



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA

Efectos vasculares del levamisol y su interacción con la cocaína

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

Presentada por:

Solanye Jacqueline Guerra Ojeda

Dirigida por:

Dr. Martín Aldasoro Celaya

Dra. Lilian Soraya Vallés Martí

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Valencia, 2019

D. Martín Aldasoro Celaya, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Valencia, **Dña. Lilian Soraya Vallés Martí**, profesora titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia y **Dña. María Dolores Mauricio Aviñó**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN: Que **Solanye Jacqueline Guerra Ojeda** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado «**Efectos vasculares del levamisol y su interacción con la cocaína** » para optar al Grado de Doctora.

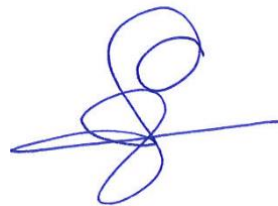
Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 26 de julio de 2019.

Fdo:



Martín Aldasoro Celaya

Fdo:



Lilian Soraya Vallés Martí

Fdo:



Mª Dolores Mauricio Aviñó

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por el Instituto de Salud Carlos III con una ayuda otorgada al proyecto de investigación con referencia PI12/00407 y por COLCIENCIAS (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia) con una beca de doctorado con referencia PDBCEX COLDOC 679.

AGRADECIMIENTOS

¡Esto es todo! Esta es mi tesis doctoral y finalmente la he terminado. Este trabajo es el resultado de 5 años de esfuerzo y dedicación en los que he aprendido mucho más que hacer ciencia. Además, no habría culminado con éxito sin la ayuda de varias personas que no sólo intervinieron directamente en el proceso experimental, sino que también me apoyaron y participaron decisivamente en mi formación profesional y orientación hacia la investigación. Por ello, en este apartado me gustaría expresarles mi gratitud.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Soraya Vallés, co-directora de esta Tesis, quien fue la primera persona que me dio la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación. Gracias por confiar en mí desde el primer momento y acogerme en tu laboratorio.

Al Dr. Martín Aldasoro, co-director de esta Tesis, por su dedicación y supervisión de esta tesis. Gracias por tus charlas en el laboratorio que aliviaban un poco los días ajetreados de protocolo experimental.

A la Dra. María Dolores Mauricio, co-directora de esta Tesis, por haber guiado mis primeros pasos en la técnica del baño de órganos. Gracias por haberme apoyado en todo lo que necesitaba y por responder a todas mis dudas aun cuando nos separaban los husos horarios (tú en Oxford o yo en Coímbra).

Al Dr. José Vila, por abrirme las puertas del laboratorio de fisiología vascular y haber apreciado mi vocación por la investigación. Gracias por transmitirme tus conocimientos que sin lugar a duda me ayudaron a llevar a buen puerto este trabajo.

Al Dr. Luis Such, director del grupo de Electrofisiología Cardíaca Experimental (GRELCA) del Departamento de Fisiología de la Universitat de València, por haber puesto a nuestra disposición el modelo experimental utilizado y su quirófano para la obtención de muestras. A cada uno de los integrantes y colaboradores de su equipo de investigación, a los Dres. Antonio Alberola, Javier Chorro, Irene del Canto, Luis Such Miquel, Germán Parra y Carlos Soler. Especial mención a Oscar Arias y Patricia Genovés por su inestimable ayuda para la organización de los procedimientos experimentales. Gracias a todos por la calidez con la que soy recibida cada vez que me acerco a su laboratorio.

A mi compañera de laboratorio la Dra. Patricia Marchio, por trabajar junto a mí en el laboratorio en jornadas maratónicas, muchas veces hasta horas intempestivas, y por ayudarme en esta Tesis. De ti surgió la idea para iniciar este trabajo y lo has sufrido tanto como yo, por lo que en definitiva no hubiese sido posible sin tu aportación. También dar las gracias a Marc Gimeno,

antiguo compañero y hoy ya doctor, por compartir gratos momentos conmigo en el laboratorio.

Al Departamento de Fisiología de la Universitat de Valencia, en especial a las secretarias Mari y Elena por su amabilidad y prestarme su eficiente ayuda ante cualquier trámite administrativo. También agradecer a Inma, por su simpatía y pequeñas charlas de pasillo.

A mi familia, en especial a mi madre, por enseñarme con su ejemplo a ser independiente y mostrarme el valor de la educación.

Finalmente a Jaime, mi compañero de vida. Gracias por tu comprensión y apoyo en los buenos momentos y en los no tan buenos, y por aguantar mi mal humor cuando llegaba a casa. Por compartir esta experiencia conmigo mientras escribimos la historia de nuestra vida.

RESUMEN

Alrededor del 30% de las visitas al servicio de urgencias por abuso de drogas están relacionadas con complicaciones inducidas por la cocaína sobre el sistema cardiovascular, principalmente como consecuencia de un aumento del tono simpático. El levamisol, fármaco antihelmíntico limitado al uso veterinario por sus efectos adversos en humanos, es el adulterante más frecuente de la cocaína. Al igual que la cocaína, el levamisol bloquea de forma aguda la la recaptación de aminas biógenas, pero sus efectos vasculares no son bien conocidos. Por lo tanto, el objetivo central de este estudio fue evaluar los efectos directos del levamisol y la cocaína en tres arterias diferentes.

Se montaron segmentos de arterias carótida, renal y aorta de 3 mm de longitud, procedentes de 30 conejos sanos, en un sistema de baño de órganos que contenía solución fisiológica (solución de Krebs-Henseleit) para el registro de tensión isométrica. Además, se midió la expresión proteica de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2), de la eNOS y de marcadores de estrés oxidativo (SOD1, SOD2 y Nox4) mediante la técnica de Western Blot.

El levamisol, al igual que la cocaína, no modificó el tono vascular basal. Sin embargo, el levamisol (10^{-3} M) produjo un ligero aumento en la arteria carótida. En vasos contraídos con noradrenalina, el levamisol, pero no la cocaína, indujo una relajación dependiente de la concentración. La administración conjunta de levamisol y cocaína no alteró la respuesta relajante máxima inducida por el levamisol. El levamisol (10^{-4} - 10^{-3} M) redujo la respuesta contráctil a la fenilefrina en todos los lechos estudiados, mientras que la cocaína (10^{-5} M) potenció esta respuesta en la arteria carótida. La administración conjunta de ambas sustancias no modificó la respuesta producida por el levamisol. Tanto el levamisol (10^{-6} - 10^{-4} M) como la cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) evocaron una potenciación dependiente de la concentración del estímulo nervioso simpático. Este efecto aumentó aún más con la combinación

de levamisol (10^{-4} M) y cocaína (10^{-4} M) en las arterias carótida y renal. Sin embargo, una mayor concentración de levamisol (10^{-3} M) anuló la respuesta contráctil al estímulo simpático solo o en presencia de cocaína en todos los lechos vasculares. La respuesta relajante a la acetilcolina se redujo en presencia de levamisol, mientras que la cocaína solo la disminuyó en las arterias renal y aorta. Una menor relajación dependiente del endotelio inducida por ambas sustancias se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo que conduciría a disminuir la biodisponibilidad de NO. Ninguna de estas sustancias modificó la relajación inducida por el nitroprusiato sódico.

La exposición aguda al levamisol y cocaína también produjo cambios a nivel molecular en los vasos estudiados. El levamisol y la cocaína a bajas concentraciones disminuyeron la expresión proteica de los receptores α_2 -adrenérgicos, mientras que los receptores α_1 -adrenérgicos solo fueron infra expresados en presencia de altas concentraciones de levamisol. La cocaína redujo la expresión proteica de los receptores α_1 adrenérgicos en la arteria renal. Por otro lado, el levamisol disminuyó la expresión proteica de la eNOS en la aorta, mientras que la cocaína solo lo hizo en las arterias renal y aorta. Tanto el levamisol como la cocaína aumentaron la expresión proteica de la enzima prooxidante Nox4 en la arteria renal. Paradójicamente, el levamisol infra expresó esta enzima en la arteria carótida. La expresión de las enzimas antioxidantes SOD1 y SOD2 se redujo en presencia de levamisol o cocaína tanto en la arteria renal como en la aorta.

Estos resultados indican que: 1) dependiendo de la concentración el levamisol se comporta como un antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 , 2) el levamisol a bajas concentraciones potencia los efectos de la cocaína a nivel presináptico, lo que se traduce en un sinergismo, 3) el levamisol disminuye la respuesta relajante a la acetilcolina de forma concentración-dependiente en los tres vasos estudiados, mientras que la

cocaína solo afecta a las arterias renal y aorta. La combinación de levamisol y cocaína no altera la respuesta producida por el levamisol, 4) la disfunción endotelial inducida por ambas sustancias puede estar relacionada con un aumento de estrés oxidativo.

ABSTRACT

About 30% of Emergency Department visits for drug abuse are related to cocaine cardiovascular toxicity, mainly secondary to an increased sympathetic tone. Levamisole, a veterinary anthelmintic drug, is the most used cocaine adulterant. Like cocaine, levamisole acutely blocks noradrenaline reuptake, but its vascular effects are not well known. Therefore, the main purpose of this study was to evaluate the direct effects of levamisole and cocaine in three different arteries.

Rings (3 mm long) of carotid and renal arteries and the aorta from 30 healthy rabbits were mounted for isometric tension recording in organ bath chambers containing Krebs-Henseleit solution. α_1 and α_2 -adrenergic receptors, eNOS, SOD1 and SOD2, and Nox4 protein expression was measured by Western Blot.

Only levamisole at the highest concentration (10^{-3} M) slightly increased basal vascular tone, effect limited to carotid artery. In vessels contracted with noradrenaline, only levamisole induced a concentration-dependent relaxation. Levamisole (10^{-4} - 10^{-3} M) reduced the contractile response to phenylephrine, while cocaine (10^{-5} M) enhanced this response in the carotid artery. Co-administration of both substances did not modify levamisole response. Both levamisole (10^{-6} - 10^{-4} M) and cocaine (10^{-6} - 10^{-4} M) produced a concentration-dependent potentiation of the electrical field stimulation. This effect was further enhanced by the combination of levamisole (10^{-4} M) and cocaine (10^{-4} M) in the carotid and renal arteries. However, levamisole (10^{-3} M) abolished adrenergic neurotransmission alone or in the presence of cocaine. The relaxing response to acetylcholine was reduced by levamisole, while cocaine decreased relaxation only in the renal artery and aorta. Impaired relaxation induced by both substances was associated with increased oxidative stress. Neither cocaine nor levamisole

modified the relaxation induced by sodium nitroprusside. Levamisole and cocaine also induced vessels changes at molecular level. Lower concentrations of each substance reduced α_2 adrenergic receptor protein expression whereas α_1 expression was only reduced by higher concentrations of levamisole. Cocaine decreased α_1 expression only in the renal artery. Furthermore, cocaine reduced eNOS protein expression in both renal artery and aorta, whereas levamisole did it only in the aorta. Both cocaine and levamisole increased Nox4 protein expression in the renal artery. However, levamisole reduced its expression in the carotid artery. SOD1 and SOD2 expression was reduced by both substances in the renal artery and aorta.

In conclusion, 1) depending on concentration, levamisole acts as a non-selective antagonist of α_1 and α_2 adrenergic receptors; 2) lower concentrations of levamisole enhances the effects of cocaine at presynaptic level, resulting in synergism; 3) levamisole decreases the relaxation to acetylcholine in a concentration dependent manner in the three vessels while cocaine does it only in the renal artery and aorta. 4) The endothelial dysfunction induced by both substances may be related to increased oxidative stress.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

ADMA	Ng, Ng-dimetil-L-arginina asimétrica
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANCA	Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos
BH4	Tetrahidrobiopterina
Big ET-1	Proendotelina
COX	Ciclooxigenasa
DAT	Transportador de dopamina
DEA	Administración de Control de Drogas de los Estados Unidos
EDH	Hiperpolarización derivada del endotelio
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavín adenina dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GSHpx	Glutación peroxidasa
GTP	Guanosina 5-trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Receptores de prostaciclina
K _{ATP}	Canales de K ⁺ activados por ATP
Kir	Canales de K ⁺ rectificadores de entrada
L-NAME	Ng-nitro-L-arginina metil éster
L-NArg	Ng-nitro-L-arginina
L-NMMA	Ng-monometil-L-arginina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAO	Monoamino oxidasa
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptores nicotínicos de la acetilcolina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NET	Transportador de noradrenalina
NFκB	Factor nuclear kappa-B
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
Nox	NADPH oxidasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo

ONOO-	Peroxinitrito
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMPc
PPAR γ	Proliferador de peroxisomas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
sCD40L	Ligando CD40 soluble
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
TNF	Factor de necrosis tumoral
Trx	Thioredoxina peroxidasa
TXA ₂	Tromboxano A ₂
XO	Xantina oxidasa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Regulación del tono vascular	3
1.1. Factores relajantes derivados del endotelio.....	3
1.1.1. Óxido nítrico	3
1.1.2. Prostanoides	6
1.1.3. Hiperpolarización derivada del endotelio	7
1.2. Factores contráctiles derivados del endotelio	8
1.2.1. Endotelina-1	8
1.2.2. Factores contráctiles derivados de la ciclooxigenasa.....	9
2. Sistema simpático.....	10
3. Disfunción endotelial	11
3.1. Regulación de las especies reactivas de oxígeno	11
3.2. Estrés oxidativo vascular.....	13
4. Cocaína.....	14
4.1. Estructura química	15
4.2. Farmacocinética	16
4.3. Mecanismos de acción	17
4.4. Efectos farmacológicos	18
4.5. Efectos vasculares	19
4.5.1. Efectos agudos	19
4.5.2. Efectos crónicos	22
4.6. Adulteración de la cocaína.....	22
5. Levamisol.....	23
5.1. Estructura química	24
5.2. Farmacocinética	25
5.3. Mecanismos de acción	25
5.4. Efectos farmacológicos	26
5.5. Efectos vasculares	28
6. Cocaína adulterada con levamisol.....	28
6.1. Efectos adversos de la cocaína adulterada con levamisol.....	29
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Animales de experimentación.....	41
2. Extracción de las muestras	41
3. Estudio de la reactividad vascular.....	43
3.1. Preparación de las muestras para el baño de órganos	43
3.2. Respuesta al KCl.....	45

3.3. Curvas concentración-respuesta.....	45
3.3.1. Levamisol.....	46
3.3.2. Cocaína.....	46
3.3.3. Fenilefrina	46
3.3.4. Acetilcolina	47
3.3.5. Nitroprusiato sódico	47
3.4. Obtención de las curvas frecuencia-respuesta.....	48
3.5. Soluciones y fármacos.....	48
4. Análisis de la expresión proteica mediante western blot	49
4.1. Incubación de arterias	49
4.2. Extracción y cuantificación de proteínas	49
4.3. Separación y transferencia de proteínas.....	50
4.4. Inmunodetección.....	50
5. Estadística	52
RESULTADOS	53
1. Efectos del levamisol y cocaína sobre el tono basal	55
2. Efecto del levamisol sobre la respuesta contráctil a distintos agonistas ...	57
3. Participación de receptores adrenérgicos sobre la respuesta relajante del levamisol	59
4. Participación de los factores endoteliales sobre la respuesta relajante del levamisol	61
5. Efectos de la cocaína en arterias precontraídas con noradrenalina y su interacción con el levamisol.....	63
6. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta inducida por agonistas contráctiles	64
6.1. Respuesta al KCl.....	64
6.2. Respuesta adrenérgica inducida por fenilefrina	66
6.3. Respuesta al estímulo nervioso simpático.....	72
6.3.1. Naturaleza del estímulo eléctrico	72
6.3.2. Curvas frecuencia-respuesta.....	73
7. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta relajante dependiente del endotelio	80
7.1. Participación de radicales libres en la respuesta al levamisol y a la cocaína.....	86
8. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta relajante independiente del endotelio.....	91
9. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la expresión proteica	93
DISCUSIÓN	101
1. Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental	103
2. Arterias de conejo como modelo experimental.....	104
3. Efectos del levamisol y de la cocaína sobre el tono vascular	104

4. Efectos del levamisol y de la cocaína sobre la respuesta contráctil.....	107
4.1. Respuesta contráctil inespecífica	108
4.2. Respuesta contráctil dependiente de receptor	108
4.3. Estudio de la expresión proteica de los receptores α -adrenérgicos..	112
5. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta relajante	113
5.1. Arteria carótida.....	115
5.2. Arteria renal	116
5.3. Aorta.....	117
6. Consideraciones finales.....	117
CONCLUSIONES	121
CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAFÍA	129

INTRODUCCIÓN

1. Regulación del tono vascular

El tono vascular está determinado por el balance entre la vasodilatación y vasoconstricción del músculo liso vascular. Está regulado por la influencia simultánea de hormonas circulantes, derivados plaquetarios, neurotransmisores y la producción de sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio [1].

El endotelio reviste la cara interna de la vasculatura y ejerce una función dual, mediante la secreción de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH) y factores vasoconstrictores como el tromboxano (TXA₂), la endotelina-1 (ET-1) y el anión superóxido (O₂⁻), en respuesta a diferentes estímulos humorales, y/o mecánicos [1, 2]. Es considerado un importante regulador de la homeostasis vascular local, ya que mantiene el equilibrio entre vasodilatación y vasoconstricción; inhibición y promoción de la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular; prevención y estimulación de la adhesión y agregación plaquetaria así como en la trombogénesis y la fibrinólisis [2].

1.1. Factores relajantes derivados del endotelio

1.1.1. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un vasodilatador dependiente del endotelio, que contribuye al mantenimiento del tono vascular mediante su acción dilatadora en los vasos sanguíneos [1]. Además, tiene efectos adicionales sobre la neurotransmisión, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico [3]. Actualmente, es considerado una molécula antiaterosclerótica debido a sus propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antiplaquetarias y

antiproliferativas [4]. En su estructura posee un electrón desapareado, por lo que se le considera un radical libre capaz de reaccionar rápidamente con otras moléculas que contienen electrones no apareados y con metales de transición como el hierro hemínico [5].

El NO es generado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual se han identificado tres isoformas: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). La nNOS se expresa en neuronas y actúa como un mensajero neuronal que regula la liberación de neurotransmisores sinápticos [6, 7], la iNOS, que es inducible, sólo se expresa en células que han estado expuestas a mediadores inflamatorios u otros estímulos nocivos que activan los macrófagos [7, 8], y la eNOS se expresa principalmente en células endoteliales, aunque también se ha detectado en cardiomiocitos, plaquetas y otras células [7].

En respuesta a estímulos físico-químicos como la tensión de cizallamiento, o a agonistas dependientes de receptor como la acetilcolina, la bradiquinina o la sustancia P, se produce un aumento de calcio en la célula endotelial que se une a la calmodulina. El complejo Ca^{2+} -calmodulina resultante inicia la activación de la eNOS (Figura 1). La eNOS activada genera NO y L-citrulina a partir de L-arginina, O_2 y NADPH [7]. La generación de NO requiere de una serie de cofactores esenciales como la tetrahidrobiopterina (BH_4), flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD) [9]. Una vez sintetizado, el NO difunde al músculo liso vascular, donde se une y activa la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), que cataliza la conversión de guanosina 5-trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) [10]. El aumento de los niveles de GMPc activa la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) responsable de la vasodilatación mediante la reducción del calcio citosólico regulado por diferentes mecanismos [11].

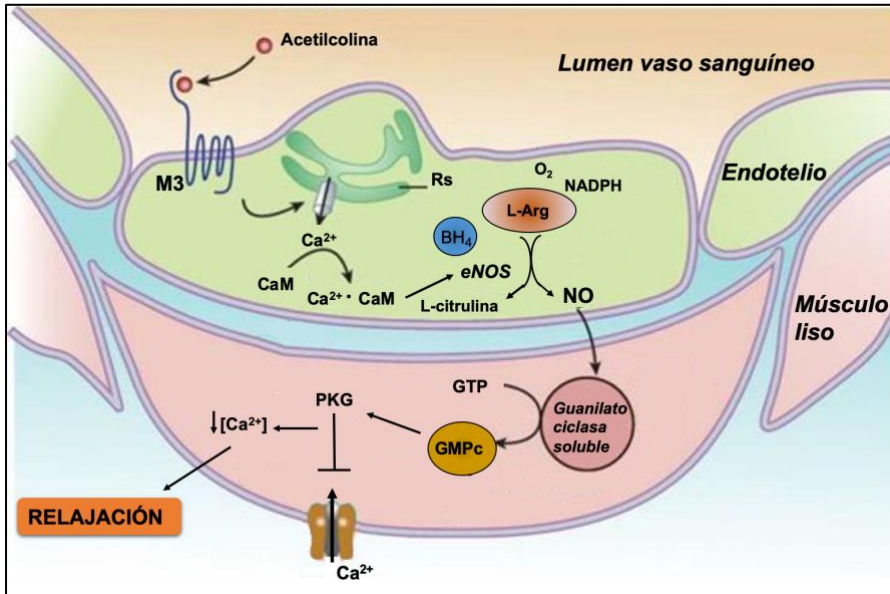


Figura 1. Esquema de la vía de formación de NO y relajación vascular a través del GMPc. **M3**: receptor muscarínico; **Rs**: retículo sarcoplásmico; **CaM**: calmodulina; **BH₄**: tetrahidrobiopterina; **eNOS**: óxido nítrico sintasa endotelial; **L-Arg**: NG-nitro-L-arginina; **NADPH**: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato; **GTP**: guanosina 5-trifosfato; **GMPc**: guanosina monofosfato cíclica; **PKG**: proteína quinasa dependiente de GMPc. Imagen adaptada de [12].

La reacción del NO con el grupo hemo de la hemoglobina, que actúa como un depurador intravascular, es la principal vía metabólica para su eliminación. In vivo, el NO difunde al eritrocito donde reacciona con la oxihemoglobina originando nitratos, lo cual limita su vida media biológica entre 1 y 10 segundos [5, 13].

En la actualidad, la inhibición farmacológica del NO se consigue principalmente mediante inhibidores de la NOS, y en menor medida, de los segundos mensajeros [14]. Los inhibidores de la NOS son análogos de la L-arginina. Existen dos inhibidores endógenos: NG, NG-dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA) y NG-monometil-L-arginina (L-NMMA). El ADMA es potente y no competitivo, mientras que el L-NMMA es menos potente y

competitivo [15]. Los inhibidores exógenos más importantes son el N_G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y la N_G-nitro-l-arginina (L-Arg). Ambos son inhibidores no selectivos de la NOS [16].

1.1.2. Prostanoides

Los prostanoides son una familia de compuestos lipídicos sintetizados a partir del ácido araquidónico [17]. En el sistema cardiovascular, la PGI₂ y el TXA₂ son los prostanoides que participan en la regulación del tono vascular. Su producción es catalizada por la enzima ciclooxigenasa (COX) de la cual existen dos isoformas, COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa constitutivamente en las células endoteliales y puede sobreexpresarse en situaciones de incremento de la tensión de cizallamiento, mientras que la COX-2 se induce a menudo cuando el endotelio está dañado y expuesto a citoquinas inflamatorias. Sin embargo, la COX-2 también se expresa constitutivamente en varios órganos y tipos de células, incluidas las endoteliales, donde su expresión también se ve aumentada por un incremento en la tensión de cizallamiento. La indometacina puede inhibir la actividad de la COX, actuando de forma no selectiva para la COX-1 y 2 [18].

La COX-2 parece ser la principal responsable de la generación de PGI₂. La COX-2 convierte el ácido araquidónico en prostaglandina H₂ (PGH₂), que por acción de la prostaciclina sintasa se transforma en PGI₂. La PGI₂ se une a los receptores de prostaciclina (IP) que se encuentran tanto en las plaquetas como en las células del músculo liso vascular. La activación de los receptores IP plaquetarios conduce a la inhibición de la agregación plaquetaria. La unión de la PGI₂ al receptor IP vascular activa la adenilato ciclasa que induce la síntesis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) y disminuye el calcio intracelular responsable de la vasodilatación [19].

Se ha descrito una relación compensatoria entre la relajación mediada por NO y PGI₂. Si bien en presencia de NO el bloqueo de la PGI₂ no tiene mucho efecto, cuando se reduce la producción de NO, la PGI₂ compensa en parte la relajación [20].

A diferencia de la PGI₂, el TXA₂ produce vasoconstricción y agregación plaquetaria, y deriva predominantemente de la COX-1 plaquetaria, aunque también puede ser generada por las células endoteliales [17].

El equilibrio en la actividad de la PGI₂ y el TXA₂ ayuda a mantener la homeostasis en el vaso sanguíneo. La importancia de este equilibrio se hace evidente cuando se utilizan inhibidores selectivos de la COX-2 como antiinflamatorios, lo que disminuye la producción de PGI₂ sin afectar la producción de TXA₂, lo cual producirá vasoconstricción y agregación plaquetaria aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares [21].

1.1.3. Hiperpolarización derivada del endotelio

El endotelio controla el tono vascular no sólo mediante la liberación de varias sustancias vasoactivas, sino también por otra vía asociada a la hiperpolarización de las células endoteliales y del músculo liso, denominada hiperpolarización dependiente del endotelio (EDH). Esta respuesta se manifiesta cuando las células endoteliales son activadas por agonistas como la bradiquinina y la acetilcolina, o la tensión de cizallamiento [22, 23]. El NO y la PGI₂ pueden producir vasodilatación hiperpolarizando las células del músculo liso, aunque sea por un corto período de tiempo, antes de que sus mecanismos de acción se manifiesten [23]. Sin embargo, cuando la síntesis de NO y PGI₂ están inhibidas, persiste la hiperpolarización, lo cual sugiere la implicación de otras vías [22].

El mecanismo de acción propuesto para el EDH se inicia con el aumento en la concentración del calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ de las células endoteliales. Este aumento conlleva la apertura de canales de K^+ activados por calcio (K_{Ca}) de baja e intermedia conductancia, con la consiguiente salida de iones K^+ al espacio intersticial y la hiperpolarización de las células endoteliales. El acoplamiento eléctrico directo a través de las uniones mioendoteliales tipo gap y/o la acumulación de iones K^+ en el espacio intersticial que activan en el músculo liso, la bomba $Na^+K^+ATPasa$ y los canales de K^+ rectificadores de entrada (K_{ir}) evocarán la hiperpolarización de las células del músculo liso [21, 23]. La hiperpolarización disminuye la entrada de Ca^{2+} al músculo liso por el cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje produciendo finalmente vasodilatación [25].

Además, se ha propuesto otro mecanismo hiperpolarizante del músculo liso, en el que no es necesaria la hiperpolarización de las células endoteliales. En este caso factores como el NO, la PGI_2 , los ácidos epoxyecosatrienoicos (EETs), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el monóxido de carbono, activan diferentes familias de canales de K^+ , predominantemente los activados por calcio de alta conductancia y/o los activados por ATP (K_{ATP}), que son bloqueados por la iberotoxina o la glibenclamida, respectivamente [25, 26].

1.2. Factores contráctiles derivados del endotelio

1.2.1. Endotelina-1

La endotelina (ET) es un péptido vasoconstrictor con tres isoformas: ET-1, ET-2 y ET-3 [27]. Las células endoteliales sólo liberan ET-1 convirtiendo la proendotelina (Big ET-1) en ET-1 mediante la enzima convertidora de endotelina [27]. La producción de ET-1, así como su

liberación, es estimulada por factores inflamatorios como las interleucinas (IL) y el factor de necrosis tumoral (TNF), y la disminución de NO y PGI₂ [28].

Se han identificado receptores para la ET-1 tanto en las células del músculo liso (ET_A y ET_B) como en las células endoteliales (ET_B), y su distribución depende del tipo de lecho vascular [29]. Por ejemplo, la relación ET_A/ET_B en venas, es menor que en arterias. Cuando la ET-1 se une a los receptores ET_A o ET_B de las células del músculo liso, los canales de Ca²⁺ se abren permitiendo la entrada del Ca²⁺ extracelular produciendo vasoconstricción. Sin embargo, la activación de los receptores ET_B endoteliales induce la liberación de NO y PGI₂ [30] ejerciendo como modulador de la contracción inducida por la ET-1.

1.2.2. Factores contráctiles derivados de la ciclooxigenasa

Actualmente se considera que los factores contráctiles derivados del endotelio que dependen de la COX desempeñan un papel primordial. Se ha demostrado que el ácido araquidónico es capaz de inducir contracciones dependientes del endotelio en arterias y venas y que este efecto es inhibido por bloqueantes de la COX [31]. Estudios experimentales han identificado al TXA₂ y a la prostaglandina H₂ como los principales factores derivados de la COX con efecto vasoconstrictor [31]. Además, la PGI₂, cuyo efecto es vasodilatador, también es capaz de comportarse como un vasoconstrictor bajo condiciones patológicas como la hipertensión. Los derivados de la COX difunden al músculo liso vascular y mediante la activación de receptores TP producen vasoconstricción, agregación plaquetaria y proliferación del músculo liso vascular [31].

2. Sistema simpático

El sistema simpático es un regulador crítico del tono vascular y la presión arterial, desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y las funciones fisiológicas. Los estímulos extrínsecos, como el estrés, el trauma, la hemorragia y el dolor, pueden elevar la actividad simpática, resultando en un aumento de la resistencia vascular. Los nervios simpáticos inervan principalmente a las grandes arterias y las arteriolas precapilares [32]. La noradrenalina (NA) es el principal neurotransmisor simpático y actúa sobre diferentes poblaciones de receptores adrenérgicos clasificados en α_1 , α_2 , β_1 , y β_2 [33]. Los receptores α_1 están localizados en las células del músculo liso y cuando se activan participan en el aumento del $[Ca^{2+}]_i$, evocando una respuesta vasoconstrictora [33]. Los receptores α_2 se localizan a nivel presináptico y postsináptico, tanto en el músculo liso vascular como en el endotelio. A nivel presináptico, su activación aumenta la recaptación de NA liberada durante la neurotransmisión simpática, reduciendo la vasoconstricción [34]. A nivel postsináptico, la activación de los receptores α_2 del músculo liso disminuye la actividad de la adenilato ciclasa, inhibiendo la liberación de AMPc que conlleva a un aumento del $[Ca^{2+}]_i$, lo que resulta en una respuesta vasoconstrictora [34]. La estimulación de los α_2 endoteliales reduce la vasoconstricción al favorecer la liberación de NO [35].

Por otro lado, la activación de los receptores β_1 y β_2 inducen vasodilatación. Estos receptores se encuentran en el músculo liso y su estimulación conduce al aumento de la adenilato ciclasa, promoviendo la producción de AMPc que conlleva a la disminución del $[Ca^{2+}]_i$. Además, la vasodilatación también se puede producir a través de la hiperpolarización de las células del músculo liso, probablemente a través de la activación de los

canales K_{ATP} [36]. También se ha demostrado que los β_2 localizados en el endotelio pueden contribuir a la vasodilatación mediante la liberación de NO [34].

3. Disfunción endotelial

La disfunción endotelial se define como la alteración de la función normal del endotelio que causa interacciones no adaptativas en la pared vascular y que contribuyen al inicio y/o progresión de enfermedades cardiovasculares [37]. Esta alteración puede aparecer como resultado de variaciones de los patrones de flujo sanguíneo, o por un desequilibrio en la producción de factores relajantes y contráctiles; mediadores procoagulantes y anticoagulantes; o de elementos inhibidores y promotores del crecimiento vascular [37]. Se considera que el principal mecanismo que contribuye a la disfunción endotelial es la disminución de la biodisponibilidad de NO, bien por disminución de la síntesis o bien por aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la pared vascular [37, 38]. En cualquier caso, la reducción de la biodisponibilidad de NO favorece la trombosis, la infiltración de macrófagos, el crecimiento celular y la respuesta inflamatoria [38]. Además, puede desencadenar la liberación de sustancias contráctiles derivadas del endotelio, como prostanoïdes contráctiles y ET-1 que amplifican el grado de disfunción endotelial [38].

3.1. Regulación de las especies reactivas de oxígeno

Las ROS son un grupo de moléculas derivadas del oxígeno y generadas principalmente por las mitocondrias durante los procesos normales oxidativos del metabolismo. Las principales ROS son el O_2^- y sus derivados,

el H_2O_2 y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Niveles basales de ROS pueden activar la eNOS, iniciando la relajación dependiente de endotelio en varios lechos vasculares [38]. En el caso del $\text{O}_2\cdot^-$, concentraciones fisiológicas son efectivamente eliminadas por las tres isoformas de la superóxido dismutasa (SOD) vascular, un enzima antioxidante. La SOD convierte el $\text{O}_2\cdot^-$ en H_2O_2 , que a su vez se descompone en agua y O_2 por la acción de enzimas antioxidantes como la catalasa, la glutatión peroxidasa (GSHpx) o la thio redoxina peroxidasa (Trx) [39]. El H_2O_2 difunde al músculo liso y produce hiperpolarización lo que resulta en una respuesta vasodilatadora [40] (Figura 2).

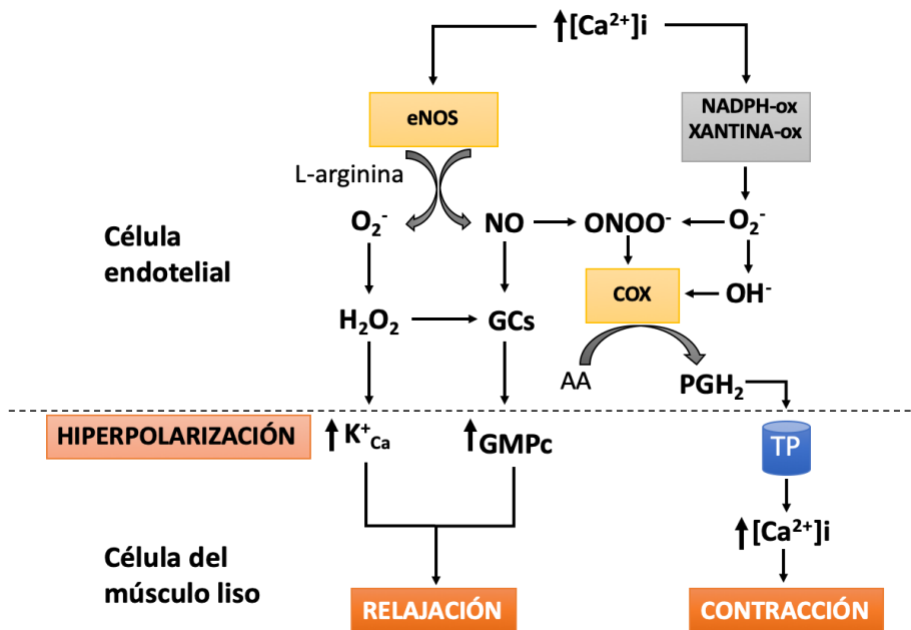


Figura 2. Interacción del óxido nítrico y superóxido en la regulación del tono vascular dependiente del endotelio. **eNOS**: óxido nítrico sintasa endotelial; $\text{O}_2\cdot^-$: anión superóxido; **NO**: óxido nítrico; **H₂O₂**: peróxido de hidrógeno; **GCS**: guanilato ciclasa soluble; K^+_{Ca} : canales de K^+ activados por calcio; **GMPc**: guanosina monofosfato cíclica; **ONOO⁻**: peroxinitrito; **COX**: ciclooxigenasa; **OH[·]**: radical hidroxilo; **AA**: ácido araquidónico; **PGH₂**: prostaglandina H₂; **TP**: receptor TP. Imagen adaptada de [40].

3.2. Estrés oxidativo vascular

El incremento de la producción de ROS implica estrés oxidativo y se caracteriza por un desequilibrio entre los sistemas prooxidante y antioxidante [41]. Aunque la principal fuente de O_2^- vascular es la NADPH oxidasa (Nox), otras enzimas como la xantina oxidasa (XO), la eNOS desacoplada, COXs, lipoxigenasas, monooxigenasas del citocromo P450 o la propia cadena de transporte de electrones mitocondriales, también pueden estar implicadas en la producción de ROS [42]. La Nox reduce el oxígeno a O_2^- el cual reacciona con el NO formando peroxinitrito (ONOO $^-$), que a su vez desactiva la producción de NO disminuyendo su biodisponibilidad e induciendo disfunción endotelial [41]. También se ha demostrado que el ONOO $^-$ es capaz de inactivar la PGI_2 a través de la nitración de tirosina [38], lo que resulta en una producción de agentes vasoconstrictores como el TXA_2 o la PGH_2 [43] aumentando con ello el tono vascular. Adicionalmente, el O_2^- puede transformarse en OH $^-$, un radical altamente reactivo y tóxico para la mayoría de los componentes celulares [39, 40]. Al igual que el ONOO $^-$, el OH $^-$ también cataliza la producción de prostanoïdes vasoconstrictores [40].

Otra consecuencia del estrés oxidativo vascular es la activación de factores de transcripción que regulan procesos inflamatorios, como el factor nuclear kappa-B (NF κ B) o el receptor- γ activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) [44, 45]. El aumento de ROS activa al NF κ B, el cual induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , que a su vez promueve la síntesis de factores inflamatorios y el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que permite el reclutamiento y la adhesión de neutrófilos y otras células inflamatorias [44]. Además, el aumento de ROS atenúa la expresión y actividad del PPAR γ en la

pared vascular, disminuyendo su acción antiinflamatoria y la producción de NO [45].

4. Cocaína

La cocaína es un alcaloide natural extraído de las hojas de la planta de *Erythroxylum coca*, originaria y cultivada en Suramérica, aislado por primera vez en 1859 por Albert Niemann [46]. Es un fuerte estimulante del SNC, usado principalmente como droga recreativa de consumo ilegal, aunque también se le atribuyen aplicaciones médicas como anestésico tópico o antihemorrágico en algunas cirugías [47].

Es el estupefaciente ilegal más consumido en Europa, con mayor prevalencia en los países del sur y el oeste. De acuerdo con el Informe Europeo sobre Drogas correspondiente al año 2018 elaborado por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, se estima que 2,3 millones de jóvenes europeos entre 15 y 34 años (1,9% de la prevalencia global) han consumido cocaína en el último año [48], registrándose una prevalencia del 2,5% o superior en Dinamarca, Irlanda, España, los Países Bajos y el Reino Unido [48] (Figura 3).

En España, el consumo de cocaína representó más del 30% de las consultas a los servicios de emergencias relacionadas con el abuso de drogas ilícitas registradas entre 2013 y 2016 en la Red Europea de Emergencias en materia de Drogas (EURO-DEN) [49]. Si bien el consumo de esta sustancia es el factor común en la mayoría de las urgencias (traumatismos o infecciones), la intoxicación es la causa más frecuente de estas visitas. Los principales síntomas de la intoxicación por cocaína se producen por sus efectos estimulantes sobre el SNC como agitación, convulsiones y psicosis; y

sobre el sistema cardiovascular como taquicardias, hipertensión o arritmias [50].

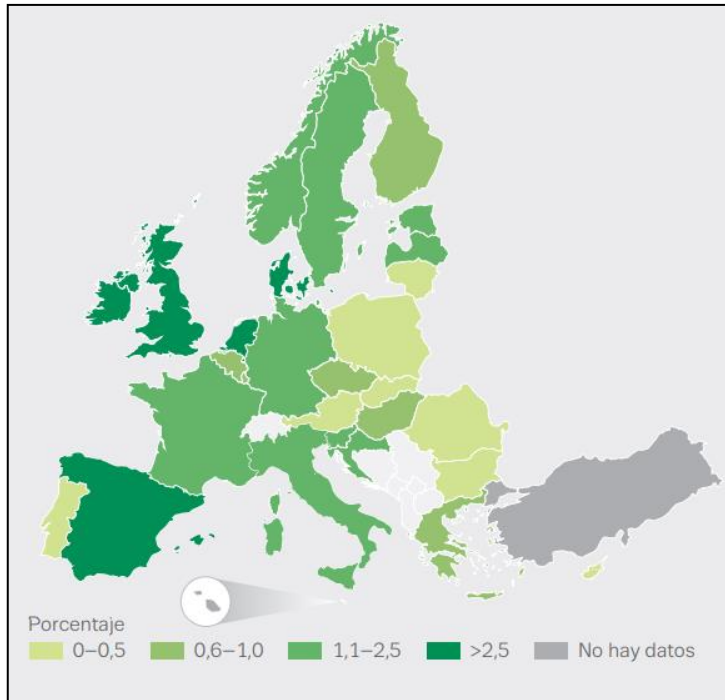


Figura 3. Prevalencia del consumo de cocaína en el último año entre jóvenes europeos (15-34 años). Imagen tomada del Informe Europeo sobre Drogas correspondiente al año 2018 [48].

4.1. Estructura química

La cocaína, desde el punto de vista químico, se denomina benzoilmetilecgonina, un éster del ácido benzoico y una base aminoalcohólica relacionada con la atropina que contiene nitrógeno. Esta estructura con dos dominios, hidrofílicos (amina) e hidrofóbico (anillo aromático) unidos por un éster, puede ser la responsable de sus acciones como anestésico local [51] (Figura 4).

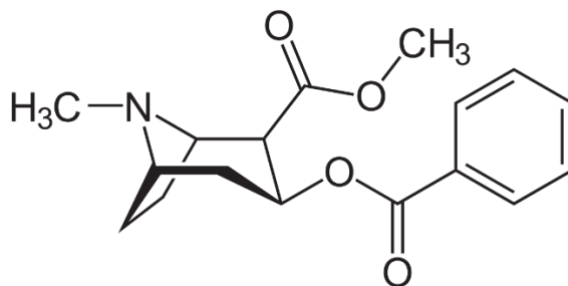


Figura 4. Estructura química de la cocaína.

4.2. Farmacocinética

La concentración plasmática de cocaína varía dependiendo de la vía de administración. La vía intravenosa e inhalatoria son más rápidas que la oral y alcanzan valores plasmáticos superiores. En estudios controlados en consumidores habituales voluntarios, los valores plasmáticos (Tabla 1) oscilan entre 0,1 y 1,25 μM mientras que los valores en consumidores que acuden a urgencias, oscilan entre 0,1 y 120 μM [52–54].

Una vez absorbida, la cocaína se distribuye por todo el organismo, teniendo especial afinidad por el cerebro, ya que atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica debido a su alta liposolubilidad. El volumen de distribución varía entre 1,5 a 2 L/kg [55, 56].

La ruta principal para el metabolismo de la cocaína involucra la hidrólisis de cada uno de sus dos grupos éster, por acción de las esterasas hepáticas y plasmáticas, a metabolitos activos e inactivos que son finalmente excretados en la orina [57]. La benzoilecgonina es el principal metabolito urinario y puede ser detectado entre 2 hasta 5 días después de consumo moderado [56, 57].

La eliminación de la cocaína es muy rápida, variando entre 20 a 30 ml/min/kg. La semivida plasmática varía entre 60 y 120 min y la de sus

metabolitos entre 4 y 7 horas [55, 56]. Estas semividas se pueden prolongar considerablemente con dosis repetidas.

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de cocaína según la vía de administración.

Vía administración	Dosis (mg)	Concentración plasmática (μM)	Pico efecto máximo (min)	Estudio
Intravenosa	20-50	0,4 – 3	inmediato	[58, 59]
Inhalatoria	10-50	0,1 – 1,25	<3	[59, 60]
Nasal	100	1	20 - 40	[57]
Oral	100 - 200	0,3 – 0,9	60 - 120	[61]

4.3. Mecanismos de acción

En los efectos fisiológicos de la cocaína están implicados al menos dos mecanismos de acción. Por una parte, la cocaína es un inhibidor de la recaptación de aminas biógenas como la dopamina, la noradrenalina o la serotonina, aumentando su biodisponibilidad en la hendidura sináptica y potenciando su actividad en los receptores postsinápticos. En este sentido, se ha comprobado que la cocaína se une al transportador de dopamina (DAT) de las terminaciones nerviosas [62] aunque también están descritas sus acciones sobre los receptores postsinápticos D₁ y D₂ [63]. Del mismo modo, el exceso de noradrenalina y serotonina se debe al bloqueo de los transportadores de noradrenalina (NET) y serotonina (SERT), dando lugar a la activación indirecta de los receptores del sistema adrenérgico y serotoninérgico [64–66]. Por lo tanto, la cocaína se comporta como un agente simpaticomimético [67].

Por otra parte, la cocaína se puede unir a varios canales iónicos activados por voltaje que se encuentran en las células excitables. Así, la cocaína (10-50 μM) inhibe los canales de sodio (Na^+), observándose una clara disminución de la corriente rápida de entrada de Na^+ (I_{Na}) y de la fase inicial del potencial de acción. De esta forma, la conducción del impulso se vuelve más lenta y la probabilidad de propagación del potencial de acción disminuye [68]. Estas acciones contribuyen al efecto anestésico local de la cocaína.

Además, la cocaína disminuye la corriente de K^+ por inhibir los K_{ir} . Esto se traduce en una alteración de la repolarización temprana asociada a la prolongación del intervalo QT. Este mecanismo es el responsable de la taquicardia ventricular asociada al consumo de cocaína [69].

Finalmente, también se ha demostrado la acción directa de la cocaína sobre los canales de calcio tipo L con un efecto dual. Mientras que a elevadas concentraciones (30 - 100 μM) los inhibe (acortando la duración del potencial de acción), a bajas concentraciones (0,1 - 1 μM) los activa y por tanto, prolonga la duración del potencial de acción [70, 71]. Estos efectos están relacionados con las propiedades arritmogénicas del consumo de cocaína [69].

4.4. Efectos farmacológicos

Los efectos farmacológicos de la cocaína se producen sobre todo en el SNC y la rama simpática del sistema nervioso autónomo. A nivel de aparatos y sistemas, los efectos de la cocaína se ejercen fundamentalmente sobre el sistema cardiovascular.

El efecto agudo predominante de la cocaína en el SNC es una intensa euforia asociada a una mayor estimulación del sistema dopaminérgico. Esta fase eufórica puede ir acompañada de hiperactividad motora y verbal, insomnio y alucinaciones a la vez que disminuye el apetito y la sensación de

cansancio. Finalizado este efecto agudo aparece un periodo de cansancio, fatiga y desánimo [72].

Los efectos periféricos de la cocaína se desarrollan principalmente sobre el sistema nervioso simpático. La inhibición de la recaptación de noradrenalina produce un efecto simpaticomimético sobre los receptores α y β -adrenérgicos. Esto se traduce a nivel vascular en un aumento de la vasoconstricción y por lo tanto de la presión arterial, y a nivel cardiaco en un aumento de la frecuencia cardiaca y de la fuerza de contracción [73, 74]. Por otro lado, la cocaína produce alteraciones en el ritmo cardiaco, pudiendo actuar como anestésico local mediado por el bloqueo de los canales de sodio y potasio [74].

4.5. Efectos vasculares

Aunque los efectos más importantes de la cocaína se deben a sus acciones estimulantes sobre el sistema nervioso central, en la tesis nos vamos a centrar únicamente en sus acciones vasculares. En este sentido, los efectos se pueden dividir en dos bloques atendiendo a los efectos agudos y crónicos.

4.5.1. Efectos agudos

Los efectos agudos de la cocaína sobre los vasos sanguíneos se centran en la pérdida de las funciones protectoras del endotelio (Figura 5), siendo la vasoconstricción y la trombosis los primeros en manifestarse.

Aunque en una fase temprana la cocaína produce vasodilatación, el efecto más destacado es la vasoconstricción. La acción vasodilatadora temprana puede ser atribuida a su efecto como bloqueante de los canales de Na^+ [75] mientras que la respuesta vasoconstrictora es multifactorial y puede ser debido de la activación de varios mecanismos. El mecanismo principal se

debe al efecto simpaticomimético de la cocaína que activaría los receptores α -adrenérgicos [75]. Los otros mecanismos implican al endotelio y al músculo liso vascular. Sobre el endotelio, la cocaína induce un aumento de la liberación de ET-1, lo cual a través de la activación de los receptores ET_A incrementa la vasoconstricción [76]. Además, disminuye la producción de NO mediante la inhibición de la actividad enzimática de la eNOS [76, 77] que se traduce en un aumento de la vasoconstricción. Sobre el músculo liso vascular la cocaína activa los canales de calcio tipo L incrementando el calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ [78, 79].

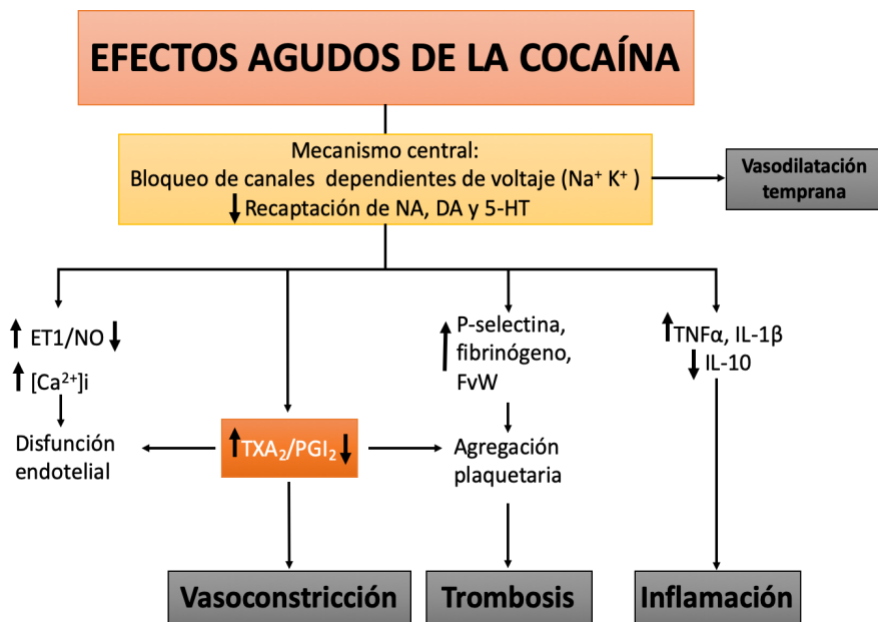


Figura 5. Efectos agudos de la cocaína. **ET-1:** endotelina-1; **NO:** óxido nítrico; **TXA₂:** tromboxano A₂; **PGI₂:** prostaciclina; **FvW:** factor von Willebrand; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α ; **IL-1 β :** interleucina-1 β ; **IL-10:** interleucina-10.

Los síndromes clínico-patológicos que se manifiestan por la vasoconstricción inducida por la cocaína incluyen el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular y el infarto renal [80].

Además de estas acciones directas sobre la motilidad de los vasos sanguíneos, se ha demostrado que la cocaína puede producir activación y agregación plaquetaria que conlleva a la formación de trombos [81]. Esta es una respuesta compleja que implica la interacción de las células sanguíneas, el sistema de coagulación y el endotelio vascular. En este sentido, se ha observado que la cocaína induce activación plaquetaria mediada por liberación de los gránulos α [81], aumento de la expresión de P-selectina [82] y de la unión de fibrinógeno a la superficie plaquetaria [82]. Además, también se ha propuesto que la cocaína puede estimular a las plaquetas indirectamente mediante la activación del endotelio vascular. Así, la cocaína aumenta la adhesión plaquetar (por aumento del factor von Willebrand [83]) y disminuye la fibrinólisis [84] favoreciendo con ello la formación de trombos. Los efectos sobre la agregación plaquetaria son consecuencia del desequilibrio entre la formación de TXA₂ (agregante) y PGI₂ (antiagregante). La cocaína aumenta la liberación de TXA₂ [85, 86] e inhibe la liberación de PGI₂ endotelial [87]. Los síndromes fisiopatológicos relacionados con las acciones trombóticas de la cocaína incluyen el accidente cerebrovascular isquémico, el síndrome coronario agudo, y el infarto renal o pulmonar [80, 88].

De igual forma, la cocaína induce un estado inflamatorio como consecuencia de incrementar citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-1 β y de disminuir citoquinas antiinflamatorias como la IL-10. Este estado inflamatorio se ha relacionado con el desarrollo de endocarditis bacteriana, cardiomiopatía, vasculitis cerebral o colitis [80, 89].

4.5.2. Efectos crónicos

A nivel vascular, los efectos adversos derivados del consumo crónico de cocaína están más relacionados con procesos inflamatorios y aterogénicos. Ambos procesos están asociados al daño endotelial persistente que constituye un marcador temprano del desarrollo de arterosclerosis. Por un lado, se ha observado que la cocaína produce disfunción endotelial de forma persistente, debido al aumento de la síntesis de ET-1 [76], lo que puede precipitar una arterosclerosis temprana debido a sus propiedades proinflamatorias (aumento de ROS y citoquinas, entre las cuales se encuentra el TNF- α y diversas interleucinas) y por el aumento de la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) [90].

Por sus propiedades aterogénicas, la cocaína induce defectos estructurales en la barrera celular endotelial, lo que conlleva a un aumento de la permeabilidad a la peroxidasa y a las LDL [91]. Un indicador del aumento de la permeabilidad y de la captación de lipoproteínas es el gran número de mastocitos encontrados en la adventicia de consumidores habituales de cocaína [92, 93]. Además, el consumo crónico de cocaína se asocia al incremento de los niveles plasmáticos del ligando CD40 soluble (sCD40L) [94], una glicoproteína procoagulante y proinflamatoria liberada por las plaquetas activadas y relacionada con la formación y progresión de la placa de ateroma [95].

4.6. Adulteración de la cocaína

Las drogas ilícitas como la cocaína no tienen ningún tipo de control de calidad en su fabricación, y son frecuentemente diluidas con agentes adulterantes para aumentar el volumen del producto y así obtener mayores beneficios económicos [96]. Además, la adición de ciertos adulterantes está

guiada por la consideración de que éste no debe ser percibido por el consumidor. Un ejemplo de ello es la lidocaína, un anestésico local que mimetiza el adormecimiento de la lengua producido por la cocaína de alta pureza [96]. En este sentido, a los riesgos derivados del consumo de drogas ilícitas deben sumarse los efectos adversos de los compuestos empleados como adulterantes.

En España, el informe del programa Energy Control de 2016 sobre el consumo de psicoactivos indica que el 71.6% de las muestras de cocaína analizadas contenían adulterantes. El informe destaca la alta presencia de adulterantes tóxicos como el levamisol (42.6%) y la fenacetina (6.8%) [97]. Además, se encontraron otros adulterantes como cafeína, analgésicos y anestésicos. Tal y como se refleja en el informe, el levamisol se ha convertido en el adulterante más común de la cocaína. De hecho, en algunos países de la Unión Europea también se ha detectado la presencia de levamisol en muestras de cocaína obtenidas hasta el 2014, variando la concentración de un país a otro, aunque con una clara tendencia a aumentar [98]. Por lo tanto, es el levamisol el agente adulterante que está despertando mayor preocupación, por los potenciales efectos tóxicos que puede tener sobre los consumidores de cocaína.

5. Levamisol

El levamisol es un derivado sintético del imidazotiazol. En la década de los 70 se utilizó en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide y síndrome nefrótico) por sus propiedades moduladoras sobre el sistema inmunitario [99, 100], como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de colon [101] y como antihelmíntico [102]. En 1999, debido a la aparición de numerosos efectos adversos que incluyen agranulocitosis, leucopenia,

trombocitopenia, neutropenia o vasculitis entre otros [103–106] y a la aparición de alternativas más efectivas, se retiró del mercado para uso en humanos [107]. Actualmente se utiliza como antihelmíntico en medicina veterinaria [102].

A partir de 2003, el levamisol se identificó como un nuevo adulterante de la cocaína [108]. En el año 2009, la Administración de Control de Drogas de los Estados Unidos (DEA) estimó que el 69% de la cocaína incautada contenía levamisol [109]. Ese mismo año se publicaron los primeros casos de agranulocitosis atribuidos al abuso de cocaína adulterada con esta sustancia [110]. Desde entonces, muchos otros informes de complicaciones han sido publicados [102]. De lo expuesto se deduce que el uso del levamisol como adulterante de la cocaína representa un problema de salud pública.

5.1. Estructura química

El levamisol es el S-enantiómero del fenil tetrahydroimidazotiazol (PTHIT). Químicamente, el levamisol pertenece a la clase de los imidazotiazoles, heterociclos bicíclicos formados por un anillo de imidazol unido a un anillo de tiazol [111] (Figura 6).

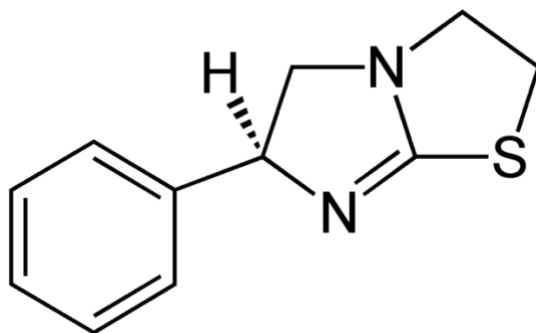


Figura 6. Estructura química del levamisol.

5.2. Farmacocinética

La vía de administración del levamisol, como indicación terapéutica, es la oral, siendo rápidamente absorbido con un tiempo máximo entre 1,5 y 2 horas [112]. Su biodisponibilidad es de aproximadamente 60-70% después de una dosis oral de 150 mg y el volumen aparente de distribución varía entre 1,5 y 5 L/kg [113]. En estudios post mortem se ha observado la presencia de levamisol en el hígado, aunque las concentraciones más altas se encontraron en sangre y en tejido pulmonar [114]. El levamisol es ampliamente metabolizado en el hígado mediante la hidroxilación del anillo fenil y/o por oxidación del anillo de imidazotiazol [115]. Se han detectado varios metabolitos del levamisol en orina, aunque hasta la fecha solo se han identificado dos: el p-hydroxil-levamisol y el aminorex, siendo este último el de mayor importancia, ya que es un metabolito activo con un comportamiento similar a las anfetaminas [113].

5.3. Mecanismos de acción

Los efectos fisiológicos y farmacológicos del levamisol se asocian con distintos mecanismos de acción. En primer lugar, es un agonista de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR), de lo cual derivan sus efectos antihelmínticos [116]. Además, también se ha demostrado que actúa como agonista parcial de nAChR en humanos, teniendo mayor afinidad por el subtipo $\alpha 3\beta 4$ [117].

En segundo lugar, el levamisol es un inhibidor de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) [118] involucrada en la síntesis de GABA y adenosina [119].

Finalmente, se ha demostrado que el levamisol inhibe la recaptación de aminas biógenas, como la noradrenalina, dopamina y serotonina, mediante el bloqueo de sus transportadores (NET, DAT y SERT) [96], comportándose de forma similar a la cocaína pero con menor potencia.

Otros estudios involucran al levamisol en el aumento de los niveles de opiáceos endógenos como morfina y codeína [120] y en la inhibición de la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa [121, 122], enzimas involucradas en la degradación de NA, dopamina y serotonina, lo que se traduce en una prolongación de la presencia de aminas biógenas en la hendidura sináptica.

5.4. Efectos farmacológicos

En parásitos helmínticos, el bloqueo de los nAChR neuromusculares por el levamisol produce una despolarización mantenida de las células musculares induciendo su parálisis. En mamíferos, el levamisol tiene poca eficacia sobre estos receptores [123] aunque en el ser humano se ha propuesto que ejerce sus acciones sobre los nAChR neuronales (receptores $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$), homólogos a los nAChR neuromusculares de los nematodos [117]. En este caso la modulación es más compleja pudiendo ser facilitadora o inhibitoria dependiendo de la concentración del levamisol. En este sentido, la activación de los nAChR neuronales produce un incremento de dopamina en el sistema mesolímbico [125], responsable de los efectos conductuales y de la activación locomotora producidos por el levamisol.

El levamisol también puede producir graves efectos neurológicos, en particular convulsiones epilépticas y leucoencefalopatía inflamatoria multifocal, aunque en este caso se especula que su etiología puede estar asociada a la acción inhibitoria del levamisol sobre la TNAP [119]. Sobre el

sistema nervioso, el levamisol, al igual que la cocaína, inhibe la recaptación de aminas biógenas por bloqueo de sus transportadores (NET, DAT y SERT). En este caso, el orden de eficacia es NET>DAT>SERT [126]. A nivel adrenérgico, la inhibición de la recaptación de noradrenalina y de su metabolismo pueden ser los mecanismos responsables de los efectos cardiovasculares del levamisol. Se ha descrito un efecto inotrópico positivo sobre corazón de cobaya [127] y un aumento de la presión arterial en perros [128]. A nivel dopaminérgico, el levamisol disminuye el catabolismo de la dopamina lo cual, junto a la activación de los nAChR, producen un aumento de los niveles de dopamina. Este efecto se ha relacionado con la activación motora que induce a realizar movimientos repetitivos en planarias [129]. A nivel serotoninérgico, los efectos del levamisol no son tan evidentes debido probablemente a que el bloqueo de su transportador es menos eficaz. Sin embargo, puede estar relacionado con la hipertensión pulmonar descrita para el aminorex, metabolito activo del levamisol, al aumentar la concentración de serotonina en la hendidura sináptica [126].

Por otro lado, el uso crónico de levamisol puede aumentar la repuesta inmune. En este sentido, se ha demostrado que se comporta como un inmunoestimulante a través del incremento de la quimiotaxia de monocitos [130]. Su eficacia ha sido comprobada en el tratamiento del carcinoma de colon y del síndrome nefrótico pediátrico [131, 132]. Además, promueve la activación y maduración de células dendríticas y de células T a la vez que aumenta la producción de citoquinas, como IL-12 y IL-10 relacionadas con el proceso de la inflamación [133]. En conjunto, estas acciones sobre la inmunidad pueden estar relacionadas con los efectos adversos severos asociados al uso del levamisol (agranulocitosis [134], vasculitis [135] o dermatitis [136]).

5.5. Efectos vasculares

Mientras que en la literatura se puede encontrar una gran variedad de estudios sobre los efectos vasculares producidos por la cocaína, poco se ha publicado sobre los efectos del levamisol sobre el tono y la función vascular. Estas acciones se producen principalmente a través de su interacción con el sistema nervioso simpático y con el endotelio. Las primeras están ligadas a la inhibición de la recaptación de noradrenalina. Respecto al papel del endotelio, se ha demostrado que el levamisol produce apoptosis y reduce la expresión de eNOS en cultivos de células endoteliales humanas [137]. El proceso de apoptosis parece estar relacionado con el estrés oxidativo ya que es contrarrestado por antioxidantes como el glutatión y la N-acetilcisteína [137]. La apoptosis puede ser responsable de la vasculitis cutánea descrita como efecto adverso del levamisol por aumentar el riesgo de formación de microtrombos y provocar la oclusión de los vasos sanguíneos cutáneos.

En cuanto a la reactividad vascular, un estudio reciente demostró que el levamisol, como bloqueante de la TNAP, es capaz de atenuar la respuesta vascular renal y la presión arterial inducida por NA, sugiriendo la posible participación de la TNAP en la regulación de la función renovascular [138].

6. Cocaína adulterada con levamisol

El levamisol se ha convertido en el adulterante de cocaína usado con mayor frecuencia en los últimos 10 años. Sin embargo, no quedan claras las razones de su uso como adulterante y la respuesta sigue siendo especulativa.

En primer lugar, el levamisol es una sustancia de bajo precio y a la que se accede fácilmente debido a su uso en medicina veterinaria [139]. Sus propiedades fisicoquímicas representan una ventaja en el proceso de adulteración. Tiene un color similar a la cocaína, por lo que puede pasar

desapercibido en pruebas colorimétricas, dando un color azul (prueba positiva) incluso en ausencia de cocaína [140]. Interfiere con la detección electroquímica de la cocaína, suprimiendo la señal de oxidación de la cocaína en muestras con proporciones superiores a 1:1 (levamisol: cocaína), resultando en falsos negativos [140]. Mantiene el brillo iridiscente de la cocaína pura [141] siendo imperceptible a la vista del consumidor. El punto de fusión de la base libre de levamisol (60-61,5° C) [142] se encuentra por debajo del punto de fusión de la base libre de cocaína o crack (95° C) [143], por lo tanto, puede ser inhalada sin ser percatada y no dejar residuos sospechosos.

Otra posible explicación para el uso del levamisol como adulterante, es su efecto potenciador sobre la cocaína. En este sentido, se ha demostrado que el levamisol aumenta la acción de la cocaína in vivo en planarias y ratas [125, 129]. Este claro sinergismo ha sido atribuido a la acción combinada del levamisol sobre el bloqueo de la MAO y la activación de los receptores nicotínicos, de modo que aumenta la transmisión dopaminérgica. Del mismo modo, se ha postulado que su metabolito activo, el aminorex, podría potenciar las propiedades estimulantes de la cocaína, ya que este ejerce un efecto similar al de la cocaína en el DAT y el NET y un efecto similar al de las anfetaminas en el SERT [126]. Por lo tanto, se puede suponer que el levamisol se utiliza para prolongar el efecto de la cocaína.

6.1. Efectos adversos de la cocaína adulterada con levamisol

Generalmente los efectos adversos producidos por el levamisol como adulterante de la cocaína son reversibles y presentan una tasa de recurrencia que supera el 27% con la re-exposición [102]. La incidencia de estas complicaciones y su magnitud es variable, dado que la cantidad de levamisol

que se añade a la cocaína para su adulteración es imprevisible [144, 145]. La más frecuente es el síndrome vasculítico caracterizado por la aparición de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA). Además, cursa con neutropenia o agranulocitosis y lesiones cutáneas purpúreas en cara, especialmente en orejas, y en extremidades [146–148]. Las biopsias de las lesiones cutáneas generalmente muestran vasculitis de vasos pequeños en forma de vasculitis leucocitoclástica, con o sin trombos intravasculares [149]. Con frecuencia, los síntomas de vasculitis y neutropenia se presentan juntos, aunque la neutropenia suele aparecer en una etapa más avanzada, debido al deterioro del sistema inmunológico [147].

En el sistema nervioso, el uso crónico de cocaína adulterada con levamisol puede producir aumento de los trastornos de la función ejecutiva y adelgazamiento de la corteza prefrontal lateral [150]. También se han descrito casos de leucoencefalopatía, con desmielinización difusa y deterioro cognitivo [151, 152].

En el sistema renal, se han comunicado casos de glomerulonefritis, probablemente secundaria a una vasculitis, con proteinuria y hematuria que puede derivar en insuficiencia renal aguda [147, 153, 154].

Finalmente, en el sistema cardiovascular, además de la vasculitis sistémica, solo se ha reseñado un caso de síndrome coronario agudo relacionado con el uso de las dos sustancias [155]. En el examen postmortem se encontró una placa erosionada en la arteria coronaria descendente anterior izquierda y cicatrices de infarto en el ventrículo izquierdo. El examen microscópico de la arteria coronaria reveló infiltración de eosinófilos en la adventicia y en la íntima.

HIPÓTESIS

El levamisol, un derivado del imidazotiazol retirado del mercado para uso terapéutico en humanos por sus efectos adversos, se utiliza en gran medida como adulterante habitual de la cocaína, y en este sentido se pueden presentar efectos adversos atribuidos al consumo de cocaína que, sin embargo, son debidos al levamisol. Además, puesto que ambas sustancias poseen un mecanismo de acción común, cabe la posibilidad de la existencia de un sinergismo entre ellas. Así, el levamisol podría exacerbar los efectos de la cocaína derivados de la inhibición de la recaptación de aminas biógenas. Estas acciones están poco estudiadas en el sistema vascular por lo que constituyen el objetivo central del estudio.

Nuestra hipótesis es que el levamisol podría potenciar el efecto de la cocaína, aumentando la respuesta a agonistas contráctiles o induciendo una disfunción endotelial. Ambos efectos conducirían a incrementar la vasoconstricción y por tanto la tendencia al vasoespasmo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los efectos del levamisol y su interacción con la cocaína sobre la respuesta vascular y la función endotelial. Puesto que los efectos vasculares pueden variar dependiendo del lecho vascular, este estudio se realiza en las arterias carótida, renal y aorta de conejo.

Objetivos específicos

1. Definir el efecto del levamisol y la cocaína sobre el tono vascular.
2. Estudiar el efecto del levamisol sobre la respuesta a agonistas contráctiles y la participación de factores endoteliales (prostanoides, NO y canales de K⁺).
3. Analizar los efectos de la cocaína en arterias precontraídas con noradrenalina y su interacción con el levamisol.
4. Caracterizar los efectos del levamisol y de la cocaína sobre la respuesta contráctil (KCl, fenilefrina y estímulo nervioso simpático) y relajante (acetilcolina y nitroprusiato sódico).
5. Estudiar la implicación del estrés oxidativo vascular en la respuesta a la acetilcolina en presencia del levamisol y la cocaína.
6. Analizar los efectos del levamisol y la cocaína sobre la expresión proteica de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2), de la eNOS y de marcadores de estrés oxidativo (SOD1, SOD2 y Nox4) en tejido arterial de conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado muestras de 30 conejos macho, raza White New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) con un peso medio de 3500 ± 350 g procedentes del estabulario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València. Todos los animales fueron estabulados en jaulas individuales y alimentados ad libitum con pienso y agua durante 7 días y posteriormente fueron sacrificados para la obtención de las muestras.

Los experimentos se han realizado cumpliendo las normas éticas establecidas por la Comunidad Europea (Directiva 2010/63/EU). Además, este trabajo fue desarrollado mediante el aprovechamiento de especie del procedimiento 2017/VSC/PEA/00049 tipo 2 autorizado por el Comité de Ética de la Universitat de València. En este caso, el modelo experimental constituye parte del proyecto titulado: «Utilidad de la estabilización de la homeostasis del calcio intracelular en el control de los procesos fibrilatorios». Este proyecto fue desarrollado por el grupo de Electrofisiología Cardíaca Experimental (GRELCA), del Departamento de Fisiología de la Universitat de València, liderado por el profesor Luis Such.

2. Extracción de las muestras

Los animales se sacrificaron mediante una inyección intravenosa de tiopental sódico (60 mg/kg) con 800 UI de heparina sódica, a través de la vena marginal de la oreja. A continuación, mediante laparotomía abdominal se extrajeron las arterias renales y aorta (Figura 7). La extracción de las arterias carótidas se realizó mediante sección longitudinal de la zona media del cuello y separación de los músculos paratraqueales (Figura 8).

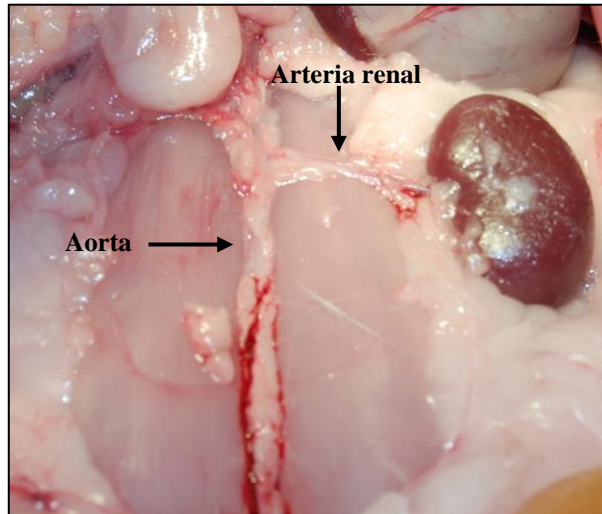


Figura 7. Resección de arteria renal y aorta

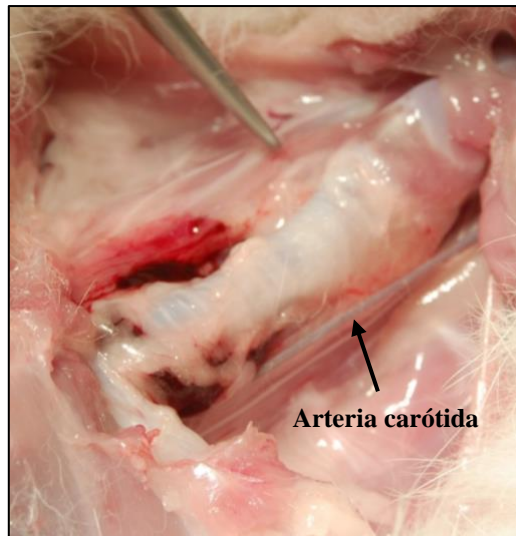


Figura 8. Resección de arteria carótida.

3. Estudio de la reactividad vascular

3.1. Preparación de las muestras para el baño de órganos

Las arterias se limpiaron en una placa Petri con solución salina (NaCl 0,9%) a 4°C bajo una lupa iluminada con luz fría, eliminando el tejido adiposo perivascular con tijeras de microdissección para cirugía oftálmica. Se cortaron segmentos de 3 mm de longitud y se montaron en un sistema para el registro de tensión isométrica (Figura 9).

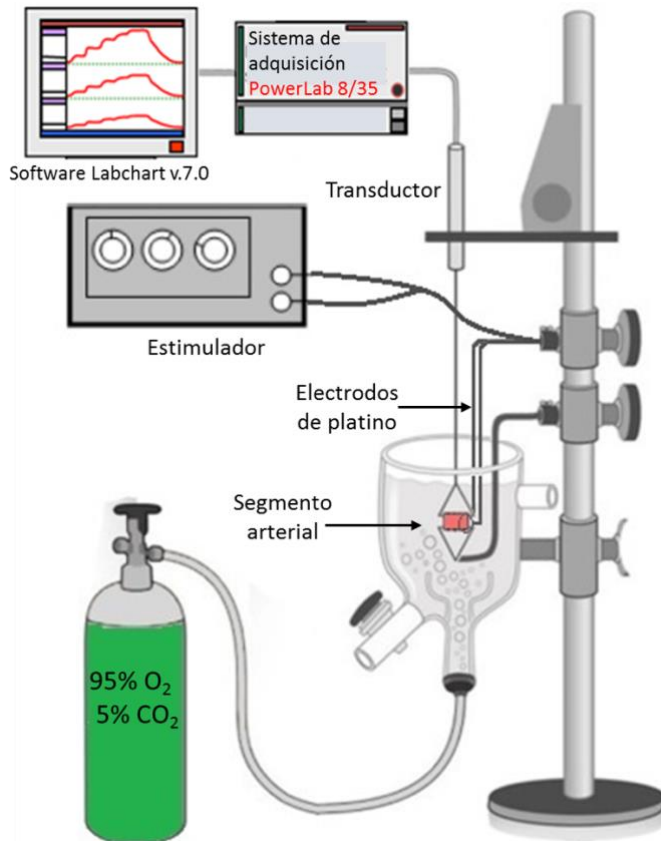


Figura 9. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica.

Antes de analizar la respuesta de los segmentos arteriales a los diversos estímulos, se procedió a determinar la tensión basal óptima en un grupo de experimentos preliminares en segmentos de longitud y diámetro semejantes a los experimentales. Para ello se registró la contracción inducida por el KCl (60 mM) después de exponer los segmentos arteriales a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta contráctil al KCl 60 mM se consideró como la tensión óptima de reposo y la que se consideraría como referencia para calibrar los transductores isométricos. La tensión pasiva óptima para los segmentos de arteria carótida y renal fue de 1 g, y para la aorta fue de 3 g.

La preparación experimental consistió en introducir dos alambres rígidos (1,5 mm de diámetro) de acero inoxidable a través de la luz del segmento vascular. Uno de los alambres estaba unido a un soporte que a su vez se fijó a la pared del baño de órganos; el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conectó a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada segmento, con los alambres introducidos en su luz, se colocó en un baño de órganos que contenía 4 ml de solución fisiológica (solución de Krebs) cuya composición es la siguiente (en mM): NaCl 115; KCl 4,6; MgCl₂·6H₂O 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01. Esta solución se equilibró con una mezcla gaseosa (95% O₂ y 5% CO₂) que proporciona un pH entre 7,3 - 7,4. La temperatura de la solución se mantuvo a 37° C durante todo el experimento. Un tornillo micrométrico unido al transductor isométrico (UF1 Pioden Controls Ltd) permitió aplicar al segmento la tensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron usando un sistema de adquisición de datos PowerLab (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EE.UU). Una vez montadas, las arterias se dejaron estabilizar en el baño de órganos durante 1 hora, renovándose la solución de Krebs con lavados cada

15 minutos.

La integridad funcional del endotelio se comprobó mediante la relajación provocada por la acetilcolina (10^{-7} - 10^{-6} M) en segmentos previamente contraídos con noradrenalina (10^{-7} - 3×10^{-7} M), considerando válidas todas las muestras que presentaban una respuesta relajante máxima de al menos 70%.

El estímulo nervioso simpático fue aplicado mediante dos electrodos de platino, situados a 5 mm uno del otro y entre los cuales se localiza el segmento arterial. Los electrodos se conectaron a un estimulador Grass S88 (Grass Instruments, Quincy, USA). La relación entre la frecuencia aplicada y la respuesta obtenida fue estudiada en un rango de frecuencias comprendido entre 2 y 8 Hz, con estímulos de 15 V (voltaje supramáximo) de 0,2 ms de duración, durante 30 s.

3.2. Respuesta al KCl

La capacidad de contracción del músculo liso vascular se comprobó por su respuesta al KCl (60mM). La respuesta máxima al KCl fue mayor en la arteria renal (11.000 ± 650 mg), seguida de la aorta (7.700 ± 518 mg) y la carótida (3.300 ± 340 mg).

3.3. Curvas concentración-respuesta

Se construyeron curvas concentración-respuesta al levamisol y cocaína para evaluar sus efectos directos sobre el tono vascular. Además, se realizaron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina, a la acetilcolina y al nitroprusiato sódico en ausencia (control) y en presencia de levamisol, cocaína o la combinación de ambas sustancias.

3.3.1. Levamisol

Las curvas concentración-respuesta al levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M) se realizaron en arterias sometidas a tensión basal y contraídas con KCl (60mM), NA (10^{-7} M), ET-1 (10^{-7} M) y U-46619 (10^{-7} M), un análogo del TXA₂.

Para evaluar la participación de los receptores adrenérgicos, se realizaron curvas concentración-respuesta al levamisol en arterias contraídas con NA, en ausencia (control) y en presencia de: prazosín (10^{-6} M), bloqueante de los receptores α_1 -adrenérgicos; yohimbina (10^{-6} M), bloqueante de los receptores α_2 -adrenérgicos; y propranolol (10^{-6} M), bloqueante de los receptores β -adrenérgicos.

Además, para analizar la contribución de los factores relajantes endoteliales en los efectos del levamisol, se realizaron curvas concentración-respuesta al levamisol en arterias previamente contraídas con noradrenalina, en ausencia (control) y en presencia de: indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de la COX; N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10^{-4} M), un inhibidor de la eNOS; y cloruro de tetraetilamonio (TEA, 10^{-3} M), un inhibidor selectivo de los canales de K⁺ activados por calcio relacionados con la EDH.

3.3.2. Cocaína

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) en arterias a tensión basal y previamente contraídas con NA (10^{-7} M).

3.3.3. Fenilefrina

Se estudió la respuesta a la fenilefrina (10^{-9} - 10^{-4} M), un agonista de los receptores α_1 -adrenérgicos, con el fin de valorar si la respuesta vascular

adrenérgica se alteraba en presencia de levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M), cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) y la combinación de ambas sustancias.

3.3.4. Acetilcolina

En arterias previamente contraídas con NA (10^{-7} M), se estudió la respuesta relajante dependiente del endotelio inducida por la acetilcolina (10^{-9} - 3×10^{-6} M), un agonista que estimula la eNOS a través de la unión a los receptores muscarínicos M3 en el endotelio, en presencia de levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M), cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) y la combinación de ambas sustancias. Además, con el fin de evaluar la implicación del estrés oxidativo inducido por el levamisol o la cocaína se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en presencia de superóxido dismutasa (SOD, 200 U/ml), responsable de la catalización de O_2^- en H_2O_2 y O_2 , para valorar la producción de estrés oxidativo inducido por el levamisol y la cocaína.

3.3.5. Nitroprusiato sódico

Se estudió la respuesta relajante al nitroprusiato sódico (10^{-9} - 3×10^{-6} M) en arterias previamente contraídas con NA (10^{-7} M) para comprobar si la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente de endotelio se modificaba en presencia de levamisol (10^{-3} M) o cocaína (10^{-4} M).

Todas las curvas de los diferentes agonistas se realizaron en vasos correspondientes a los tres lechos estudiados, utilizando segmentos arteriales diferentes. Las curvas en presencia de levamisol, cocaína y los distintos inhibidores, se realizaron después de un período de incubación de 30 minutos a excepción de las incubadas con SOD que se incubaron durante 45 minutos.

3.4. Obtención de las curvas frecuencia-respuesta

Para estudiar la naturaleza de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico, los segmentos arteriales se incubaron durante 20 minutos con tetrodotoxina (10^{-6} M), un bloqueante de la conducción nerviosa, guanetidina (10^{-6} M), un bloqueante de la neurotransmisión adrenérgica, o prazosín (10^{-6} M), un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos. Como control, en otro grupo de segmentos se realizó una segunda secuencia de estímulos en ausencia de los antagonistas.

Una vez comprobado el carácter neurógeno de la respuesta, se estudió la respuesta contráctil al estímulo eléctrico en presencia de levamisol (10^{-6} - 10^{-3} M), cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) y la combinación de ambas sustancias en segmentos de arteria carótida, renal y aorta. Las curvas frecuencia-respuesta se construyeron después de un período de incubación de 30 minutos. Las frecuencias utilizadas fueron 4 Hz en la carótida y de 8 Hz en la arteria renal y en la aorta.

3.5. Soluciones y fármacos

Clorhidrato de cocaína, clorhidrato de noradrenalina, clorhidrato de fenilefrina, endotelina-1, U-46619, cloruro de acetilcolina, L-NAME, cloruro de tetraetilamonio, indometacina, superóxido dismutasa, nitroprusiato sódico, tetrodotoxina, guanetidina sulfato, clorhidrato de prazosín, clorhidrato de yohimbina. Todos ellos distribuidos por Sigma. Cloruro potásico distribuido por Panreac. Las soluciones concentradas de los fármacos utilizados en baño de órganos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01%. Las

diluciones correspondientes se hicieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

4. Análisis de la expresión proteica mediante western blot

4.1. Incubación de arterias

Se utilizaron segmentos limpios de 5 mm de longitud de arteria carótida, renal y aorta y se mantuvieron en solución de Krebs a 37° C equilibrada con una mezcla gaseosa (95% O₂ y 5% CO₂). Los segmentos se incubaron durante 30 minutos en ausencia (control) y presencia de levamisol (10⁻⁵-10⁻³ M) o cocaína (10⁻⁴ M). Tras la incubación, los segmentos fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y se guardaron a -80° C hasta el momento de la extracción de proteínas.

4.2. Extracción y cuantificación de proteínas

Se sumergieron 50 mg de tejido arterial en buffer de lisis (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 19% glicerol y 1% (v/v) inhibidor de proteasas) en un micro tubo de 1,5 ml y se homogenizaron mediante fricción mecánica. Los homogenizados se congelaron toda la noche a -20° C y al día siguiente se centrifugaron a 4° C, 10.000 r.p.m. durante 20 minutos. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas totales por el método del ácido bicinónico (BCA) utilizando una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA).

4.3. Separación y transferencia de proteínas

Una vez conocida la concentración de proteínas de cada muestra, se añadió 0,5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) azul de bromofenol y se calentó a 95° C durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturante SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Para ello, se cargaron 30 µg de proteína de cada muestra en geles de resolución, preparados con un gradiente de poliacrilamida del 4 - 15%, en función del peso molecular de la proteína a estudiar. Así mismo, se utilizó una proteína estándar multicolor (Broad MultiColor Pre-Stained Protein Standard, GenScript) para verificar la eficacia de la transferencia y determinar el tamaño aproximado de las proteínas de interés. La electroforesis se realizó en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad), que contenía un tampón de migración (Tris 25mM, glicina 200mM y SDS al 0.1% (p/v), pH 8,3), y se aplicó un voltaje constante de 140 V durante 50 – 60 minutos.

Tras la electroforesis, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas en medio húmedo a una membrana de difluoruro de polivinidileno (PVDF) (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU) activada previamente con metanol. Para la transferencia se usó un tampón de transferencia (Tris 25mM, 190mM Glicina y 20% de Metanol), y se aplicó un voltaje constante de 40 V durante 1 hora a 4° C.

4.4. Inmunodetección

Para la inmunodetección, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo para impedir las uniones inespecíficas, compuesta por BSA al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20mM, NaCl 150mM, Tween-20 0.1%,

pH 7.5). El bloqueo se realizó en agitación suave, a temperatura ambiente, durante 1 hora. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 2), diluido en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4° C, en agitación suave.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión proteica por western blot.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Peso molecular (KDa)	Dilución	Casa comercial
eNOS	130	1:1000	Signalway
Receptor α_1	50	1:1000	Novus
Receptor α_2	45	1:1000	Novus
SOD 1	20	1:1000	Thermo Fisher Scientific
SOD 2	15	1:1000	Thermo Fisher Scientific
Nox4	67	1:500	Novus
α-tubulina	15	1:1000	Sigma-Aldrich

Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-Tween (3 lavados de 5 minutos) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-rabbit para eNOS, receptor α_1 , receptor α_2 , SOD1 y Nox4; y anti-mouse para SOD2 y α -tubulina) conjugado con la enzima peroxidasa de rabano picante (HRP), diluido en la solución de bloqueo.

Finalmente, tras lavar las membranas varias veces con TBS-Tween para eliminar el exceso del anticuerpo secundario, se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con HRP. La actividad de

la peroxidasa se visualizó mediante el sistema ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Science, Barcelona, Spain). La señal obtenida se cuantificó por densitometría utilizando el software ImageJ.

5. Estadística

Los resultados se indican como la media \pm error estándar. En los resultados de la reactividad vascular, la relajación se expresa como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina. La contracción se expresa en mg de tensión para las curvas concentración-respuesta al KCl mientras que para las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina, o para el estímulo nervioso simpático, el resultado se expresa relativo al valor de la contracción máxima al KCl (60 mM).

La concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima (CE_{50}) se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. Los resultados se expresan como pD_2 calculado a partir del $-\log(CE_{50})$. En cada grupo de experimentos, n indica el número de individuos (conejos).

Las diferencias entre los distintos tratamientos fueron estimadas por el test de t-Student y ANOVA respectivamente. Se consideraron las diferencias como significativas cuando el valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Efectos del levamisol y cocaína sobre el tono basal

Para estudiar los efectos del levamisol y cocaína sobre el tono basal, se realizaron curvas concentración-respuesta de ambas sustancias en los tres lechos vasculares.

En la arteria renal y en la aorta, la incubación con levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M) no indujo incrementos significativos sobre el tono basal, mientras que en la arteria carótida concentraciones elevadas de levamisol (10^{-3} M) aumentaron significativamente el tono basal en términos de efecto máximo ($E_{max} = 14 \pm 2$). La incubación con cocaína (10^{-5} - 10^{-3} M) no modificó el tono basal en ninguno de los lechos estudiados (Figura 10).

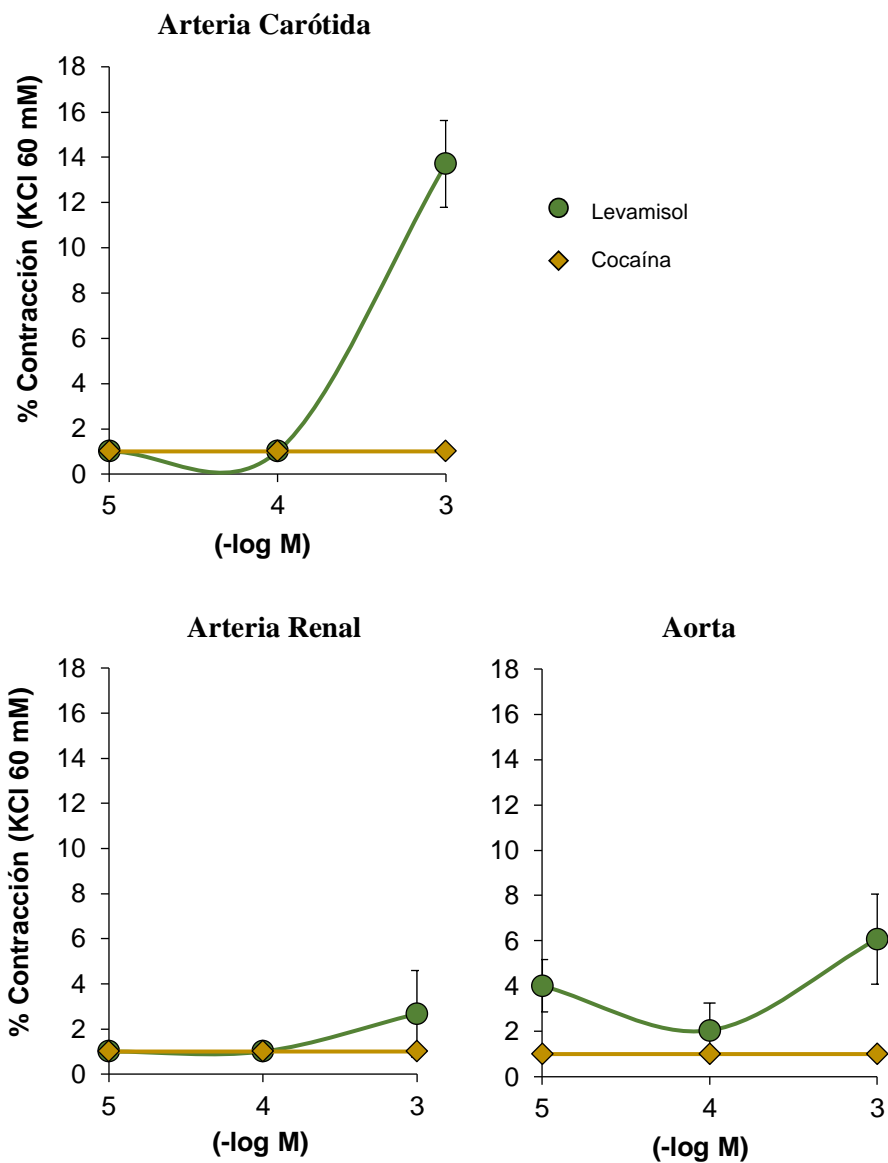


Figura 10. Efectos del levamisol y la cocaína sobre el tono basal en segmentos de arteria carótida, renal y aorta. n=4 para cada condición experimental. Cada punto representa la media \pm error estándar.

2. Efecto del levamisol sobre la respuesta contráctil a distintos agonistas

Para evaluar el efecto del levamisol a diferentes agonistas contráctiles, se realizaron curvas concentración-respuesta al levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M) en arterias contraídas con KCl (60 mM), NA (10^{-7} M), ET-1 (10^{-7} M) y U-46619 (10^{-7} M).

El levamisol solo produjo relajación dependiente de la concentración cuando los segmentos arteriales se contrajeron con noradrenalina (Figura 11). En este caso, el orden de eficacia fue: arteria renal ($E_{max} = 93 \pm 1$) > aorta ($E_{max} = 67 \pm 4$) > arteria carótida ($E_{max} = 39 \pm 3$). Estos resultados indican que los efectos del levamisol están mediados al menos en parte por la interacción con los receptores adrenérgicos.

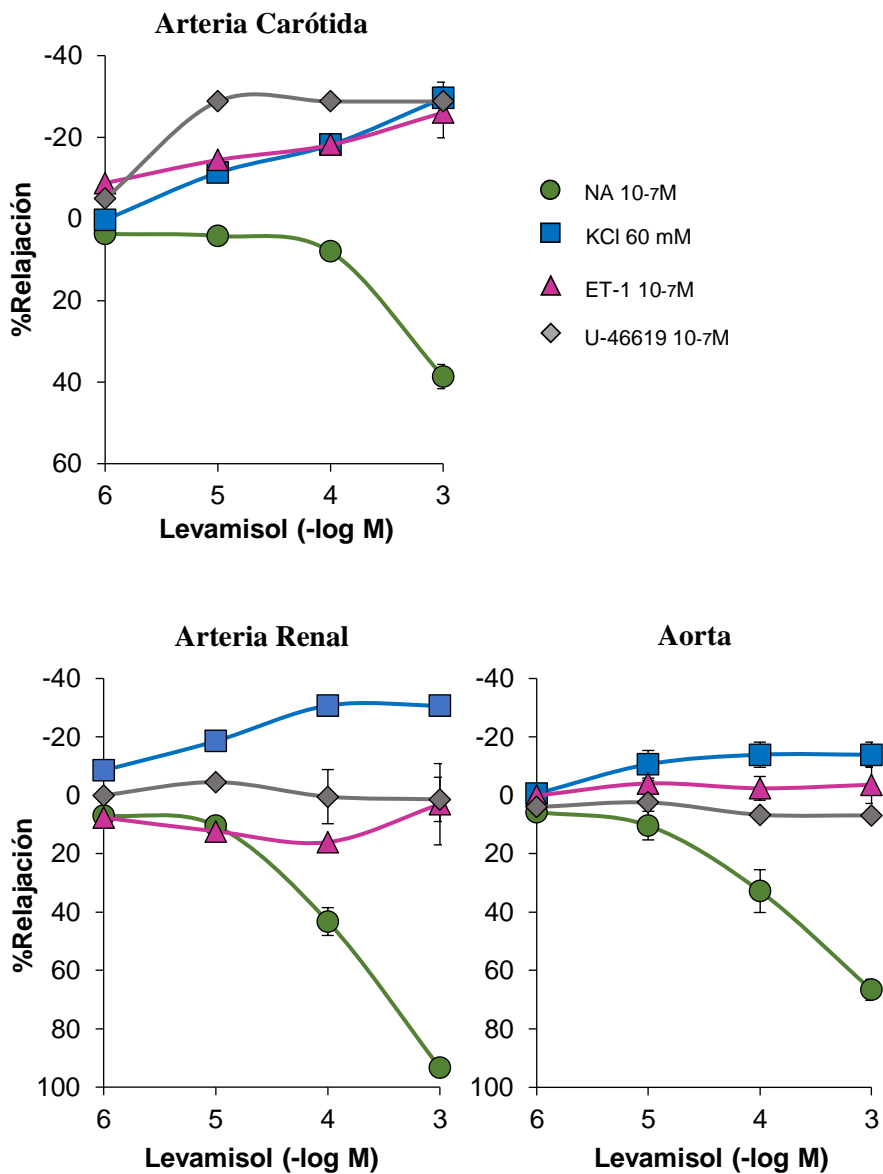


Figura 11. Efectos del levamisol sobre el tono vascular en segmentos de arteria carótida renal y aorta contraídos con NA 10⁻⁷ M, KCl 60 mM, ET-1 10⁻⁷ M y U-46619 10⁻⁷ M. n=4 para cada condición experimental. Cada punto representa la media ± error estándar.

3. Participación de receptores adrenérgicos sobre la respuesta relajante del levamisol

Para determinar qué receptores participan en la respuesta al levamisol, se realizaron curvas concentración-respuesta al levamisol en arterias contraídas con NA (a concentraciones suficientes como para alcanzar aproximadamente el 70% de la contracción máxima al KCl 60 mM), en ausencia (control) y en presencia de prazosín (10^{-6} M), yohimbina (10^{-6} M) y propranolol (10^{-6} M).

El prazosín bloqueó significativamente los efectos relajantes del levamisol en los tres lechos vasculares, disminuyendo el E_{max} (39 ± 3 vs -28 ± 9 , $P < 0,05$ en arteria carótida; 93 ± 4 vs 10 ± 3 , $P < 0,05$ en arteria renal y 67 ± 4 vs -4 ± 2 , $P < 0,05$ en aorta). La yohimbina bloqueó los efectos relajantes del levamisol en mayor o menor medida dependiendo del vaso. Para concentraciones bajas de levamisol (10^{-6} - 10^{-4} M), prácticamente el bloqueo fue total en todos los lechos vasculares mientras que a la concentración de 10^{-3} M persistió el bloqueo en términos de E_{max} en las arterias carótida (39 ± 3 vs 11 ± 7 , $P < 0,05$) y aorta (67 ± 4 vs 25 ± 7 , $P < 0,05$), pero no en la arteria renal (93 ± 4 vs 84 ± 7). El propranolol no modificó la curva concentración-respuesta al levamisol (Figura 12).

En conjunto estos resultados indican que los efectos del levamisol sobre la contracción inducida por la NA son debidos a un antagonismo de los receptores α -adrenérgicos. Para los receptores α_2 este antagonismo depende de la concentración y del lecho vascular. En ningún caso parece que estén implicados los receptores β -adrenérgicos.

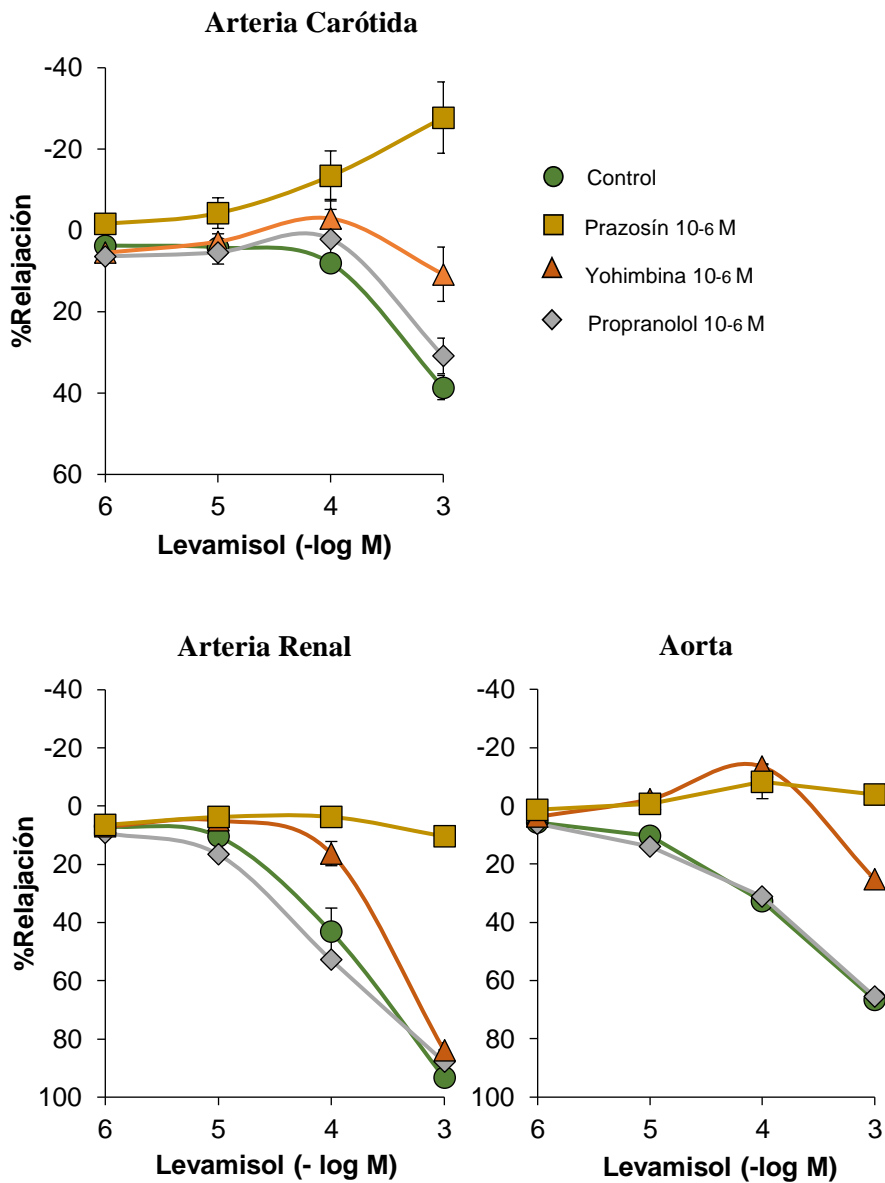


Figura 12. Curvas de relajación al levamisol en ausencia y en presencia de prazosín 10⁻⁶ M, yohimbina 10⁻⁶ M y propranolol 10⁻⁶ M en segmentos de arteria carótida, renal y aorta contraídos con NA 10⁻⁷ M. n=4 para cada condición experimental. Cada punto representa la media ± error estándar.

4. Participación de los factores endoteliales sobre la respuesta relajante del levamisol

Para analizar la posible contribución de los factores relajantes endoteliales en los efectos del levamisol, se realizaron curvas concentración-respuesta al levamisol en arterias previamente contraídas con NA, en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) y TEA (10^{-3} M).

La incubación con indometacina, L-NAME o TEA no modificó la respuesta relajante del levamisol en ninguno de los lechos estudiados (Figura 13). Estos resultados implican que los efectos relajantes del levamisol no están mediados por factores endoteliales.

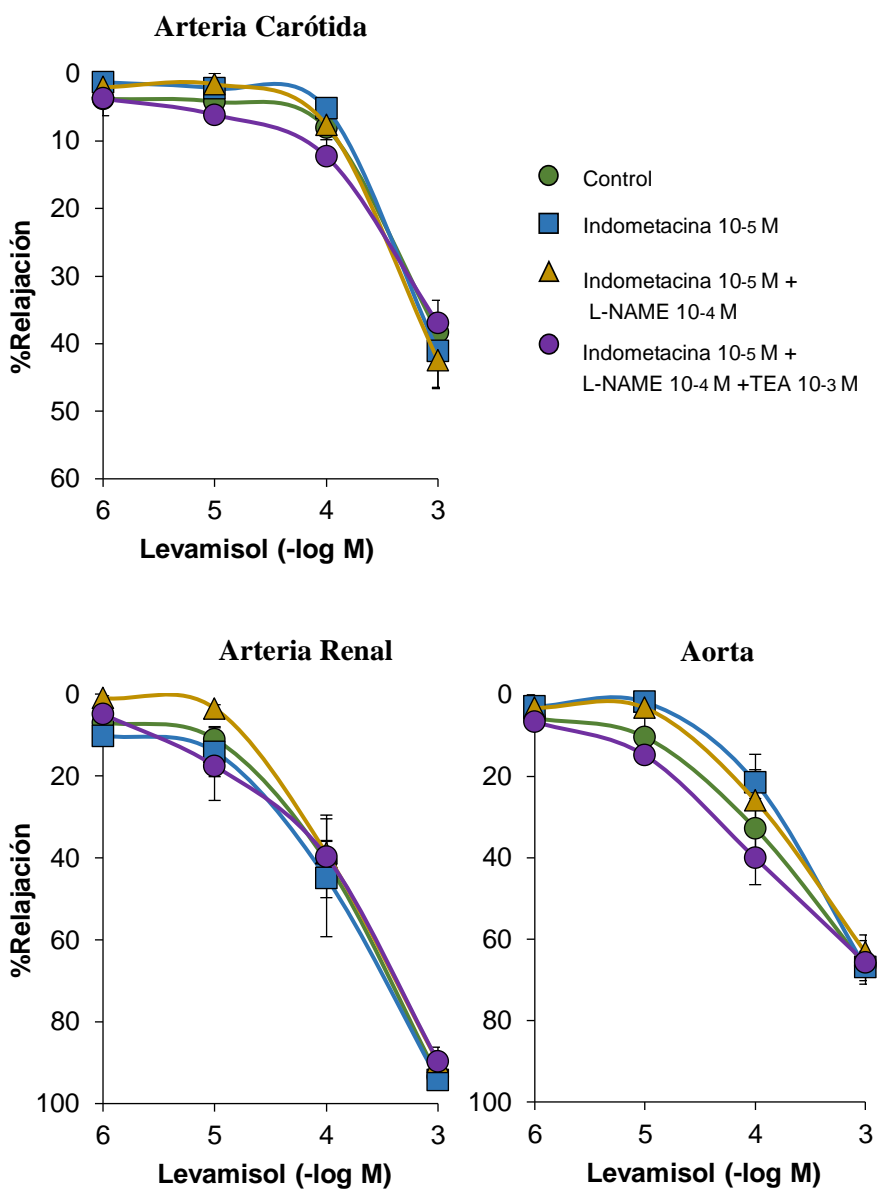


Figura 13. Curvas de relajación al levamisol en ausencia y en presencia de indometacina 10-5 M, indometacina 10-5 M + L-NAME 10-4 M, e indometacina 10-5 M + L-NAME 10-4 M + TEA 10-3 M, en segmentos de arteria carótida, renal y aorta contraídos con NA 10-7 M. n=4 para cada condición experimental. Cada punto representa la media ± error estándar.

5. Efectos de la cocaína en arterias precontraídas con noradrenalina y su interacción con el levamisol.

Para estudiar los efectos de la cocaína sobre el tono vascular, se realizaron curvas concentración-respuesta en segmentos vasculares previamente contraídos con NA (10^{-7} M). La cocaína (10^{-6} - 10^{-3} M) no produjo efectos relajantes ni en la arteria renal ni en la aorta. Sin embargo, la concentración más elevada de cocaína (10^{-3} M) produjo una contracción del 49 ± 1 % en la arteria carótida, que fue estadísticamente significativa comparada con el efecto obtenido para las arterias renal o aorta (Figura 14).

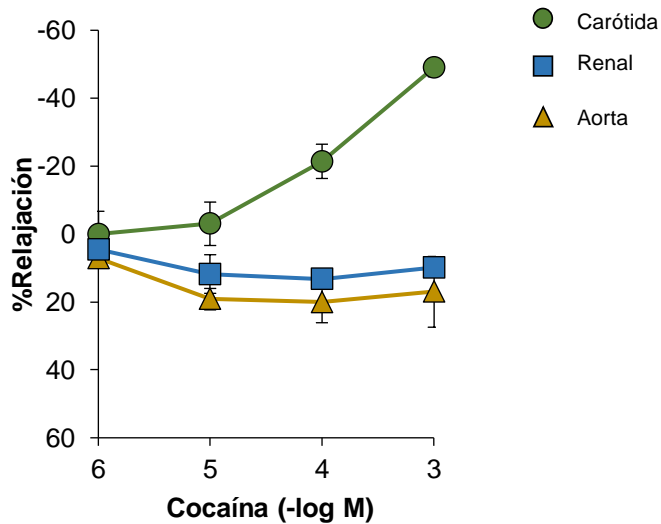


Figura 14. Efectos de la cocaína sobre el tono vascular en segmentos de arteria carótida, renal y aorta contraídos con NA 10^{-7} M. $n=4$ para cada condición experimental. Cada punto representa la media \pm error estándar.

La administración conjunta de levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M) no modificó la respuesta relajante máxima inducida por el levamisol (10^{-3} M) solo (38 ± 11 vs 39 ± 3 , (n=4) en arteria carótida; 92 ± 3 vs 93 ± 4 , (n=3) en arteria renal y 64 ± 7 vs 67 ± 4 , (n=4) en aorta, comparando el Emax de levamisol más cocaína vs el Emax de levamisol respectivamente). En todos los lechos estudiados los efectos del levamisol prevalecieron sobre los de la cocaína.

6. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta inducida por agonistas contráctiles

6.1. Respuesta al KCl

La incubación con levamisol (10^{-5} y 10^{-3} M) o cocaína (10^{-6} y 10^{-4} M) no modificó la respuesta contráctil al KCl en ninguno de los tres lechos estudiados. Estos resultados indican que ambas sustancias no afectan la capacidad contráctil de los vasos (Figura 15).

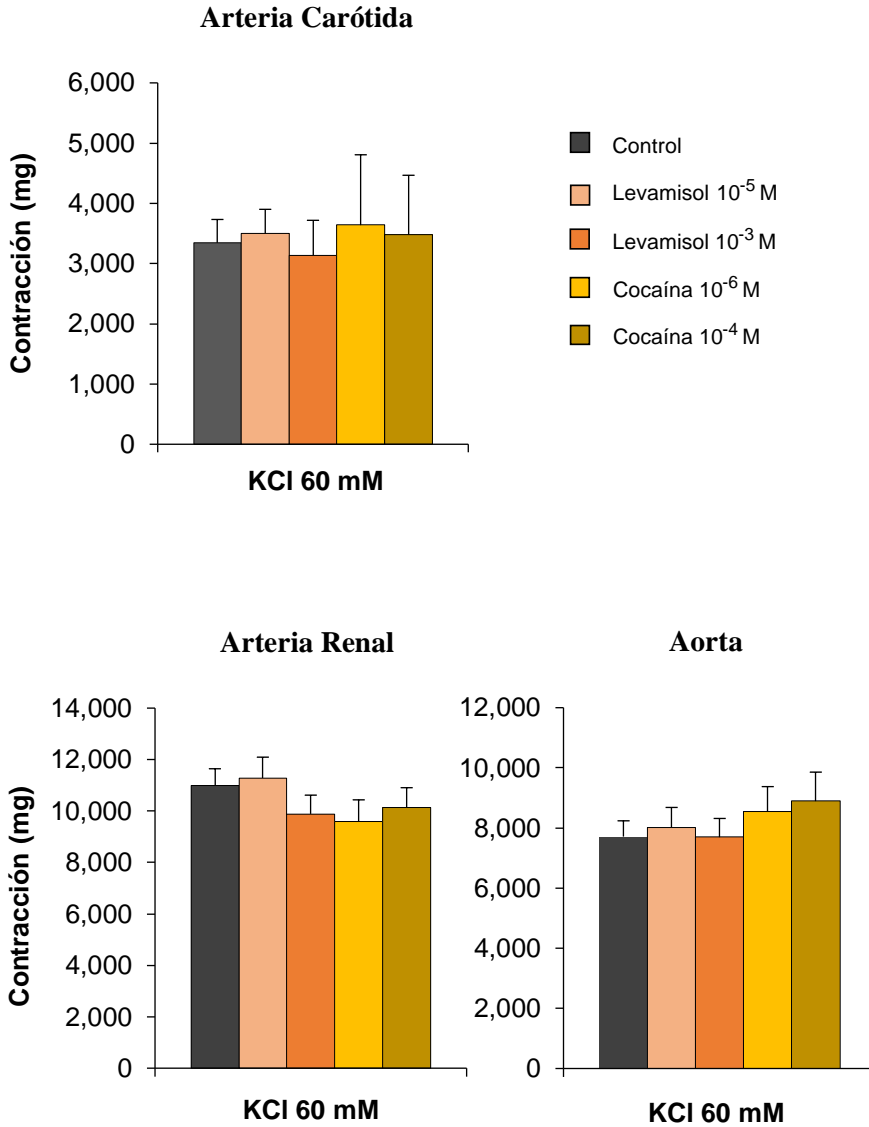


Figura 15. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta contráctil al KCl 60 mM en segmentos de arteria carótida, renal y aorta. $n=5$ para cada condición experimental. Cada punto representa la media \pm error estándar.

6.2. Respuesta adrenérgica inducida por fenilefrina

Para valorar los efectos postsinápticos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta adrenérgica, se realizaron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina (10^{-9} - 10^{-4} M) en las arterias carótida, renal y aorta, en ausencia y presencia de levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M), cocaína (10^{-5} - 10^{-4} M) y la combinación de ambas sustancias. La fenilefrina indujo una contracción dependiente de la concentración en los tres lechos estudiados.

En la arteria carótida, la incubación con levamisol (10^{-5} - 10^{-4} M) no modificó la respuesta contráctil a la fenilefrina, mientras que el levamisol a concentraciones elevadas (10^{-3} M) disminuyó significativamente la sensibilidad a la fenilefrina, medida en términos de pD_2 , y el efecto máximo (E_{max}) (Figura 16A). La incubación con cocaína (10^{-4} M) aumentó significativamente el valor de la pD_2 sin modificar el efecto máximo. Bajas concentraciones de cocaína (10^{-5} M) no alteraron la respuesta contráctil a la fenilefrina (Figura 16B). Cuando la curva de fenilefrina se realizó en presencia de levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M), el resultado fue el mismo que con levamisol (10^{-3} M) solo. (Figura 16C). La Tabla 3 recoge los valores de pD_2 y efecto máximo producido por la fenilefrina, en presencia de levamisol y cocaína en segmentos de arteria carótida.

Arteria Carótida

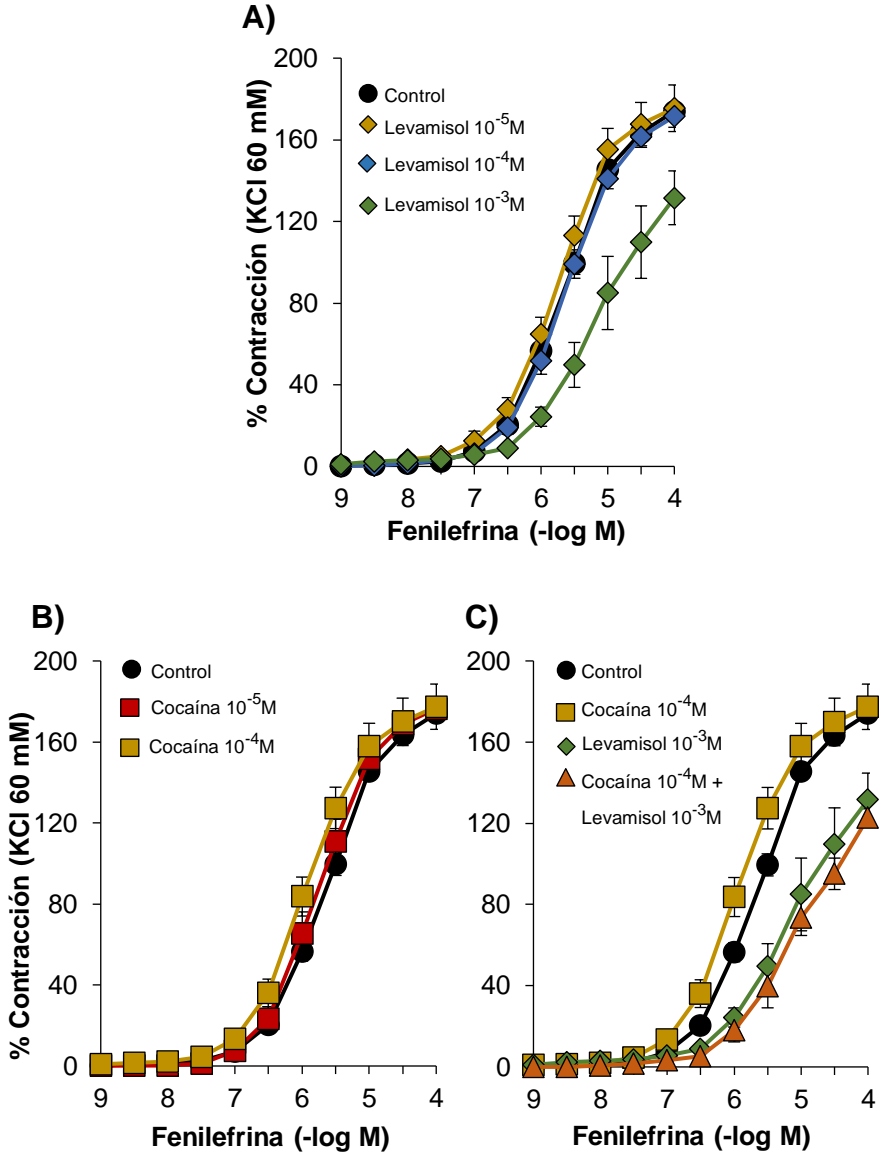


Figura 16. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en segmentos de arteria carótida en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína y (C) la combinación de ambas sustancias. Cada punto representa la media \pm error estándar.

Tabla 3. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la fenilefrina en segmentos de arteria carótida en las diferentes condiciones experimentales.

Fenilefrina	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Control	10	$5,7 \pm 0,1$	177 ± 4
Levamisol 10^{-5} M	7	$5,8 \pm 0,1$	175 ± 10
Levamisol 10^{-4} M	7	$5,6 \pm 0,1$	171 ± 5
Levamisol 10^{-3} M	7	$5,1 \pm 0,1^*$	$132 \pm 9^*$
Cocaína 10^{-5} M	6	$5,8 \pm 0,1$	176 ± 6
Cocaína 10^{-4} M	6	$6,0 \pm 0,1^*$	178 ± 4
Levamisol 10^{-3} M + Cocaína 10^{-4} M	5	$5,2 \pm 0,1^*$	$123 \pm 4^*$

n = número de conejos.

* $P < 0,05$ comparado con el control

En la arteria renal, la incubación con levamisol (10^{-4} - 10^{-3} M) disminuyó significativamente la sensibilidad a la fenilefrina de forma concentración dependiente y sin cambios en el E_{max} (Figura 17A), mientras que cocaína no modificó la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (Figura 17B). Al igual que ocurre en arteria carótida, la administración conjunta de levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M) no modificó los efectos producidos por el levamisol cuando se administró solo (Figura 17C). La Tabla 4 recoge los valores de pD_2 y del efecto máximo producido por la fenilefrina, en presencia de levamisol y cocaína en segmentos de arteria renal.

Arteria Renal

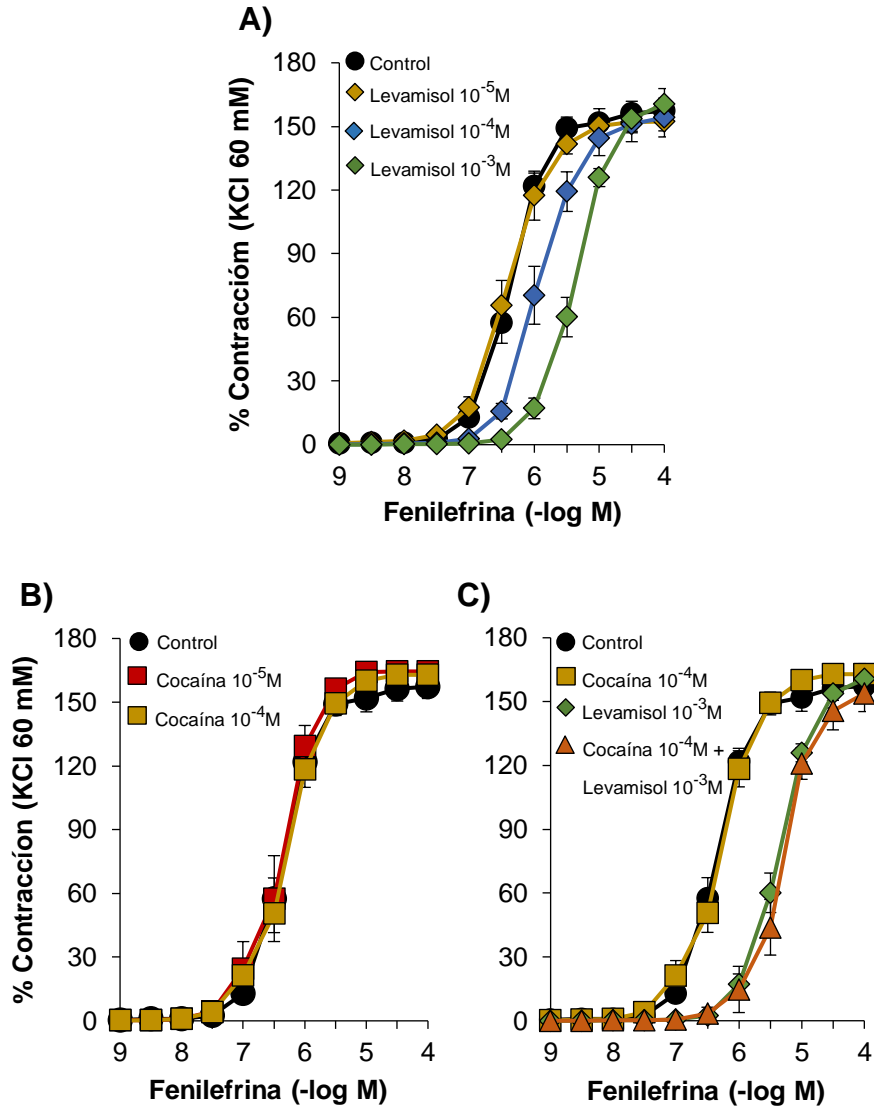


Figura 17. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en segmentos de arteria renal en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína y (C) la combinación de ambas sustancias. Cada punto representa la media \pm error estándar.

Tabla 4. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la fenilefrina en segmentos de arteria renal en las diferentes condiciones experimentales.

Fenilefrina	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Control	13	$6,3 \pm 0,1$	157 ± 6
Levamisol 10^{-5} M	5	$6,4 \pm 0,1$	152 ± 4
Levamisol 10^{-4} M	5	$5,9 \pm 0,1^*$	154 ± 9
Levamisol 10^{-3} M	5	$5,5 \pm 0,1^*$	161 ± 7
Cocaína 10^{-5} M	7	$6,4 \pm 0,2$	165 ± 2
Cocaína 10^{-4} M	7	$6,3 \pm 0,1$	163 ± 4
Levamisol 10^{-3} M + Cocaína 10^{-4} M	7	$5,4 \pm 0,1^*$	154 ± 8

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

En la aorta, mientras que el levamisol (10^{-4} - 10^{-3} M) disminuyó significativamente la respuesta a la fenilefrina de forma concentración dependiente (Figura 18A), la cocaína no produjo ningún efecto sobre la respuesta a la fenilefrina (Figura 18B). De igual forma, la administración conjunta de levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M) no modificó los efectos producidos por el levamisol cuando se administró solo (Figura 18C). La Tabla 5 recoge los valores de pD_2 y del efecto máximo producido por la fenilefrina en las distintas condiciones experimentales.

Aorta

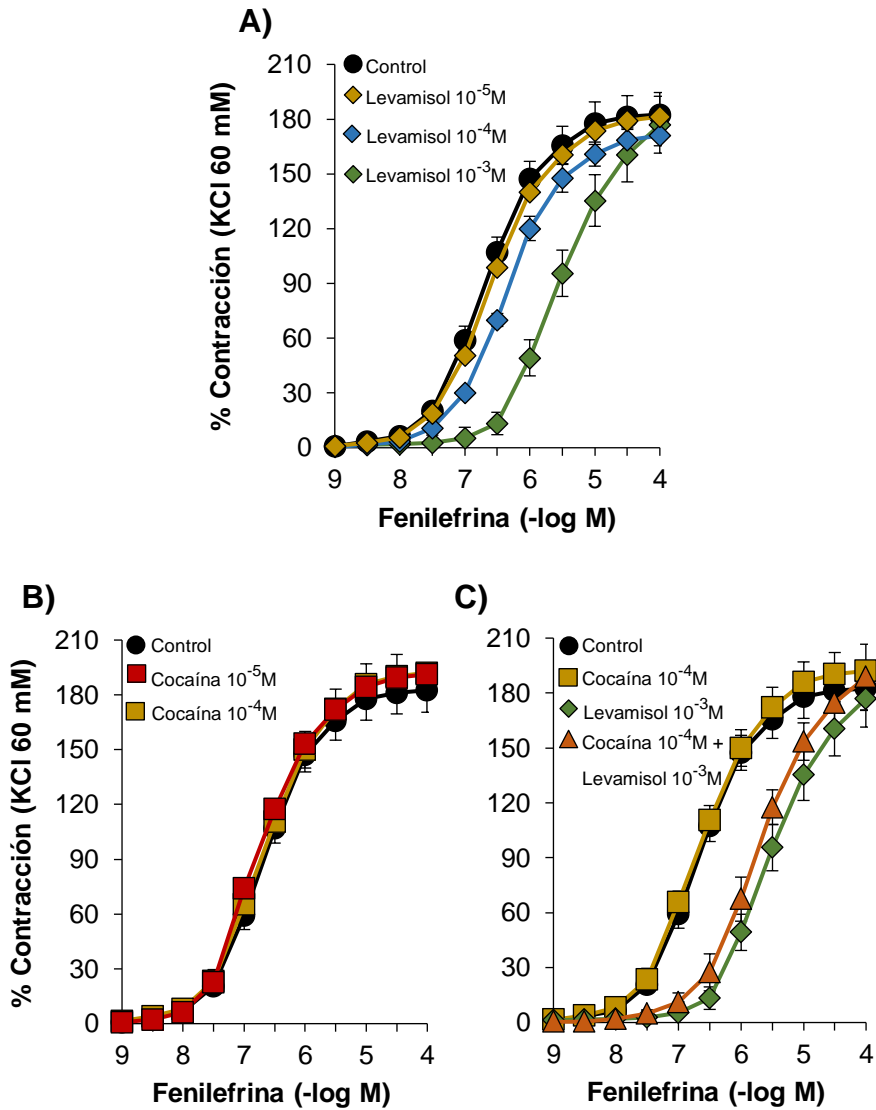


Figura 18. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en segmentos de aorta en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína y (C) la combinación de ambas sustancias. Cada punto representa la media \pm error estándar.

Tabla 5. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la fenilefrina en segmentos de aorta en las diferentes condiciones experimentales.

Fenilefrina	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Control	8	$6,7 \pm 0,1$	185 ± 10
Levamisol 10^{-5} M	6	$6,6 \pm 0,1$	181 ± 14
Levamisol 10^{-4} M	6	$6,4 \pm 0,1^*$	171 ± 6
Levamisol 10^{-3} M	6	$5,6 \pm 0,1^*$	177 ± 13
Cocaína 10^{-5} M	7	$6,8 \pm 0,1$	196 ± 9
Cocaína 10^{-4} M	7	$6,7 \pm 0,1$	198 ± 13
Levamisol 10^{-3} M + Cocaína 10^{-4} M	7	$6,0 \pm 0,2$	168 ± 11

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

6.3. Respuesta al estímulo nervioso simpático

6.3.1. Naturaleza del estímulo eléctrico

El estímulo eléctrico (15 V, 0,2 ms de duración, 2, 4 y 8 Hz durante 30 s), indujo una contracción dependiente de la frecuencia en segmentos de los tres lechos vasculares. Esta contracción fue abolida al incubar con tetrodotoxina, guanetidina o prazosín (todos a la concentración de 10^{-6} M) en todo el rango de frecuencias estudiado, lo cual indica que la contracción inducida por el estímulo eléctrico es de origen nervioso simpático, se debe a la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares y a la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos y no a un estímulo directo sobre el músculo liso vascular (Figura 19).

Aunque la naturaleza del estímulo nervioso simpático se caracteriza en un rango de frecuencias entre 2 y 8 Hz, los efectos del levamisol y la cocaína se estudiaron utilizando frecuencias de 4 Hz en la carótida y de 8 Hz en las arterias renal y aorta.

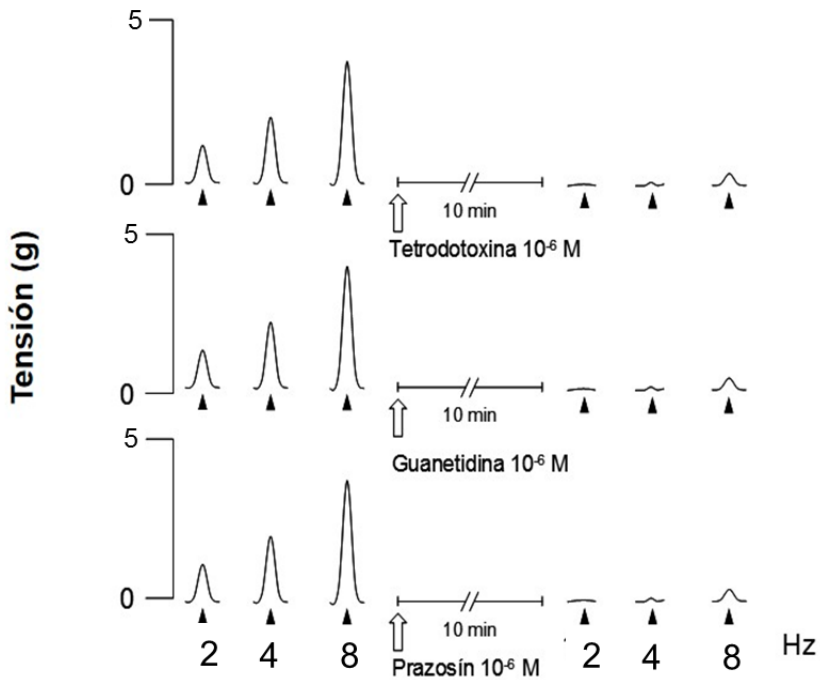


Figura 19. Ejemplo de registro de la respuesta al estímulo eléctrico perivascular en segmentos de aorta.

6.3.2. Curvas frecuencia-respuesta

Para estudiar los efectos presinápticos del levamisol y de la cocaína sobre la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático, se

realizaron curvas frecuencia-respuesta en ausencia y presencia de levamisol (10^{-6} - 10^{-3} M), cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) y la combinación de ambas sustancias.

En la arteria carótida, tanto el levamisol (10^{-6} - 10^{-4} M) como la cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) produjeron un aumento significativo de la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático ($25 \pm 1\%$ para control, $52 \pm 5\%$ para levamisol (10^{-4} M) y $45 \pm 2\%$ para cocaína (10^{-4} M)), siendo la respuesta del levamisol mayor que la producida por la cocaína. La administración conjunta de levamisol (10^{-4} M) y cocaína (10^{-4} M) incrementó aún más la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático ($64 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Por otro lado, altas concentraciones de levamisol (10^{-3} M) disminuyen significativamente la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático, ya sea cuando se administra solo o conjuntamente con la cocaína (Figura 20).

Arteria Carótida

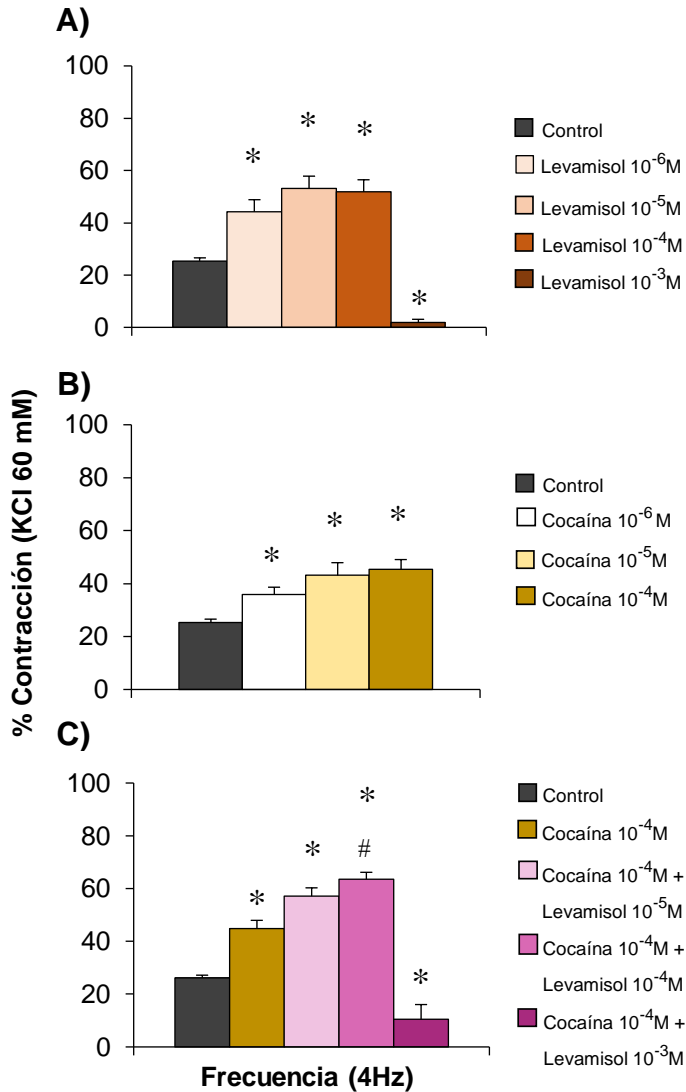


Figura 20. Respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático en la arteria carótida en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína o (C) la administración conjunta de ambas sustancias. $n=6$ para cada condición experimental (*) $P<0,05$ comparado con el control. (#) $P<0,05$ comparado con cocaína 10^{-4} M.

En la arteria renal, la administración de levamisol (10^{-5} - 10^{-4} M) o cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) produjo un aumento significativo de la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático ($33 \pm 3\%$ para control, $45 \pm 3\%$ para levamisol (10^{-5} M) y $55 \pm 5\%$ para cocaína (10^{-4} M)), siendo la respuesta del levamisol menor que la producida por la cocaína. La administración conjunta de levamisol (10^{-5} - 10^{-4} M) y cocaína (10^{-4} M) incrementa aún más la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático ($62 \pm 6\%$, $p < 0,05$) lo que indica un posible sinergismo entre ambas sustancias. Sin embargo, altas concentraciones de levamisol (10^{-3} M) reducen significativamente la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático, ya sea administrado solo o conjuntamente con cocaína (10^{-4} M) (Figura 21).

Arteria Renal

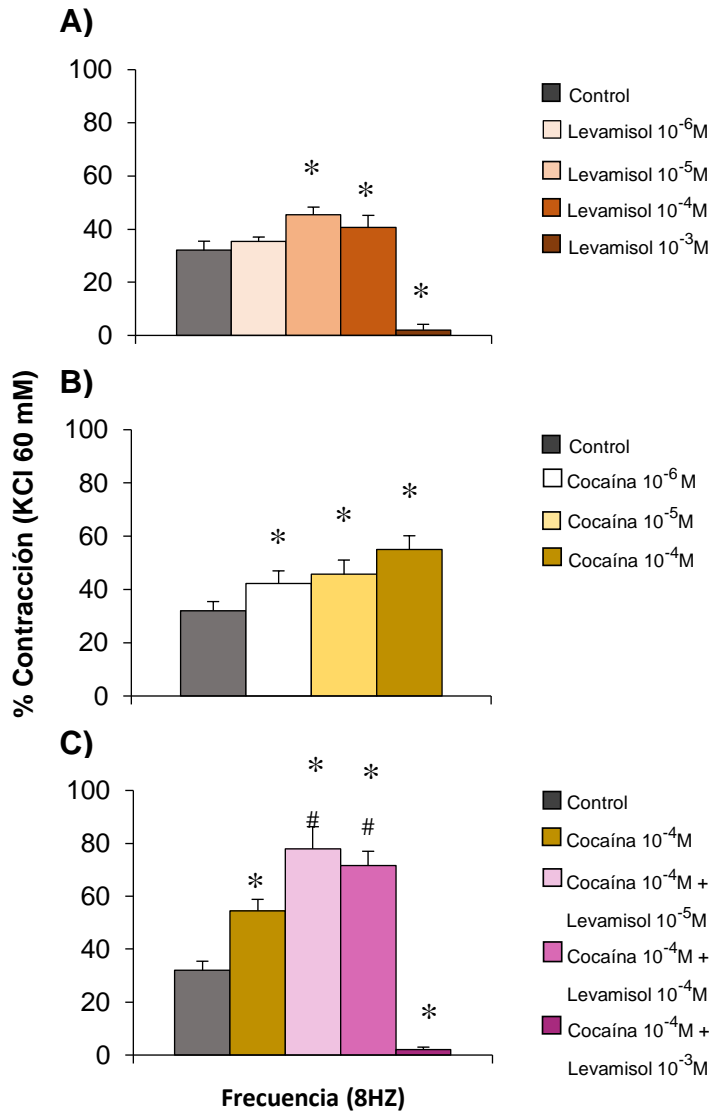


Figura 21. Respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico en la arteria renal en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína o (C) la administración conjunta de ambas sustancias. $n=6$ para cada condición experimental. (*) $P<0,05$ comparado con el control. (#) $P<0,05$ comparado con cocaína 10^{-4} M.

En la aorta, la administración de levamisol (10^{-6} - 10^{-4} M) o cocaína (10^{-6} - 10^{-4} M) presentan un patrón de respuesta similar al de las arterias carótida y renal. Ambas sustancias aumentan significativamente la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático ($20 \pm 1\%$ para control, $41 \pm 4\%$ para levamisol (10^{-5} M) y $36 \pm 2\%$ para cocaína (10^{-4} M)), siendo la respuesta del levamisol mayor que la producida por la cocaína. Sin embargo la administración conjunta no produce un incremento en la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático ($39 \pm 6\%$ para levamisol (10^{-5} M) y cocaína (10^{-4} M)), lo que indica que en este lecho no se produce sinergismo entre ambas sustancias. Del mismo modo que ocurre en los otros lechos vasculares, altas concentraciones de levamisol (10^{-3} M) prácticamente bloquean la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático, tanto si se administra solo o conjuntamente con cocaína (10^{-4} M) (Figura 22).

Aorta

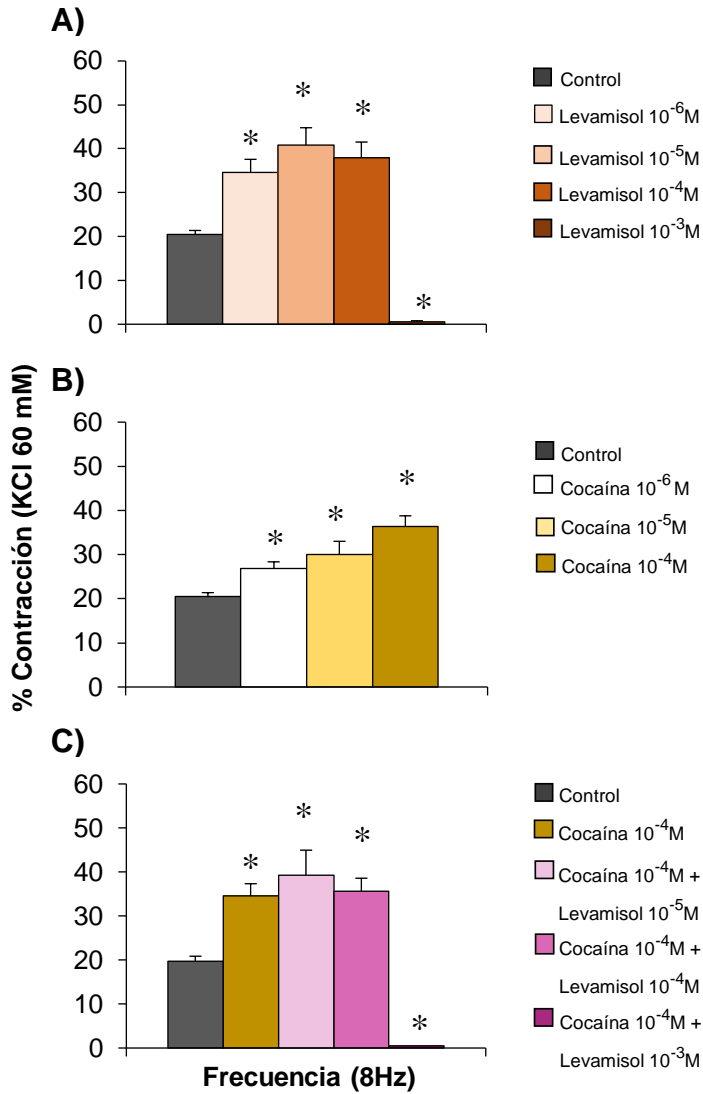


Figura 22. Respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico en la aorta en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína o (C) la administración conjunta de ambas sustancias. $n=6$ para cada condición experimental. (*) $P<0,05$ comparado con el control.

7. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta relajante dependiente del endotelio

Para estudiar los efectos del levamisol y la cocaína sobre la relajación dependiente del endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en las arterias carótida, renal y aorta previamente contraídas con NA (10^{-7} M), en ausencia y presencia de levamisol (10^{-5} - 10^{-3} M), cocaína (10^{-5} - 10^{-4} M) y la combinación de ambas sustancias. La acetilcolina indujo una relajación dependiente de la concentración en los tres lechos estudiados.

En la arteria carótida el levamisol (10^{-5} M) no modificó la respuesta relajante a la acetilcolina, mientras que concentraciones mayores de levamisol (10^{-4} - 10^{-3} M) la disminuyó significativamente, medida en términos de pD_2 , y E_{max} (Figura 23A). La incubación con cocaína (10^{-5} - 10^{-4} M) no modificó la respuesta a la acetilcolina (Figura 23B). La respuesta relajante a la acetilcolina en presencia de levamisol (10^{-3} M) no varió cuando se administraron de forma conjunta levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M) (Figura 23C). La Tabla 6 recoge los valores de pD_2 y del efecto máximo producido por la acetilcolina en presencia de levamisol y cocaína en segmentos de arteria carótida.

Arteria Carótida

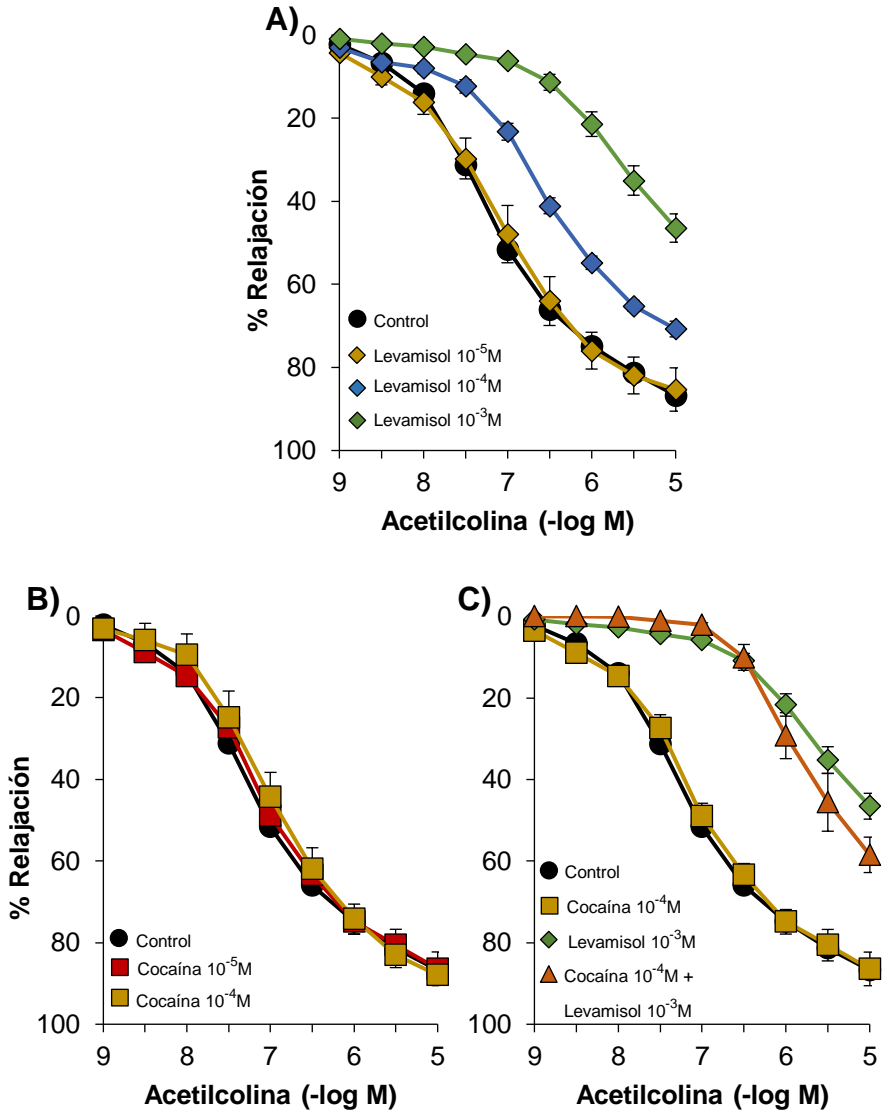


Tabla 6. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria carótida en las diferentes condiciones experimentales.

Acetilcolina	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	10	$7,2 \pm 0,1$	85 ± 1
Levamisol 10^{-5} M	4	$7,1 \pm 0,1$	85 ± 5
Levamisol 10^{-4} M	5	$6,7 \pm 0,1^*$	$71 \pm 2^*$
Levamisol 10^{-3} M	6	$6,9 \pm 0,1^*$	$45 \pm 3^*$
Cocaína 10^{-5} M	7	$7,1 \pm 0,2$	86 ± 2
Cocaína 10^{-4} M	5	$7,0 \pm 0,1$	88 ± 4
Levamisol 10^{-3} M + Cocaína 10^{-4} M	4	$6,0 \pm 0,2^*$	$58 \pm 4^*$

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

En la arteria renal, la incubación con levamisol (10^{-5} - 10^{-4} M) no modificó la respuesta a la acetilcolina. Es necesaria una concentración mayor de levamisol (10^{-3} M) para disminuir significativamente la sensibilidad a la acetilcolina (Figura 24A). La incubación con cocaína (10^{-5} - 10^{-4} M) disminuyó la relajación inducida por la acetilcolina de forma concentración-dependiente (Figura 24B). Al igual que ocurre en la arteria carótida, la administración conjunta de levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M) no modificó los efectos de la administración única de levamisol (10^{-3} M) (Figura 24C). La Tabla 7 recoge los valores de pD_2 y del efecto máximo producido por la acetilcolina, en presencia de levamisol y cocaína, en segmentos de arteria renal.

Arteria Renal

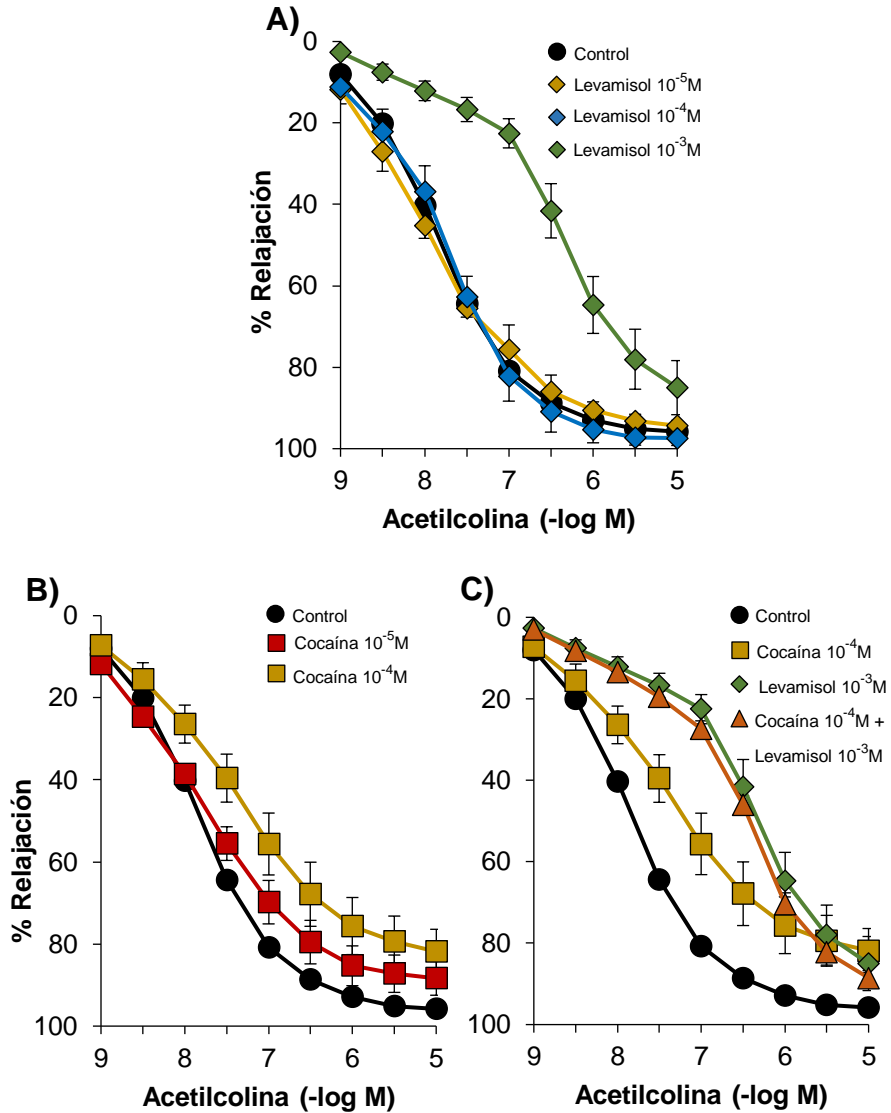


Figura 24. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria renal contraídos con NA 10^{-7} , en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína y (C) la combinación de ambas sustancias. Cada punto representa la media \pm error estándar.

Tabla 7. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria renal en las diferentes condiciones experimentales.

Acetilcolina	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Control	10	$7,8 \pm 0,0$	96 ± 1
Levamisol 10^{-5} M	7	$7,8 \pm 0,3$	95 ± 2
Levamisol 10^{-4} M	7	$7,8 \pm 0,1$	97 ± 2
Levamisol 10^{-3} M	9	$6,6 \pm 0,1^*$	$85 \pm 6^*$
Cocaína 10^{-5} M	9	$7,6 \pm 0,1^*$	$88 \pm 4^*$
Cocaína 10^{-4} M	7	$7,2 \pm 0,1^*$	$82 \pm 5^*$
Levamisol 10^{-3} M + Cocaína 10^{-4} M	4	$6,6 \pm 0,1^*$	$88 \pm 2^*$

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

En la aorta, el levamisol (10^{-5} M) disminuyó la relajación máxima a la acetilcolina sin modificar la pD_2 . Concentraciones mayores de levamisol (10^{-4} - 10^{-3} M) disminuyeron significativamente tanto el E_{max} como la pD_2 de forma concentración dependiente (Figura 25A). La cocaína (10^{-4} M) produjo una disminución significativa de la respuesta relajante inducida por acetilcolina (Figura 25B). Del mismo modo que ocurre en los otros territorios vasculares estudiados, la administración conjunta de levamisol (10^{-3} M) y cocaína (10^{-4} M) no modificó los efectos producidos por el levamisol cuando se administró solo (Figura 25C). La Tabla 8 recoge los valores de pD_2 y del efecto máximo producido por la acetilcolina, en presencia de levamisol y cocaína, en segmentos de aorta.

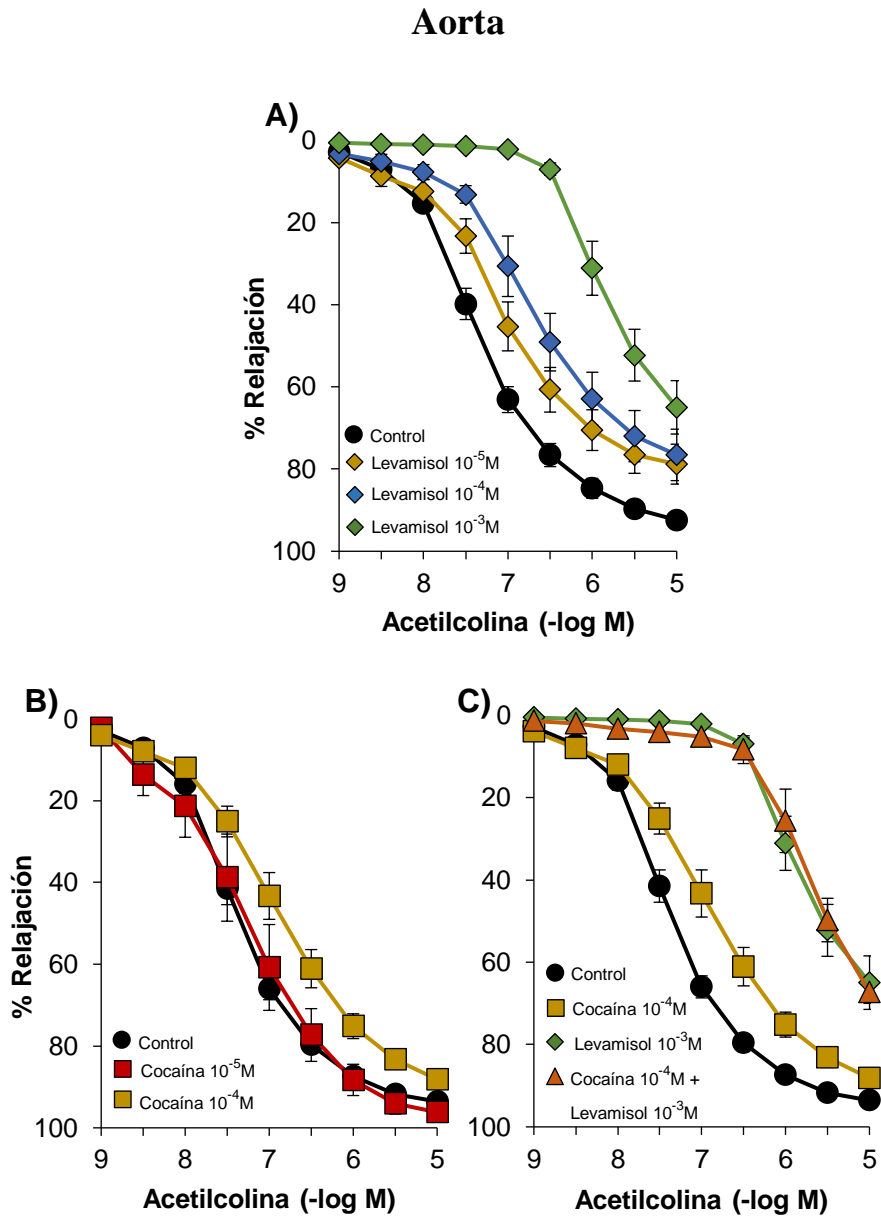


Figura 25. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de aorta contraídos con NA 10^{-7} , en presencia de (A) levamisol, (B) cocaína y (C) la combinación de ambas sustancias. Cada punto representa la media \pm error estándar.

Tabla 8. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de aorta en las diferentes condiciones experimentales.

Acetilcolina	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Control	14	$7,4 \pm 0,1$	93 ± 1
Levamisol 10^{-5} M	7	$7,1 \pm 0,1$	$79 \pm 5^*$
Levamisol 10^{-4} M	6	$6,8 \pm 0,1^*$	$77 \pm 6^*$
Levamisol 10^{-3} M	5	$6,0 \pm 0,1^*$	$65 \pm 6^*$
Cocaína 10^{-5} M	5	$7,3 \pm 0,1$	96 ± 2
Cocaína 10^{-4} M	6	$7,0 \pm 0,1^*$	$86 \pm 2^*$
Levamisol 10^{-3} M + Cocaína 10^{-4} M	5	$6,0 \pm 0,1^*$	$67 \pm 3^*$

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

En resumen, la disminución de la respuesta a la acetilcolina tanto en presencia de levamisol como de cocaína es compatible con una disfunción endotelial dependiente del lecho vascular. Puesto que la PGI_2 el NO y los canales de K^+ no intervienen en la respuesta relajante al levamisol, es posible que esta disfunción esté relacionada con el estrés oxidativo.

7.1. Participación de radicales libres en la respuesta al levamisol y a la cocaína

La disminución en la relajación inducida por acetilcolina en presencia de levamisol y cocaína podría deberse a un aumento de producción de radicales libres. Para valorar la influencia del estrés oxidativo inducido por estas sustancias, se realizaron curvas de acetilcolina en presencia de levamisol o cocaína en ausencia y en presencia de SOD (200 U/ml), que fue utilizada para inactivar el radical superóxido.

En presencia de SOD los efectos del levamisol (10^{-3} M) sobre la relajación a la acetilcolina disminuyeron parcialmente en los tres vasos estudiados (Figura 26, tabla 9), mientras que revirtió completamente los efectos de la cocaína (10^{-4} M) sobre la respuesta a la acetilcolina en las arterias renal y aorta (Figura 27, Tabla 10).

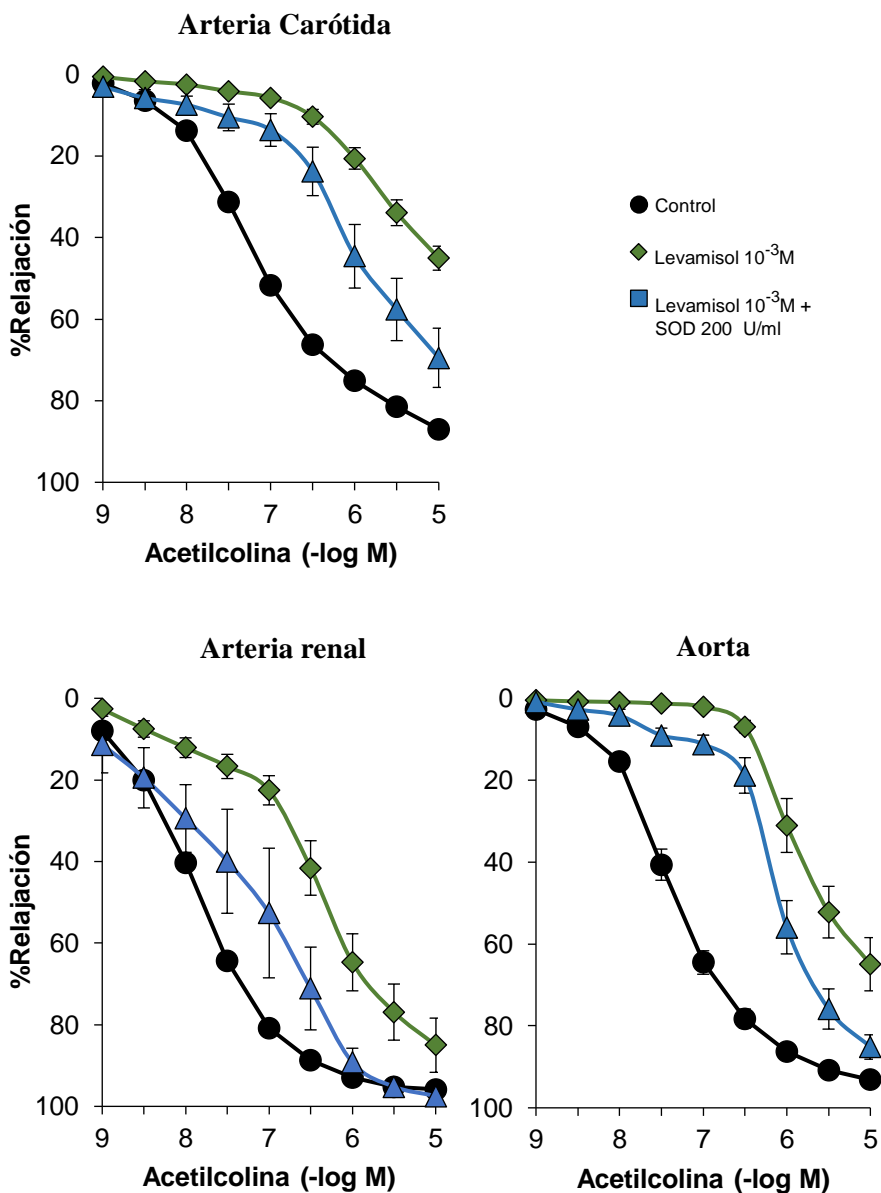


Figura 26. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia y en presencia de levamisol 10⁻³M y de levamisol 10⁻³M + SOD 200 U/ml en segmentos de arterias carótida, renal y aorta contraídas con NA 10⁻⁷ M. Cada punto representa la media ± error estándar.

Tabla 9. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arterias carótida, renal y aorta en las diferentes condiciones experimentales.

Acetilcolina	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Arteria carótida			
Control	10	$7,2 \pm 0,0$	87 ± 1
Levamisol 10^{-3} M	6	$6,9 \pm 0,1^*$	$45 \pm 3^*$
Levamisol 10^{-3} M + SOD 200U/ml	4	$6,2 \pm 0,1\#$	$70 \pm 7\#$
Arteria renal			
Control	10	$7,8 \pm 0,0$	96 ± 1
Levamisol 10^{-3} M	9	$6,6 \pm 0,1^*$	$85 \pm 6^*$
Levamisol 10^{-3} M + SOD 200U/ml	4	$7,3 \pm 0,1\#$	$96 \pm 1\#$
Aorta			
Control	10	$7,4 \pm 0,1$	93 ± 1
Levamisol 10^{-3} M	5	$6,0 \pm 0,1^*$	$65 \pm 6^*$
Levamisol 10^{-3} M + SOD 200U/ml	4	$6,2 \pm 0,0\#$	$85 \pm 3\#$

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

$P < 0,05$ comparado con levamisol 10^{-3} M

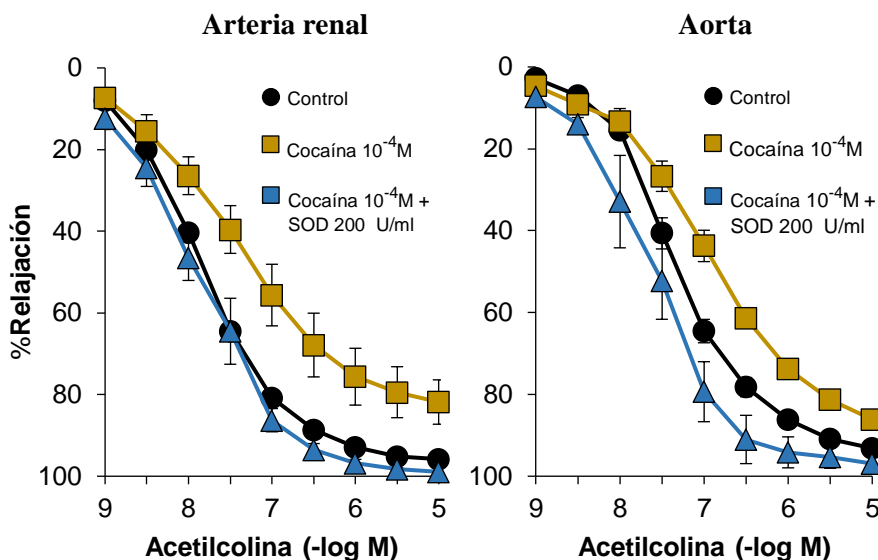


Figura 27. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia y en presencia de cocaína 10^{-4} M y de cocaína 10^{-4} M + SOD 200 U/ml en segmentos de arterias renal y aorta contraídas con NA 10^{-7} M. Cada punto representa la media \pm error estándar.

Tabla 10. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arterias renal y aorta en las diferentes condiciones experimentales.

Acetilcolina	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Arteria renal			
Control	10	$7,8 \pm 0,0$	96 ± 1
Cocaína 10^{-4} M	10	$7,5 \pm 0,2^*$	$82 \pm 6^*$
Cocaína 10^{-4} M + SOD 200U/ml	4	$7,9 \pm 0,1\#$	$99 \pm 0\#$
Aorta			
Control	10	$7,4 \pm 0,1$	93 ± 1
Cocaína 10^{-4} M	8	$7,4 \pm 0,1^*$	$86 \pm 2^*$
Cocaína 10^{-4} M + SOD 200U/ml	4	$7,8 \pm 0,2\#$	$97 \pm 2\#$

n = número de conejos

* $P < 0,05$ comparado con el control

$P < 0,05$ comparado con cocaína 10^{-4} M

8. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta relajante independiente del endotelio

Para estudiar la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente de endotelio se efectuaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico en los tres lechos arteriales. El nitroprusiato sódico produjo una relajación dependiente de la concentración que no se modificó en presencia de levamisol (10^{-3} M) ni de cocaína (10^{-4} M) (Figura 28). Estos resultados indican que ni el levamisol ni la cocaína producen cambios en la capacidad relajante del músculo liso vascular en respuesta al NO.

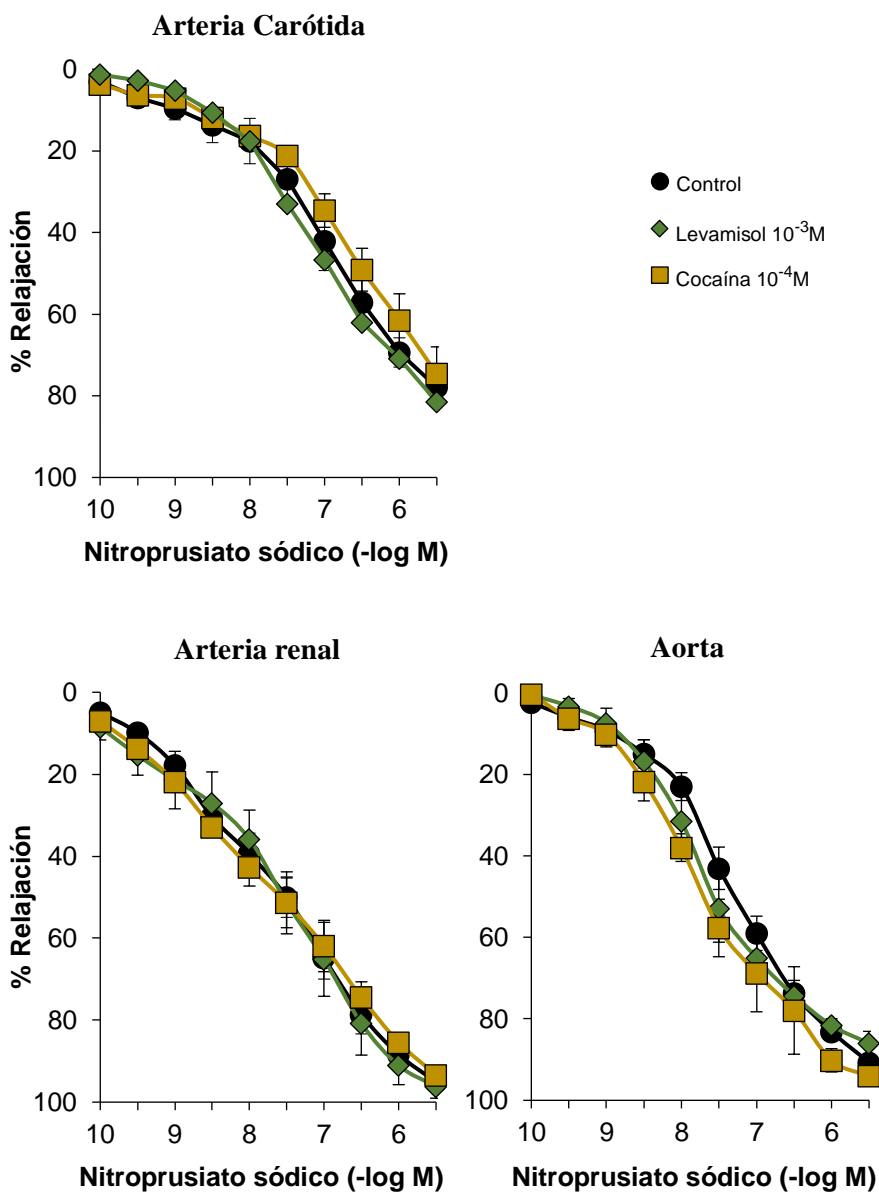


Figura 28. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico en ausencia y en presencia de levamisol 10⁻³ M y cocaína 10⁻⁴ M en segmentos de arterias carótida, renal y aorta contraídas con NA 10⁻⁷ M. n=4 para cada condición experimental. Cada punto representa la media ± error estándar.

9. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la expresión proteica

Para estudiar si los efectos vasculares inducidos por el levamisol y la cocaína producen cambios a nivel molecular que puedan afectar la reactividad del vaso, se midió la expresión proteica de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2), de la eNOS y de marcadores de estrés oxidativo (SOD1, SOD2 y Nox4) en arterias previamente incubadas con levamisol y cocaína.

En la arteria carótida, el levamisol no modificó la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos. Sin embargo, el levamisol (10^{-5} - 10^{-4} M) disminuyó significativamente la expresión de los receptores α_2 -adrenérgicos. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ambos receptores en presencia de cocaína (Figura 29).

La incubación con levamisol no modificó la expresión de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2) en la arteria renal, aunque si la disminuyó en presencia de cocaína 10^{-4} M (Figura 30).

En la aorta, el levamisol (10^{-4} M) produjo un descenso significativo de la expresión de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2), mientras que la concentración más elevada de levamisol (10^{-3} M) solo redujo la expresión de los receptores α_1 . La incubación con cocaína disminuyó la expresión de los receptores α_2 (Figura 31).

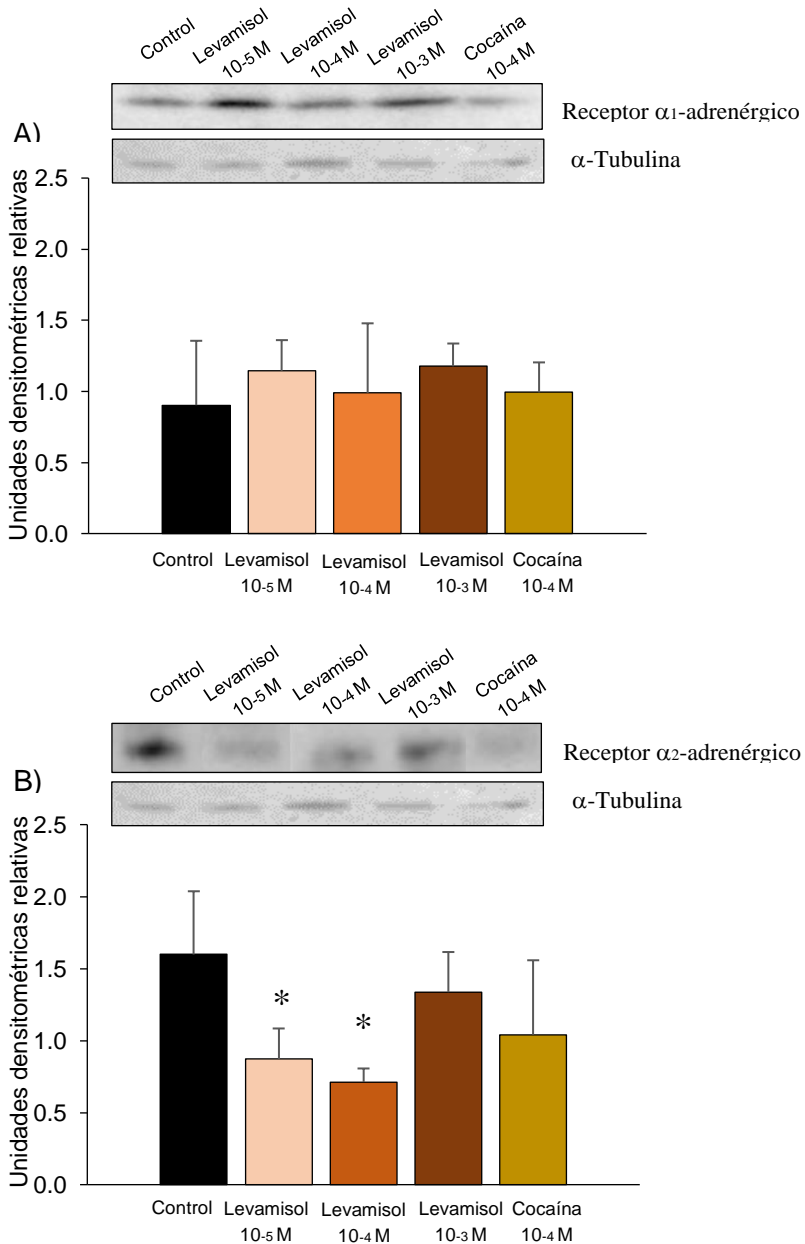


Figura 29. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de (A) receptores α_1 y (B) α_2 -adrenérgicos en arteria carótida (n=4). Las barras representan la media \pm desviación estándar. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

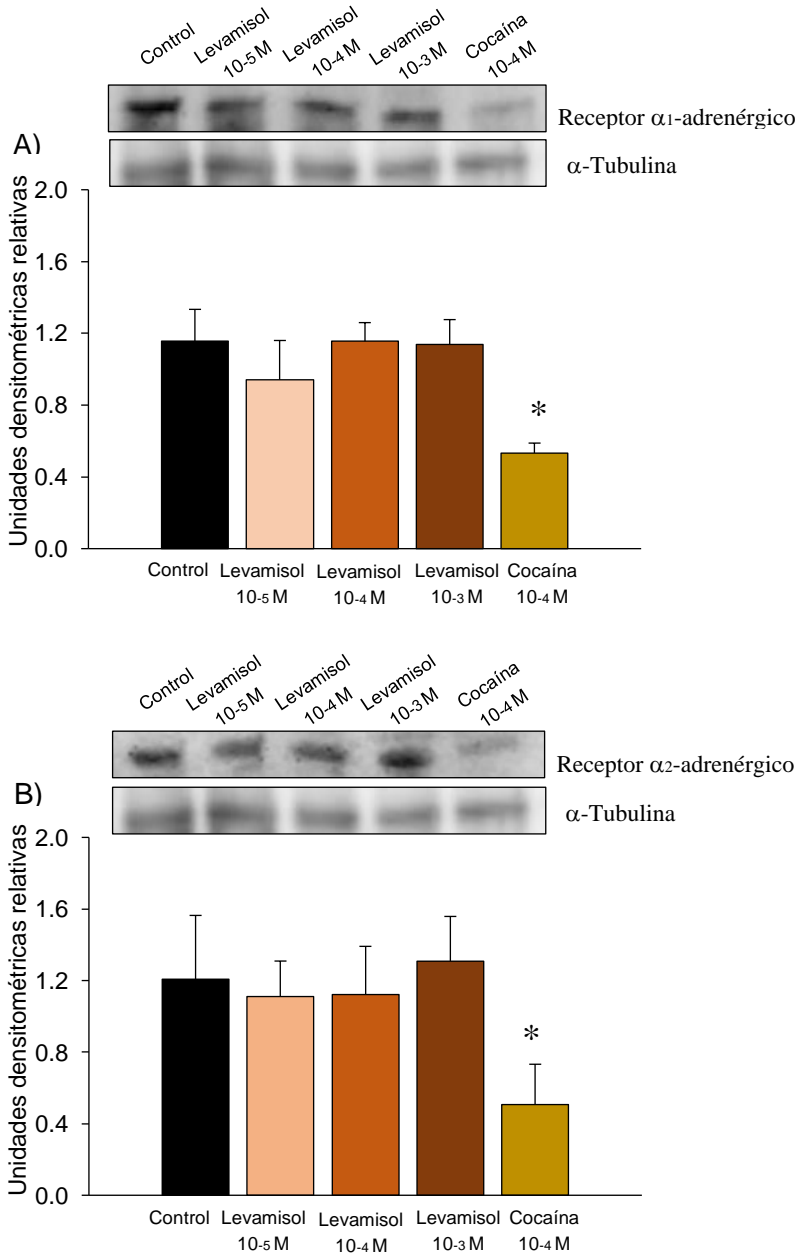


Figura 30. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de (A) receptores α_1 y (B) α_2 -adrenérgicos en arteria renal (n=4). Las barras representan la media \pm desviación estándar. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

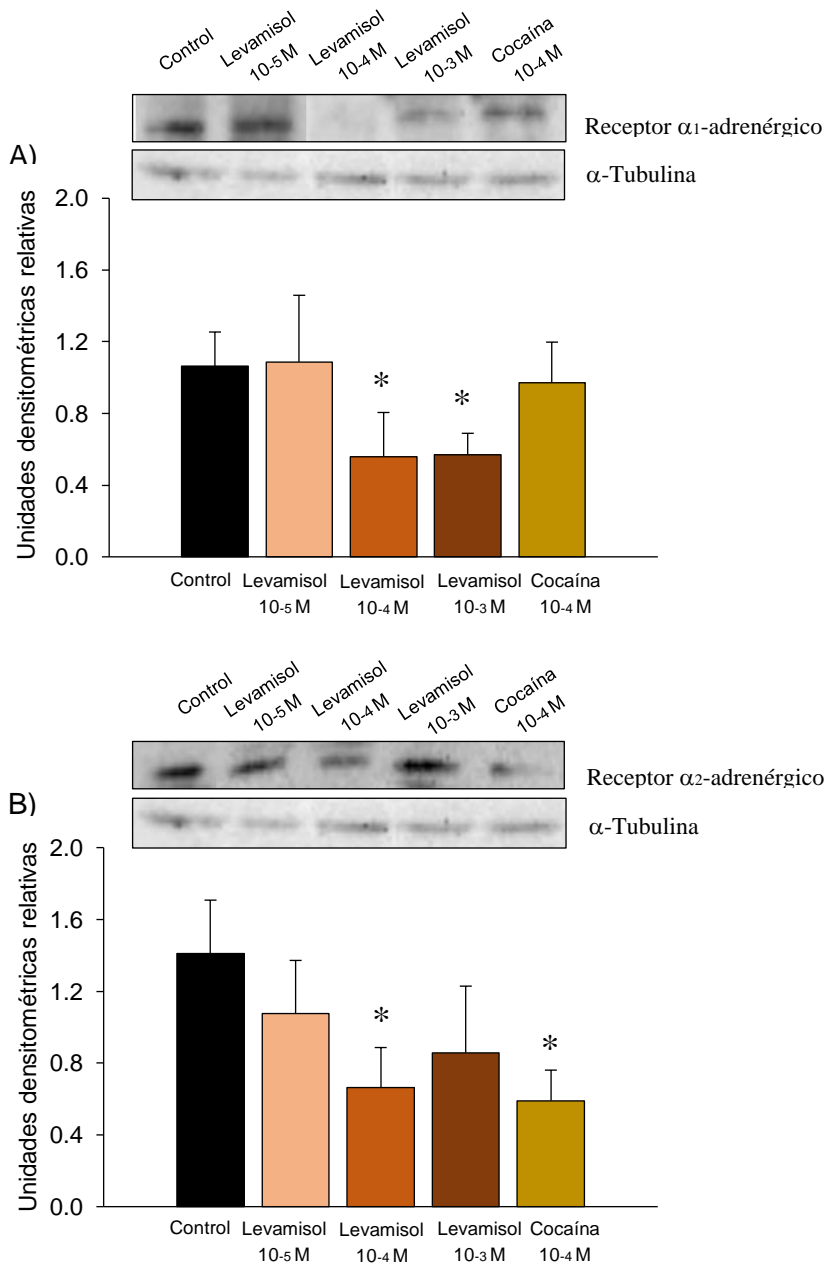


Figura 31. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de (A) receptores α_1 y (B) α_2 -adrenérgicos en aorta (n=4). Las barras representan la media \pm desviación estándar. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Debido a que el levamisol y la cocaína alteran la relajación inducida por acetilcolina y, puesto que la relajación a la acetilcolina se produce mayoritariamente por la participación de NO, hemos determinado la expresión de la eNOS, enzima implicada en las síntesis de NO.

En la arteria carótida la presencia de levamisol no modificó la expresión de la eNOS (Figura 32).

En la arteria renal, mientras que el levamisol no modificó la expresión de la eNOS, la cocaína (10^{-4} M) la disminuyó significativamente (Figura 33).

En la aorta, tanto el levamisol (10^{-4} - 10^{-3} M) como la cocaína (10^{-4} M) provocaron un descenso significativo de la expresión de la eNOS (figura 34).

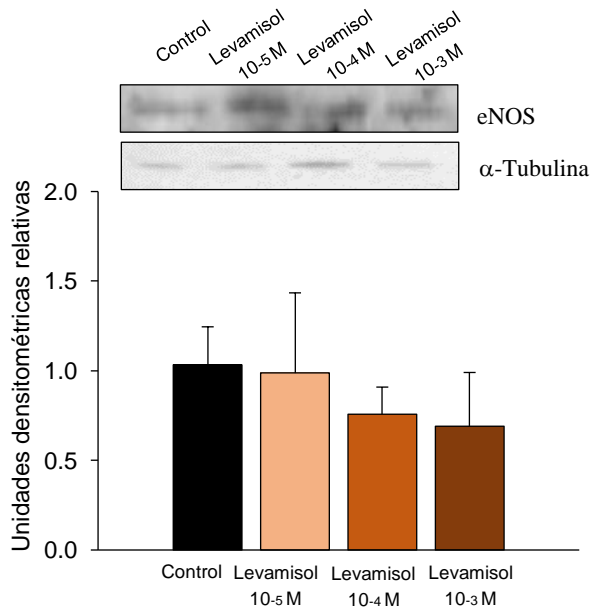


Figura 32. Efectos del levamisol en la expresión proteica de eNOS en arteria carótida (n=4). Las barras representan la media \pm desviación estándar.

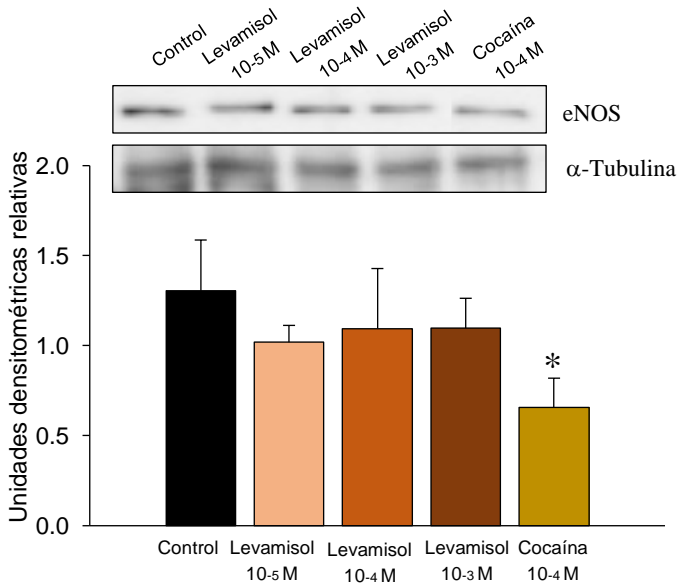


Figura 33. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de eNOS en arteria renal (n=4). Las barras representan la media \pm desviación estándar. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

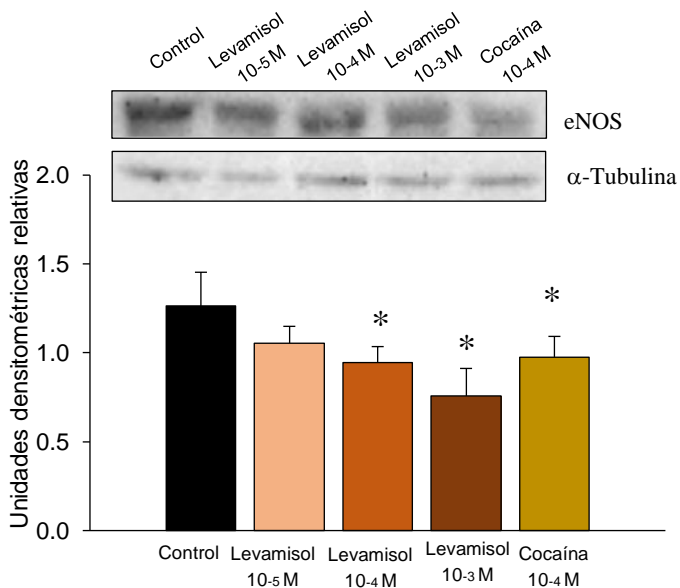


Figura 34. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de eNOS en aorta (n=4). Las barras representan la media \pm desviación estándar. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Otro componente que puede alterar la relajación dependiente del endotelio es el incremento de estrés oxidativo en la pared vascular, por ello se determinó la expresión proteica de dos isoformas de la SOD (SOD1 y SOD2), enzimas antioxidantes, y de la Nox4, enzima prooxidante y principal isoforma de la Nox a nivel vascular.

En la arteria carótida, el levamisol (10^{-3} M) no modificó la expresión proteica de las dos isoformas de la SOD pero disminuyó significativamente la expresión de Nox4 (Figura 35). En la arteria renal, tanto el levamisol (10^{-3} M) como la cocaína (10^{-4} M) disminuyeron la expresión de las dos isoformas de la SOD y aumentaron la expresión de la Nox4 de forma significativa (figura 36). En la aorta, tanto el levamisol (10^{-3} M) como la cocaína (10^{-4} M) indujeron un descenso significativo de la expresión de SOD1 y SOD2. La expresión de Nox4 no se alteró ni en presencia de levamisol (10^{-3} M) ni de cocaína (10^{-4} M) (Figura 37).

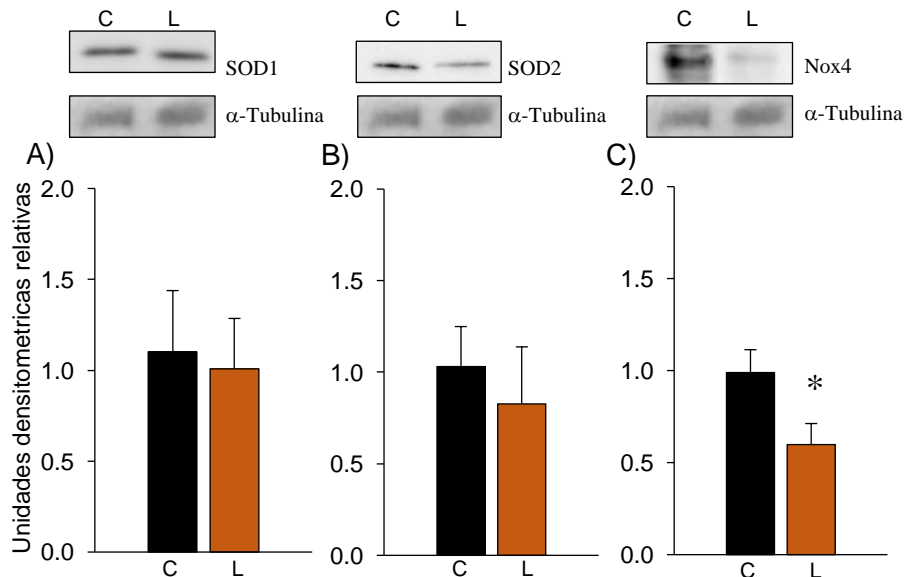


Figura 35. Efectos del levamisol en la expresión proteica de (A) SOD1, (B) SOD2 y (C) Nox4 en arteria carótida (n=4). C: control; L: Levamisol 10^{-3} M. Las barras representan la media \pm desviación estándar. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

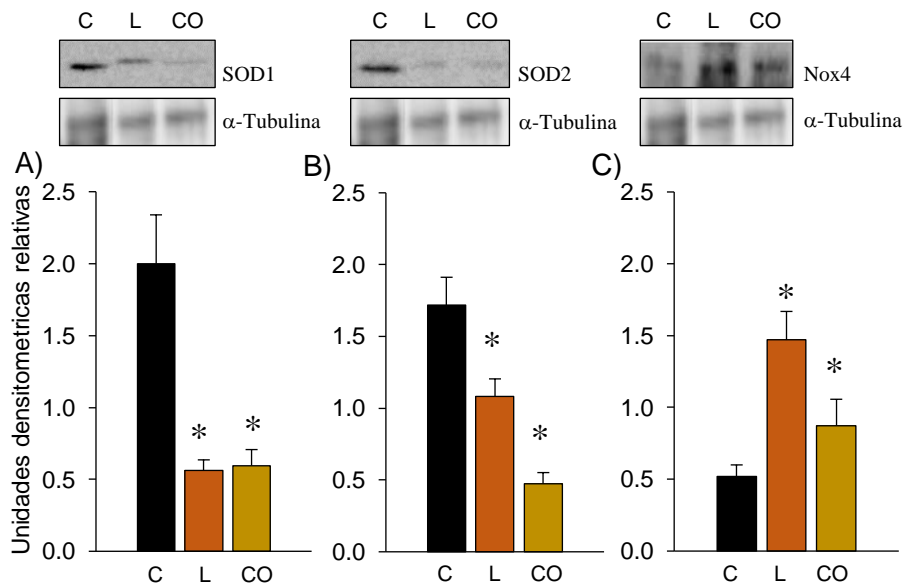


Figura 36. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de (A) SOD1, (B) SOD2 y (C) Nox4 en arteria renal (n=4). C: control; L: Levamisol 10⁻³M; CO: Cocaína 10⁻⁴M. Las barras representan la media ± desviación estándar. (*) *P*<0,05 comparado con el control.

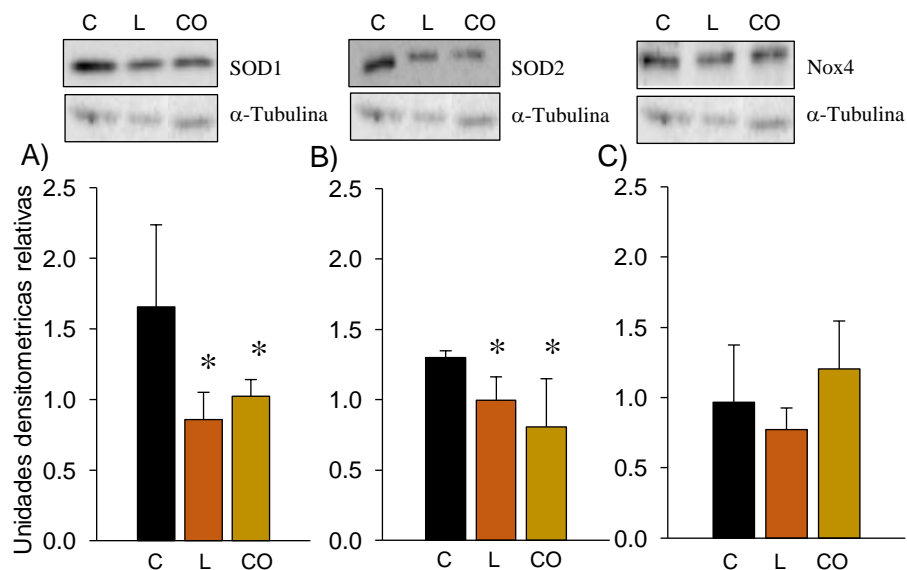


Figura 37. Efectos del levamisol y cocaína en la expresión proteica de (A) SOD1, (B) SOD2 y (C) Nox4 en aorta (n=4). C: control; L: Levamisol 10⁻³M; CO: Cocaína 10⁻⁴M. Las barras representan la media ± desviación estándar. (*) *P*<0,05 comparado con el control.

DISCUSIÓN

1. Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental

Los sistemas de baño de órganos han sido ampliamente utilizados en estudios *in vitro* para medir la tensión isométrica transversal de vasos aislados en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos. La principal ventaja de este método es que permite obtener resultados en tiempo real, de modo que rápidamente se puedan obtener conclusiones y planificar los próximos pasos, así como resolver problemas durante un experimento. Por lo general, se puede preparar varios segmentos del mismo modelo experimental y estudiarlos de forma paralela. Además, aislar el vaso del organismo vivo implica que se puede evaluar la función vascular independientemente de las influencias sistémicas, como la regulación neurohumoral. Sin embargo, esta misma ventaja puede representar una limitación a la hora de extrapolar los resultados a situaciones clínicas, ya que el vaso en sí no refleja necesariamente la situación *in vivo* debido a la falta de respuestas hemodinámicas sistémicas, como los cambios de presión arterial. Tampoco se vería reflejado lo que pueda ocurrir en vasos de resistencia como arterias de menor calibre o arteriolas, ya que este trabajo se limita a estudiar los efectos vasculares sobre arterias de mayor calibre como las arterias carótida, renal y aorta.

Otra de nuestras limitaciones es que nuestro estudio aborda los efectos agudos del levamisol y su interacción con la cocaína. Los rápidos efectos que puedan producir estas sustancias a nivel vascular durante el consumo agudo quizá no reflejen por completo lo que sucede en pacientes consumidores habituales, ya que la mayoría tiene una historia de abuso mucho más dilatada, llegando a consumir cocaína repetidas veces al día.

2. Arterias de conejo como modelo experimental

Como se describió en la introducción, los efectos adversos provocados por la cocaína adulterada con levamisol ocurren principalmente en el sistema nervioso [150–152], renal [147, 153, 154] y cardiovascular [155], y los hallazgos sugieren que el territorio vascular podría verse afectado. Puesto que los mecanismos reguladores del flujo sanguíneo no son iguales en todos los territorios vasculares, hemos abordado la influencia que el territorio vascular puede ejercer sobre la respuesta al levamisol y a la cocaína mediante su estudio en diferentes lechos: la arteria carótida, como representativa del principal aporte de flujo sanguíneo al cerebro, la arteria renal como representativa del elevado flujo que percibe el riñón como órgano diana, y la aorta, como vaso de conducción.

Por razones éticas y obvias, es difícil la obtención de muestras humanas por lo que en estos casos se recurre al uso de modelos animales. En este sentido, hemos recurrido al conejo como modelo ampliamente validado para el estudio de enfermedades cardiovasculares [156, 157]. Estudios previos en este modelo han obtenido resultados comparables a lo que puede suceder en el ser humano [158–161].

3. Efectos del levamisol y de la cocaína sobre el tono vascular

El levamisol, utilizado como adulterante de la cocaína, comparte similitudes con el mecanismo de acción de la cocaína, por lo que cabe la posibilidad de sinergismos de acción. Además, efectos adversos atribuidos a la cocaína podrían ser debidos al levamisol. Estas acciones están poco estudiadas en el sistema vascular por lo que constituyen el objetivo central del estudio.

En líneas generales el levamisol, al igual que la cocaína, no modifica el tono vascular basal. Solo a concentraciones elevadas se produce un aumento significativo ($14 \pm 2 \%$) en la arteria carótida, que no presenta ni la arteria renal ni la aorta. Estas diferencias pueden ser atribuibles a las diferentes características del lecho vascular. Por otra parte, las condiciones del tono basal difieren de las que presenta un vaso con tono incrementado [162]. En este sentido, en vasos contraídos con noradrenalina, el levamisol induce una relajación dependiente de la concentración en todos los lechos estudiados. Esta respuesta no se reproduce cuando utilizamos como agentes contráctiles agonistas inespecíficos como el KCl u otros dependientes de receptor como la ET-1 o el TXA₂. Estos resultados indican que el efecto relajante del levamisol no es un efecto inespecífico sino que puede estar relacionado con receptores específicos.

La contracción inducida por noradrenalina esta mediada por la activación no selectiva de los receptores adrenérgicos (α y β), con mayor afinidad por los α_1 [163], lo cual sugiere que los efectos del levamisol están relacionados con estos receptores. A elevadas concentraciones de levamisol, cuando sus efectos son más patentes, el bloqueo de los receptores α_2 con yohimbina disminuye en parte los efectos relajantes mientras que en presencia de prazosín prácticamente se bloquea la respuesta, indicando que los efectos del levamisol están más relacionados con los receptores α_1 que con los α_2 . Aunque estos resultados se producen en todos los lechos vasculares estudiados, hay diferencias entre ellos. Por una parte, la distribución de los receptores α_1 -adrenérgicos postsinápticos varía entre especies y lechos vasculares [164, 165]. Por otra parte, de nuestros resultados se desprende que el bloqueo de los receptores α_2 con yohimbina disminuye el efecto del levamisol en las arterias carótida y aorta mientras que prácticamente no modifica la respuesta en la arteria renal. Estas diferencias también podrían ser

debidas a una distinta distribución de estos receptores. Aunque en la bibliografía no hemos encontrado datos referentes a la distribución de receptores α_2 en vasos de conejo, sí los hay en carótida de perro donde predominan los α_2 sobre los α_1 [164]. Atendiendo al efecto remanente del levamisol tras incubarlo con yohimbina, podemos hipotetizar que la distribución de receptores α_2 es mayor en la aorta y la carótida respecto a la renal.

El mecanismo de acción del levamisol por el que se produce relajación, además de estar relacionado con sus efectos antiadrenérgicos, podría estar afectando la disponibilidad de factores endoteliales. La disminución de la respuesta contráctil del músculo liso a diferentes agonistas podría ser debida a la liberación de NO por parte del endotelio [166]. Es posible que la noradrenalina utilizada como agonista contráctil pueda interaccionar con receptores α_2 -adrenérgicos de las células endoteliales para liberar NO que se opondría a la contracción del músculo liso. Sin embargo, en presencia de L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, la respuesta al levamisol no se ve afectada lo cual nos indica que los efectos relajantes del levamisol no están mediados por el NO. De igual forma, la respuesta al levamisol podría estar mediada por la liberación de prostaglandinas relajantes de origen endotelial [19]. Este mecanismo también parece improbable puesto que en presencia de indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa, no se altera la respuesta al levamisol. La EDH constituye el tercer mecanismo responsable de la relajación. Está ampliamente aceptado que sus efectos están mediados por los canales de K^+ [22, 24, 25]. La presencia de TEA, un inhibidor selectivo de los canales de K^+ activados por calcio [40], tampoco modifica la relajación inducida por levamisol.

En conjunto, de estos resultados podemos concluir que bajo nuestras condiciones experimentales, el endotelio no juega un papel importante en la relajación inducida por levamisol.

La cocaína no modifica el tono basal en ninguno de los vasos estudiados. Tampoco induce relajación en vasos previamente contraídos con noradrenalina. Solo a concentraciones muy elevadas se produce una contracción en la arteria carótida. Este efecto puede ser debido a un mecanismo no adrenérgico. Las propiedades de la cocaína como anestésico se deben a su interferencia con canales iónicos. El cierre de canales de K^+ produce despolarización y activación de los canales de Ca^{2+} lo cual conlleva un aumento del tono vascular. De forma similar, el cierre de canales de Na^+ también puede aumentar el Ca^{2+} intracelular por activación del intercambiador Na^+-Ca^{2+} [167].

La combinación de cocaína y levamisol no modifica los efectos del levamisol solo, lo que indica que las acciones vasculares de ambas sustancias se producen por mecanismos distintos que no interactúan entre ellos y por consiguiente no se produce una sinergia de efectos.

4. Efectos del levamisol y de la cocaína sobre la respuesta contráctil

Además de los efectos directos, estas sustancias podrían modificar la respuesta neurohumoral de agonistas que intervienen en la regulación del tono vascular, bien sea por interferir en los mecanismos de la contracción del músculo liso o bien a través de su interacción con receptores específicos. A nivel del SNC, el levamisol ejerce sus acciones mediante la inhibición de la degradación de noradrenalina [121, 122] y el bloqueo de su recaptación [96] como sucede con la cocaína. Si trasladamos lo que ocurre en el SNC al sistema vascular, el levamisol, sea por la activación directa de los receptores adrenérgicos postsinápticos o por el aumento de la concentración de catecolaminas en las terminaciones adrenérgicas perivasculares [151], podría

modificar el tono vascular. En este sentido, hemos estudiado los efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta contráctil inespecífica inducida por el KCl y la inducida por el sistema adrenérgico, considerado como uno de los principales factores reguladores del tono vascular [166].

4.1. Respuesta contráctil inespecífica

La respuesta contráctil inducida por altas concentraciones de KCl se debe a la despolarización de la membrana que permite la entrada de calcio extracelular a través de los canales de Ca_{2+} dependientes del voltaje [169]. Esta repuesta no está relacionada con la activación de ningún receptor, y se usa como una herramienta estándar para evaluar la capacidad contráctil de los vasos en pruebas de reactividad vascular.

Puesto que la respuesta contráctil al KCl no se ha modificado en presencia de levamisol ni cocaína en ninguno de los lechos vasculares estudiados, podemos concluir que ambas sustancias no modifican la capacidad contráctil del músculo liso. Aunque en la bibliografía consultada no hemos encontrado resultados referentes al levamisol, sí están descritos para la cocaína. En la arteria cerebral media de cabra la cocaína disminuye la respuesta al KCl por un mecanismo que implica el bloqueo de la entrada de Ca_{2+} extracelular [170]. Las diferencias respecto a nuestros resultados pueden ser debidas tanto al lecho vascular como al modelo animal utilizado.

4.2. Respuesta contráctil dependiente de receptor

Respuesta a la fenilefrina

Las catecolaminas circulantes y liberadas localmente juegan un papel crucial en la homeostasis cardiovascular y en la regulación de la presión

arterial. Su unión a los receptores α -adrenérgicos presentes en el músculo liso vascular produce generalmente vasoconstricción [59].

Nuestros resultados en arterias contraídas con noradrenalina parecen indicar que el levamisol bloquea los receptores α -adrenérgicos, siendo más importante el ejercido sobre los receptores α_1 . Es más, el levamisol desplaza a la derecha la curva concentración-respuesta de la fenilefrina, agonista selectivo α_1 -adrenérgico, en todos los lechos estudiados. Esta respuesta es dependiente de la concentración en las arterias renal y aorta mientras que se requiere una mayor concentración en la arteria carótida. Las diferencias regionales pueden ser atribuidas a una distinta distribución de los receptores α_1 -adrenérgicos [164, 165]. Estos resultados confirman la naturaleza antagonista del levamisol a altas concentraciones sobre los receptores α_1 -adrenérgicos y concuerdan con estudios previos en safena de perro [171] y riñón perfundido de rata [138].

En los tres lechos estudiados, la cocaína solo aumenta la respuesta contráctil a la fenilefrina en la arteria carótida mediante sensibilización de los receptores α_1 -adrenérgicos. Este efecto ha sido descrito previamente en otros estudios [172–174] y es consistente con su papel como inhibidor de la recaptación de catecolaminas en las terminales nerviosas, lo que resulta en un aumento de la contracción inducida por fenilefrina, un agonista normalmente susceptible a la recaptación neuronal [175, 176].

La ausencia de un efecto significativo de la cocaína sobre las arterias renal y la aorta podría ser atribuida a un escaso tiempo de exposición a la cocaína puesto que en modelos experimentales que valoran los efectos crónicos se ha demostrado un aumento de la sensibilidad de la noradrenalina [177]. En este sentido, nuestros resultados reflejan un ligero aumento, aunque no significativo, del efecto máximo inducido por fenilefrina en presencia de cocaína en ambas arterias.

La combinación de levamisol y cocaína no modificó los efectos producidos por el levamisol sobre la contracción inducida por fenilefrina. Es probable que este resultado se deba a que el levamisol ejerce un efecto antagonista directamente sobre los receptores α_1 -adrenérgicos, mientras que la cocaína los activa indirectamente a través de la disminución de la recaptación de catecolaminas. En este sentido, prevalecen los efectos producidos por levamisol a nivel postsináptico y por lo tanto no se observa un sinergismo entre ambas sustancias.

Respuesta al estímulo nervioso simpático

El sistema nervioso simpático es el responsable del control neurogénico del tono vascular mediante la liberación de noradrenalina desde las terminaciones adrenérgicas perivasculares [33], que activa los receptores α_1 -adrenérgicos postsinápticos induciendo vasoconstricción. Los niveles de noradrenalina en la hendidura sináptica dependen de su recaptación (aproximadamente el 80%-90%) a través del transportador neuronal de noradrenalina (NET) [178]. Posteriormente, se almacena en vesículas, mediante el transportador monoamínico vesicular-2, o se degrada por acción de la enzima monoamino-oxidasa (MAO) [178].

El estímulo nervioso simpático se mimetiza mediante estímulos eléctricos con unas características determinadas que nos aseguran que lo que se está estimulando son las terminaciones nerviosas y no el músculo liso. Esto se comprueba porque en presencia de tetrodotoxina, un bloqueante de la transmisión nerviosa, se inhibe completamente la respuesta contráctil. Puesto que en presencia de guanetidina, un inhibidor de la liberación del neurotransmisor adrenérgico, también se inhibe la respuesta contráctil, podemos concluir que la respuesta está mediada por la liberación de noradrenalina. Por último, en presencia de prazosín, un bloqueante de los

receptores α_1 -adrenérgicos, también se inhibe la respuesta contráctil. En conjunto, estos resultados indican que la respuesta al estímulo eléctrico es de origen nervioso y está mediada por la liberación de noradrenalina que actúa sobre receptores α_1 -adrenérgicos postsinápticos.

La respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático se ha potenciado en todos los lechos vasculares, tanto en presencia de levamisol como de cocaína. Puesto que ambas sustancias bloquean el NET [96] podemos deducir que tanto el levamisol como la cocaína interfieren en el mecanismo de recaptación neuronal.

El aumento del neurotransmisor en la hendidura sináptica potencia la contracción mediada por los receptores α_1 . Sobre los receptores α_2 el efecto es dual, por una parte aumenta la recaptación de neurotransmisor y por otra disminuye su liberación por un mecanismo desconocido que puede estar relacionado con la inhibición de la adenilato ciclasa, de los canales de Ca^{2+} tipo N o de los canales de K^+ [179]. De lo expuesto anteriormente, se desprende que tanto el levamisol como la cocaína producen un aumento de la respuesta al estímulo simpático que está mediado, al menos en parte, por el bloqueo de los receptores α_2 presinápticos. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis ya que el bloqueo de los α_2 postsinápticos con yohimbina produce una disminución de los efectos del levamisol sobre la contracción inducida por noradrenalina. Este bloqueo se ha demostrado en experimentos previos para la cocaína [180].

Por otro lado, el levamisol a altas concentraciones ($10^{-3}M$) disminuye la contracción inducida por el estímulo nervioso simpático. Esta respuesta se debe muy probablemente a que el levamisol se comporta como un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos postsinápticos descrito en los experimentos con fenilefrina.

La combinación de levamisol y cocaína incrementa aún más la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático en las arterias carótida y renal pero no en la aorta, lo que se traduce en un sinergismo entre ambas sustancias, al menos a nivel presináptico.

En conjunto estos resultados nos llevan a concluir que el levamisol se comporta como un bloqueante no selectivo de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2), e interacciona de forma sinérgica con la cocaína a nivel presináptico.

4.3. Estudio de la expresión proteica de los receptores α -adrenérgicos

Es posible que parte de los efectos del levamisol y de la cocaína sobre la respuesta adrenérgica sean debidos a alteraciones de la expresión proteica de los receptores α -adrenérgicos. Sin embargo, nuestros resultados arrojan diferencias dependientes del lecho vascular que no siempre concuerdan con los estudios funcionales. En la arteria carótida el levamisol disminuye la expresión proteica de los receptores α_2 -adrenérgicos sin modificar los α_1 . Estos resultados son compatibles con los obtenidos en el estudio funcional. En este caso, el aumento de la respuesta al estímulo simpático podría ser debido a la disminución de los receptores α_2 presinápticos con el consiguiente aumento del neurotransmisor en la hendidura sináptica. Solo a concentraciones elevadas ($10^{-3}M$) se produce una disminución de la contracción inducida por fenilefrina que es independiente de la expresión proteica y que sería compatible con sus acciones como antagonista α_1 . Por el contrario, la cocaína no modifica la expresión ni de α_1 ni de α_2 y sin embargo aumenta la respuesta al estímulo simpático y a la fenilefrina.

Los resultados en la arteria renal son más complejos. Mientras que el levamisol no modifica la expresión proteica de los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos, la cocaína la disminuye. En este caso, el exceso de

neurotransmisor por disminución de los α_2 , podría inducir una posterior disminución de la expresión de los receptores α_1 postsinápticos (downregulation) [181].

En la aorta, el aumento de la respuesta al estímulo simpático y la disminución a la fenilefrina en presencia de levamisol, es compatible con la disminución de la expresión de los receptores α_1 y α_2 . En este lecho, la cocaína no modifica la expresión de los receptores α_1 pero sí disminuye la de los α_2 .

5. Efectos del levamisol y la cocaína sobre la respuesta relajante

La respuesta relajante inducida por la acetilcolina es producida por la activación de los receptores muscarínicos localizados en el endotelio, que a su vez liberan factores relajantes como el NO, los prostanoideos y la EDH [182, 183]. Dado que la respuesta de la acetilcolina depende de la integridad del endotelio, se usa como herramienta estándar para evaluar la función endotelial y por consiguiente, la alteración de la respuesta normal a la acetilcolina se considera un indicador de disfunción endotelial [184]. Este proceso patológico es multifactorial y resulta principalmente del deterioro de la biodisponibilidad de NO debido a una disminución de su producción, o a un aumento de su degradación asociado con el incremento de la producción de ROS [185].

En concordancia con otros estudios realizados en conejo [161, 186, 187], nuestros resultados demostraron que la acetilcolina produce vasodilatación dependiente de la concentración en todos lechos estudiados. Sin embargo, la incubación previa con levamisol disminuye la respuesta relajante a la acetilcolina. Esta respuesta es dependiente de la concentración de levamisol en las arterias carótida y aorta mientras que se requiere de una mayor concentración para modificarla en la arteria renal. Dado que no existen referencias en la literatura relacionadas con el efecto de esta sustancia sobre

el endotelio, nuestro trabajo es el primero en demostrar que el levamisol disminuye la respuesta relajante dependiente del endotelio en arterias de conducción de conejo.

Por otro lado, la cocaína disminuye la respuesta relajante a la acetilcolina en las arterias renal y aorta, mientras que no la modifica en la arteria carótida. Estos resultados se corresponden con estudios previos en los que la cocaína provoca una disfunción endotelial a corto plazo, relacionada con la disminución de la liberación de NO por inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de ATP [146]; y a largo plazo, probablemente por distintos mecanismos que incluyen proliferación endotelial o aumento de la liberación de sustancias contráctiles de origen endotelial entre otros [188]. En este sentido, se ha demostrado que la cocaína reduce los niveles de PGI_2 [86, 87] y aumenta la producción de TXA_2 [85, 86].

La combinación de levamisol y cocaína no modifica los efectos producidos por el levamisol, lo que indica que no se produce un sinergismo entre ambas sustancias, prevaleciendo los efectos del levamisol.

La reducción de la respuesta relajante a la acetilcolina también podría ser debida a que el levamisol y la cocaína disminuyan la sensibilidad del músculo liso al NO. Sin embargo, ninguna de estas sustancias modifica la relajación inducida por el nitroprusiato sódico, un dador de óxido nítrico independiente de la función endotelial, por lo que no parece que modifiquen la sensibilidad del músculo liso al NO.

Por lo tanto, el deterioro de la relajación dependiente del endotelio producida tanto por el levamisol como la cocaína puede estar originado por una reducción de la biodisponibilidad de NO por mecanismos que facilitan su degradación como puede ser el aumento de estrés oxidativo. En este sentido, evaluamos la contribución de ROS a la relajación inducida por acetilcolina y

determinamos la expresión proteica de la NOS, SOD y Nox4 en presencia de ambas sustancias.

5.1. Arteria carótida

La expresión proteica de la eNOS no se modifica en presencia de levamisol. Estos resultados descartan que la disminución de la relajación a la acetilcolina sea debida a interacciones con la síntesis de NO.

En situaciones de estrés oxidativo se produce un exceso de ROS, entre los que destaca el anión superóxido (O_2^-) y sus derivados [189]. La NADPH oxidasa (Nox) es la principal familia de enzimas que intervienen en la producción de ROS en la pared vascular y la mayor defensa celular contra el exceso ROS es la familia de enzimas superóxido dismutasa (SOD) [190]. En este sentido, la presencia de SOD previene parcialmente la inhibición del levamisol sobre la respuesta a la acetilcolina, indicando que los efectos del levamisol en la arteria carótida pueden estar parcialmente mediados por estrés oxidativo. Sin embargo, a nivel molecular, la presencia de levamisol no modifica la expresión proteica de la SOD (SOD1 y SOD2), mientras que disminuye la expresión de Nox4, isoforma de la Nox con mayor presencia en las células endoteliales [191]. Otra posibilidad es que el levamisol aumente la producción ROS por otras vías distintas a la Nox4, como la Nox1 o Nox2, que son consideradas isoformas de la Nox mediadoras de la disfunción endotelial por facilitar la liberación de O_2^- [192]. Además, se ha demostrado que la Nox4 puede tener una función antagónica sobre la Nox1 y Nox2 puesto que al presentar una alta actividad constitutiva, libera predominantemente H_2O_2 en lugar de O_2^- [193]. Puesto que el H_2O_2 se comporta como un vasodilatador mediante la activación de la eNOS [194], una menor expresión de Nox4 podría estar relacionada con una menor biodisponibilidad de NO que explicaría la menor sensibilidad a la acetilcolina inducida por levamisol. Se necesitan más

experimentos para estudiar el papel de las enzimas implicadas en la producción de radicales libres en la respuesta al levamisol.

5.2. Arteria renal

El principal hallazgo en este lecho vascular es que la cocaína y el levamisol disminuyen la relajación inducida por la acetilcolina y que la administración conjunta de ambas sustancias no incrementa sus efectos cuando se administran por separado.

La menor relajación a la acetilcolina inducida por el levamisol no se acompaña de una disminución en la expresión proteica de eNOS. Sin embargo, la presencia de cocaína reduce la expresión de la eNOS, de forma similar a lo observado en otros estudios [76, 77]. La reducción de la relajación dependiente del endotelio podría estar relacionada con el aumento de la producción de ROS. De hecho, la incubación previa con SOD previene parcialmente los efectos inducidos por el levamisol mientras que revierte por completo los producidos por la cocaína, indicando que los efectos de estas sustancias en la arteria renal pueden estar mediados por estrés oxidativo. Además, la incubación de segmentos arteriales con levamisol o cocaína reduce la expresión proteica de la SOD (SOD1 y SOD2) y aumenta la expresión de Nox4. De las isoformas Nox, la Nox4 se expresa abundantemente en el riñón y es una fuente importante de ROS a nivel renal [195]. En este sentido, se ha demostrado que el aumento de la expresión de la Nox4 y la disminución de la SOD son factores determinantes en el exceso de O₂⁻ observados en procesos fisiopatológicos como la lesión renal aguda inducida por sustancias de contraste yodadas [196] o la hiperglucemia crónica [197, 198]. Además, la sobreexpresión de Nox4 se ha relacionado con una menor biodisponibilidad de NO [199]. Por lo tanto, este mecanismo podría ser el responsable del

aumento del estrés oxidativo causante de la disfunción endotelial debida al levamisol y a la cocaína en este lecho vascular.

5.3. Aorta

Los resultados en aorta de conejo son similares a los hallazgos en la arteria renal. El levamisol y la cocaína reducen la respuesta relajante inducida por acetilcolina, lo cual se correlaciona con una menor expresión de la eNOS. Estos resultados sugieren que los efectos de ambas sustancias se deben en parte a una disminución de la biodisponibilidad de NO lo que conlleva una disfunción endotelial. En el caso de la cocaína, este mecanismo ha sido previamente descrito en otras especies y lechos vasculares [161, 188, 200].

La falta de biodisponibilidad de NO también podría ser debida a un aumento de ROS que incremente la degradación de NO ya que la administración de SOD en el baño de órganos revierte parcialmente los efectos producidos por levamisol y completamente los inducidos por cocaína. Además, el aumento de ROS se corresponde con una reducción significativa de la expresión proteica de las isoformas de SOD tanto en presencia de levamisol como de cocaína, lo que contribuye a la patogénesis del estrés oxidativo asociado a estas sustancias.

6. Consideraciones finales

El levamisol es una sustancia farmacológicamente activa que se utiliza como adulterante de la cocaína. Existe la sospecha de que algunas de las complicaciones de la cocaína sean debidas al levamisol o a la interacción entre ambas sustancias ya que coinciden con los efectos secundarios descritos con el uso terapéutico del levamisol. Parte de ellos están relacionados con el sistema cardiovascular e incluyen patología isquémica de diversa índole,

trombosis, vasoespasmo y disfunción endotelial. La influencia de la exposición directa al levamisol y su interacción con la cocaína sobre los vasos sanguíneos están aún por definir. Además, dado que ambas sustancias poseen un mecanismo de acción común, cabe la posibilidad de que los efectos vasculares de la cocaína se vean potenciados por la adulteración con el levamisol.

Nuestro trabajo ofrece una base experimental de los mecanismos inducidos por el levamisol y su interacción con la cocaína en vasos arteriales de distintos territorios. En los lechos vasculares estudiados, el levamisol se comporta como un antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2) y además potencia los efectos de la cocaína a nivel presináptico. Este efecto podría tener importancia en clínica puesto que los principales síntomas de la intoxicación por cocaína sobre el sistema cardiovascular incluyen aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial [89] que, en presencia de levamisol, podrían agravarse.

En nuestro modelo experimental, en base al análisis de la respuesta relajante a la acetilcolina, hemos demostrado que el levamisol produce disfunción endotelial en los tres lechos, mientras que la cocaína solo afecta a las arterias renal y aorta. Es muy probable que en un modelo agudo no se ponga de manifiesto la disfunción endotelial inducida por la cocaína en la arteria carótida, lo cual sí está demostrado con la administración crónica [76, 202].

La evidencia clínica atribuye al consumo de cocaína muchos de los accidentes cerebrovasculares que están mediados por diversos mecanismos como el vasoespasmo, la vasculitis cerebral o la agregación plaquetaria [203, 204]. En este caso, la disfunción endotelial inducida por el levamisol podría empeorar el proceso isquémico cerebrovascular. De hecho, sus efectos

podrían prevalecer sobre los de la cocaína en función de la concentración de levamisol empleada y el grado de adulteración de la cocaína.

Finalmente, se ha propuesto el uso del levamisol como tratamiento de enfermedades cardiovasculares, incluida la hipertensión arterial [138]. El comportamiento del levamisol como antagonista adrenérgico descrito en nuestro estudio apoyaría este uso. Sin embargo, nuestros resultados indican que el levamisol induce disfunción endotelial que contraindicaría su uso terapéutico como hipotensor.

Si bien nuestros resultados deben tratarse con cautela a la hora de extrapolarlos al ser humano, ponen en evidencia que en el vaso aislado el levamisol tiene efectos propios e independientes de los de la cocaína que pueden mimetizar los efectos clínicos de ésta.

CONCLUSIONES

1. Teniendo como base la comprobación de la hipótesis, nuestros resultados demuestran que, en el sistema vascular, el levamisol potencia el tono simpático producido por la cocaína, causa disfunción endotelial y actúa como un agente antiadrenérgico. Estas dos últimas acciones no se ven potenciadas en presencia de cocaína.
2. En todos los lechos vasculares estudiados, el levamisol se comporta como un bloqueante de los receptores α_1 -adrenérgicos, lo cual produce una disminución de la contracción mediada por fenilefrina. Este efecto es independiente de la presencia de cocaína.
3. Sin embargo, a concentraciones bajas, el levamisol incrementa la respuesta contráctil inducida por el estímulo nervioso simpático, mientras que a concentraciones elevadas la anula, confirmando su papel como antagonista no selectivo de los receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos. Además, interactúa de forma sinérgica con la cocaína a nivel presináptico de modo que potencia sus efectos contráctiles, lo cual depende del lecho vascular.
4. El levamisol produce disfunción endotelial en todos los lechos estudiados, mientras que la cocaína solo lo hace en las arterias renal y aorta. El efecto producido por el levamisol es independiente de la presencia de cocaína.
5. La disfunción endotelial inducida por el levamisol y la cocaína podría estar parcialmente mediada por el aumento del estrés oxidativo que conduciría a una menor biodisponibilidad de NO.

CONCLUSIONS

1. Based on hypothesis testing, our results show that, at vascular level, levamisole potentiates the sympathetic tone produced by cocaine, induces endothelial dysfunction and acts as an anti-adrenergic agent. These last two actions are not enhanced by cocaine.
2. Levamisole acts as an α_1 -adrenergic blocker in all vessels studied, by decreasing the contractile response induced by phenylephrine. This effect does not change in the presence of cocaine.
3. However, levamisole at low concentrations increases sympathetic response, while at higher concentrations abolishes adrenergic neurotransmission, confirming its role as a non-selective antagonist of the α_1 and α_2 -adrenergic receptors. In addition, it interacts synergistically with cocaine at the presynaptic level enhancing its contractile effects, which depends on the vascular bed.
4. Levamisole induces endothelial dysfunction in all vessels studied, while cocaine while cocaine does so in the renal artery and in the aorta. The impairment produced by levamisole is independent of the presence of cocaine.
5. Endothelial dysfunction induced by levamisole and cocaine may be partially mediated by increased oxidative stress leading to a reduced NO bioavailability.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. F. Galley and N. R. Webster, "Physiology of the endothelium," *Br. J. Anaesth.*, vol. 93, no. 1, pp. 105–113, Jul. 2004.
- [2] M. Félétou and P. M. Vanhoutte, "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)," *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 291, no. 3, pp. H985–H1002, Sep. 2006.
- [3] S. Moncada, A. Higgs, and R. Furchgott, "XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research," *Pharmacol. Rev.*, vol. 49, no. 2, pp. 137–142, Jun. 1997.
- [4] P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 315–424, Jan. 2007.
- [5] J. S. Beckman and W. H. Koppenol, "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly," *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 271, no. 5, pp. C1424–C1437, Nov. 1996.
- [6] H. Prast and A. Philippu, "Nitric oxide as modulator of neuronal function," *Prog. Neurobiol.*, vol. 64, no. 1, pp. 51–68, May 2001.
- [7] U. Förstermann and W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: regulation and function," *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, pp. 829–837, Apr. 2012.
- [8] U. Förstermann, E. I. Closs, J. S. Pollock, et al., "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions," *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 23, no. 6 Pt 2, pp. 1121–1131, Jun. 1994.
- [9] I. Fleming and R. Busse, "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase," *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 284, no. 1, pp. R1–R12, Jan. 2003.
- [10] R. M. Rapoport, M. B. Draznin, and F. Murad, "Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation," *Nature*, vol. 306, no. 5939, pp. 174–176, Nov. 1983.
- [11] R. C. Jin and J. Loscalzo, "Vascular nitric oxide: formation and function," *J. Blood Med.*, vol. 1, pp. 147–162, Aug. 2010.
- [12] S. R. Jaffrey, "Nitric Oxide," in *Basic & Clinical Pharmacology*, 13th ed., B. G. Katzung and A. J. Trevor, Eds. New York, NY: McGraw-Hill Medical, 2015.
- [13] R. Radi, "Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 23, p. 5839, Jun. 2018.
- [14] V. (Wai C. Wong and E. Lerner, "Nitric oxide inhibition strategies," *Future Sci. OA*, vol. 1, no. 1, Aug. 2015.
- [15] A. Kielstein, D. Tsikas, G. P. Galloway, and J. E. Mendelson, "Asymmetric dimethylarginine (ADMA)—A modulator of nociception in opiate tolerance and addiction?," *Nitric Oxide*, vol. 17, no. 2, pp. 55–59, Sep. 2007.
- [16] E. D. London, A. S. Kimes, and D. B. Vaupel, "Inhibitors of nitric oxide synthase and the opioid withdrawal syndrome," *NIDA Res. Monogr.*, vol. 147, pp. 170–181, 1995.
- [17] M. Félétou, Y. Huang, and P. M. Vanhoutte, "Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 164, no. 3, pp. 894–912, Oct. 2011.

- [18] S. Lucas, “The Pharmacology of Indomethacin,” *Headache J. Head Face Pain*, vol. 56, no. 2, pp. 436–446, 2016.
- [19] M. Félétou, *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2011.
- [20] S. Verma, S. R. Raj, L. Shewchuk, K. J. Mather, and T. J. Anderson, “Cyclooxygenase-2 blockade does not impair endothelial vasodilator function in healthy volunteers: randomized evaluation of rofecoxib versus naproxen on endothelium-dependent vasodilatation,” *Circulation*, vol. 104, no. 24, pp. 2879–2882, Dec. 2001.
- [21] M. R. Marwali and J. L. Mehta, “COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies,” *Thromb. Haemost.*, vol. 96, no. 4, pp. 401–406, Oct. 2006.
- [22] C. J. Garland, C. R. Hiley, and K. A. Dora, “EDHF: spreading the influence of the endothelium,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 164, no. 3, pp. 839–852, Oct. 2011.
- [23] M. Félétou and P. M. Vanhoutte, “Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 1215–1225, Jun. 2006.
- [24] M. Félétou and P. M. Vanhoutte, “Endothelium-dependent hyperpolarizations: Quo vadis?,” *Acta Physiol.*, vol. 219, no. 1, pp. 100–107, 2017.
- [25] M. Félétou and P. M. Vanhoutte, “EDHF: an update,” *Clin. Sci.*, vol. 117, no. 4, pp. 139–155, Aug. 2009.
- [26] G. Edwards, M. Félétou, and A. H. Weston, “Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis,” *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.*, vol. 459, no. 6, pp. 863–879, May 2010.
- [27] A. P. Davenport, K. A. Hyndman, N. Dhaun, et al., “Endothelin,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 68, no. 2, pp. 357–418, Apr. 2016.
- [28] F. L. Marasciulo, M. Montagnani, and M. A. Potenza, “Endothelin-1: the yin and yang on vascular function,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, no. 14, pp. 1655–1665, 2006.
- [29] J. J. Maguire and A. P. Davenport, “Endothelin receptors and their antagonists,” *Semin. Nephrol.*, vol. 35, no. 2, pp. 125–136, Mar. 2015.
- [30] S. K. Nishiyama, J. Zhao, D. W. Wray, and R. S. Richardson, “Vascular function and endothelin-1: tipping the balance between vasodilation and vasoconstriction,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 122, no. 2, pp. 354–360, Feb. 2017.
- [31] D. Versari, E. Daghini, A. Virdis, L. Ghiadoni, and S. Taddei, “Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 157, no. 4, pp. 527–536, Jun. 2009.
- [32] Y. Sheng and L. Zhu, “The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels,” *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, vol. 10, no. 1, pp. 17–28, Mar. 2018.
- [33] S. Guimarães and D. Moura, “Vascular adrenoceptors: an update,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 2, pp. 319–356, Jun. 2001.

- [34] E. B. Westcott and S. S. Segal, "Perivascular innervation: A multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling," *Microcirc. N. Y. N* 1994, vol. 20, no. 3, pp. 217–238, Apr. 2013.
- [35] P. M. Vanhoutte, "Endothelial adrenoceptors," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 38, no. 5, pp. 796–808, Nov. 2001.
- [36] C. J. Garland, P. L. Yarova, F. Jiménez-Altayó, and K. A. Dora, "Vascular hyperpolarization to β -adrenoceptor agonists evokes spreading dilatation in rat isolated mesenteric arteries," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 164, no. 3, pp. 913–921, Oct. 2011.
- [37] R. K. Mallat, C. M. John, D. J. Kendrick, and A. P. Braun, "The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 54, no. 7–8, pp. 458–470, Nov. 2017.
- [38] P. M. Vanhoutte, H. Shimokawa, M. Feletou, and E. H. C. Tang, "Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update," *Acta Physiol. Oxf. Engl.*, vol. 219, no. 1, pp. 22–96, 2017.
- [39] U. Förstermann, N. Xia, and H. Li, "Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis," *Circ. Res.*, vol. 120, no. 4, pp. 713–735, Feb. 2017.
- [40] P. M. Vanhoutte, "Endothelium-derived free radicals: for worse and for better," *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 1, pp. 23–25, Jan. 2001.
- [41] U. Förstermann, "Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies," *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 338–349, Jun. 2008.
- [42] U. Förstermann, "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease," *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, vol. 459, no. 6, pp. 923–939, May 2010.
- [43] M.-H. Zou, R. Cohen, and V. Ullrich, "Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus," *Endothel. J. Endothel. Cell Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 89–97, Apr. 2004.
- [44] D. Closa and E. Folch-Puy, "Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response," *IUBMB Life*, vol. 56, no. 4, pp. 185–191, Apr. 2004.
- [45] C. Blanquicett, B.-Y. Kang, J. D. Ritzenthaler, D. P. Jones, and C. M. Hart, "Oxidative Stress Modulates PPAR γ in Vascular Endothelial Cells," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 12, pp. 1618–1625, Jun. 2010.
- [46] V. B. Stolberg, "The Use of Coca: Prehistory, History, and Ethnography," *J. Ethn. Subst. Abuse.*, vol. 10, no. 2, pp. 126–146, Apr. 2011.
- [47] S. J. Harper and N. S. Jones, "Cocaine: what role does it have in current ENT practice? A review of the current literature," *J. Laryngol. Otol.*, vol. 120, no. 10, pp. 808–811, Oct. 2006.
- [48] P. O. of the E. Union, "Informe europeo sobre drogas 2018 : tendencias y novedades.," 12-Jun-2018. [Online]. Available: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/2420e3dd-6dea-11e8-9483-01aa75ed71a1/language-es>. [Accessed: 07-Jan-2019].
- [49] Ó. Miró, P. I. Dargan, D. M. Wood, et al., "Epidemiology, clinical features and management of patients presenting to European emergency departments with acute cocaine toxicity: comparison between powder cocaine and crack cocaine cases," *Clin. Toxicol.*, vol. 57, no. 8, pp. 718–726, Aug. 2019.

- [50] Ò. Miró, C. Yates, A. M Dines, et al., “Emergencies related to recreational drug abuse in Spain compared to emergencies attended in 3 European areas,” *Emerg. Rev. Soc. Espanola Med. Emerg.*, vol. 30, no. 6, pp. 384–394, Dec. 2018.
- [51] W. A. Catterall and K. Mackie, “Local Anesthetics,” in *Goodman & Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13th ed., L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, and B. C. Knollmann, Eds. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2017.
- [52] A. W. Jones, “Chapter 5 - Concentrations of Cocaine in Blood Samples From Impaired Drivers and Drug-Related Deaths,” in *The Neuroscience of Cocaine*, V. R. Preedy, Ed. San Diego: Academic Press, 2017, pp. 39–48.
- [53] K. Blaho, B. Logan, S. Winbery, L. Park, and E. Schwilke, “Blood cocaine and metabolite concentrations, clinical findings, and outcome of patients presenting to an ED,” *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 18, no. 5, pp. 593–598, Sep. 2000.
- [54] F. Musshoff and B. Madea, “Cocaine and benzoylecgonine concentrations in fluorinated plasma samples of drivers under suspicion of driving under influence,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 200, no. 1, pp. 67–72, Jul. 2010.
- [55] N. L. Benowitz, “Clinical pharmacology and toxicology of cocaine,” *Pharmacol. Toxicol.*, vol. 72, no. 1, pp. 3–12, Jan. 1993.
- [56] J. A. Fleming, R. Byck, and P. G. Barash, “Pharmacology and therapeutic applications of cocaine,” *Anesthesiology*, vol. 73, no. 3, pp. 518–531, Sep. 1990.
- [57] A. R. Jeffcoat, M. Perez-Reyes, J. M. Hill, B. M. Sadler, and C. E. Cook, “Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking,” *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 153–159, Apr. 1989.
- [58] K. N. Ellefsen, M. Concheiro, S. Pirard, D. A. Gorelick, and M. A. Huestis, “Pharmacodynamic effects and relationships to plasma and oral fluid pharmacokinetics after intravenous cocaine administration,” *Drug Alcohol Depend.*, vol. 163, pp. 116–125, Jun. 2016.
- [59] D. S. Isenschmid, M. W. Fischman, R. W. Foltin, and Y. H. Caplan, “Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 16, no. 5, pp. 311–314, Oct. 1992.
- [60] A. J. Jenkins, R. M. Keenan, J. E. Henningfield, and E. J. Cone, “Correlation between pharmacological effects and plasma cocaine concentrations after smoked administration,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 26, no. 7, pp. 382–392, Oct. 2002.
- [61] M. A. Coe, R. A. Jufer Phipps, E. J. Cone, and S. L. Walsh, “Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 42, no. 5, pp. 285–292, Jun. 2018.
- [62] N. D. Volkow, G. J. Wang, M. W. Fischman, et al., “Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy,” *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 827–830, Apr. 1997.

- [63] M. Hummel and E. M. Unterwald, "D1 dopamine receptor: A putative neurochemical and behavioral link to cocaine action," *J. Cell. Physiol.*, vol. 191, no. 1, pp. 17–27, 2002.
- [64] M. Y. Zhu, S. Shamburger, J. Li, and G. A. Ordway, "Regulation of the human norepinephrine transporter by cocaine and amphetamine," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 295, no. 3, pp. 951–959, Dec. 2000.
- [65] B. N. Manukhin, L. V. Berdysheva, O. V. Boiko, and L. A. Nesterova, "Similarities and differences in the effect of cocaine on α -adrenergic and muscarinic response," *Biol. Bull.*, vol. 38, no. 3, p. 266, May 2011.
- [66] D. C. Mash, J. K. Staley, S. Izenwasser, M. Basile, and A. J. Rutenber, "Serotonin transporters upregulate with chronic cocaine use," *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 20, no. 3–4, pp. 271–280, Dec. 2000.
- [67] G. E. Billman, "Mechanisms responsible for the cardiotoxic effects of cocaine," *FASEB J.*, vol. 4, no. 8, pp. 2469–2475, May 1990.
- [68] W. J. Crumb and C. W. Clarkson, "Characterization of cocaine-induced block of cardiac sodium channels," *Biophys. J.*, vol. 57, no. 3, pp. 589–599, Mar. 1990.
- [69] M. E. O'Leary and J. C. Hancox, "Role of voltage-gated sodium, potassium and calcium channels in the development of cocaine-associated cardiac arrhythmias," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 69, no. 5, pp. 427–442, 2010.
- [70] C. W. Clarkson, Y.-Q. Xu, C. Chang, and C. H. Follmer, "Analysis of the Ionic Basis for Cocaine's Biphasic Effect on Action Potential Duration in Guinea-pig Ventricular Myocytes," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 28, no. 4, pp. 667–678, Apr. 1996.
- [71] L. S. Premkumar, "Selective potentiation of L-type calcium channel currents by cocaine in cardiac myocytes," *Mol. Pharmacol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1138–1142, Dec. 1999.
- [72] A. Prakash and G. Das, "Cocaine and the nervous system," *Int. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 31, no. 12, pp. 575–581, Dec. 1993.
- [73] L. Afonso, T. Mohammad, and D. Thatai, "Crack Whips the Heart: A Review of the Cardiovascular Toxicity of Cocaine," *Am. J. Cardiol.*, vol. 100, no. 6, pp. 1040–1043, Sep. 2007.
- [74] R. A. Kloner, S. Hale, K. Alker, and S. Rezkalla, "The effects of acute and chronic cocaine use on the heart," *Circulation*, vol. 85, no. 2, pp. 407–419, Feb. 1992.
- [75] B. S. Benzaquen, V. Cohen, and M. J. Eisenberg, "Effects of cocaine on the coronary arteries," *Am. Heart J.*, vol. 142, no. 3, pp. 402–410, Sep. 2001.
- [76] L. Pradhan, D. Mondal, S. Chandra, M. Ali, and K. C. Agrawal, "Molecular analysis of cocaine-induced endothelial dysfunction: role of endothelin-1 and nitric oxide," *Cardiovasc. Toxicol.*, vol. 8, no. 4, pp. 161–171, Dec. 2008.
- [77] J. He, S. Yang, and L. Zhang, "Effects of Cocaine on Nitric Oxide Production in Bovine Coronary Artery Endothelial Cells," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 314, no. 3, pp. 980–986, Sep. 2005.
- [78] G. Q. He, A. Zhang, B. T. Altura, and B. M. Altura, "Cocaine-induced cerebrovasospasm and its possible mechanism of action," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 268, no. 3, pp. 1532–1539, Mar. 1994.

- [79] C. Du, M. Yu, N. D. Volkow, et al., "Cocaine increases the intracellular calcium concentration in brain independently of its cerebrovascular effects," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 26, no. 45, pp. 11522–11531, Nov. 2006.
- [80] M. S. Boghdadi and R. J. Henning, "Cocaine: pathophysiology and clinical toxicology," *Heart Lung J. Crit. Care*, vol. 26, no. 6, pp. 466–483; quiz 484–485, Dec. 1997.
- [81] C. M. Heesch, C. R. Wilhelm, J. Ristich, et al., "Cocaine activates platelets and increases the formation of circulating platelet containing microaggregates in humans," *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 83, no. 6, pp. 688–695, Jun. 2000.
- [82] A. D. Kugelmass, A. Oda, K. Monahan, C. Cabral, and J. A. Ware, "Activation of human platelets by cocaine," *Circulation*, vol. 88, no. 3, pp. 876–883, Sep. 1993.
- [83] A. J. Siegel, M. B. Sholar, J. H. Mendelson, et al., "Cocaine-Induced Erythrocytosis and Increase in von Willebrand Factor: Evidence for Drug-Related Blood Doping and Prothrombotic Effects," *Arch. Intern. Med.*, vol. 159, no. 16, pp. 1925–1929, Sep. 1999.
- [84] D. J. Moliterno, R. A. Lange, R. D. Gerard, et al., "Influence of intranasal cocaine on plasma constituents associated with endogenous thrombosis and thrombolysis," *Am. J. Med.*, vol. 96, no. 6, pp. 492–496, Jun. 1994.
- [85] G. Togna, E. Tempesta, A. R. Togna, et al., "Platelet responsiveness and biosynthesis of thromboxane and prostacyclin in response to in vitro cocaine treatment," *Haemostasis*, vol. 15, no. 2, pp. 100–107, 1985.
- [86] M. Monga, S. Chmielowiec, R. L. Andres, L. R. Troyer, and V. M. Parisi, "Cocaine alters placental production of thromboxane and prostacyclin," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 171, no. 4, pp. 965–969, Oct. 1994.
- [87] D. S. Mastrogiannis and W. F. O'Brien, "Cocaine affects prostaglandin production in human umbilical cord cell cultures," *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 261–266, Jan. 2003.
- [88] H. A. Brownlow and J. Pappachan, "Pathophysiology of cocaine abuse," *Eur. J. Anaesthesiol.*, vol. 19, no. 6, pp. 395–414, Jun. 2002.
- [89] Schwartz Bryan G., Rezkalla Shereif, and Kloner Robert A., "Cardiovascular Effects of Cocaine," *Circulation*, vol. 122, no. 24, pp. 2558–2569, Dec. 2010.
- [90] A. Fogo, K. R. Superdock, and J. B. Atkinson, "Severe arteriosclerosis in the kidney of a cocaine addict," *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.*, vol. 20, no. 5, pp. 513–515, Nov. 1992.
- [91] F. D. Kolodgie, P. S. Wilson, W. J. Mergner, and R. Virmani, "Cocaine-Induced Increase in the Permeability Function of Human Vascular Endothelial Cell Monolayers," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 66, no. 2, pp. 109–122, Jun. 1999.
- [92] F. D. Kolodgie, R. Virmani, J. F. Cornhill, E. E. Herderick, and J. Smialek, "Increase in atherosclerosis and adventitial mast cells in cocaine abusers: an alternative mechanism of cocaine-associated coronary vasospasm and thrombosis," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 17, no. 7, pp. 1553–1560, Jun. 1991.
- [93] J. B. Atkinson, C. W. Harlan, G. C. Harlan, and R. Virmani, "The association of mast cells and atherosclerosis: A morphologic study of early atherosclerotic

- lesions in young people,” *Hum. Pathol.*, vol. 25, no. 2, pp. 154–159, Feb. 1994.
- [94] J. Pereira, C. G. Sáez, J. Pallavicini, et al., “Platelet activation in chronic cocaine users: Effect of short term abstinence,” *Platelets*, vol. 22, no. 8, pp. 596–601, Dec. 2011.
- [95] D. Lievens, A. Zerneck, T. Seijkens, et al., “Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis,” *Blood*, vol. 116, no. 20, pp. 4317–4327, Nov. 2010.
- [96] O. Kudlacek, T. Hofmaier, A. Luf, et al., “Cocaine adulteration,” *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 83–84, pp. 75–81, Oct. 2017.
- [97] F. Caudevilla, M. Ventura, I. Fornís, et al., “Results of an international drug testing service for cryptomarket users,” *Int. J. Drug Policy*, vol. 35, pp. 38–41, Sep. 2016.
- [98] C. Eiden, C. Diot, O. Mathieu, M. Mallaret, and H. Peyrière, “Levamisole-adulterated cocaine: what about in European countries?,” *J. Psychoactive Drugs*, vol. 46, no. 5, pp. 389–392, Dec. 2014.
- [99] J. C. Williams and S. D. Broussard, “Comparative efficacy of levamisole, thiabendazole and fenbendazole against cattle gastrointestinal nematodes,” *Vet. Parasitol.*, vol. 58, no. 1–2, pp. 83–90, May 1995.
- [100] “Levamisole for corticosteroid-dependent nephrotic syndrome in childhood. British Association for Paediatric Nephrology,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 337, no. 8757, pp. 1555–1557, Jun. 1991.
- [101] C. G. Moertel, T. R. Fleming, J. S. Macdonald, et al., “Levamisole and Fluorouracil for Adjuvant Therapy of Resected Colon Carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 322, no. 6, pp. 352–358, Feb. 1990.
- [102] A. Larocque and R. S. Hoffman, “Levamisole in cocaine: Unexpected news from an old acquaintance,” *Clin. Toxicol.*, vol. 50, no. 4, pp. 231–241, Apr. 2012.
- [103] J. Sany, G. Morlack, G. Kalfa, and H. Serre, “[Letter: Agranulocytosis during treatment with levamisole],” *Nouv. Presse Med.*, vol. 5, no. 17, p. 1148, Apr. 1976.
- [104] G. T. Williams, S. A. Johnson, P. A. Dieppe, and E. C. Huskisson, “Neutropenia during treatment of rheumatoid arthritis with levamisole,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 37, no. 4, pp. 366–369, Aug. 1978.
- [105] A. F. El-Ghobarey and H. A. Capell, “Levamisole-induced thrombocytopenia,” *Br. Med. J.*, vol. 2, no. 6086, pp. 555–556, Aug. 1977.
- [106] D. G. Macfarlane and P. A. Bacon, “Levamisole-induced vasculitis due to circulating immune complexes,” *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 6110, pp. 407–408, Feb. 1978.
- [107] E. Bertol, F. Mari, M. G. D. Milia, et al., “Determination of aminorex in human urine samples by GC–MS after use of levamisole,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 55, no. 5, pp. 1186–1189, Jul. 2011.
- [108] A. M. M. Valentino and K. Fuentecilla, “Levamisole: An Analytical Profile,” *Microgram Journal*, vol. 3, pp. 3–4, 2005.

- [109] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), “Agranulocytosis associated with cocaine use - four States, March 2008–November 2009,” *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 58, no. 49, pp. 1381–1385, Dec. 2009.
- [110] J. A. Buchanan, R. J. Oyer, N. R. Patel, et al., “A Confirmed Case of Agranulocytosis after Use of Cocaine Contaminated with Levamisole,” *J. Med. Toxicol.*, vol. 6, no. 2, pp. 160–164, Jun. 2010.
- [111] R. J. Crossley, *Chirality and Biological Activity of Drugs*. CRC Press, 1995.
- [112] J. M. Reid, J. S. Kovach, M. J. O’Connell, P. G. Bagniewski, and C. G. Moertel, “Clinical and pharmacokinetic studies of high-dose levamisole in combination with 5-fluorouracil in patients with advanced cancer,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 41, no. 6, pp. 477–484, Mar. 1998.
- [113] C. Hess, N. Ritke, S. Broecker, B. Madea, and F. Musshoff, “Metabolism of levamisole and kinetics of levamisole and aminorex in urine by means of LC-QTOF-HRMS and LC-QqQ-MS,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 12, pp. 4077–4088, May 2013.
- [114] E. Pawlik, H. Mahler, B. Hartung, G. Plässer, and T. Daldrup, “Drug-related death: adulterants from cocaine preparations in lung tissue and blood,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 249, pp. 294–303, Apr. 2015.
- [115] A. Wolford, T. S. McDonald, H. Eng, et al., “Immune-mediated agranulocytosis caused by the cocaine adulterant levamisole: a case for reactive metabolite(s) involvement,” *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 40, no. 6, pp. 1067–1075, Jun. 2012.
- [116] T. J. Wiegand, “Adulterated Cocaine and Lessons Learned from the Jake Walk Blues,” *J. Med. Toxicol.*, vol. 6, no. 1, pp. 63–66, Mar. 2010.
- [117] M. M. Levandoski, B. Piket, and J. Chang, “The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 471, no. 1, pp. 9–20, Jun. 2003.
- [118] H. V. Belle, “Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans,” *Clin. Chem.*, vol. 22, no. 7, pp. 972–976, Jul. 1976.
- [119] L. G. Nowak, B. Rosay, D. Czégé, and C. Fonta, “Tetramisole and Levamisole Suppress Neuronal Activity Independently from Their Inhibitory Action on Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase in Mouse Cortex,” in *Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP)*, C. Fonta and L. Négyessy, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015, pp. 239–281.
- [120] S. Spector, I. Munjal, and D. E. Schmidt, “Effects of the Immunostimulant, Levamisole, on Opiate Withdrawal and Levels of Endogenous Opiate Alkaloids and Monoamine Neurotransmitters in Rat Brain,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 19, no. 5, pp. 417–427, Nov. 1998.
- [121] L. P. Raymon and D. S. Isenschmid, “The Possible Role of Levamisole in Illicit Cocaine Preparations,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 33, no. 9, pp. 620–622, Jan. 2009.
- [122] A. Larocque and R. S. Hoffman, “Levamisole in cocaine: Unexpected news from an old acquaintance,” *Clin. Toxicol.*, vol. 50, no. 4, pp. 231–241, Apr. 2012.

- [123] D. Rayes, M. J. De Rosa, M. Bartos, and C. Bouzat, "Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 35, pp. 36372–36381, Aug. 2004.
- [124] W. D. Atchison, T. G. Geary, B. Manning, E. A. VandeWaa, and D. P. Thompson, "Comparative neuromuscular blocking actions of levamisole and pyrantel-type anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 112, no. 1, pp. 133–143, Jan. 1992.
- [125] C. S. Tallarida, R. J. Tallarida, and S. M. Rawls, "Levamisole enhances the rewarding and locomotor-activating effects of cocaine in rats," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 149, pp. 145–150, Apr. 2015.
- [126] T. Hofmaier, A. Luf, A. Seddik, et al., "Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters," *Neurochem. Int.*, vol. 73, pp. 32–41, Jul. 2014.
- [127] J. G. Pires, H. A. Futuro-Neto, A. M. Oliveira, and A. M. Cabral, "The effect of levamisole on the cardiac responses to sympathomimetics and on the amine uptake process," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 31, no. 4, pp. 257–258, Apr. 1979.
- [128] K. K. Shah, O. D. Gulati, and K. G. Hemavathi, "Investigation of some effects of levamisole on dog blood pressure," *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 30, no. 1, pp. 55–62, Mar. 1986.
- [129] C. S. Tallarida, E. Egan, G. D. Alejo, et al., "Levamisole and cocaine synergism: a prevalent adulterant enhances cocaine's action in vivo," *Neuropharmacology*, vol. 79, pp. 590–595, Apr. 2014.
- [130] D. S. Groveman and E. C. Borden, "In vitro and in vivo effects of levamisole on monocyte chemotaxis in normal donors and patients with colorectal carcinoma," *J. Biol. Response Mod.*, vol. 2, no. 2, pp. 167–174, 1983.
- [131] C. G. Moertel, T. R. Fleming, J. S. Macdonald, et al., "Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report," *Ann. Intern. Med.*, vol. 122, no. 5, pp. 321–326, Mar. 1995.
- [132] P. Tanphaichitr, D. Tanphaichitr, J. Sureeratanan, and S. Chatasingh, "Treatment of nephrotic syndrome with levamisole," *J. Pediatr.*, vol. 96, no. 3 Pt 1, pp. 490–493, Mar. 1980.
- [133] L.-Y. Chen, Y.-L. Lin, and B.-L. Chiang, "Levamisole enhances immune response by affecting the activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 151, no. 1, pp. 174–181, 2008.
- [134] O. Ruuskanen, M. Remes, A.-L. Mäkelä, H. Isomäki, and A. Toivanen, "LEVAMISOLE AND AGRANULOCYTOSIS," *The Lancet*, vol. 308, no. 7992, pp. 958–959, Oct. 1976.
- [135] R. Laux-End, D. Inaebnit, H. A. Gerber, and M. G. Bianchetti, "Vasculitis associated with levamisole and circulating autoantibodies," *Arch. Dis. Child.*, vol. 75, no. 4, pp. 355–356, Oct. 1996.

- [136] R. S. Pinals, "The non-hematological side effects of levamisole in the treatment of rheumatoid arthritis--a review," *J. Rheumatol. Suppl.*, vol. 4, pp. 71–75, 1978.
- [137] M. Artwohl, T. Hölzenbein, L. Wagner, et al., "Levamisole induced apoptosis in cultured vascular endothelial cells," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 131, no. 8, pp. 1577–1583, Dec. 2000.
- [138] E. K. Jackson, Y. Zhang, and D. Cheng, "Alkaline Phosphatase Inhibitors Attenuate Renovascular Responses to Norepinephrine," *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 69, no. 3, pp. 484–493, 2017.
- [139] S. Martello, M. Pieri, C. Ialongo, et al., "Levamisole in Illicit Trafficking Cocaine Seized: A One-Year Study," *J. Psychoactive Drugs*, vol. 49, no. 5, pp. 408–412, Dec. 2017.
- [140] M. de Jong, A. Florea, A.-M. de Vries, et al., "Levamisole: a Common Adulterant in Cocaine Street Samples Hindering Electrochemical Detection of Cocaine," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 8, pp. 5290–5297, 17 2018.
- [141] B. Kiley, "The Mystery of the Tainted Cocaine," *The Stranger*. [Online]. Available: <https://www.thestranger.com/seattle/the-mystery-of-the-tainted-cocaine/Content?oid=4683741>. [Accessed: 11-Mar-2019].
- [142] S. B. Karch, *Karch's pathology of drug abuse*. Boca Raton Fl.: CRC Press, 2002.
- [143] H. Santos, A. S. Lima, A. Mazega, et al., "Quantification of cocaine and its adulterants (lidocaine and levamisole) using the Dragendorff reagent allied to paper spray ionization mass spectrometry," *Anal. Methods*, vol. 9, no. 24, pp. 3662–3668, Jun. 2017.
- [144] C. Eiden, H. Peyrière, C. Diot, and O. Mathieu, "Prevalence of levamisole and aminorex in patients tested positive for cocaine in a French University Hospital," *Clin. Toxicol. Phila. Pa*, vol. 53, no. 7, pp. 604–608, 2015.
- [145] M. Dziadosz, M. Klintschar, and J. Teske, "Monitoring of Levamisole Concentration in Serum of Traffic Participants after Cocaine Consumption," *J. Forensic Sci.*, vol. 61 Suppl 1, pp. S250-251, Jan. 2016.
- [146] T. Pearson, M. Bremmer, J. Cohen, and M. Driscoll, "Vasculopathy related to cocaine adulterated with levamisole: A review of the literature," *Dermatol. Online J.*, vol. 18, no. 7, p. 1, Jul. 2012.
- [147] M. M. McGrath, T. Isakova, H. G. Rennke, et al., "Contaminated Cocaine and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Disease," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no. 12, pp. 2799–2805, Dec. 2011.
- [148] T. van der Veer, E. Pennings, J. W. C. Tervaert, and L.-A. Korswagen, "Levamisole-contaminated cocaine: a hairy affair," *Case Rep.*, vol. 2015, p. bcr2015210970, Aug. 2015.
- [149] H. Tran, D. Tan, and T. P. Marnejon, "Cutaneous Vasculopathy Associated with Levamisole-Adulterated Cocaine," *Clin. Med. Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 26–30, Jan. 2013.
- [150] M. Vonmoos, S. Hirsiger, K. H. Preller, et al., "Cognitive and neuroanatomical impairments associated with chronic exposure to levamisole-contaminated cocaine," *Transl. Psychiatry*, vol. 8, no. 1, p. 235, Oct. 2018.

- [151] N. Sheldon and B. Bagert, "Leukoencephalopathy Associated With Levamisole Toxicity From Cocaine Use (P5.173)," *Neurology*, vol. 82, no. 10 Supplement, p. P5.173, Apr. 2014.
- [152] J. R. Vitt, E. G. Brown, D. S. Chow, and S. A. Josephson, "Confirmed case of levamisole-associated multifocal inflammatory leukoencephalopathy in a cocaine user," *J. Neuroimmunol.*, vol. 305, pp. 128–130, Apr. 2017.
- [153] L. Garg, S. Gupta, A. Swami, and P. Zhang, "Levamisole/Cocaine Induced Systemic Vasculitis and Immune Complex Glomerulonephritis," *Case Rep. Nephrol.*, vol. 2015, 2015.
- [154] A. T. Ammar, M. Livak, and J. C. Witsil, "Old drug new trick: levamisole-adulterated cocaine causing acute kidney injury," *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 33, no. 2, pp. 309.e3-309.e4, Feb. 2015.
- [155] K. Michaud, S. Grabherr, K. Shiferaw, et al., "Acute coronary syndrome after levamisole-adulterated cocaine abuse," *J. Forensic Leg. Med.*, vol. 21, pp. 48–52, Jan. 2014.
- [156] F. J. Chorro, L. Such-Belenguer, and V. López-Merino, "Animal Models of Cardiovascular Disease," *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.*, vol. 62, no. 1, pp. 69–84, Jan. 2009.
- [157] C. Zaragoza, C. Gomez-Guerrero, J. L. Martin-Ventura, et al., "Animal Models of Cardiovascular Diseases," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011.
- [158] S. H. Yoon, M. Zuccarello, and R. M. Rapoport, "Acute cocaine induces endothelin-1-dependent constriction of rabbit basilar artery," *Endothel. J. Endothel. Cell Res.*, vol. 14, no. 3, pp. 137–139, Jun. 2007.
- [159] S. Tadipatri, D. van Heuven-Nolsen, W. Feniuk, and P. R. Saxena, "Analysis of the 5-HT receptors mediating contractions in the rabbit isolated renal artery," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 104, no. 4, pp. 887–894, Dec. 1991.
- [160] R. L. Sutliff, G. Cai, H. Gurdal, et al., "Cardiovascular hypertrophy and increased vascular contractile responsiveness following repeated cocaine administration in rabbits," *Life Sci.*, vol. 58, no. 8, pp. 675–682, 1996.
- [161] G. I. Togna, M. Graziani, P. Russo, and L. Caprino, "Cocaine toxic effect on endothelium-dependent vasorelaxation: an in vitro study on rabbit aorta," *Toxicol. Lett.*, vol. 123, no. 1, pp. 43–50, Aug. 2001.
- [162] R. J. Korthuis, *Chapter 3, Regulation of Vascular Tone in Skeletal Muscle*. Morgan & Claypool Life Sciences, 2011.
- [163] I. Sayet, G. Neuilly, L. Rakotoarisoa, C. Mironneau, and J. Mironneau, "Relation between alpha 1-adrenoceptor subtypes and noradrenaline-induced contraction in rat portal vein smooth muscle," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 110, no. 1, pp. 207–212, Sep. 1993.
- [164] J. J. Polonia, M. Guerreiro, S. Guimarães, and J. Garrett, "Postsynaptic alpha-adrenoceptor subtypes in the internal carotid, mesenteric, splenic, renal and femoral vascular beds of the dog," *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, vol. 279, no. 1, pp. 5–16, Jan. 1986.
- [165] M. Satoh, K. Enomoto, I. Takayanagi, and K. Koike, "Analysis of alpha1-adrenoceptor subtypes in rabbit aorta and arteries: regional difference and co-existence," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 374, no. 2, pp. 229–240, Jun. 1999.

- [166] D. Sorriento, B. Trimarco, and G. Iaccarino, "Adrenergic Mechanism in the Control of Endothelial Function," *Transl. Med. UniSa*, vol. 1, pp. 213–228, Oct. 2011.
- [167] M. L. Albuquerque and C. D. Kurth, "Cocaine constricts immature cerebral arterioles by a local anesthetic mechanism," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 249, no. 2, pp. 215–220, Nov. 1993.
- [168] I. Biaggioni and D. Robertson, "Adrenoceptor Agonists & Sympathomimetic Drugs," in *Basic & Clinical Pharmacology*, 13th ed., B. G. Katzung and A. J. Trevor, Eds. New York, NY: McGraw-Hill Medical, 2015.
- [169] P. H. Ratz, K. M. Berg, N. H. Urban, and A. S. Miner, "Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus," *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 288, no. 4, pp. C769–C783, Apr. 2005.
- [170] J. B. Salom, G. Torregrosa, M. D. Barberá, et al., "Effects of cocaine on human and goat isolated cerebral arteries," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 42, no. 1, pp. 65–71, Sep. 1996.
- [171] P. M. Vanhoutte, J. M. V. Nueten, T. J. Verbeuren, and P. M. Laduron, "Differential effects of the isomers of tetramisole on adrenergic neurotransmission in cutaneous veins of dog," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 200, no. 1, pp. 127–140, Jan. 1977.
- [172] S. Shibata, K. Hattori, I. Sakurai, J. Mori, and M. Fujiwara, "Adrenergic innervation and cocaine-induced potentiation of adrenergic responses of aortic strips from young and old rabbits," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 177, no. 3, pp. 621–632, Jun. 1971.
- [173] K. Egashira, K. G. Morgan, and J. P. Morgan, "Effects of cocaine on excitation-contraction coupling of aortic smooth muscle from the ferret," *J. Clin. Invest.*, vol. 87, no. 4, pp. 1322–1328, Apr. 1991.
- [174] E. D. Högestätt and K. E. Andersson, "On the postjunctional alpha-adrenoreceptors in rat cerebral and mesenteric arteries," *J. Auton. Pharmacol.*, vol. 4, no. 3, pp. 161–173, Sep. 1984.
- [175] A. Rawlow, H. Fleig, K. Kurahashi, and U. Trendelenburg, "The neuronal and extraneuronal uptake and deamination of 3H(-)-phenylephrine in the perfused rat heart," *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, vol. 314, no. 3, pp. 237–247, Nov. 1980.
- [176] C. G. Sobey, V. Sozzi, and O. L. Woodman, "Ischaemia/reperfusion enhances phenylephrine-induced contraction of rabbit aorta due to impairment of neuronal uptake," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 23, no. 4, pp. 562–568, Apr. 1994.
- [177] E. O. Mikkelsen, S. H. Poulsen, N. C. B. Nyborg, N. Korsgaard, and J. Sehested, "Difference between aortic and renal vascular reactivity in cyclosporin A treated rats and the effect of cicletanine," *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, vol. 345, no. 3, pp. 356–361, Mar. 1992.
- [178] C. Schroeder and J. Jordan, "Norepinephrine Uptake Mechanisms in Cardiovascular Disease Deserve Our Attention," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 58, no. 4, p. 406, Oct. 2011.

- [179] S. Z. Langer, "25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 95–99, Mar. 1997.
- [180] O. A. Nedergaard, "Presynaptic α -Adrenoceptor Control of Transmitter Release from Vascular Sympathetic Neurones in Vitro," in *New Aspects of the Role of Adrenoceptors in the Cardiovascular System*, 1986, pp. 24–32.
- [181] J. E. S. Wikberg, M. Akers, M. G. Caron, and P.-O. Hagen, "Norepinephrine-induced down regulation of alpha1 adrenergic receptors in cultured rabbit aorta smooth muscle cells," *Life Sci.*, vol. 33, no. 14, pp. 1409–1417, Oct. 1983.
- [182] R. M. Eglén and R. L. Whiting, "Heterogeneity of vascular muscarinic receptors," *J. Auton. Pharmacol.*, vol. 10, no. 4, pp. 233–246, 1990.
- [183] H. S. Leung, F. P. Leung, X. Yao, et al., "Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery," *Vascul. Pharmacol.*, vol. 44, no. 5, pp. 299–308, May 2006.
- [184] Deanfield John E., Halcox Julian P., and Rabelink Ton J., "Endothelial Function and Dysfunction," *Circulation*, vol. 115, no. 10, pp. 1285–1295, Mar. 2007.
- [185] S. Karbach, P. Wenzel, A. Waisman, T. Munzel, and A. Daiber, "eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 20, no. 22, pp. 3579–3594, 2014.
- [186] Y. Lee, S. Jung, J.-E. Won, T. Nam, and D. Ahn, "Elevated Contractile Responses to Acetylcholine in Organ Cultured Rabbit Carotid Artery," *Yonsei Med. J.*, vol. 47, no. 2, pp. 249–254, Apr. 2006.
- [187] M. H. M. Yousif, A. Cherian, and M. A. Oriowo, "Endothelium-dependent relaxation in isolated renal arteries of diabetic rabbits," *Auton. Autacoid Pharmacol.*, vol. 22, no. 2, pp. 73–82, Apr. 2002.
- [188] E. P. Havranek, K. Nademane, P. A. Grayburn, and E. J. Eichhorn, "Endothelium-dependent vasorelaxation is impaired in cocaine arteriopathy," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 28, no. 5, pp. 1168–1174, Nov. 1996.
- [189] A. Gajos-Draus, M. Duda, and A. Beręsewicz, "Cardiac and renal upregulation of Nox2 and NF- κ B and repression of Nox4 and Nrf2 in season- and diabetes-mediated models of vascular oxidative stress in guinea-pig and rat," *Physiol. Rep.*, vol. 5, no. 20, p. e13474, 2017.
- [190] I. N. Zelko and R. J. Folz, "Regulation of Oxidative Stress in Pulmonary Artery Endothelium. Modulation of Extracellular Superoxide Dismutase and NOX4 Expression Using Histone Deacetylase Class I Inhibitors," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 53, no. 4, pp. 513–524, Oct. 2015.
- [191] H. Morawietz, "Endothelial NADPH oxidases: friends or foes?," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 106, no. 4, pp. 521–525, Jul. 2011.
- [192] R. P. Brandes, N. Weissmann, and K. Schröder, "NADPH oxidases in cardiovascular disease," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 5, pp. 687–706, Sep. 2010.
- [193] M. D. Mauricio, S. Guerra-Ojeda, P. Marchio, et al., "Nanoparticles in Medicine: A Focus on Vascular Oxidative Stress," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, p. 6231482, 2018.

- [194] Schröder Katrin, Zhang Min, Benkhoff Sebastian, et al., “Nox4 Is a Protective Reactive Oxygen Species Generating Vascular NADPH Oxidase,” *Circ. Res.*, vol. 110, no. 9, pp. 1217–1225, Apr. 2012.
- [195] M. Sedeek, R. Nasrallah, R. M. Touyz, and R. L. Hébert, “NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1512–1518, Oct. 2013.
- [196] B. Y. Jeong, H. Y. Lee, C. G. Park, et al., “Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury,” *PLOS ONE*, vol. 13, no. 1, p. e0191034, Jan. 2018.
- [197] Y. Gorin, K. Block, J. Hernandez, et al., “Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 47, pp. 39616–39626, Nov. 2005.
- [198] H. Fujita, H. Fujishima, S. Chida, et al., “Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy,” *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 20, no. 6, pp. 1303–1313, Jun. 2009.
- [199] Tong XiaoYong, Hou Xiuyun, Jourd’heuil David, Weisbrod Robert M., and Cohen Richard A., “Upregulation of Nox4 by TGFβ1 Oxidizes SERCA and Inhibits NO in Arterial Smooth Muscle of the Prediabetic Zucker Rat,” *Circ. Res.*, vol. 107, no. 8, pp. 975–983, Oct. 2010.
- [200] W. Mo, A. K. Singh, J. A. Arruda, and G. Dunea, “Role of nitric oxide in cocaine-induced acute hypertension,” *Am. J. Hypertens.*, vol. 11, no. 6 Pt 1, pp. 708–714, Jun. 1998.
- [201] A. De Giorgi, F. Fabbian, M. Pala, et al., “Cocaine and acute vascular diseases,” *Curr. Drug Abuse Rev.*, vol. 5, no. 2, pp. 129–134, Jun. 2012.
- [202] C. G. Sáez, P. Olivares, J. Pallavicini, et al., “Increased number of circulating endothelial cells and plasma markers of endothelial damage in chronic cocaine users,” *Thromb. Res.*, vol. 128, no. 4, pp. e18–23, Oct. 2011.
- [203] A. Siniscalchi, A. Bonci, N. B. Mercuri, et al., “Cocaine dependence and stroke: pathogenesis and management,” *Curr. Neurovasc. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 163–172, 2015.
- [204] S. D. Treadwell and T. G. Robinson, “Cocaine use and stroke,” *Postgrad. Med. J.*, vol. 83, no. 980, pp. 389–394, Jun. 2007.