descartando de esta manera la participación de los receptores D₂ en dicho efecto del quinpirol. En este sentido, existen datos que podríamos considerar contradictorios o que probablemente pudieran explicarse por diferencias de especie o de lecho vascular. Por ejemplo, el SKF89124, un agonista selectivo de los receptores D₂, fue incapaz de provocar algún efecto en la arteria esplácnica de conejo en las preparaciones con endotelio. Por otro lado, se ha demostrado que la dopamina puede ejercer un efecto vasodilatador en la arteria y en la vena femoral de perro por un mecanismo que no involucra la participación de los receptores dopaminérgicos (Segawa et al, 1998). En este mismo sentido, se ha encontrado que el quinpirol provoca vasodilatación en la arteria renal de perro, evaluada como un incremento en el flujo sanguíneo renal, como consecuencia de la estimulación de receptores H₁ y H₂ (Horn & Kohli, 1991). Congruentes con estos estudios, en el presente trabajo se demuestra que una concentración alta de raclopride (10⁻⁵M) fue incapaz de modificar la relajación

inducida por quinpirol, indicando que el agonista dopaminérgico produce relajación de los anillos aórticos por un mecanismo distinto al de los receptores dopaminérgicos. Existen otras evidencias que indican que la dopamina y otros agonistas dopaminérgicos puede producir un efecto vasodilatador a través de mecanismos que involucran a los receptores dopaminérgicos o mecanismos distintos a los relacionados con estos receptores. Por ejemplo; en la arteria pulmonar de conejo el mecanismo de relajación de la dopamina, que se produce en forma dependiente e independiente del endotelio, involucra la estimulación de receptores DA1 (Yamauchi et al., 1992); en forma similar en la arteria pulmonar humana, la dopamina produce relajación por estimular esos mismos receptores (Yamauchi et al., 1989); contrariamente; en la arteria coronaria del perro, la dopamina produce relajación por la estimulación de receptores β adrenérgicos y liberación de prostaglandinas (Takenaka & Morishita, 1976); en este mismo sentido, la dopexamina y el fenoldopan (agonistas dopaminérgicos D1) producen vasodilatación en el riñón perfundido de la rata por un mecanismo que involucra el bloqueo de los receptores adrenérgicos α_1 (Martin & Broadley, 1995). Estas evidencias ponen de manifiesto, que tanto la dopamina, como los agonistas dopaminérgicos, pueden ser consideradas herramientas con múltiples mecanismos de acción, por lo que deben sistemáticamente estudiarse para establecer dichos mecanismos para que se puedan encontrar compuestos más selectivos y poder tener más claro el papel funcional de los receptores dopaminérgicos.

Otra de las posibles acciones de algunos de los fármacos dopaminérgicos es a través de los receptores adrenérgicos α_2 . En este sentido se ha encontrado que la relajación inducida por la dopamina en la arteria y en la vena femoral de perro se debe a la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 , los cuales están asociados a la síntesis y liberación de óxido

nítrico (Segawa et al 1998; Zanzottera et al., 1998). Este punto se discute más ampliamente en el siguiente apartado.

3. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÈRGICOS α EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.

Existen evidencias que indican que la dopamina predominantemente actúa sobre los receptores α_2 en la arteria cerebral de perro aislada y que en la arteria mesentérica muestra un efecto equipotente sobre los receptores α_1 y α_2 (Segawa et al., 1998). Con respecto a los receptores adrenèrgicos α_1 , se ha demostrado en la arteria pulmonar de rata que la administración de fenilefrina, un agonista de los receptores adrenèrgicos α_1 , se asocia con contracción y con producción de NO en preparaciones vasculares con endotelio y que en las sin endotelio solo se aprecia la contracción. La prazosina bloquea tanto la contracción como la producción de NO y un fármaco no adrenèrgico como la angiotensina II fue incapaz de inducir la formación del NO. Estos datos sugieren fuertemente la existencia de un receptor adrenèrgico α_1 , el cual está asociado con la formación de óxido nítrico. En este estudio, la cuantificación de NO se realizó en forma directa a través de un electrodo (Boer et al., 1999). Esto sugiere la posibilidad de la existencia de un receptor adrenèrgico α_1 funcional en el endotelio en las arterias pulmonares de rata. Por lo tanto, considerando estos datos y aquellos obtenidos por Segawa et al. (1998), se podría pensar que al igual que la dopamina, el quinpirol pudiera interactuar con el receptor adrenèrgico α_1 para ejercer su efecto vasodilatador. Sin embargo y para descartar la participación de los receptores adrenèrgicos α_1 en el efecto relajante inducido por el quinpirol, se realizaron experimentos de protección con quinpirol del bloqueo irreversible de la fenoxibenzamina (antagonista irreversible de los receptores adrenèrgicos α) sobre la contracción inducida por fenilefrina

(agonista de los receptores adrenérgicos α_1). Con respecto a los experimentos de protección, existen datos que indican que fármacos como el 5-metilurapidil y el BMY7378 (antagonistas de los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1D} respectivamente) protegen del bloqueo irreversible con fenoxibenzamina a la contracción por noradrenalina en la aorta de la rata, en el vaso deferente de la rata y en la próstata humana. Siendo más potente el 5-metilurapidil para proteger el efecto de la noradrenalina en el vaso deferente de rata y en la próstata humana, y el BMY7378 en la aorta de la rata (Chess-Williams et al., 2002). Los resultados de los experimentos obtenidos en la presente Tesis demuestran que el quinpirol fue incapaz de proteger del bloqueo irreversible con fenoxibenzamina a la contracción por fenilefrina. Sugiriendo con estos datos que el quinpirol carece de actividad adrenérgica α_1 , a diferencia de la clonidina, la indanidina y la oximetazolina (agonistas de los receptores adrenérgicos α_2); las cuales si lograron proteger del mencionado bloqueo en anillos de aorta de rata (Valencia, 1994).

Por las razones anteriores es claro que la dopamina y otras sustancias dopaminérgicas como el quinpirol ejercen distintos efectos a través de acciones distintas a los producidos sobre los receptores dopaminérgicos. En particular, se tiene evidencia experimental de que el quinpirol puede interaccionar con receptores adrenérgicos α_2 . Por ejemplo, se ha demostrado en vasos deferentes de rata que el quinpirol reduce la contractilidad inducida por estimulación eléctrica, efecto bloqueado por la yohimbina indicando la participación de los receptores α_2 en dicho efecto (Cohen et al., 1984). Por lo tanto, resultaba natural pensar que, la relajación dependiente del endotelio ocasionada por el quinpirol en la aorta de la rata fuera consecuencia de la estimulación de tales receptores adrenérgicos. En forma congruente con estos estudios, los obtenidos en el presente trabajo indican que la

yohimbina, un antagonista de los receptores adrenérgicos α_2 , inhibió significativamente el efecto relajante del quinpirol (fig.7). Estos resultados sugieren que, en el efecto relajante del quinpirol podrían estar participando los receptores adrenérgicos α_2 . Resultados similares han sido reportados sobre la arteria y la vena femoral del perro, donde la dopamina produce un efecto vasodilatador, a través de la estimulación de la síntesis y liberación de NO, por una acción a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 (Segawa et al., 1998).

Cabe hacer mención que se ha descrito que la yohimbina, además de sus propiedades antagonistas sobre los receptores adrenérgicos α_2 , posee propiedades de bloqueo de los receptores dopaminérgicos posinápticos del subtipo D_2 (Scatton et al., 1980). Sin embargo y considerando los resultados obtenidos con raclopride, en donde se demuestra que este antagonista no modifica la relajación por el quinpirol, se puede afirmar que la yohimbina inhiba la relajación inducida por el quinpirol a través de acciones dopaminérgicas. A este punto es claro que el quinpirol produce su efecto vasodilatador dependiente del endotelio a través de la estimulación de los receptores α_2 . No obstante lo anterior, hasta la fecha no se tiene evidencia de si el quinpirol produce tal efecto a través de la estimulación de alguno de los subtipos de los receptores adrenérgicos α_2 y si la estimulación de estos receptores está asociado a la síntesis y liberación de NO. Existen varias herramientas farmacológicas para discernir a los subtipos de los receptores adrenérgicos α_2 . En este sentido, el ARC239 se ha descrito como un antagonista de los adrenoceptores α_{2B} . De tal forma que en la corteza cerebral humana, donde existen preferencialmente receptores adrenérgicos α_{2A} , se encontró que el ARC239 tiene un valor de $pK_i = 6.86 \pm 0.06$; y en pulmón de rata donde existen principalmente α_{2B} el ARC239 tiene una $pK_i = 8.8 \pm 0.05$ (Bylund et al., 1988). En el caso

del BRL44408, descrito como un antagonista de los adrenoceptores α_{2A} , se ha encontrado que las arterias ciliares del cerdo, la brimonidina produce vasoconstricción mediada por receptores adrenérgicos α_{2A} , debido a que el BRL44408 y el ARC239 mostraron afinidades, manifestada como valores de pK_b , de 7.8 y 5.8 respectivamente (Wikberg & Simonsen, 2001). Por lo tanto, el ARC239 y el BRL44408 pueden ser empleados para discriminar los subtipos de receptores adrenérgicos α_{2B} y α_{2A} respectivamente, ya que la diferencia de potencia del BRL44408 para discernir entre los receptores α_{2A} y α_{2B} es de 72 (Young et al., 1989) y la diferencia para el ARC239 entre los receptores α_{2B} y α_{2A} es de 126 (Bylund et al., 1988). En el presente trabajo se demuestra que el BRL44408 (antagonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_{2A}) reduce significativamente la relajación inducida por quinpirol en los anillos aórticos con endotelio precontraídos con 5-HT (10^{-5} M) obteniendo un valor de $-\log CI_{50}$ para este antagonista de 85 ± 0.06 .

Por lo que podemos afirmar que la relajación dependiente del endotelio e inducida por quinpirol puede ocurrir como consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_{2A} localizados en el endotelio. Al igual que con el BRL44408 y con la finalidad de calcular un valor de afinidad para el ARC239, se realizaron experimentos de inhibición de la relajación de una dosis fija de quinpirol en anillos precontraídos con 5-HT. En estas condiciones el ARC239 inhibió la relajación inducida por el quinpirol de una forma dependiente de la concentración del antagonista. Sin embargo, el valor de $-\log CI_{50}$ para este antagonista fue de 6.6 ± 0.15 , valor de afinidad reportado para el receptor α_{2A} . Por lo tanto los resultados confirman que el efecto dependiente del endotelio observado con quinpirol en la aorta de rata es consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 , yya que la diferencia en potencia relativa entre los dos antagonistas fue de

77.61 veces lo que sugiere la participación de los receptores adrenérgicos α_{2A} en dicho efecto. Existen estudios similares en anillos de la arteria mesentérica superior de ratas, donde se demostró que el UK14304 y la guanfacina, agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 , provocaron relajación que fue mediada por NO tras la estimulación del receptor adrenérgico $\alpha_{2A/D}$, empleando como antagonistas al WB-4101 ($pK_b=6.6$) y a la rauwolscina ($pK_b=7.7$), para el discernimiento del subtipo de receptor $\alpha_{2A/D}$ (Bockman et al., 1996).

Otros estudios de Bockman et al. (1993), en arterias coronarias de cerdo, demostraron que la clonidina y el UK14304 presentaron un efecto relajante dependiente de endotelio tras la estimulación del receptor adrenérgico α_{2A} , empleando como antagonistas al SKF104856 ($pK_b=7.4\pm 4.6$), y a la rauwolscina ($pK_b=8.8\pm 0.26$), para el discernimiento del subtipo de receptor $\alpha_{2A/D}$. Cabe señalar que por la similaridad relativamente alta de los subtipos de receptores adrenérgicos α_{2A} y α_{2D} en su secuencia de aminoácidos, son considerados especies homólogas (Blaxall et al., 1993). Por lo que considerando los resultados obtenidos en el presente estudio y los obtenidos por Bockman et al (1996), se puede decir que los subtipos de receptores adrenérgicos, α_{2A} y α_{2D} presentan también homología funcional debido a que la estimulación de ambos subtipos de receptores causan un efecto relajante dependiente del endotelio vía NO, haciendo mención que la presentación del subtipo de receptor adrenérgico α_2 , varía dependiendo la especie y el lecho vascular estudiados. Por lo tanto, solo quedaba por demostrar que la relajación inducida por el quinpirol mediada por la estimulación de receptores α_{2A} endoteliales estuviera asociada a la producción de NO, aspecto que se analiza a continuación.

4. PARTICIPACIÓN DEL NO EN EL EFECTO RELAJANTE DEL QUINPIROL.

Ya se ha mencionado que varios agonistas dopaminérgicos ejercen sus acciones a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 , los cuales están acoplados a la formación y liberación de NO. Específicamente, se ha demostrado que la dopamina al actuar sobre los receptores adrenérgicos α_2 endoteliales produce una relajación en la arteria y vena femoral de perro al igual que en la arteria pulmonar (Angus et al., 1986; Vanhoutte, 2001). Por lo que resulta razonable pensar que inhibidores de la síntesis de NO como el L-NAME (Vandeputte et al., 2003) pueden reducir la relajación mediada por esos agonistas. En el presente trabajo, se demuestra que el L-NAME provocó una inhibición dependiente de la concentración del inhibidor, lo que sugiere que en la relajación dependiente del endotelio e inducida por el quinpirol participa el NO. En este sentido, el quinpirol se parece a la dopamina, la cual provocó una relajación dependiente de endotelio vía NO por la estimulación de receptores adrenérgicos α_2 en arteria y vena femoral de perro (Segawa et al., 1998). Con el propósito de mostrar una evidencia directa de la participación del óxido nítrico en el efecto relajante dependiente del endotelio inducido por el quinpirol, se cuantificó la producción de nitritos a través de la técnica de Griess (Gutman et al., 1992; Green et al., 1982). Se sabe que la especie principal en el metabolismo del NO es el ión nitrato (Miranda, 2000), este ión puede ser reducido a ión nitrito, para después cuantificar los nitritos totales por la técnica de Griess. La cantidad de nitritos cuantificada de esta forma se ha tomado como una medida de la producción de NO (Green et al., 1982). Por ejemplo, se ha descrito que la acetilcolina produce un efecto relajante en vasos sanguíneos, el cual se asocia con la producción de NO, el cual se cuantificó a través de la producción de nitritos y nitratos (Gutman et al., 1992; Green et al., 1982). En el presente trabajo, la

incubación de los anillos aórticos con quinpirol incrementó los valores de nitritos por arriba de los valores basales, indicando que esta sustancia puede inducir vasodilatación de la aorta de la rata a través de la producción de NO. Debido a que anteriormente se demostró que el agonista dopaminérgico produce una vasodilatación en forma dependiente del endotelio y de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_{2A} , faltaba demostrar que dicho incremento resultaba como consecuencia de la estimulación de tales receptores. En este sentido se encontró que a diferencia de la prazosina, raclopride y ARC239; el L-NAME, la yohimbina y el BRL44408 inhibieron en forma significativa el incremento en la producción de nitritos inducido por el quinpirol. Cabe hacer notar que las concentraciones empleadas tanto de yohimbina, BRL44408 estuvieron en el rango en que se ha demostrado que actúan sobre los receptores adrenérgicos α_2 (10^{-8} M). Estos datos nos confirman que el quinpirol produce una vasodilatación, al estimular a los receptores adrenérgicos del subtipo α_{2A} , los cuales están acoplados a la síntesis y liberación de NO. Se ha demostrado en otros lechos vasculares, como la arteria mesentérica superior de la rata, que agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 , como la clonidina; provocan una relajación dependiente del endotelio y de la producción de NO, detectado a través de técnicas de quimioluminiscencia (Figuroa et al., 2001). En este trabajo se demostró que tales efectos eran consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{2A/D}$.

XIV. CONCLUSIONES:

1. El quinpirol indujo una relajación dependiente de la concentración y de la presencia del endotelio.
2. En la relajación dependiente del endotelio se descarta la participación de los receptores dopaminérgicos D2/D3, ya que el raclopride fue incapaz de bloquear dicha relajación.
3. El quinpirol fue incapaz de proteger los receptores adrenérgicos α_1 del antagonismo irreversible de la fenoxibenzamina
4. El efecto relajante parece ser consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 , debido a que la relajación inducida por el quinpirol se bloquea con yohimbina.
5. El subtipo α_2 que media la relajación inducida por quinpirol parece ser el α_{2A} ya que dicha relajación fue inhibida por BRL44408 y por ARC239 (a concentraciones relacionadas con aquellos valores de afinidad para este subtipo).
6. El efecto relajante del quinpirol parece ser consecuencia de la síntesis y liberación de NO ya que el L-NAME inhibe la síntesis.
7. El incremento en la producción de NO inducido por quinpirol parece ser consecuencia de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_{2A} .
8. Se descarta la participación de los receptores dopaminérgicos, adrenérgicos α_1 , y α_{2B} en el efecto relajante del quinpirol.

XV. BIBLIOGRAFIA:

Angus JA, Cocks TM and Satoh K. The α -adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc* 45: 2355-2359, 1986.

Angus JA, Cocks TM, Satoh K. The alpha adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc*. Aug;45(9):2355-9, 1986.

Arbilla S, Langer SZ. Stereoselectivity of presynaptic autoreceptors modulating dopamine release. *Eur J Pharmacol*. Dec 17;76(4):345-51, 1981.

Blaxall HS, Heck DA, Bylund DB. Molecular determinants of the alpha-2D adrenergic receptor subtype. *Life Sci*.;53(17):PL255-9, 1993.

Bockman CS, Gonzalez-Cabrera I and Abel PW. Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1235-1243, 1996.

Bockman CS, Gonzalez-Cabrera I, Abel PW. Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Sep;278(3):1235-43, 1996.

Bockman CS, Jeffries WB and Abel PW. Binding and functional characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 1126-1133, 1993.

Bockman CS, Jeffries WB, Abel PW. Binding and functional characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther*. Dec;267(3):1126-33, 1993.

Bockman, CS, Jeffries, WB, Pettinger, WA and Abel, PW. Enhanced release of endothelium-derived relaxing factor in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, Vol 20, 304-313, 1992.

Brodde OE. Vascular dopamine receptors: Demonstration and characterization by in vitro studies. *Life Sci.* Jul 26;31(4):289-306, 1982.

Bylund,D.B., Subtypes of alpha 1- and alpha 2- adrenergic receptors, *FASEB J*, 6:832-839, 1992.

Bylund,D.B., Subtypes of alpha 1- and alpha 2- adrenergic receptors, *FASEB J*, 6:832-839, 1992.

Bylund D.B, Alpha – 2 adrenergic receptor: a historical and perspective. In: *The Alpha-2 Adrenergic Receptors* Ed. Limbird, New York,1-13. 1998.

Bylund D.B, Alpha – 2 adrenergic receptor: a historical and perspective. In: *The Alpha-2 Adrenergic Receptors* Ed. Limbird, New York, 1-13,1998.

Bylund D.B, Alpha – 2 adrenergic receptor: a historical and perspective. In: *The Alpha-2 Adrenergic Receptors* Ed. Limbird, New York, , 1-13,1998

Chess-Williams R, Mason S, Sellers DJ, Wyllie M, Chapple CR. The role of alpha1D-adrenoceptors in prostatic contraction examined using protection studies. *Auton Autacoid Pharmacol.* Oct-Dec;22(5-6):291-6, 2002.

Cocks TM and Angus JA., Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature (Lond)* 305: 627-630,1983

Cohen M.L., Shaar c.j., Colbert W.E. Alpha 2- agonist activity of the dopamine DA2-agonist LY171555. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6:1245-8, 1984.

Cohen M.L., Shaar c.j., Colbert W.E. Alpha 2- agonist activity of the dopamine DA2-agonist LY171555. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6:1245-8,1984.

Dal Toso, R., B. Sommer, M. Ewart, A. Herb, D. B. Pritchett, A. Bach, B. D. Shivers, And P. H. Seeburg. The dopamine receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.* 8: 4025-4034, 1989.

Eble Jn. A Proposed Mechanism For The Depressor Effect Of Dopamine In The Anesthetized Dog. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul;145:64-70, 1964.

Figueroa X.F., Poblete M., Boris M.P. Mendizábal V.E., Alder, Graschinsky E., Huidobro- Toro J.P. Clonidine induced nitric oxide-dependent vasorelaxation mediated by endothelial alpha (2)-adrenoceptor activation. *Br. J. Pharmacol* 134:957-68,2001.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* Nov 27;288(5789):373-6,1980.

Gibbins J.L, Morris J.L., Pathway specific expression of neuropeptides and autonomic control of the vasculature. *Regul. Pept.* 93: 93-107, 2000.

Giros, B., P. Sokoloff, M. P. Martres, J. F. Riou, L. J. Emorine, And J. C. Schwartz. Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature* 342: 923-926, 1989.

Goldberg L.I., Cardiovascular and renal actions of dopamine: Potential Clinical Applications, *Pharmacological Reviews*, 24:1-29,1972.

Goldberg Li, Mcdonald Rh Jr, Zimmerman Am. Sodium Diuresis Produced By Dopamine In Patients With Congestive Heart Failure. *N Engl J Med.* Nov 14;269:1060-4, 1963.

Goldberg, L. I., And S. I. Rajfer. Dopamine receptors: applications in clinical cardiology. *Circulation* 72: 245-248, 1985.

Goldberg, L. I., P. H. Volkman, And J. D. Kohli. A comparison of the vascular dopamine receptors with other dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 57-79, 1978.

Goldberg, L. I., P. H. Volkman, And J. D. Kohli. A comparison of the vascular dopamine receptors with other dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 57-79, 1978.

Green, L.C., Wanger, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*; 126(1): 131-8, 1982.

Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* Jun;53(2):319-56,2001.

Hahn RA, MacDonald BR, Martin MA. Antihypertensive activity of LY141865, a selective presynaptic dopamine receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan;224(1):206-14,1983.

Gutman, S.I., Hollywood, C.A. Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. *Clin Chem*; 38 (10):2152, 1992.

Hahn RA, Wardell JR Jr. Antagonism of the renal vasodilator activity of dopamine by metoclopramide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Nov;314(2):177-82, 1980.

Hahn RA. Inhibitory effects of pergolide on peripheral adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* Dec 14;29(24):2501-9,1981.

Hodgson J.M., Nitric Oxide, *Clin. Chemistry, Cannon* 44(8):1809, 2002.

- Holtz P, Stock K, Westermann E. [On The Effect Of Dopamine On The Blood Pressure] *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Nov 8;246:133-46,1963.
- Horn PT, Kohli JD. Absence of postsynaptic DA2 dopamine receptors in the dog renal vasculature. *Eur J Pharmacol.* May 17;197(2-3):125-30,1991.
- Horwitz D, Goldberg Li, Sjoerdsma A. Increased blood pressure responses to dopamine and norepinephrine produced by monoamine oxidase inhibitors in man. *J Lab Clin Med.* Nov;56:747-53, 1960.
- Hudson R., Adrenoceptor Pharmacology, TOCRIS Reviews. Psychopharmacology Unit, Department of Pharmacology, School of Medical Sciences. University of Bristol, 1-6, 1998.
- Hussain T., Mustafa F., Lokhandwala. Renal Dopamine Receptor Function in Hypertension. *Hypertension* 32:1987-97, 1998.
- Jackobson D.M., Westlind D., Dopamine receptors: molecular, biochemistry and behavior aspects. *Pharmacol. Ther.* 64:291-369, 1994.
- Jerome F., O'Hara., Low- Dose "Renal" Dopamine, *Anesthesiology Clinics of North America*; 18: 835-47, 2000.
- Kebabian, J. W., And D. B. Calne. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96, 1979.
- Kim M.O., Koh P.O., Kim J.H., Kim J.S., Kang S.S. Cho G.J., Kim K., Choi W. S., Localization of dopamine D1 and D2 receptor mRNAs in the rat systemic and pulmonary vasculatures. *Mol. Cells* 9:417,1999.

Lanier S.M, Downing S., Duzic E., Homcy C.J. Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha-2 adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J. Biol. Chem* 266:10470- 8,1991.

Lefkowitz, Robert J., Hoffman, Brian B., , Palme T. Sistema nervioso autónomo y motor somático. En: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª. ed Ed Mac-Graw-Hill interamericana, 128-133,1997

Lokhandwala MF, Barrett RJ. Cardiovascular dopamine receptors: physiological, pharmacological and therapeutic implications. *J Auton Pharmacol.* Sep;2(3):189-215,1982.

Lomanesney, J.W., Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure function relationships. *Biochem. Biophys. Acta*, 1095:127-139, 1991.

Martin SW, Broadley KJ. Renal vasodilatation by dopexamine and fenoldopam due to alpha 1-adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol.* May;115(2):349-55., 1995.

Mattson D.L., Celso Y., Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. *Hypertension* 31: 15-20, 1998.

McDonald, R. H.. Jr., L. I. Goldberg, J. L. McNay, And E. P. Tuttle. Effect of dopamine on man: augmentation of sodium excretion, glomerular filtration rate, and renal plasma flow. *J. Clin. Invest.* 43: 1116-1124, 1964.

McNay, J. L., R. H. McDonald, And L. I. Goldberg. Direct renal vasodilation produced by dopamine in the dog. *Circ. Res.* 16: 510-517, 1965.

Miranda, K.M., Espey M.G., Grisham, M.B., Fukuto, J.M., Feelisch, M., Wink, D.A.,
The Chemical Biology of Nitric oxide in Nitric Oxide, Biology and pathobiology by
Academic Press, The Angeles, California, 2000; p.p. 41-55.

Missale C., Nash R.S.R., Robinson S.W., Jaber M., Caron M.G. Dopamine Receptors:
From Structure to Function. *Pharmacological Reviews*. 78: 189-225,1997.

Moncada S., Higgs A., Furchgott R. XIV International Union of Pharmacology
Nomenclature in Nitric Oxide Research, *Pharmacological Reviews* 49: 137 -42,1997.

O'Dowd B.F., Structure of dopamine receptors, *J. Neurochem.* 60:804-816,1993.

Olanrewaju HA, Hargittai PT, Lieberman EA, Mustafa SJ. Role of endothelium in
hyperpolarization of coronary smooth muscle by adenosine and its analogues. *J*
Cardiovasc Pharmacol. Feb;25(2):234-9, 1995

Palmer, R.M. , Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the
biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*; 327(6122):524-6,
1987.

Paul L.Feldman, Owen W.Griffith, Dennis J.Stuehr. The surprising life of Nitric
Oxide, *Special Report*, 20:26-38, 1993.

Pendleton, R. G., And S. S. Sherman. Studies concerning dopamine diuresis in the rat.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 222: 94-102, 1976.

Ramírez R.L., Calderón C. J, Zarco M.E., García M. J., Molina M.J., Fernández R.G.
Cambios en los índices de oxigenación con el uso de óxido nítrico en el postoperatorio

de corrección de cardiopatías congénitas con hipertensión pulmonar severa. *Archivos de Cardiología de México*. 71:121-6, 2001.

Ricci A, Collier WL, Amenta F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the portal vein. *J Auton Pharmacol*. Feb;14(1):61-8,1994.

Richard A. Cohen, Robert M. Weisbrod, Marion Gericke, Mohammad Yaghoubi, Charlene Bierl, Victoria M. Bolotina Mechanism of Nitric Oxide- Induced Vasodilatation. Refilling of Intracellular Stores by Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase and Inhibition of Store-Operated Ca^{2+} Influx. *Circ. Res.* 84: 210-19, 1999.

Richard V, Tanner FC, Tschudi M and Luscher TF. Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin and clonidine in coronary arteries. *Am J Physiol* 259: H1433-H1439, 1990.

Scatton B, Zivkovic B, Dedek J. Antidopaminergic properties of yohimbine. *J Pharmacol Exp Ther*. Nov;215(2):494-9, 1980.

Segawa T, Ito H, Inoue K, Wada H, Minatoguchi S, Fujiwara H. Dopamine releases endothelium-derived relaxing factor via alpha 2-adrenoceptors in canine vessels: comparisons between femoral arteries and veins. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Sep;25(9):669-75, 1998.

Simonneaux V, Ebadi M, Bylund DB.

Identification and characterization of alpha 2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol Pharmacol*. Aug;40(2):235-41, 1991.

Spano, P. F., S. Govoni, And M. Trabucchi. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol*. 19: 155-165, 1978.

Standaert, David G., Young, Anne B., Tratamiento de los trastornos degenerativos del sistema nervioso central. En: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed Mac-Graw-Hill interamericana. 9ª. ed , p.p. 542-545,1997

Strange, Philip G. , Dopamine receptors . School of Animal and Microbial Sciences, University of Reading Whiteknights , *Tocris Review* 1-6 , 2002

Takenaka F, Morishita H. Possible mechanisms involved in the coronary vasodilatory response to dopamine. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* Jul;222(1):81-93,1976.

Titus RD, Kornfeld EC, Jones ND, Clemens JA, Smalstig EB, Fuller RW, Hahn RA, Hynes MD, Mason NR, Wong DT, Foreman MM. Resolution and absolute configuration of an ergoline-related dopamine agonist, trans-4,4a,5,6,7,8,8a,9-Octahydro-5-propyl-1H(or 2H)-pyrazolo[3,4-g]quinoline. *Med Chem.* Aug;26(8):1112-6,1983.

Uichi I., M.D., Kazuyuki Shimada, M.D. Nitric Oxide and Cardiac Failure., *Clin. Cardiol.*, 20:837-41,1997.

Valencia, I., Papel del endotelio sobre las respuestas vasculares y presoras inducidas por agonistas adrenérgicos α . IPN-ESM, México,D.F., 1994.

Van de Voorde J, Leusen I. Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. *Eur J Pharmacol.* Jan 28;87(1):113-20,1983.

Van Tol, H. H. M., J. R. Bunzow, H.-C. Guan, R. K. Sunahara, P. Seeman, H. B. Niznik, And O. Civelli. Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614, 1991.

Vandeputte C, Aiden McCormick P, Docherty JR. Responsiveness to noradrenaline in aorta from wild-type, nitric oxide synthase-2, nitric oxide synthase-3 and alpha_{2A}/D-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol.* Apr 11;466(1-2):129-36, 2003.

Vanhoutte P.M. Endothelial adrenoceptors, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 38:796-808, 2001.

Vanhoutte PM and Miller VM Alpha₂-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med* 87: 1S-5S,1989.

Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J.* Jul;67(7):572-5, 2003.

Velasco M., Luchsinger A. Dopamine: pharmacologic and therapeutic aspects. *Am. J. Ther.* 5: 37-43, 1998.

Wikberg-Matsson A, Simonsen U. Potent alpha(2A)-adrenoceptor-mediated vasoconstriction by brimonidine in porcine ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Aug;42(9):2049-55,2001

Yamauchi M, Kobayashi Y, Hattori K, Yamada K, Nakase A. Dopamine-induced relaxation in human pulmonary arteries. *Experientia.* Feb 15;45(2):150-2,1989

Yamauchi M., Kabayashi Y, Shimoura K., Hattori K, Nakase A. Endothelium-dependent and independent relaxation by dopamine in the rabbit pulmonary artery. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* 19:401-10,1992.

Yeh BK, McNay JL, Goldberg LI. Attenuation of dopamine renal and mesenteric vasodilation by haloperidol: evidence for a specific dopamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug;168(2):303-9,1969.

Zanzottera D, Ferlenga P, Marchini F, Semeraro C. Pharmacological evidence for the presence of a peripheral postjunctional D2-like dopamine receptor in rabbit splenic artery. *Br J Pharmacol.* Feb;123(4):730-6,1998.

Zeng D., Harrison J.K., D'Angelo D.D., Barber C.M., Tucker A.L., Lu Z., Lynch K.R. Molecular characterization of a rat α_{2B} -adrenergic receptor. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 87:3102-3106,1990.