

Biológicas

401

T.D

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

Tesis Doctoral

**INFLUENCIA DEL ION MAGNESIO ( $Mg^{2+}$ ) SOBRE EL LECHO**

**VASCULAR CEREBRAL**



Memoria presentada por  
D<sup>a</sup> Teresa Jover Mengual  
para aspirar al grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas.

Burjassot (València), Mayo 1996.

UMI Number: U607675

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607675

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

30 anys.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA	
BIBLIOTECA CIÈNCIES	
Nº Registre	8993
DATA	31.5.96
SIGNATURA	401 T.D
Nº LIBIS:	1204758 6X

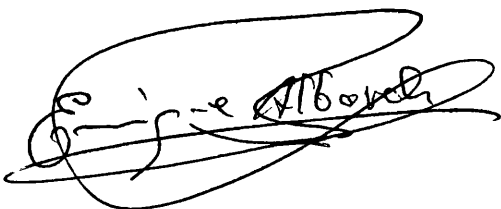
Biologia

**D. Enrique ALBORCH DOMÍNGUEZ**, Catedrático de Fisiología de la Universitat de València y Jefe de Sección de la Unidad de Circulación Cerebral Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitari "La Fe" de València, y **D. Germán TORREGROSA BERNABÉ** Facultativo Especialista de la Unidad de Circulación Cerebral Experimental del Hospital Universitari "La Fe" de València

**CERTIFICAN:**

Que D<sup>a</sup> Teresa Jover Mengual, Licenciada con Grado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección en el Centro de Investigación del Hospital Universitari "La Fe" de València el trabajo experimental para la elaboración de su Tesis Doctoral "**Influencia del ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ) sobre el lecho vascular cerebral**".

Y para que así conste, expedimos la presente en València a 26 de marzo de 1996.



*Enrique ALBORCH DOMÍNGUEZ*



*Germán TORREGROSA BERNABÉ*



Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por la **Direcció General d'Ensenyaments Universitaris i Investigació de la GENERALITAT VALENCIANA** con una Beca de Investigación concedida a D<sup>a</sup> Teresa Jover Mengual y por el **Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social**, con una Ayuda de Investigación concedida a la Unidad de Circulación Cerebral Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitari "La Fe" de València (Exp. 92/442).

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral no hubiera podido realizarse sin la ayuda y colaboración de las personas que forman parte de la Unidad de Circulación Cerebral del Centro de Investigación del Hospital Universitari "La Fe" de València. Estas personas, a las que quiero dejar constancia de mi agradecimiento son:

Dr. Enrique Alborch y Dr. Germán Torregrosa, directores de la presente Tesis Doctoral, por su constante dedicación y ayuda en la realización del trabajo. Deseo sinceramente que esta Tesis Doctoral pueda compensar las horas de trabajo que como maestros han dedicado a mi formación científica.

Dr. Alfredo Perales, auténtico inspirador de esta Tesis Doctoral, por habernos contagiado su entusiasmo por el sulfato magnésico desde la perspectiva obstétrico-ginecológica.

Dr. Joan B. Salom, por el desinterés con el que me ha aconsejado en todo momento.

Dres. F. Javier Miranda y J. Antonio Alabadi, por todos sus consejos.

D<sup>a</sup> Carmen Tirados y D<sup>a</sup> Carmen Máñez, por su inestimable ayuda en el trabajo de laboratorio.

Marta, Jose y de forma especial a la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Barberà, por todas las horas que hemos pasado juntas "codo a codo" y por su camaradería.

A todos ellos agradezco la confianza puesta en mí, así como la oportunidad de trabajar junto a un grupo de personas a las que realmente considero amigos a la vez que compañeros.

Quiero además dejar constancia de mi agradecimiento a Ana, Angel y Amparo, compañeros del Centro de Investigación, que me han ayudado siempre que lo he necesitado. Y a todos aquellos que de una forma u otra han contribuido a hacer posible este trabajo.

A Pepa, Isabel, Pepe y Rafa, por los ánimos infundidos.

A Itsaso, por su presencia.

A mis hermanos, Tata y Kiko, por su permanente apoyo y cariño.

A mi madre, por todo lo que ha sacrificado por mí y por su confianza.

Por último y de forma muy especial quiero recordar a mi padre, porque esté donde esté siempre le tengo presente y de manera privilegiada en los momentos más importantes de mi vida.

*Als meus pares*  
*Als meus germans i a Itsaso*



# *ÍNDICE*

<b>1.- Introducción</b> .....	1
1.1.- Papel funcional del Mg <sup>2+</sup> en el organismo.....	1
1.1.1.- Distribución y metabolismo del Mg <sup>2+</sup> .....	1
1.1.2.- Significación funcional del Mg <sup>2+</sup> .....	2
1.2.- Papel del Mg <sup>2+</sup> en la fisiología cardiovascular.....	4
1.2.1.- Efecto del Mg <sup>2+</sup> sobre la presión arterial.....	4
1.2.2.- Efecto del Mg <sup>2+</sup> sobre la resistencia vascular y el flujo sanguíneo.....	5
1.2.3.- Efecto del Mg <sup>2+</sup> sobre el calibre vascular: estudios <i>in situ</i> .....	5
1.2.4.- Efecto del Mg <sup>2+</sup> sobre los vasos sanguíneos aislados: estudios <i>in vitro</i> .....	6
1.2.4.1.- Influencia de la concentración extracelular de Mg <sup>2+</sup> sobre el tono, actividad espontánea y reactividad vascular.....	6
1.2.4.2.- Influencia de la concentración extracelular de Mg <sup>2+</sup> sobre la función endotelial.....	8
1.3.- Mecanismo de acción del Mg <sup>2+</sup> .....	10
1.3.1.- Papel del Ca <sup>2+</sup> en la actividad vascular.....	11
1.3.1.1.- Ca <sup>2+</sup> y acoplamiento excitación/contracción en el músculo liso vascular.....	11
1.3.1.2.- Papel del Ca <sup>2+</sup> en la función del endotelio vascular.....	14
1.3.1.3.- Canales de Ca <sup>2+</sup> en las arterias cerebrales.....	15
1.3.2.- Influencia del Mg <sup>2+</sup> en la homeostasis del Ca <sup>2+</sup> .....	17
1.4.- Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos relacionados con el Mg <sup>2+</sup> .....	20
1.4.1.- Fisiopatología y patogénesis de la preeclampsia-eclampsia.....	20
1.4.2.- Mg <sup>2+</sup> en la prevención y tratamiento de la preeclampsia-eclampsia.....	22
1.5.- Mg <sup>2+</sup> y circulación cerebral.....	24
<b>2.- Objetivos</b> .....	26
<b>3.- Material y métodos</b> .....	27
3.1.- Modelo experimental <i>in vitro</i> : registro de la tensión isométrica desarrollada por arterias aisladas.....	27
3.1.1.- Preparación experimental.....	27
3.1.2.- Técnicas de registro y medición.....	28

3.1.3.- Procedimiento experimental.....	29
3.1.4.- Protocolos experimentales.....	30
3.1.5.- Fármacos y soluciones.....	33
3.1.6.- Análisis de los resultados.....	33
3.2.- Modelo experimental <i>in vivo</i> .....	35
3.2.1.- Consideraciones anatómicas y fisiológicas acerca del lecho vascular cerebral de la cabra.....	35
3.2.2.- Técnica quirúrgica: preparación vascular para la medición del flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos.....	36
3.2.3.- Procedimiento experimental: medición del flujo sanguíneo cerebral en la cabra sin anestésicar.....	38
3.2.4.- Protocolos experimentales.....	40
3.2.5.- Fármacos y soluciones.....	42
3.2.6.- Análisis de los resultados.....	42
<b>4.- Resultados.....</b>	<b>43</b>
4.1.- Estudios <i>in vitro</i> .....	43
4.1.1.- Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre el tono de la arteria cerebral media aislada de cabra.....	43
4.1.2.- Efecto relajante de $Mg^{2+}$ sobre arterias aisladas en función de la especie, el agente inductor del tono activo y el tipo de arteria.....	44
4.1.3.- Influencia de factores derivados del endotelio en la respuesta relajante de la arteria cerebral media aislada de cabra frente a $Mg^{2+}$ .....	46
4.1.4.- Efecto de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a vasoconstrictores: $Ca^{2+}$ , endotelina-1 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y prostaglandina $F_{2\alpha}$ .....	47
4.2.- Estudios <i>in vivo</i> .....	49
4.2.1.- Influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de $Mg^{2+}$ al cerebro.....	49

4.2.2.- Efecto del sulfato magnésico sobre flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos en la cabra sin anestésicar.....	49
4.2.3.- Efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina.....	50
<b>5.- Figuras.....</b>	<b>53</b>
<b>6.- Tablas.....</b>	<b>88</b>
<b>7.- Discusión.....</b>	<b>103</b>
7.1.- Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre el tono de la arteria cerebral media aislada de cabra.....	103
7.2.- Efecto relajante de $Mg^{2+}$ sobre arterias aisladas en función de la especie, el agente inductor del tono activo y el tipo de arteria.....	106
7.3.- Influencia de factores derivados del endotelio en la respuesta relajante de la arteria cerebral media aislada de cabra frente a $Mg^{2+}$ .....	108
7.4.- Efecto de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a vasoconstrictores: $Ca^{2+}$ , endotelina-1, 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y prostaglandina $F_{2\alpha}$ .....	110
7.5.- Influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de $Mg^{2+}$ al cerebro.....	117
7.6.- Efecto del sulfato magnésico sobre flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos en la cabra sin anestésicar.....	118
7.7.- Efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina.....	119
<b>8.- Conclusiones.....</b>	<b>123</b>
<b>9.- Bibliografía.....</b>	<b>126</b>

# ***1.- INTRODUCCIÓN***

## 1.1.- PAPEL FUNCIONAL DEL $Mg^{2+}$ EN EL ORGANISMO

### 1.1.1.- Distribución y metabolismo del $Mg^{2+}$

El  $Mg^{2+}$  es el cuarto catión más abundante en el organismo y el segundo más abundante en el medio intracelular después del potasio. Como promedio, el organismo de un ser humano de 70 kg de peso contiene aproximadamente 24 g de  $Mg^{2+}$ , los cuales se distribuyen desigualmente de tal forma que las mayores concentraciones se encuentran en aquellos tejidos con una mayor tasa metabólica: cerebro, corazón, hígado y riñón. Aproximadamente el 1% del  $Mg^{2+}$  total existente en el organismo se encuentra en el espacio extracelular constituyendo el  $Mg^{2+}$  circulante. Alrededor del 35% está unido inespecíficamente a la albúmina, y el resto se encuentra fundamentalmente en forma ionizada. Una baja concentración sérica de  $Mg^{2+}$  implica una deficiencia en  $Mg^{2+}$ . El  $Mg^{2+}$  sérico, sin embargo, puede no reflejar el contenido intracelular del catión. De hecho, puede producirse una depleción del  $Mg^{2+}$  intracelular a pesar de que exista una concentración sérica de  $Mg^{2+}$  normal. No obstante, la determinación del  $Mg^{2+}$  sérico es el método por el cual se identifica la deficiencia en  $Mg^{2+}$  en la práctica clínica. Los valores normales de  $Mg^{2+}$  en suero se sitúan entre 0.75 y 1.5 mM; valores menores representan hipomagnesemia.

Los parámetros básicos del metabolismo del  $Mg^{2+}$  están bien caracterizados. De la ingesta normal de 200-300 mg/día, aproximadamente un tercio se absorbe en el intestino delgado, aunque esta cantidad depende de la ingesta: cuanto más  $Mg^{2+}$  se ingiere menor es la eficacia de su absorción. El riñón representa el lugar en el que con más precisión se regulan los niveles de  $Mg^{2+}$ . En condiciones normales, los riñones filtran aproximadamente 2.5 g/día de los cuales un 95% son retenidos; el resto (unos 100-150 mg) se excretan con la orina para mantener la homeostasis. En condiciones de hipomagnesemia el riñón retiene  $Mg^{2+}$  con gran avidez, pudiéndose reducir la cantidad excretada hasta 10-20 mg/día (Rude, 1989; Lauler, 1989).



### 1.1.2.- Significación funcional del $Mg^{2+}$

El sistema ATP-ADP actúa como transportador de energía en el medio celular. El ADP es capaz de aceptar un grupo fosfato en las reacciones productoras de energía, mientras que el ATP es capaz de ceder su grupo fosfato terminal en reacciones consumidoras de energía. En la célula intacta existen muy pocas cantidades de ATP y ADP en forma de aniones libres; se hallan presentes, en su mayor parte, en forma de complejos 1:1 con el ion  $Mg^{2+}$  ( $MgATP^{2-}$  y  $MgADP^-$ ) a causa de la elevada concentración de este ion y de la gran afinidad de los grupos pirofosfato para enlazar cationes divalentes. Por lo tanto, el  $Mg^{2+}$  tiene como función primordial la de formar el sustrato para la actuación de enzimas que catalizan reacciones en las que se requiere una transferencia de energía. Además, también actúa activando directamente a determinados enzimas. Mediante este doble mecanismo de acción el  $Mg^{2+}$  participa en la función catalítica de algunos de los principales enzimas de la glucólisis (hexoquinasa, fosfofructoquinasa, fosfogliceratoquinasa, fosfogliceromutasa, enolasa, piruvatoquinasa), enzimas del ciclo de Krebs (isocitrato deshidrogenasa específica del NAD, succinil-CoA-sintetasa, piruvato carboxilasa) y enzimas de la ruta del fosfogluconato (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). De particular interés resulta la participación del sustrato  $MgATP^{2-}$  en la fosforilación de la miosina, fenómeno que, como después se expondrá, resulta clave para el desarrollo de la contracción muscular. Otro grupo de importantes enzimas cuya actividad depende del  $Mg^{2+}$  son las ATPasas implicadas en el transporte iónico a través de la membrana, principalmente la  $Na^+K^+$ -ATPasa y las  $Ca^{2+}$ -ATPasas (de la membrana plasmática y del retículo sarcoplásmico), cuyo significado funcional en el músculo liso vascular se expondrá más adelante (Altura, 1982; Rude, 1989; O'Donnell y Owen, 1994) (Figura 1).

Dado su importante papel como cofactor enzimático, resulta evidente que la alteración de la homeostasis del  $Mg^{2+}$  puede causar alteraciones del metabolismo que se traducen en manifestaciones clínicas. En este sentido, la deficiencia en  $Mg^{2+}$  (hipomagnesemia) posee una mayor relevancia clínica que el exceso de dicho ion (hipermagnesemia).

La hipomagnesemia es una condición que puede presentarse por multitud de causas, aunque todas ellas pueden agruparse en dos grandes grupos: las que producen una ingestión reducida y las que dan lugar a una eliminación aumentada. En la Figura 2 se muestran las principales causas de la deficiencia en  $Mg^{2+}$  en humanos (Seelig, 1989; Reinhart, 1995). Por su parte, la hipermagnesemia aparece principalmente como consecuencia del deterioro de la función renal, aunque otras circunstancias tales como la ingestión de medicación rica en  $Mg^{2+}$ , uremias y shock circulatorio se asocian a menudo con hipermagnesemia (Mordes y Wacker, 1978). En cuanto a las alteraciones orgánicas originadas por las variaciones de la magnesemia (en la Figura 3 se muestran las alteraciones orgánicas asociadas a la hipomagnesemia), resultan de especial interés las que se producen en el sistema cardiovascular.





## **1.2.- PAPEL DEL $Mg^{2+}$ EN LA FISIOLÓGÍA CARDIOVASCULAR**

### **1.2.1.- Efecto del $Mg^{2+}$ sobre la presión arterial**

El interés por el papel del  $Mg^{2+}$  en las enfermedades cardiovasculares resultó estimulado por algunos estudios ecológicos que demostraron una relación inversa entre la dureza del agua (uno de cuyos principales responsables es el  $Mg^{2+}$ ) y la tasa de hipertensión y de enfermedades cardiovasculares (Stitt et al., 1973; Dawson et al., 1978). Estudios experimentales con ratas han demostrado que la ingestión de dietas deficitarias en  $Mg^{2+}$  produce aumento de la presión arterial (Altura et al., 1984). Aunque las relaciones hipermagnesemia/hipotensión e hipomagnesemia/hipertensión se han constatado tanto en animales como en humanos (Altura, 1982), su incidencia, severidad y duración han resultado ser muy variables. Por lo que respecta al posible efecto antihipertensor del  $Mg^{2+}$ , en la experimentación animal no resulta fácil sustraerse a la influencia de la anestesia y de las diferencias interespecíficas; en cuanto a los humanos, hay que considerar la vía de administración así como la diferente susceptibilidad entre individuos frente a la hipermagnesemia (Mordes y Wacker, 1978).

Las investigaciones acerca de la influencia del  $Mg^{2+}$  sobre la presión arterial han sido particularmente intensas en el área obstétrica. Esto es consecuencia de la extendida utilización del sulfato magnésico en los Estados Unidos de America para la prevención y tratamiento de los desórdenes hipertensivos asociados a la gestación, aun cuando, como más adelante se describirá, los fundamentos de su acción beneficiosa siguen estando sujetos a debate. Ni la experimentación animal ni los ensayos clínicos controlados permiten concluir taxativamente que el sulfato magnésico sea un antihipertensor. Hay estudios que apoyan que el sulfato magnésico provoca descenso mantenido de la presión arterial (Lee et al., 1984, 1985; Bathia et al., 1987; England et al., 1990), descenso transitorio (Dandavino et al., 1977; Ayromlooi et al. 1980; Cotton et al., 1984) y una ausencia de efecto (Thiagarajah et al., 1985; Chestnut et al., 1988; O'Brien et al., 1990; Aisenbrey et al., 1992; Armson et al., 1992). No obstante, puesto que cierto grado de hipotensión es evidente en muchos estudios, resulta de gran interés conocer el mecanismo de acción a través del cual el  $Mg^{2+}$  podría

ejercer dicho efecto.

### 1.2.2.- Efecto del $Mg^{2+}$ sobre la resistencia vascular y el flujo sanguíneo

Las asociaciones hipermagnesemia-reducción de la resistencia vascular-vasodilatación y, por otra parte, hipomagnesemia-aumento de la resistencia vascular-vasoconstricción han sido puestas de manifiesto desde hace años en una amplia variedad de lechos vasculares y constituyen, de hecho, el esquema básico para comprender el efecto de las alteraciones de la magnesemia sobre la hemodinámica general y sobre la presión arterial en particular (Mordes y Wacker, 1978; Altura, 1982). Desde esta perspectiva, el efecto hipotensor a menudo asociado con la hipermagnesemia podría atribuirse a la capacidad del  $Mg^{2+}$  para reducir la resistencia vascular e incrementar el flujo sanguíneo, mientras que lo inverso ocurriría para la hipertensión asociada a la hipomagnesemia: incremento de la resistencia vascular y reducción del flujo sanguíneo.

En los últimos años se han acumulado numerosas evidencias experimentales que apoyan la hipótesis de que los efectos hemodinámicos del  $Mg^{2+}$  se deben, al menos en parte, a su acción directa sobre la pared vascular influyendo en el tono, la actividad espontánea y la reactividad de los vasos sanguíneos.

### 1.2.3.- Efecto del $Mg^{2+}$ sobre el calibre vascular: estudios *in situ*

Experimentos en los que se mide el calibre de los microvasos mediante un sistema de intensificación de imágenes por televisión, han demostrado que la administración local o sistémica (intravenosa) de  $Mg^{2+}$  en forma de sulfato magnésico produce un aumento del calibre vascular (dilatación) en diferentes lechos vasculares tales como mesenterio (Altura et al., 1987; Nishio et al., 1989) y músculo esquelético (Altura et al., 1987; Nagai et al., 1988) de rata. Las características principales de esta respuesta son la inmediatez de su aparición (2-5 seg de latencia cuando se aplica localmente) y su dosis-dependencia. Ambas evidencias apuntan hacia un efecto dilatador directo del  $Mg^{2+}$  sobre los microvasos. Por otra parte, la deficiencia en  $Mg^{2+}$  inducida experimentalmente por ingestión de dietas pobres en

este ion, produce una disminución del calibre vascular (constricción) de magnitud directamente proporcional al déficit de  $Mg^{2+}$  en microvasos mesentéricos de rata (Altura et al., 1984).

#### **1.2.4.- Efecto del $Mg^{2+}$ sobre los vasos sanguíneos aislados: estudios *in vitro***

##### **1.2.4.1.- *Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre tono, actividad espontánea y reactividad vascular***

Está suficientemente documentado que la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  ( $[Mg^{2+}]_e$ ) afecta directamente al tono basal de los vasos sanguíneos. Las primeras investigaciones al respecto fueron llevadas a cabo a principio de los años 70 por el grupo de Altura y colaboradores. Estudiando diferentes lechos vasculares aislados de diferentes especies animales, estos investigadores han demostrado que existe una relación inversa entre la  $[Mg^{2+}]_e$  y el tono basal, de tal forma que descensos en la  $[Mg^{2+}]_e$  resultan en un aumento de la tensión basal, mientras que aumentos en la  $[Mg^{2+}]_e$  resultan en una disminución de la tensión basal (Altura y Altura, 1974, 1977; Altura et al., 1983; Turlapaty y Altura, 1980; Turlapaty et al., 1981). Otros autores han confirmado esta relación más recientemente (Noguera y D'Ocón, 1993). Además, este comportamiento se manifiesta también en pequeños vasos de resistencia (arteriolas). Utilizando un sistema de perfusión *in vitro* de arteria mesentérica de rata, se ha observado que la eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio de perfusión da lugar a una reducción rápida y progresiva del calibre arteriolar concomitantemente con una reducción del flujo sanguíneo (Altura y Altura, 1978). Los cambios en la  $[Mg^{2+}]_e$  afectan también al tono activo de los vasos aislados, es decir, de los vasos previamente expuestos a algún agente que induce un aumento sostenido de la tensión vascular. En estas condiciones, la reducción de la  $[Mg^{2+}]_e$  produce invariablemente relajación vascular que se sigue o no de recuperación (completa o incompleta) del tono activo (Ku y Ann, 1987, 1991; Gold et al. 1990; Szabó et al., 1992a,b)

La  $[Mg^{2+}]_e$  influye en la actividad contráctil espontánea en aquellas preparaciones vasculares que la manifiestan. En aorta de rata, el aumento de la  $[Mg^{2+}]_e$  desde 1.2 mM

(valor fisiológico) hasta 6.0 mM inhibió completamente la actividad espontánea (Altura y Altura, 1974). En vena mesentérica de conejo se ha observado que el aumento de la  $[Mg^{2+}]_e$  desde 1.2 mM a 2.4 mM, disminuye significativamente la magnitud de las contracciones espontáneas sin afectar a su frecuencia (Goldstein y Zsotér, 1978). En vena porta de rata, la eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio potenció la amplitud y la frecuencia de las contracciones fásicas espontáneas, mientras que el aumento gradual de la  $[Mg^{2+}]_e$  desde 1.2 mM hasta 9.6 mM redujo en forma concentración-dependiente ambos parámetros hasta su total inhibición con la concentración más alta (Altura y Altura, 1977; Turlapaty et al., 1981).

Además de su influencia sobre el tono y la actividad contráctil espontánea, la  $[Mg^{2+}]_e$  afecta también a la respuesta vascular frente a agonistas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este último caso no son tan homogéneos, lo cual indica que la influencia de la  $[Mg^{2+}]_e$  depende tanto del estímulo como del tejido investigados. Así, se ha observado que la incubación en medio libre de  $Mg^{2+}$  en unos casos disminuye (Altura y Altura, 1971; Jurevics y Carrier, 1973; Fujiwara et al., 1978) y en otros incrementa (Takagi et al., 1972; Turlapaty y Altura, 1980) la respuesta contráctil de determinados tejidos frente a norepinefrina. La ausencia de  $Mg^{2+}$  potencia la respuesta contráctil frente a 5-hidroxitriptamina en ciertos tejidos (Goldstein y Zsotér, 1978; Turlapaty y Altura, 1980; Altura et al., 1983); sin embargo, en otros dicha respuesta no se ve modificada (Altura y Altura, 1971). Otros agonistas tales como angiotensina II (Altura y Altura, 1971; Turlapaty y Altura, 1980; Altura et al., 1983) y acetilcolina (Altura y Altura, 1971; Jurevics y Carrier, 1973; Turlapaty y Altura, 1980) muestran resultados más homogéneos, ya que en todos los tejidos investigados su efecto se ve incrementado tras la eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio.

De acuerdo con lo que se acaba de exponer, no puede afirmarse que la ausencia de  $Mg^{2+}$  potencie la respuesta vascular contráctil en todos los casos, y lo mismo se puede afirmar de reducciones más discretas de la  $[Mg^{2+}]_e$  (Szabó et al., 1991a).

Los resultados obtenidos acerca del efecto de la hipermagnesemia son más homogéneos. La incubación en medio hipermagnesémico atenúa la respuesta tanto a norepinefrina (Fujiwara et al., 1978; Szabó et al., 1991a; Noguera y D'Ocón, 1993),

5-hidroxitriptamina y angiotensina II (Goldstein y Zsotér, 1978; Turlapaty y Altura, 1980; Altura et al., 1983) como a acetilcolina (Turlapaty y Altura, 1980; Szabó et al., 1991a) en todos los tejidos investigados.

Además de sus efectos sobre la zona efectora (nivel postsináptico), también se ha descrito un efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la liberación de norepinefrina desde las terminaciones simpáticas perivasculares (nivel presináptico). La adición de  $Mg^{2+}$  (1.2-24 mM) inhibió las contracciones de la aorta de conejo inducidas eléctricamente, siendo la magnitud de la inhibición dependiente de la  $[Mg^{2+}]_e$ ; con la concentración mayor (24 mM) la inhibición fue completa. Aunque no de forma tan acusada, la hipermagnesemia inhibió también la liberación de  $^3H$  en este mismo tejido (Fujiwara et al., 1978). Estos autores sugieren, no obstante, que en la valoración global de la influencia de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre la función vascular, su acción a nivel postsináptico es más importante que a nivel presináptico.

#### **1.2.4.2.- Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre la función endotelial**

La influencia del  $Mg^{2+}$  sobre las respuestas relajantes dependientes de endotelio es poco conocida. Como se ha mencionado en el epígrafe anterior, la reducción total o parcial de la  $[Mg^{2+}]_e$  produce relajación de las arterias aisladas precontraídas. La atención de los investigadores se ha dirigido hacia la posible participación de un factor relajante derivado del endotelio ("endothelium-derived relaxing factor", EDRF) en dicha respuesta, para lo cual se han desarrollado protocolos experimentales en los que se incluye la eliminación mecánica del endotelio, la incubación con inhibidores de la producción/liberación de EDRF, o ambos.

Las primeras evidencias sobre la importancia del  $Mg^{2+}$  en la generación de EDRF fueron aportadas por Ann y Ku en 1986. Sus resultados ponen de manifiesto la implicación del EDRF en la respuesta relajante producida por la ausencia de  $Mg^{2+}$  y, al mismo tiempo, la acción inhibitoria del  $Mg^{2+}$  sobre la producción de EDRF cuando el endotelio se encuentra intacto (Ann y Ku, 1986; Ku y Ann, 1987, 1991). Investigaciones posteriores han confirmado estas conclusiones (Gold et al., 1990; Szabó et al., 1992a,b). Sin embargo, los resultados acerca de la posible influencia de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre la producción/liberación de

EDRF inducida por agonistas parecen menos concordantes. (Altura y Altura, 1987; Faragó et al., 1989; Gold et al., 1990; Ku y Ann, 1991). Considerados globalmente, estos resultados demuestran que la influencia del  $Mg^{2+}$  sobre la producción/liberación de EDRF es un fenómeno complejo ya que su comportamiento parece ser diferente en la liberación de EDRF basal y en la inducida por agonistas.

Otro de los factores endoteliales relacionado con el  $Mg^{2+}$  es la prostaciclina, prostaglandina vasodilatadora que además inhibe la agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1979). Las evidencias experimentales demuestran que el  $Mg^{2+}$  estimula la producción de prostaciclina en células endoteliales cultivadas de vena umbilical humana (Watson et al., 1986) y que es el mediador de las acciones vasculares del  $Mg^{2+}$  cuando éste se administra en humanos (Nadler et al., 1987). No obstante, también existen evidencias experimentales en contra de esta mediación (O'Brien et al., 1990).

El  $Mg^{2+}$  también parece influir en la liberación de factores endoteliales de naturaleza vasoconstrictora, particularmente de endotelina, aunque de forma indirecta. Se ha postulado la hipótesis de que la deficiencia de  $Mg^{2+}$  activa los macrófagos produciéndose un estado pro-inflamatorio sistémico. Las citoquinas inflamatorias resultantes (interleuquinas, abreviadamente IL) podrían activar a su vez las células endoteliales y estimular así la producción de endotelina (Lerman et al., 1990). Hay resultados experimentales que apoyan esta hipótesis (Weglicki et al., 1992). Por otra parte, se ha sugerido que el  $Mg^{2+}$  influencia la producción/liberación de prostaglandinas constrictoras en el endotelio vascular, y que una elevada concentración de glucosa potencia este efecto (Féletou et al., 1994).

### 1.3.- MECANISMO DE ACCIÓN DEL $Mg^{2+}$

Varios son los mecanismos de acción propuestos a través de los cuales el  $Mg^{2+}$  podría influir sobre la función vascular: 1) modificando la osmolaridad del medio de incubación en los estudios *in vitro*; 2) modificando la capacidad de los agonistas para unirse a sus receptores; 3) a través de algún mediador vasoactivo liberado desde las células musculares lisas o el endotelio; y 4) modificando la actividad de los enzimas  $Mg^{2+}$ -dependientes que participan en el transporte iónico. Aunque algunos de estos mecanismos podrían contribuir, al menos parcialmente, a explicar los efectos del  $Mg^{2+}$  sobre los vasos sanguíneos, evidencias experimentales directas e indirectas sugieren que el  $Mg^{2+}$  actúa principalmente modulando la entrada, la unión y la translocación de  $Ca^{2+}$  en el músculo liso vascular (Altura y Altura, 1984a; Altura et al., 1987). De hecho, en los últimos años se ha postulado la hipótesis de que el  $Mg^{2+}$  puede considerarse realmente como un "antagonista fisiológico del  $Ca^{2+}$ ". Esta hipótesis, formulada reiteradamente por Altura y colaboradores (Altura y Altura, 1977, 1981a,b,c; Altura et al., 1982; Altura y Altura, 1984a,b), ha suscitado el interés de otros investigadores (Levine y Coburn, 1984; Iseri y French, 1984).

Para comprender el posible papel del  $Mg^{2+}$  como "antagonista fisiológico del  $Ca^{2+}$ ", es necesario considerar primeramente el papel del  $Ca^{2+}$  en la fisiología de la contracción muscular. Por la naturaleza del trabajo relativo a la presente Tesis Doctoral, se presenta exclusivamente la información relativa al músculo liso vascular.

### 1.3.1.- Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en la actividad vascular

#### 1.3.1.1.- $\text{Ca}^{2+}$ y acoplamiento excitación/contracción en el músculo liso vascular

El acoplamiento excitación/contracción consiste en la sucesión de procesos que liga un estímulo a la respuesta contráctil muscular, y en la cual el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) desempeña un papel primordial. Los fenómenos que a nivel molecular se producen en el ciclo contracción-relajación del músculo liso, esquematizados en la Figura 4, son los siguientes (Allen y Walsh, 1994):

- 1.- Estimulación (neuronal u hormonal) de las células musculares lisas.
- 2.- Incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  desde 140 nM a 500-700 nM (4-5 veces).
- 3.- Formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaM) con 4 iones  $\text{Ca}^{2+}$  por cada molécula de CaM [ $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM].
- 4.- Formación del complejo ternario entre  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM y MLCK ("myosin light-chain kinase", quinasa de la cadena ligera de la miosina). Dicho complejo  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM-MLCK es la forma activa de la MLCK.
- 5.- Fosforilación de la miosina por transferencia del grupo fosforil terminal del  $\text{MgATP}^{2-}$  al resto Ser19 en cada una de las dos cadenas ligeras de miosina de 20kDa ("myosin light-chain<sub>20</sub>",  $\text{MLC}_{20}$ ).
- 6.- Activación de los lugares de unión de la cadena pesada de miosina con la actina, produciéndose ciclos repetidos de hidrólisis de ATP: ciclo de los "puentes cruzados". **CONTRACCION.**
- 7.- Descenso de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .
- 8.- Disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM.
- 9.- Inactivación de la MLCK.
- 10.- Desfosforilación de la miosina por la MLCP ("myosin light-chain phosphatase", fosfatasa de la cadena ligera de miosina). **RELAJACION.**

Por lo tanto, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es el factor clave del acoplamiento excitación/contracción por su influencia directa sobre el nivel de fosforilación de la miosina. Sin embargo, la



procedencia del  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la activación de la maquinaria contráctil es una cuestión aún no completamente resuelta, es decir, la contribución relativa del  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del medio extracelular y del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde los depósitos intracelulares (retículo sarcoplásmico) (Himpens et al., 1995).

En el músculo liso vascular se han descrito dos tipos principales de acoplamiento: electromecánico y farmacomecánico. En el *acoplamiento electromecánico*, los cambios en el potencial de membrana dan lugar al incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , el cual se produce como consecuencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular tras la apertura de *canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje* ("voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels", VOCs) localizados en la membrana celular. De entre los distintos tipos de VOCs tipificados (L, T, N y P) (Spedding y Paoletti, 1992), los canales de tipo L (de larga duración) parecen ser los únicos que intervienen en el acoplamiento electromecánico durante la excitación del músculo liso vascular. Se caracterizan por poseer una alta conductancia y por ser altamente sensibles a la inhibición por las dihidropiridinas y otros bloqueadores orgánicos e inorgánicos. Se desconoce actualmente si la despolarización de la membrana produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (Himpens et al., 1995).

En el *acoplamiento farmacomecánico* no se precisan cambios en el potencial de membrana para el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , el cual se produce como consecuencia tanto de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular como de su liberación desde el retículo sarcoplásmico. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se produciría a través de *canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor* ("receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels", ROCs). En cuanto a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico, la hipótesis más reciente postula que ésta ocurre a través de dos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : el *receptor de inositol 1,4,5,-trifosfato* ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) y el *receptor de rianodina* (RyR). Ambos receptores se activan cuando aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , estableciéndose así un circuito de retroalimentación positiva denominado de "liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el  $\text{Ca}^{2+}$ " (Himpens et al., 1995).

La hipótesis que postula la existencia de VOCs y ROCs como vías principales para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se ha sustentado exclusivamente en observaciones indirectas

basadas en la asunción de que el nivel de contracción refleja la  $[Ca^{2+}]_i$  (Mulvany et al., 1982; Janis et al., 1987). Sin embargo, la proporcionalidad entre la magnitud de la contracción y la  $[Ca^{2+}]_i$  es cuestionable ya que, según los resultados obtenidos con técnicas que permiten la medición directa de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la activación del receptor puede alterar dicha relación sensibilizando o desensibilizando la fosforilación de la miosina por el  $Ca^{2+}$  (Nishimura et al., 1990; Jensen et al., 1992). Con la técnica de "patch-clamp" se ha demostrado la existencia de VOCs en el músculo liso vascular (Nelson et al., 1990; Ganitkevich e Isenberg, 1990). Por el contrario, la demostración directa de ROCs no ha sido realizada en el momento actual, y por lo tanto su contribución en la entrada de  $Ca^{2+}$  así como su posible influencia indirecta sobre el potencial de membrana resultan inciertas. Evidencias recientes obtenidas en pequeñas arterias mesentéricas de rata parecen demostrar que los ROCs juegan un papel insignificante en la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , al menos en estos vasos (Nilsson et al., 1994).

Por otra parte, existen mecanismos de extrusión por los cuales el  $Ca^{2+}$  es retirado del citosol una vez ha concluido la contracción, restituyéndose la  $[Ca^{2+}]_i$ . Uno de estos mecanismos son las denominadas *bombas de  $Ca^{2+}$* : bomba de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática, que media el transporte de  $Ca^{2+}$  desde el citosol hacia el exterior (medio extracelular) y es estimulada por la calmodulina, y bomba de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, que media el transporte de  $Ca^{2+}$  desde el citosol hacia el interior del retículo sarcoplásmico. Ambas son ATPasas estimuladas por el  $Ca^{2+}$  y dependientes de  $Mg^{2+}$ , por lo cual reciben también la denominación de  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPasas (O'Donnell y Owen, 1994).

Otro mecanismo para la extrusión de  $Ca^{2+}$  es el *intercambiador  $Na^+$ - $Ca^{2+}$* , que media el flujo de  $Ca^{2+}$  desde el citosol hacia el medio extracelular. Sin embargo, mientras que la bomba de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática opera como un sistema de alta afinidad/baja capacidad, el intercambiador  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  opera como un sistema de baja afinidad/alta capacidad. Esto significa que el primero de dichos mecanismos sería el responsable del "ajuste fino" de la  $[Ca^{2+}]_i$  mientras que el segundo sería el responsable de la eyección masiva de  $Ca^{2+}$  (O'Donnell y Owen, 1994) (Figura 4).

### 1.3.1.2.- *Papel del $Ca^{2+}$ en la función del endotelio vascular*

Desde la observación inicial de que la acetilcolina induce relajación arterial mediante la liberación de EDRF (Furchgott y Zawadzki, 1980), se ha acumulado mucha información sobre los factores que influyen en la síntesis y liberación de dicho factor. De particular importancia resulta la influencia del  $Ca^{2+}$ .

Se ha demostrado que la liberación de EDRF depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, y por lo tanto se ha postulado que la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular inducida por agonistas contribuye al aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células endoteliales, y que este proceso es de gran importancia para la liberación de EDRF (Zawadzki et al., 1980; Singer y Peach, 1982; Long y Stone, 1985). Estudios posteriores con marcadores fluorescentes del  $Ca^{2+}$  han aportado la evidencia directa de que los agonistas incrementan la  $[Ca^{2+}]_i$  en células endoteliales en cultivo, aunque la procedencia de dicho  $Ca^{2+}$  es una cuestión que continúa estando abierta al debate (Schilling y Elliott, 1992).

Agonistas tales como la bradikinina producen un aumento de 4-5 veces en la  $[Ca^{2+}]_i$  de células endoteliales de aorta bovina en cultivo: a un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en forma de pico rápido y transitorio le sigue un descenso hasta un nivel sostenido por encima del valor basal. El componente transitorio se observa en presencia de  $La^{3+}$  o en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, mientras que el componente sostenido desaparece en esas condiciones. Estos resultados sugieren que el componente transitorio refleja la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, mientras que el componente sostenido refleja la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular (Colden-Stanfield et al., 1987). Actualmente se sabe que la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares sigue un proceso similar al descrito para las células musculares lisas, es decir, vía la formación de  $InsP_3$ . Por el contrario, los mecanismos por los cuales los agonistas estimulan la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular en las células endoteliales no han sido identificados en el momento presente. Aunque se ha sugerido la presencia de VOCs en las células endoteliales, estos serían diferentes de los de las células musculares lisas subyacentes (Rubanyi y Vanhoutte, 1988). Independientemente del mecanismo exacto por el que se produzca la entrada de  $Ca^{2+}$ , el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por agonistas es

importante para la liberación de factores paracrinos, los cuales influyen en la reactividad y permeabilidad vasculares (Schilling y Elliott, 1992).

### 1.3.1.3.- Canales de $Ca^{2+}$ en las arterias cerebrales

#### a) *Músculo liso*

El registro por medio de la técnica de "patch-clamp" de las corrientes macroscópicas de  $Ca^{2+}$  en músculo liso aislado de arteria basilar de cobaya, ha permitido identificar dos componentes en dichas corrientes: uno con características electrofisiológicas y farmacológicas propias del canal L, y otro menos sensible a las dihidropiridinas el cual, por sus características diferentes del canal T, ha recibido la denominación de canal B (Simard, 1991; West et al., 1992). Sin embargo, sólo el canal L se expresa en miocitos en cultivo procedentes de este segmento vascular (Kent et al., 1992). Por el contrario, en miocitos aislados de arteria basilar de rata no se registra ningún componente de tipo T y, por lo tanto, la corriente de  $Ca^{2+}$  hacia el interior tiene lugar exclusivamente a través de canales L. Puesto que estos canales tienen una "probabilidad de estado abierto" ( $P_0$ ) significativa para voltajes próximos al potencial basal, existe un flujo basal de  $Ca^{2+}$  hacia el interior que contribuye al mantenimiento de una tensión basal en el miocito y, por consiguiente, del tono arterial (Langton y Standen, 1993). En miocitos aislados de arteria cerebral media de perro también se han identificado únicamente corrientes de  $Ca^{2+}$  correspondientes a canales de tipo L (Buljubasic et al., 1992).

Las técnicas de patch-clamp de alta resolución se han aplicado para el estudio de corrientes de  $Ca^{2+}$  a través de un canal único (corrientes unitarias de  $Ca^{2+}$ ). En miocitos aislados de arteria basilar de conejo se han identificado dos tipos de corrientes correspondientes a dos tipos de canales de  $Ca^{2+}$ : L y T (Oike et al., 1990). Por el contrario, en un trabajo recientemente publicado en el que se registran corrientes unitarias de  $Ca^{2+}$  en músculo liso aislado de arteria basilar y arteriolas precapilares de cobaya, se identifica únicamente el canal de tipo L (Michelakis et al., 1994). Una observación importante en este trabajo es que la actividad del canal de  $Ca^{2+}$  es más prominente próxima al potencial de

membrana basal (la activación del canal depende de un potencial más negativo) en las células musculares lisas de las arteriolas que de la arteria basilar. Además, la densidad de los canales es mayor en las primeras que en la segunda. Ambas observaciones explican que el tono basal de las arteriolas cerebrales dependa en mayor medida del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que el de las grandes arterias cerebrales (Takayasu et al., 1988; Takayasu y Dacey, 1989) y, por lo tanto, que las primeras contribuyan en mayor medida a la resistencia cerebrovascular (>50%) y al control del flujo sanguíneo cerebral (Seidel et al., 1991).

#### *b) Inervación perivascular y endotelio*

Además de su participación en el fenómeno de la contracción, existen otros procesos celulares que dependen de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y que intervienen decisivamente en el control de la función cerebroarterial: la liberación de neurotransmisores desde la inervación perivascular y la liberación de EDRF. Estos aspectos han sido investigados utilizando, entre otras aproximaciones experimentales, fármacos bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (BECa). Respecto al primero de estos procesos, se ha observado que la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica de los nervios perivasculares en arteria basilar de perro resultó inhibida por diltiazem (Fujiwara et al., 1982). Por lo que respecta a la liberación de EDRF, se ha demostrado que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  contribuye a la síntesis y liberación de NO tanto desde las terminaciones nerviosas como desde el endotelio en la arteria cerebral media de perro; sin embargo, nicardipina no inhibió ni la liberación de NO ni la relajación subsiguiente (Toda y Okamura, 1992). Resultados semejantes se han obtenido con otro fármaco BECa de tipo dihidropiridínico, nifedipina, en arterias cerebrales porcinas (Baik et al., 1988). Estos resultados sugieren que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células endoteliales son diferentes a los que se encuentran en las células musculares lisas. Además, la relajación producida por nitrendipina en arteria basilar porcina se debe a la liberación de NO, la cual, a su vez, depende del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de membrana (Günther et al., 1992).

### 1.3.2.- Influencia del $Mg^{2+}$ en la homeostasis del $Ca^{2+}$

Las evidencias experimentales directas e indirectas que sugieren que el  $Mg^{2+}$  actúa principalmente modulando la entrada, la unión y la translocación de  $Ca^{2+}$  en el músculo liso vascular son las siguientes:

#### a) *Influencia del $Ca^{2+}$ sobre la respuesta vascular inducida por la eliminación de $Mg^{2+}$*

La eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio de incubación produce un incremento inmediato de la tensión en varias preparaciones vasculares sometidas únicamente a la tensión basal, dicha respuesta quedó abolida cuando el medio carecía de  $Ca^{2+}$  o contenía algún fármaco BECa (verapamil), lo cual pone de manifiesto la dependencia de esta respuesta contráctil respecto del  $Ca^{2+}$  (Altura y Altura, 1974; Turlapaty et al., 1981).

Los resultados de algunas investigaciones parecen demostrar que la respuesta relajante (dependiente del endotelio) al reducir total o parcialmente la  $[Mg^{2+}]_e$  es también dependiente del  $Ca^{2+}$ . La respuesta relajante inducida por la eliminación de  $Mg^{2+}$  resultó progresivamente inhibida al incrementar la  $[Ca^{2+}]_e$ , mientras que la reducción de la  $[Ca^{2+}]_e$  inhibió la respuesta contráctil que se manifiesta en arterias desprovistas mecánicamente de endotelio (Ann y Ku, 1986; Ku y Ann, 1987; Gold et al., 1990). Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  ejercen acciones contrapuestas a dos niveles: sobre la activación/liberación de EDRF y sobre la contracción del músculo liso. En ambos casos el  $Ca^{2+}$  actuaría como un estimulante mientras que el  $Mg^{2+}$  actuaría como inhibidor.

#### b) *Efecto de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre las contracciones inducidas por el $Ca^{2+}$*

Está bien documentado que las variaciones de la  $[Mg^{2+}]_e$  afectan a la respuesta contráctil inducida por el  $Ca^{2+}$ . Diferentes estudios han demostrado que la presencia de  $Mg^{2+}$  disminuye la sensibilidad y aumenta la contractilidad de arteria aorta de conejo y rata frente al  $Ca^{2+}$  (Jurevics y Carrier, 1973; Altura y Altura, 1971; Turlapaty et al. 1981). Sin embargo,

en vena porta de rata ninguno de los dos parámetros se modificaron, indicando que el efecto del  $Mg^{2+}$  dependió del tejido investigado (Turlapaty et al. 1981).

*c) Influencia de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  sobre el contenido y el intercambio de  $Ca^{2+}$  en el músculo liso*

Distintos estudios apoyan que la  $[Mg^{2+}]_e$  también influye sobre el contenido y el intercambio de  $Ca^{2+}$  en el músculo liso vascular. Fueron Altura y Altura en 1971 los primeros investigadores en demostrar que la  $[Mg^{2+}]_e$  afectaba al contenido tisular de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ : la ausencia de  $Mg^{2+}$  produjo disminución del contenido tisular de  $Mg^{2+}$  del 40% y aumento del contenido tisular de  $Ca^{2+}$  del 15%. Otros autores han obtenido idénticos resultados (Goldstein y Zsotér, 1978; Turlapaty y Altura, 1978). Estudios más recientes confirman que la eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio extracelular produce un marcado incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  concomitantemente con la contracción de las células, y que dicho incremento se inhibe en ausencia de  $Ca^{2+}$ . Por el contrario, la elevación de la  $[Mg^{2+}]_e$  produce disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  aunque, en términos relativos, el efecto es menor que el de la eliminación de  $Mg^{2+}$  (Zhang et al., 1992b). Además, se ha demostrado la existencia del intercambio de  $Ca^{2+}$  por medio del transportador  $Na^+-Ca^{2+}$  en la membrana plasmática de las células musculares lisas vasculares, y la influencia del  $Mg^{2+}$  sobre dicho mecanismo de transporte (Smith et al., 1987; Altura et al., 1990).

*d) Influencia de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  sobre el contenido y el intercambio de  $Ca^{2+}$  en el endotelio*

Al igual como ocurre en el músculo liso vascular, el  $Mg^{2+}$  parece jugar un papel importante sobre el contenido y el intercambio de  $Ca^{2+}$  en el endotelio. Se ha sugerido que el mecanismo de "liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por el  $Ca^{2+}$ " interviene también en la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células endoteliales, y que el  $Mg^{2+}$  modula dicho mecanismo (Zhang et al., 1993). También se ha sugerido la existencia del intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$  y su modulación por el  $Mg^{2+}$  en células endoteliales de aorta de rata (Zhang et al., 1992a).

Las evidencias experimentales reseñadas indican claramente la influencia del  $Mg^{2+}$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ . Dicha influencia se lleva a cabo principalmente modulando el transporte de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana celular. No obstante, también parece claro que el  $Mg^{2+}$  afecta a la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares. En arterias femorales y coronarias de gato se ha observado que las contracciones producidas por prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y norepinefrina se redujeron en medio sin  $Ca^{2+}$ , y que dicha inhibición fue aún mayor si éste medio contenía una concentración de  $Mg^{2+}$  superior a la fisiológica (4.4 ó 13.2 mM). Estos resultados ponen de manifiesto la acción inhibitoria de la hipermagnesemia sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (Sjögren y Edvinsson, 1988).

Después de todo lo expuesto parece razonable admitir que el  $Mg^{2+}$  es un tipo especial de antagonista del  $Ca^{2+}$ , ya que, a diferencia de la mayoría de los BECa orgánicos, el  $Mg^{2+}$  actúa sobre canales de los tipos VOCs, ROCs y LOCs ("leak-operated  $Ca^{2+}$  channels", canales de  $Ca^{2+}$  operados por filtración o goteo) (Altura et al., 1987). Dicha actuación se manifiesta en las acciones descritas del  $Mg^{2+}$  sobre los vasos sanguíneos.



#### 1.4.- ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS Y TERAPÉUTICOS RELACIONADOS CON EL $Mg^{2+}$

Sin duda una de las aplicaciones del  $Mg^{2+}$  (en forma de sulfato magnésico) que más investigaciones ha suscitado es su posible utilidad en el tratamiento del síndrome de la preeclampsia-eclampsia.

##### 1.4.1.- Fisiopatología y patogénesis de la preeclampsia-eclampsia

La hipertensión complica casi el 10% de todos los embarazos. Según el consenso alcanzado por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos en 1972, se distinguen cuatro tipos: 1) hipertensión crónica; 2) preeclampsia-eclampsia; 3) preeclampsia superpuesta a hipertensión crónica; y 4) hipertensión transitoria.

La preeclampsia es una enfermedad específica de la gestación que se presenta después de la 20 semana de amenorrea y se caracteriza por el aumento de la presión arterial acompañado de proteinuria, edema o ambos. La preeclampsia es una enfermedad progresiva que puede llevar a una complicación convulsiva denominada *eclampsia*. Una convulsión es, por lo tanto, la línea divisoria entre la preeclampsia y la eclampsia, y puede producirse antes, durante o después del parto. El síndrome de preeclampsia-eclampsia es la principal causa de mortalidad y morbilidad asociadas al embarazo (National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy, 1990; Donaldson, 1994).

Desde el punto de vista fisiopatológico, la preeclampsia-eclampsia implica alteraciones en el funcionamiento de numerosos sistemas orgánicos: cardiovasculares (incremento de la post-carga cardíaca, hemoconcentración), hematológicas (trombocitopenia), renales (endoteliosis capilar glomerular), hepáticas (necrosis hemorrágica periportal, hematoma subcapsular), neurológicas (confusión, manifestaciones visuales, afasia, coma, cefalea, hiperreflexia, convulsiones, etc.) (Donaldson, 1994). Sin embargo, la situación básica de la preeclampsia es el vasoespasmo generalizado (National High Blood

Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy, 1990) (Figura 5).

El fenómeno de vasoespasmo afecta al cerebro (aumento de la resistencia vascular cerebral). En pacientes que sufrieron ataques eclámpicos, la realización de angiografías cerebrales y visualización mediante tomografía computerizada han puesto de manifiesto vasoconstricción cerebral generalizada (Will et al., 1987; Lewis et al., 1988), hemorragias intraventriculares e intraparenquimatosas, así como infartos en sustancia blanca (Gaitz y Bamford, 1982), edema difuso y aumento de la presión intracraneal (Kirby y Jaindl, 1984). Por otra parte, estudios *postmortem* en pacientes eclámpicas pueden revelar la existencia de algunas de las siguientes anomalías: 1) zonas de hemorragias petequiales en el córtex; 2) múltiples áreas no hemorrágicas reblandecidas; 3) pequeñas áreas hemorrágicas en la sustancia blanca; 4) una única hemorragia de gran extensión en sustancia blanca; y 5) hemorragia en los ganglios basales o en el puente, a menudo con rupturas dentro de los ventrículos (Sheehan y Lynch, 1973). La patología cerebral es responsable del 30-60% de la mortalidad eclámpica.

Una cuestión intensamente debatida y de gran alcance es la patogénesis de las lesiones cerebrales eclámpicas. La controversia se centra en la validez de cada una de las dos hipótesis siguientes: "hipótesis de la vasoconstricción primaria" e "hipótesis de la encefalopatía hipertensiva". Según la primera de estas hipótesis la vasoconstricción cerebral sería responsable de hipoperfusión cerebral y, por tanto, de isquemia e infarto cerebral. Según la segunda hipótesis, la vasoconstricción cerebral sería el resultado del mecanismo de la autorregulación, según el cual las arterias cerebrales reaccionan contrayéndose frente a los aumentos de la presión arterial con el fin de mantener la constancia de la perfusión tisular. Si la presión arterial rebasa el límite superior de autorregulación, se produce hiperemia regional, hemorragia y edema cerebral (Donaldson, 1988, 1994). Resulta del máximo interés determinar cuál de las dos hipótesis es la que mejor explica la patogénesis de las lesiones cerebrales eclámpicas, ya que de ello dependerá el tipo de fármaco más idóneo para su prevención y tratamiento. Según la "hipótesis de la vasoconstricción cerebral primaria", el mejor anticonvulsivo/cerebroprotector será aquel que evite o elimine el

vasoespasmo cerebral. Según la "hipótesis de la encefalopatía hipertensiva", el mejor anticonvulsivo/cerebroprotector será el mejor antihipertensor. Hay que hacer notar que ambas aproximaciones son contrapuestas ya que, si se administra un vasodilatador cerebral sin que se reduzca la presión arterial, se atenúa la vasoconstricción cerebral autorreguladora y por tanto el sistema de protección que ella supone para el cerebro (Thulin et al., 1993). De este modo, la vasodilatación cerebral podría ser contraproducente, e incluso fatal, en el tratamiento de la preeclampsia-eclampsia (Donaldson, 1994).

Evidencias experimentales acumuladas en los últimos años sugieren que la preeclampsia-eclampsia tiene su origen en la disfunción de las células endoteliales (Roberts et al., 1989). Esta disfunción endotelial explicaría algunos hallazgos relevantes que se producen en la preeclampsia-eclampsia: 1) disminución de la producción de prostaciclina (vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetar) y aumento de la producción de tromboxano A<sub>2</sub> (vasoconstrictor y pro-agregante plaquetario) (McGiff y Carroll, 1994); 2) cambios en el sistema hemostático tales como aumento de fibronectina, disminución de antitrombina III y disminución de  $\alpha_2$ -antiplasmina (Saleh et al., 1987); 3) incremento de los niveles plasmáticos del péptido vasoconstrictor de origen endotelial, endotelina-1 (Taylor et al., 1990; Mastrogiannis et al., 1991; Nova et al., 1991; Schiff et al., 1992); y 4) aumento de la sensibilidad vascular frente a factores presores endógenos (Roberts et al., 1989). Todas estas alteraciones cooperarían para producir los fenómenos de vasoconstricción, coagulación y redistribución intravascular de fluidos que finalmente dan lugar al síndrome clínico de preeclampsia-eclampsia (Figura 6). Por lo tanto, estas evidencias apoyan la "hipótesis de la vasoconstricción primaria" para explicar la patogénesis de la preeclampsia-eclampsia y sugieren que la supresión del vasoespasmo es la principal estrategia terapéutica en este desorden.

#### **1.4.2.- Mg<sup>2+</sup> en la prevención y tratamiento de la preeclampsia-eclampsia**

Al igual que el origen de esta patología, la utilidad terapéutica del sulfato magnésico es objeto de intensa controversia en la actualidad. En los Estados Unidos de América la administración parenteral de sulfato magnésico es la opción más utilizada por los

obstetras para la prevención y tratamiento de las convulsiones eclámpticas (Catanzarite et al., 1991). La revisión de la literatura obstétrica en los Estados Unidos durante las últimas seis décadas indica que el sulfato magnésico satisface todos los criterios del anticonvulsivo ideal: 1) es rápidamente eficaz; 2) la duración del efecto es predecible y fiable; 3) posee un amplio margen de seguridad y no es depresor ni tóxico para la madre y el feto; 4) su administración y monitorización en la clínica es muy simple; y 5) los médicos y enfermeras de las unidades obstétricas están familiarizados con su farmacocinética y farmacodinámica (Dinsdale, 1988; Pritchard, 1989; Sibai, 1990). Por el contrario, los detractores del sulfato magnésico (principalmente neurólogos) aducen que: 1) no es ni antihipertensor ni anticonvulsivo; 2) su uso es empírico ya que no se conoce su mecanismo de acción; 3) incrementa el riesgo tanto de la madre como del feto (Kaplan et al., 1988; Donaldson, 1988). Lo cierto es que, aunque a los detractores no les falta parte de razón en sus argumentaciones, el sulfato magnésico "funciona". Como apunta Sibai (1990): *"...su uso empírico sin compararlo con otros anticonvulsivos en un ensayo clínico no menoscaba su eficacia clínica, como se desprende de su repercusión favorable en el embarazo descrita en amplios estudios..."*. De hecho, el 95% de las pacientes eclámpticas en los Estados Unidos son tratadas por obstetras, y es por tanto al Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos a quien corresponde establecer las pautas en la prevención y tratamiento de la preeclampsia-eclampsia. El sulfato magnésico es una de dichas pautas, y por tanto prescindir de su uso puede acarrear problemas de tipo legal al terapeuta (Lindheimer, 1989).

Posiblemente, el fenómeno clave que podría explicar los efectos beneficiosos del sulfato magnésico en la preeclampsia-eclampsia sería la capacidad del  $Mg^{2+}$  para influir sobre la fisiología vascular a través de su relación de antagonismo con el  $Ca^{2+}$ . Esta hipótesis, sustentada por las evidencias experimentales que se han descrito detalladamente en los epígrafes precedentes, permite predecir que el  $Mg^{2+}$  podría actuar como un antagonista del  $Ca^{2+}$  atenuando el vasoespasmo cerebral implicado en la patogénesis de la eclampsia (Zaret, 1983; Sadeh, 1989).

## 1.5.- Mg<sup>2+</sup> Y CIRCULACIÓN CEREBRAL

El primer estudio del que tenemos conocimiento acerca de la influencia del Mg<sup>2+</sup> sobre la circulación cerebral fue llevado a cabo por Kapp y colaboradores en 1970. Midiendo el calibre de la arteria basilar de gato, estos autores observaron que la infusión intravenosa de sulfato magnésico era capaz de revertir parcialmente el espasmo de dicha arteria producido por la exposición previa a sangre autóloga. Este supuso el primer estudio acerca de la posible utilidad del sulfato magnésico en el tratamiento del vasoespasma cerebral secundario a hemorragia subaracnoidea (HSA). Muchos años después se ha confirmado este potencial terapéutico en investigaciones en las que se han utilizado otros modelos de HSA, como el utilizado por Ram y colaboradores en ratas, en las cuales la inyección intravenosa o la aplicación tópica de sulfato magnésico dilató la arteria basilar previamente contraída por inducción de HSA (Ram et al., 1991). Entre estos dos estudios (realizados ambos *in situ* midiendo el calibre de la arteria basilar), varios han sido los trabajos publicados en los que se ha constatado la capacidad del Mg<sup>2+</sup> para inhibir la contracción de las arterias cerebrales frente a diferentes sustancias (Allen et al., 1976; Sjögren y Edvinsson, 1986, 1988; Faragó et al., 1991; Huang et al., 1990a,b).

Otro de los aspectos investigados ha sido la influencia del Mg<sup>2+</sup> sobre el tono vascular cerebral. Fueron Altura y Altura (1980) los primeros investigadores en observar que la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> afectaba el tono basal de las arterias cerebrales aisladas (basilar y media) de perro: mientras que la disminución de la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> incrementó la tensión basal, el aumento de la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> la disminuyó. Esta relación inversa entre la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> y el tono vascular se confirmó posteriormente en estudios *in situ* en los que se observó que el incremento de la concentración de Mg<sup>2+</sup> en el líquido cefalorraquídeo produjo incremento del calibre de las arterias piales de gato (vasodilatación), mientras que la reducción de la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> produjo reducción del calibre arteriolar (vasoconstricción) (Seelig et al., 1983). Resultados similares se han obtenido posteriormente al aplicar una metodología semejante para el estudio de la circulación cortical de rata (Altura et al., 1987).

La influencia de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre el tono cerebroarterial ha sido investigada también en segmentos de arterias cerebrales sometidos a tono activo, es decir, contraídos previamente con algún agente vasoconstrictor. Esta cuestión se ha abordado siguiendo dos protocolos experimentales diferentes: incrementando o reduciendo la  $[Mg^{2+}]_e$  dentro del rango fisiológico, y añadiendo  $Mg^{2+}$  acumulativamente hasta obtener una respuesta máxima. En cuanto al primero de estos protocolos, se ha observado que la reducción de la  $[Mg^{2+}]_e$  produjo relajación mantenida de los segmentos de arteria cerebral media de gato y piales humanas precontraídos con norepinefrina, mientras que la reposición de la  $[Mg^{2+}]_e$  produjo contracción recuperándose el tono basal control (Szabó et al., 1991b; Szabó et al., 1992c). En cuanto al segundo de los protocolos, se ha constatado que la adición acumulativa de  $Mg^{2+}$  produjo relajaciones de magnitud dependiente de la concentración en segmentos de arteria cerebral media de gato precontraídos con KCl o prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Sjögren y Edvinsson, 1986), y en segmentos de arteria cerebral media de perro contraídos con el análogo del tromboxano  $A_2$ , U46619 (Belfort et al., 1994).

La revisión de la literatura pone de manifiesto la escasez de estudios en los que se registra el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre el flujo sanguíneo cerebral, y además la carencia es absoluta en cuanto al registro continuo de dicho parámetro en animales, anestesiados o conscientes. Utilizando el método autorradiográfico para la medición del flujo sanguíneo cerebral local, se ha puesto de manifiesto que la infusión intravenosa de sulfato magnésico no modificó la hipoperfusión tardía subsiguiente a un período de isquemia cerebral global en ratas (Grøgaard et al., 1988). Por el contrario, en ratas sometidas a isquemia focal por ligadura de la arteria cerebral media, la infusión de sulfato magnésico incrementó el flujo sanguíneo en el área isquémica (Chi et al., 1990). En cuanto a las investigaciones realizadas en humanos, se ha evidenciado que el sulfato magnésico redujo el "índice de pulsatilidad" en la arteria cerebral media de pacientes preeclámpticas, lo cual es indicativo de dilatación de los vasos de pequeño calibre distales a la arteria cerebral media (Belfort y Moise, 1992).



## ***2.- OBJETIVOS***

La presente Tesis Doctoral se ha diseñado con el fin de contribuir al conocimiento de la influencia del  $Mg^{2+}$  en el lecho vascular cerebral, teniendo como referencia fundamental la hipotética relación de antagonismo del  $Mg^{2+}$  sobre el  $Ca^{2+}$  en este lecho vascular. Para ello se ha desarrollado un plan de trabajo experimental utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*, cuyos objetivos concretos se detallan a continuación:

#### ESTUDIOS *IN VITRO*

- 1.- Determinar la influencia de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  sobre el tono de la arteria cerebral media aislada de cabra.
- 2.- Analizar el efecto relajante de  $Mg^{2+}$  sobre arterias aisladas en función de la especie, el agente inductor del tono activo y el tipo de arteria.
- 3.- Investigar la posible influencia de factores derivados del endotelio en la respuesta relajante de la arteria cerebral media aislada de cabra frente a  $Mg^{2+}$
- 4.- Estudiar el efecto de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a vasoconstrictores:  $Ca^{2+}$ , endotelina-1, 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y prostaglandina  $F_{2\alpha}$ .

#### ESTUDIOS *IN VIVO*

- 5.- Determinar la influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de  $Mg^{2+}$  al cerebro.
- 6.- Registrar el efecto del sulfato magnésico sobre el flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos en la cabra sin anestésicar.
- 7.- Examinar el efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina.



### ***3.- MATERIAL Y MÉTODOS***

La experimentación se llevó a cabo siguiendo la normativa vigente en España por REAL DECRETO 223/1988, de 14 de marzo, *sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos*.

### **3.1.- MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*: REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR ARTERIAS AISLADAS**

#### **3.1.1.- Preparación experimental**

Los experimentos se realizan con segmentos cilíndricos de arteria cerebral media de cabra, ramas de arteria cerebral media de humanos y arteria basilar y carótida de conejo. Los animales se sacrifican mediante inyección, en la vena yugular (cabra) y en una vena marginal de la oreja (conejo), de una mezcla de 1 g de tiopental sódico (Pentotal sódico, Abbot) y 40 mEq de cloruro potásico, que produce la muerte del animal por parada cardíaca como consecuencia de la despolarización miocárdica en un estado de anestesia general. El cráneo se expone mediante una incisión circular a nivel de la base de los cuernos (cabra) y de las orejas (conejos), realizándose a continuación una craniotomía circular con una sierra eléctrica siguiendo dicha incisión. Una vez descubierto el encéfalo, el cerebro se separa del resto del eje nervioso tras haber retirado la duramadre y seccionado las vías aferentes y eferentes, nerviosas y hemáticas. Inmediatamente se sumerge el cerebro en solución salina fisiológica fría (4°C). Las dos arterias cerebrales medias de cabra y la basilar de conejo se diseccionan cuidadosamente bajo lupa binocular (WILD, Heerbrugg) a 6.4 aumentos, eliminando todos los restos de sangre de su interior y se cortan en segmentos cilíndricos de 4 mm de longitud. Después de haber extraído el cerebro del conejo se sitúa al animal en decúbito supino, se le practica una incisión a nivel de la tráquea y por disección roma se disecciona con sumo cuidado la arteria carótida, obteniéndose segmentos de 4 mm de longitud. Las ramas de arteria cerebral media humana se obtuvieron *post-mortem* de 7 hombres y 3 mujeres (durante autopsia) un máximo de 7 h después de la muerte. El rango de edad fue entre 30-70 años y las causas de la muerte fueron: paro cardíaco (3 casos), traumatismo torácico (2 casos), edema pulmonar (1 caso), asfixia (1 caso) y otros (3 casos).

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales se introducen dos alambres de acero inoxidable, de diámetro adecuado a cada tipo de arteria, a través de la luz vascular. Uno de ellos está unido a un soporte fijo que mantiene el segmento arterial en posición horizontal. El otro alambre, en forma de "L", se introduce por su lado más corto en la luz vascular, sujetándose por su lado más largo a un transductor de tensión. Por lo tanto, este último alambre puede traccionar verticalmente en sentido perpendicular al eje mayor del segmento vascular en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la pared arterial. El tiempo máximo empleado en el montaje de la preparación es aproximadamente de 30 minutos.

Cada segmento arterial se aloja en un baño de órganos que contiene 5 ml de solución Ringer-Locke burbujeadada continuamente con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub> (95%) y CO<sub>2</sub> (5%) que le confiere un pH de 7.3-7.4. Un circuito de agua caliente que rodea exteriormente a las cubetas mantiene una temperatura constante en el líquido nutritivo de 37°C. Además, se dispone de una reserva de solución Ringer-Locke, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en el que se hallan inmersas las arterias (Figura 7).

### **3.1.2.- Técnicas de registro y medición**

El sistema de registro consta, para cada segmento arterial, de un transductor de tensión isométrica ("Universal Transducing Cell" UC3, Gould Statham), una microescala accesoria (UL5, Gould Statham), un tornillo micrométrico ("Micrometer Boss Head", Bioscience) adaptado al transductor que permite desplazar el conjunto transductor-alambre móvil, y un amplificador de tensión (Hewlett-Packard 8805C). La tensión isométrica se registra continuamente en cuatro registradores (Omniscribe, Houston D 5237-5) de dos canales cada uno.

Los cambios de tensión isométrica producidos por fármacos que incrementan la tensión vascular se cuantifican midiendo sobre el trazado la longitud desde la línea basal de tensión hasta el efecto máximo desarrollado por cada una de las dosis. Esta distancia se multiplica por el factor de calibración determinado por el sistema de amplificación, lo cual

permite la conversión de unidades de longitud (mm) en unidades de tensión (mg). Las cantidades obtenidas pueden expresarse en términos absolutos (mg) o relativos, es decir, porcentualmente, bien respecto del efecto máximo obtenido al final de la curva concentración-respuesta, o bien respecto del efecto producido por un estímulo aplicado con anterioridad (KCl 50 mM).

### **3.1.3.- Procedimiento experimental**

Mediante la rotación del tornillo micrométrico se aplica una tensión pasiva a los segmentos arteriales de 0.5, 1 ó 2 g, según se trate de arteria basilar, cerebral media o carótida, respectivamente. Dado que la respuesta inmediata de los mismos es la de relajarse, la tensión debe de reajustarse periódicamente hasta que se alcance el equilibrio, lo cual sucede entre los 60 y los 90 minutos desde el momento del primer ajuste. Durante este periodo el líquido nutritivo se renueva cada 20 minutos aproximadamente. Para examinar la capacidad contráctil de los segmentos arteriales, estos se exponen a una solución despolarizante de KCl (50 mM).

Una vez se ha alcanzado la tensión basal constante, se obtienen las curvas concentración-respuesta acumulativamente, de forma que la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una dosis es la resultante de la suma de esta última con las concentraciones administradas anteriormente. Una concentración se añade cuando la inmediatamente anterior ha desarrollado su efecto máximo. El volumen total de un fármaco añadido a un baño no supera en ningún caso el 10% del volumen del líquido del baño. Después de cada curva se renueva repetidamente la solución nutritiva, dejando transcurrir 45-60 minutos antes de obtener una nueva curva concentración-respuesta.

### 3.1.4.- Protocolos experimentales

#### a) *Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre el tono de la arteria cerebral media aislada de cabra*

La influencia de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre el tono de las arterias cerebrales de cabra se determinó en segmentos arteriales sometidos al tono basal de 1 g y en segmentos arteriales sometidos a tono activo inducido por prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M), endotelina-1 ( $10^{-9}$  M) o KCl (50 mM). En el primero de estos protocolos se procedió de la siguiente forma: una vez estabilizado el tono pasivo o basal de 1 g, el medio de incubación conteniendo la concentración normal de 1 mM  $Mg^{2+}$  se sustituyó secuencialmente por medios con concentración de  $Mg^{2+}$  progresivamente menor (0.3, 0.1 y 0 mM) y mayor (0.1, 0.3, 1 y 10 mM). En el segundo de los protocolos se procedió en primer lugar precontrayendo los segmentos arteriales con cada uno de los agentes vasoconstrictores mencionados; una vez alcanzado el nivel de tensión estable (tono activo) se sustituyó secuencialmente el medio de incubación normal (1 mM  $Mg^{2+}$ ) por medios de incubación con concentración de  $Mg^{2+}$  progresivamente menor (0.6, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 mM) conteniendo cada uno de ellos la misma concentración del agente inductor del tono activo empleada al principio del experimento. Con el fin de establecer los correspondientes controles, en experimentos realizados en paralelo se siguió el mismo procedimiento pero utilizando en todos y cada uno de los cambios el medio con la concentración fisiológica (1 mM) de  $Mg^{2+}$ .

#### b) *Efecto relajante de $Mg^{2+}$ sobre arterias aisladas en función de la especie, el agente inductor del tono activo y el tipo de arteria*

El efecto relajante de  $Mg^{2+}$  sobre arterias aisladas se analizó en segmentos de arteria cerebral media de cabra y de arterias basilar y carótida de conejo sometidos al tono basal de 1, 0.5 y 2 g, respectivamente y en segmentos de arteria cerebral media de cabra, de arterias basilar y carótida de conejo y en segmentos de ramas de arteria cerebral media de humanos sometidos a tono activo inducido por distintos agentes vasoconstrictores. Los agentes inductores del tono activo utilizados para los segmentos arteriales de cabra fueron:

5-hidroxitriptamina ( $10^{-5}$  M), endotelina-1 ( $10^{-9}$  M), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) o KCl (50 mM). En el caso de los segmentos arteriales de conejo el agente vasoconstrictor utilizado fue endotelina-1 ( $10^{-8}$  M) y para los segmentos arteriales de humanos fueron 5-hidroxitriptamina ( $10^{-5}$  M), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) o KCl (50 mM). En todos los casos se obtuvieron curvas concentración-respuesta añadiendo de forma acumulativa  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) en medio carente de  $Mg^{2+}$ .

*c) Influencia de factores derivados del endotelio en la respuesta relajante de la arteria cerebral media aislada de cabra frente a  $Mg^{2+}$*

La posible influencia de factores relajantes derivados del endotelio en la respuesta relajante de las arterias cerebrales de cabra frente a  $Mg^{2+}$  se investigó en segmentos arteriales sometidos a tono activo inducido por prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M), para lo cual se siguieron dos protocolos experimentales distintos: reduciendo la concentración de  $Mg^{2+}$  y añadiendo  $Mg^{2+}$  acumulativamente. En el primero de estos protocolos, y una vez alcanzado el nivel de tensión estable (tono activo), se procedió a sustituir secuencialmente el medio de incubación normal (1 mM  $Mg^{2+}$ ) por medios de incubación con concentración de  $Mg^{2+}$  progresivamente menor (0.6, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 mM) conteniendo cada uno de ellos la misma concentración de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . Este protocolo se siguió durante los siguientes tratamientos: eliminación mecánica del endotelio (legrado) e incubación con  $N^G$ -nitro-L-arginina ( $10^{-5}$  M). La eliminación mecánica del endotelio se realizó introduciendo una varilla de acero inoxidable con la superficie ligeramente abrasiva por la luz arterial. En el segundo protocolo se obtuvieron curvas concentración-respuesta de  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) en segmentos arteriales precontraídos durante los siguientes tratamientos: incubación con indometacina ( $10^{-6}$  ó  $10^{-5}$  M), incubación con  $N^G$ -nitro-L-arginina ( $10^{-5}$  ó  $10^{-4}$  M) y eliminación mecánica del endotelio.

d) *Efecto de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a vasoconstrictores:  $Ca^{2+}$ , endotelina-1, 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y prostaglandina  $F_{2\alpha}$*

El efecto de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre la respuesta de la arteria cerebral media de cabra frente a  $Ca^{2+}$ , se estudió con la obtención de curvas concentración-respuesta de  $Ca^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M) en medio despolarizante (KCl 50 mM) libre de  $Ca^{2+}$  conteniendo concentraciones variables de  $Mg^{2+}$  (0, 0.1, 1 y 10 mM). Para ello, y tras alcanzar el tono estable de 1 g, se procedió a lavados repetidos cada 15 min de las preparaciones con solución libre de  $Ca^{2+}$  conteniendo KCl 50 mM hasta que no apareciera respuesta contráctil alguna. En esas condiciones se adicionaron las distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$  y se procedió a la obtención de las curvas concentración-respuesta de  $CaCl_2$ .

El efecto de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre la respuesta de la arteria cerebral media de cabra frente a endotelina-1 ( $10^{-11}$ - $3 \times 10^{-8}$  M), 5-hidroxitriptamina ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) y norepinefrina ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-4}$  M) se estudió añadiendo dosis acumulativas de cada uno de los vasoconstrictores al baño de órganos conteniendo 0 (medio libre de  $Mg^{2+}$ ), 0.1, 1 (control) y 10 mM  $Mg^{2+}$ . Los segmentos arteriales fueron incubados durante 30 min (dos cambios de 15 min) en el medio libre de  $Mg^{2+}$ , y las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mM de  $Mg^{2+}$  fueron añadidas 15 min antes de la exposición a cada uno de los tres vasoconstrictores. Del mismo modo se procedió para estudiar el efecto de la  $[Mg^{2+}]_e$  sobre la respuesta de las arterias cerebrales humanas frente a 5-hidroxitriptamina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) y prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-7}$ - $3 \times 10^{-5}$  M). Se obtuvo una primera curva concentración-respuesta para cada segmento arterial frente a 5-hidroxitriptamina y prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , tanto en arterias no tratadas (para valorar posibles cambios en la respuesta a estos fármacos, y para servir como controles) como en arterias tratadas.

### 3.1.5.- Fármacos y soluciones

La solución nutritiva de Ringer-Locke tiene la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 2.2, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 25 y glucosa 5.6. Se preparó una solución concentrada (20x) de cloruros, y se diluyó en el momento de su uso, añadiendo el NaHCO<sub>3</sub> y la glucosa. Tras el burbujeo con la solución de carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) el pH se mantuvo en 7.3-7.4. La solución despolarizante de KCl (50 mM) se preparó de igual forma que la solución nutritiva de Ringer-Locke pero sustituyendo parte del NaCl por una cantidad equimolar de KCl. Las soluciones conteniendo cada una de las concentraciones de Mg<sup>2+</sup> se prepararon añadiendo las concentraciones correspondientes de MgCl<sub>2</sub> (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) o de MgSO<sub>4</sub> (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) a la solución de Ringer-Locke libre de Mg<sup>2+</sup>. El medio sin Ca<sup>2+</sup> se preparó omitiendo el CaCl<sub>2</sub> de la solución de Ringer-Locke, y del mismo modo la solución despolarizante (KCl 50 mM) libre de Ca<sup>2+</sup>.

La prostaglandina F<sub>2α</sub> (Sigma) se disolvió (10<sup>-2</sup> M) en etanol y se diluyó en solución salina. La endotelina-1 (Peptide Institute Inc.) se disolvió (10<sup>-4</sup> M) en agua bidestilada y se diluyó en PBS (tampón fosfato, NaCl 150 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM) con seroalbumina (grado V, Sigma) al 0.05%. La 5-hidroxitriptamina (Sigma), la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (Peptide Institute Inc.) y la norepinefrina (L-arterenol bitartrato, Sigma) se disolvieron (10<sup>-2</sup> M) y diluyeron en solución salina. La indometacina (Sigma) se disolvió (10<sup>-4</sup> M) en etanol y se diluyó en solución NaHCO<sub>3</sub> al 3%.

### 3.1.6.- Análisis de los resultados

La respuesta bifásica resultante de la reducción de la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> se expresó del siguiente modo: el componente fásico como porcentaje del tono activo inmediatamente anterior al cambio del medio de incubación, y el componente tónico como porcentaje del tono activo alcanzado al principio del experimento. La respuesta relajante de Mg<sup>2+</sup> se expresó como porcentaje del tono activo inducido previamente. La respuesta contráctil a Ca<sup>2+</sup>, endotelina-1 y a norepinefrina se expresó porcentualmente respecto de la contracción provocada previamente por la solución despolarizante de KCl 50 mM. La respuesta contráctil a



5-hidroxitriptamina y a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  se expresó como porcentaje del efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) obtenido en la correspondiente curva control.

Cada curva concentración-respuesta se repitió en segmentos arteriales procedentes de animales diferentes. Los resultados se agruparon posteriormente por experimentos, y a partir de los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones se calculó la media aritmética, la desviación típica y el error estándar de la media (EEM). Con estos resultados se construyeron las curvas concentración-respuesta medias de los diferentes fármacos. Además, para cada curva concentración-respuesta se calculó la  $CE_{50}$ , es decir, aquella concentración del fármaco que produce la mitad del efecto máximo. Para ello se halla la mitad del efecto máximo y las concentraciones que lo acotan. A continuación se calcula la concentración que corresponde a la mitad del efecto máximo mediante una proporción entre el efecto y el logaritmo de la concentración. Para calcular el valor medio de la  $CE_{50}$  y sus intervalos de confianza al 95%, se calcula la media y el intervalo de confianza de los valores  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) ya que se ajustan a una distribución normal. La posterior conversión aplicando antilogaritmos proporciona la media geométrica y los intervalos de confianza de la  $CE_{50}$ .

La comparación estadística entre los distintos grupos, tanto en los datos relativos al tono vascular como en los valores de  $CE_{50}$  y  $E_{m\acute{a}x}$ , se realizó con un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas si  $p < 0.05$ .

### 3.2.- MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

#### 3.2.1.- Consideraciones anatómicas y fisiológicas acerca del lecho vascular cerebral de la cabra

La cabra es el animal de elección en nuestras investigaciones por las especiales disposiciones anatómicas y características fisiológicas de su circulación cerebral (Anderson y Jewell, 1956; Baldwin y Bell, 1963), que permiten medir el flujo sanguíneo de un hemisferio cerebral sin contaminación por flujo sanguíneo extracerebral.

La arteria maxilar interna, rama de la carótida externa, proporciona el flujo sanguíneo total para cada hemisferio cerebral a través de la *rete mirabile*, compacta red de arterias que se anastomosan entre sí y que se sitúa en el seno cavernoso a ambos lados de la hipófisis. Este aporte sanguíneo procedente de la arteria maxilar interna llega a la *rete mirabile* a través de dos ramas principales: el ramo anastomótico, que se une a la *rete mirabile* en sus porciones lateral y posterior, y la arteria anastomótica, que se une a la *rete mirabile* en su posición anterior. Las arterias oftálmica, etmoidal y buccinadora tienen su origen distalmente a la arteria anastomótica, mientras que la arteria dental lo tiene proximalmente; todas ellas constituyen la fuente principal del flujo sanguíneo extracerebral aportado por la arteria maxilar interna. En la cabra las arterias vertebrales no contribuyen al aporte sanguíneo cerebral puesto que no comunican con la arteria basilar. Además, no existen carótidas internas extracraneales, quedando sólo vestigios de las mismas que comunican la *rete mirabile* con el polígono de Willis. Este polígono se diferencia del humano en que la sangre que circula por la arteria basilar fluye en dirección caudal. Todas estas particularidades anatómicas se han confirmado mediante el modelado del árbol vascular de la cabeza de la cabra con un polímero acrílico y mediante arteriografías (Daniel et al., 1953; Reimann et al., 1972) (Figura 8).

Aunque anatómicamente la *rete mirabile* representa un alto grado de comunicación entre ambos hemisferios, en condiciones normales, sin embargo, la sangre no atraviesa de un lado a otro, y sólo tras la oclusión de la arteria maxilar interna de un lado la sangre se

distribuye por ambos hemisferios cerebrales. Este hecho se ha demostrado mediante la inyección de macroagregados de albúmina marcada radiactivamente en la arteria maxilar interna: en condiciones normales el isótopo se distribuye exclusivamente por el hemisferio correspondiente al lado donde se ha efectuado la inyección; tras la oclusión de la arteria maxilar interna contralateral el isótopo aparece en ambos hemisferios (Reimann et al., 1972).

### **3.2.2.- Técnica quirúrgica: preparación vascular para la medición del flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos.**

La técnica quirúrgica que se describe a continuación tiene por objeto la eliminación del flujo sanguíneo que, circulando por la arteria maxilar interna, va a irrigar tejidos extracerebrales. De este modo, el flujo sanguíneo en la arteria maxilar interna coincide con el flujo sanguíneo del correspondiente hemisferio cerebral, y por tanto un transductor electromagnético de flujo implantado en dicha arteria mide en realidad el flujo sanguíneo del hemisferio ipsilateral (Reimann et al., 1972) (Figura 8).

Las intervenciones se realizan en condiciones estériles y con el animal en ayunas. Previa sedación con Ketolar (clorhidrato de ketamina, Parke Davis) a dosis de 10 mg/kg intramuscular, se canaliza la vena safena y se induce la anestesia administrando lentamente una solución de tiopental sódico al 2% (pentotal sódico, Abbot). Tras la intubación traqueal y gástrica se mantiene la ventilación asistida con un respirador (Themel) que suministra una mezcla de halotano (Fluothane, ICI) al 1.5% en una mezcla de 20% O<sub>2</sub> y 80 % N<sub>2</sub>O. Los parámetros ventilatorios son: frecuencia respiratoria 18 ciclos/min, volumen ventilatorio 6-8 litros/min y presión de insuflación 20-30 cm H<sub>2</sub>O.

La exposición de la arteria maxilar interna se lleva a cabo mediante una incisión a lo largo del ramo mandibular izquierdo y posterior separación por disección roma de la glándula parótida. A continuación se procede a la desinserción parcial del músculo masetero y la resección de la pequeña parte de la mandíbula que cubre la arteria maxilar interna en la zona de origen del ramo anastomótico y de la arteria dental. El nervio facial, que cruza el campo operatorio, se respeta en todos los casos. Una vez expuesta la arteria maxilar interna

se efectúa una ligadura distalmente al origen del ramo anastomótico y otra en la arteria dental. Sin embargo, esta maniobra no es suficiente para eliminar el flujo sanguíneo extracerebral que pasa por las arterias oftálmica, etmoidal y buccinadora, las cuales reciben de nuevo su aporte sanguíneo como consecuencia del flujo retrógrado que, procedente de la *rete mirabile* se establece a través de la arteria anastomótica debido a la caída de presión en la arteria maxilar interna después de la ligadura. Dado que por su situación anatómica estas arterias no pueden ser expuestas quirúrgicamente, se inyectan 1000 unidades N.I.H. (National Institute of Health) de trombina (Sigma) disueltas en 1.5 ml de solución salina fisiológica en la arteria maxilar interna en sentido craneal, inmediatamente distal a la ligadura realizada previamente. Así se produce una obliteración inmediata de estos vasos que priva al ojo de su irrigación normal, con lo cual aparece una ceguera secundaria. No obstante, la circulación colateral parece ser suficiente para evitar la necrosis de las partes blandas de la cara. El flujo sanguíneo extracerebral eliminado representa el 30-50% del flujo sanguíneo total que circula por la arteria maxilar interna (Reimann et al., 1972). En estas condiciones, prácticamente todo el flujo sanguíneo de la arteria maxilar interna se destina al cerebro, tal y como ha sido confirmado inyectando microesferas marcadas en esta arteria y analizando posteriormente la distribución de la radiactividad en los tejidos extracerebrales e intracerebrales. Si se tiene en cuenta que el flujo sanguíneo extracerebral representa el 23% del flujo sanguíneo total tras la ligadura de la arteria maxilar interna (Edelman et al., 1972), la importancia de la trombosis de los vasos extracerebrales resulta evidente.

Tras la eliminación del flujo sanguíneo extracerebral se implanta un transductor electromagnético de flujo, previamente calibrado, en la arteria maxilar interna, inmediatamente antes del origen del ramo anastomótico. Para que la medición posterior del flujo sanguíneo cerebral sea correcta hay que constatar que el vaso sanguíneo es normal, a continuación dejar la superficie exterior del vaso limpia y uniforme, y por último asegurarse de que el vaso está ajustado al transductor en todo momento (Wyatt, 1984). Algunos estudios en los que se ha empleado una preparación similar han mostrado una gran correlación entre el flujo sanguíneo cerebral registrado por el método de la fluximetría y mediante la técnica de las microesferas radiactivas (Chapman et al., 1979).

Para la determinación del flujo cero, se coloca un ocluser mecánico de vasos alrededor de la arteria carótida externa y proximalmente a la arteria temporal. El ocluser consiste básicamente en un hilo de nilón en forma de lazo que rodea a la arteria sobre una superficie de silicona. A su vez, este hilo se halla enfundado en todo su trayecto excepto en la zona de contacto con la arteria, para que su desplazamiento no irrite la zona intervenida. Los extremos del hilo van unidos a una pieza tope con la cual se pueden modificar las dimensiones del lazo y, por tanto, de la arteria, pudiéndose llegar hasta la completa oclusión de la misma. La inyección o infusión de fármacos directamente en la circulación cerebral se realiza a través de un catéter de polietileno introducido en la arteria temporal.

Los terminales del transductor de flujo, del catéter y del ocluser se dirigen subcutáneamente y se fijan a la base del cuerno, quedando así dispuestos para llevar a cabo los experimentos en el animal despierto. La sutura se realiza por planos según la técnica habitual, procediendo a continuación a la aplicación tópica de un antiséptico para evitar la infección de la herida. Para el registro de la presión arterial sistémica y toma de muestras de sangre, se introduce un catéter en la arteria femoral. El terminal de este catéter se lleva a través de un tunel subcutáneo y se fija en la parte posterior de la pata con puntos de seda. De la misma forma se introduce un catéter en la vena femoral para la infusión de fármacos vía intravenosa. Como medida preventiva, después de la intervención se le administran al animal 1.200.000 unidades de penicilina por vía intramuscular.

### **3.2.3.- Procedimiento experimental: medición del flujo sanguíneo cerebral en la cabra sin anestesiarse**

Los experimentos se realizan en el animal despierto, totalmente recuperado de la intervención quirúrgica, con parámetros cardiorrespiratorios estables y colocado en una plataforma portátil especialmente diseñada para que pueda adoptar su posición estática natural. Dicha plataforma va provista de una plancha de metacrilato que se adapta a modo de yugo alrededor del cuello del animal, impidiéndole el movimiento de marcha.

Los experimentos se inician al tercer o cuarto día de la operación. Una vez el animal en la plataforma comienza la experimentación. Aunque lo habitual es que permanezca tranquilo y no manifieste ningún signo de incomodidad durante las inyecciones de fármacos y durante las oclusiones de la arteria carótida, el experimento se interrumpe siempre que aparecen signos de excitación o irritabilidad, devolviéndose el animal a los estabularios y dejando transcurrir 24 h antes de intentar un nuevo experimento.

El registro del flujo sanguíneo cerebral se realizó conectando el transductor electromagnético de flujo (Carolina Medical Electronics) implantado en la arteria maxilar interna a un medidor electromagnético de flujo (Carolina Medical Electronics, mod. 501), y éste a su vez a un amplificador (Hewlett-Packard 8802A). La presión arterial sistémica se registró a partir del catéter introducido en la arteria femoral conectado a un transductor de presión (Hewlett-Packard 8805C). La frecuencia cardíaca se registró mediante un tacómetro (Hewlett-Packard 7807C) a partir de la onda pulsátil de la presión arterial. El flujo sanguíneo cerebral (pulsátil y medio), la presión arterial y la frecuencia cardíaca se registraron continuamente en un polígrafo de ocho canales (Hewlett-Packard 7758A).

El flujo sanguíneo cerebral basal se obtiene midiendo la altura en milímetros desde la línea que aparece al practicar una oclusión de la arteria carótida externa (3-4 segundos de duración) y que corresponde al flujo cero, hasta la onda de flujo sanguíneo cerebral medio. El producto de esta distancia por el factor de calibración determinado de antemano proporciona el flujo sanguíneo cerebral en ml/min. Cuando se quieren obtener valores de flujo sanguíneo cerebral en distintos periodos de tiempo sin que medie la inyección de un fármaco, se procede de igual forma. Esta maniobra se repite también cuando la inyección de una dosis de un fármaco desarrolla su efecto máximo. La variación de flujo entre ambas situaciones se expresa en valores absolutos (ml/min) y porcentualmente. De forma similar se procede para la medición de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, aunque en estos casos el valor cero se obtiene al principio del experimento a partir de la señal interna de los amplificadores correspondientes y se considera constante a lo largo de todo el experimento. La resistencia vascular cerebral se calcula como el cociente entre la presión arterial sistémica en mm Hg, y el flujo sanguíneo cerebral en ml/min por 100 g de tejido, y

sus cambios se expresan en valores absolutos o porcentualmente.

Los fármacos se inyectaron directamente en la circulación cerebral a través del catéter introducido en la arteria temporal, o por vía intravenosa. Todos los fármacos, excepto la endotelina-1, se inyectaron disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica. En todos los casos se realizó inmediatamente después una inyección de 1 ml de solución salina para arrastrar los restos de fármaco que pudieran haber quedado en el catéter. Inyecciones control realizadas con este volumen de solución salina fisiológica no produjeron en ningún caso modificaciones en el flujo sanguíneo cerebral ni en otros parámetros hemodinámicos.

### 3.2.4.- Protocolos experimentales

#### *a) Influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de $Mg^{2+}$ al cerebro*

La influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de  $Mg^{2+}$  al cerebro se determinó obteniendo la evolución temporal de los niveles de  $Mg^{2+}$  en plasma y líquido cefalorraquídeo, tras administración intravenosa de una dosis de sulfato magnésico de 3 g durante 15 min. Los experimentos se realizaron en el animal anestesiado según el procedimiento descrito anteriormente. Para la toma de muestras de líquido cefalorraquídeo se realizó una punción cervical percutánea en la cisterna magna. Las muestras de sangre se tomaron a través del catéter de la arteria femoral. El sulfato magnésico se administró a través del catéter situado en la vena femoral por medio de una bomba de perfusión (Hoechst PP50, velocidad de 1 ml/min). Las muestras de sangre y de líquido cefalorraquídeo se tomaron a los 0 (control), 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min desde el comienzo de la infusión. La sangre se centrifugó a 3500 rpm para separar el plasma. Mediante un espectrofotómetro UV visible (Shimadzu, modelo UV-240) y utilizando Magnesium (reactivos para la determinación cuantitativa colorimétrica de magnesio, Sigma) se determinó la concentración de  $Mg^{2+}$  presente en todas las muestras.

*b) Efectos del sulfato magnésico sobre flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos en la cabra sin anestesiarse*

El efecto de sulfato magnésico sobre flujo sanguíneo cerebral, presión arterial, frecuencia cardíaca y resistencia vascular cerebral en la cabra sin anestesiarse se registró durante la administración directa de sulfato magnésico en el sistema de aporte cerebroarterial o por vía intravenosa. En el primer grupo de experimentos se inyectaron dosis crecientes de sulfato magnésico (10, 30, 100 y 300 mg) en la arteria maxilar interna a través del catéter temporal. En el segundo grupo de experimentos se infundieron dosis crecientes de sulfato magnésico (0.3, 1 y 3 mg) a través del catéter de la vena femoral por medio de una bomba de perfusión (Hoeschst PP50, velocidad 1 ml/min) durante 15 min cada una.

*c) Efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina*

El efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida mediante 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina, se examinó realizando infusiones de 5-hidroxitriptamina (10 µg/min), endotelina-1 (0.1 ó 0.001 nmol/min) y norepinefrina (10 µg/min) directamente en la arteria maxilar interna. Tras 15-20 min de infusión se alcanza una vasoconstricción cerebral estable que permite examinar los efectos del sulfato magnésico. Para ello se siguieron dos protocolos: en el primer grupo de experimentos se inyectaron dosis crecientes de sulfato magnésico (10, 30, 100 y 300 mg) en la arteria maxilar interna; en el segundo grupo de experimentos el sulfato magnésico se infundió a través de la vena femoral a dosis de 3 g/15 min en el caso de endotelina-1 y 5-hidroxitriptamina, y de 0.3, 1 y 3 g/15 min en el caso de norepinefrina. En un tercer grupo de experimentos se infundió norepinefrina (30 µg/min) y sulfato magnésico (0.3 y 3 g/15 min) ambos por vía intravenosa.



### **3.2.5.- Fármacos y soluciones**

La preparación de los fármacos (disolventes y diluyentes) es idéntica a la descrita en el epígrafe 3.1.5., obteniéndose en este caso las dosis correspondientes a los protocolos descritos en el epígrafe 3.2.4.

### **3.2.6.- Análisis de los resultados**

Las concentraciones de  $Mg^{2+}$  en plasma y líquido cefalorraquídeo se expresaron en valores absolutos (mg/dL). Con los datos obtenidos en todos los experimentos se calculó la media aritmética, la desviación típica y EEM. El análisis estadístico de la evolución temporal de dichas concentraciones, se realizó aplicando el test de rango múltiple de Newman-Keuls.

Para determinar el efecto de las diferentes dosis de sulfato magnésico sobre los cuatro parámetros objeto de estudio se realizaron dos mediciones: una correspondiente a la situación basal (antes de la inyección) y otra correspondiente al efecto máximo sobre el flujo sanguíneo cerebral alcanzado tras la inyección. Los valores de flujo sanguíneo cerebral, resistencia vascular cerebral, presión arterial y frecuencia cardíaca se expresaron porcentualmente de sus valores control. Con los datos obtenidos en todos los experimentos se calculó la media aritmética, la desviación típica y EEM para cada una de las dosis, construyéndose las correspondientes curvas dosis-respuesta. Las comparaciones múltiples entre dosis se hicieron aplicando el test de mínimas diferencias significativas (LSD). De la misma forma se procedió en aquellos experimentos en los que previamente se había inducido vasoconstricción cerebral mediante 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina. La comparación estadística entre dosis, se realizó con un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas si  $p < 0.05$ .

## ***4.- RESULTADOS***

#### 4.1.- ESTUDIOS *IN VITRO*

##### 4.1.1.- Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre el tono de la arteria cerebral media aislada de cabra

En tono basal constante de 1 g, la sustitución secuencial del medio de incubación que contenía la concentración normal de  $Mg^{2+}$  (1 mM) por medios con concentraciones de  $Mg^{2+}$  decrecientes (0.3, 0.1, 0) y crecientes (0.1, 0.3, 1 y 10 mM), no produjo cambios apreciables en la tensión de los segmentos arteriales (Figura 9).

En arterias precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$   $10^{-5}$  M, la sustitución secuencial del medio de incubación con 1 mM  $Mg^{2+}$  por medios con concentraciones decrecientes en  $Mg^{2+}$  (0.6, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 mM), produjo una respuesta bifásica: una primera relajación inmediata transitoria (componente fásico) seguida de contracción, es decir, recuperación del tono activo llegando a superar en ocasiones el valor control (componente tónico) (Figuras 10 y 11). El análisis estadístico mostró que los componentes fásicos correspondientes a cada una de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  eran estadísticamente significativos, aunque su magnitud no era función de la hipomagnesemia. Por el contrario, los componentes tónicos no fueron estadísticamente significativos y tampoco lo fueron entre ellos. Tras renovar sucesivamente el medio de incubación conteniendo 1 mM  $Mg^{2+}$  y prostaglandina  $F_{2\alpha}$   $10^{-5}$  M, se observó de igual forma una respuesta bifásica con cada uno de los cambios (Figuras 10 y 11). Todos los componentes fásicos obtenidos fueron estadísticamente significativos, aunque no hubo diferencias entre ellos. En cuanto a los componentes tónicos, ninguno resultó estadísticamente significativo. Además, el análisis estadístico mostró que los componentes fásicos y tónicos obtenidos al disminuir la concentración de  $Mg^{2+}$  no fueron diferentes de los obtenidos al mantener la concentración normal de  $Mg^{2+}$  (1 mM).

En arterias precontraídas con endotelina-1  $10^{-9}$ , la sustitución secuencial del medio de incubación con 1 mM  $Mg^{2+}$  por medios de incubación con concentraciones de  $Mg^{2+}$  progresivamente menores (0.6, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 mM) provocó también una respuesta bifásica: relajación transitoria (componente fásico) seguida de recuperación parcial del tono

activo (componente tónico) (Figuras 12 y 13). El análisis estadístico mostró que los componentes fásicos correspondientes a cada una de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  fueron estadísticamente significativos, y su magnitud fue función de la hipomagnesemia hasta la concentración 0.2 mM. Los componentes tónicos correspondientes a las concentraciones de 0.6 y 0.3 mM no fueron estadísticamente significativos; sin embargo, sí lo fueron los correspondientes a las concentraciones de 0.2, 0.1 y 0 mM, aunque su magnitud no fue función de la hipomagnesemia. La renovación sucesiva del medio de incubación conteniendo 1 mM  $Mg^{2+}$  y endotelina-1  $10^{-9}$  M, produjo también respuesta bifásica en todos los casos (Figuras 12 y 13). Los componentes fásicos no fueron estadísticamente significativos hasta el cuarto cambio del medio, y los componentes tónicos no lo fueron en ningún caso. El análisis estadístico mostró que los componentes fásicos y tónicos obtenidos al disminuir la concentración de  $Mg^{2+}$  no fueron diferentes de los obtenidos al mantener la concentración normal de  $Mg^{2+}$  (1 mM).

En arterias precontraídas con KCl 50 mM no se evidenció ni el componente fásico ni el componente tónico al sustituir el medio de incubación, tanto al disminuir la concentración de  $Mg^{2+}$  como al mantenerla constante (1 mM  $Mg^{2+}$ ).

#### **4.1.2.- Efecto relajante de $Mg^{2+}$ sobre arterias aisladas en función de la especie, el agente inductor del tono activo y el tipo de arteria**

En tono basal de 1 g, la adición al baño de órganos de concentraciones acumulativas de  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) sobre arteria cerebral media de cabra no provocó cambios en la tensión vascular. Por otra parte, la adición de una única concentración de 5-hidroxitriptamina ( $10^{-5}$  M), endotelina-1 ( $10^{-9}$  M), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) o KCl (50 mM) provocó contracción mantenida (tono activo) en medio libre de  $Mg^{2+}$  cuya magnitud fue (mg):  $659 \pm 121$ ,  $1330 \pm 164$ ,  $1580 \pm 98$  y  $3200 \pm 400$ , respectivamente. En estas condiciones, la adición al baño de órganos de dosis acumulativas de  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) provocó relajaciones en todos los casos que fueron de magnitud concentración-dependiente (Figura 14, Tabla 1). Tanto respecto de los valores de  $CE_{50}$  como de  $E_{m\acute{a}x}$  la menor respuesta relajante al  $Mg^{2+}$  correspondió a los segmentos arteriales precontraídos con KCl, siendo

equiefectiva con los tres vasoconstrictores restantes.

La adición de una concentración única de 5-hidroxitriptamina ( $10^{-5}$  M), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) o KCl (50 mM) provocó contracción acusada y mantenida (tono activo) de los segmentos arteriales humanos en medio libre de  $Mg^{2+}$ , cuya magnitud fue (mg):  $1048 \pm 96$ ,  $3182 \pm 272$  y  $3013 \pm 367$ , respectivamente. La adición al baño de órganos de dosis acumulativas de  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) provocó relajaciones concentración-dependientes (Figura 15) del tono arterial obtenido al añadir los distintos vasoconstrictores. La mayor respuesta relajante se obtuvo precontrayendo con 5-hidroxitriptamina, y la menor con KCl (Tabla 1).

Al igual que en arteria cerebral media de cabra, la adición acumulativa de  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) no provocó cambios en la tensión vascular de arterias basilar y carótida de conejo en situación de tono basal de 0.5 y 2 g, respectivamente. La adición de una única concentración de endotelina-1  $10^{-8}$  M en medio libre de  $Mg^{2+}$ , provocó contracción mantenida (tono activo) en ambos tipos de arteria, cuya magnitud fue (mg):  $1026 \pm 94$  y  $1252 \pm 237$ , respectivamente. En estas condiciones, el  $Mg^{2+}$  provocó relajaciones concentración-dependientes en ambos casos, pero la respuesta fue significativamente menor en la arteria carótida (Figura 16 y Tabla 1).

El análisis estadístico mostró que en términos de  $E_{m\acute{a}x}$  el efecto relajante del  $Mg^{2+}$  sobre arteria cerebral media de cabra precontraída con 5-hidroxitriptamina o KCl fue significativamente menor que en las arterias cerebrales humanas, mientras que el efecto fue el mismo cuando se precontrajo con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . En términos de  $CE_{50}$  la respuesta relajante de  $Mg^{2+}$  en segmentos arteriales precontraídos con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  fue significativamente mayor en arterias cerebrales humanas que en arterias cerebrales de cabra, mientras que la respuesta fue equipotente cuando ambos tipos de arterias fueron precontraídos con 5-hidroxitriptamina o KCl. En términos de  $E_{m\acute{a}x}$ , el efecto relajante del  $Mg^{2+}$  sobre arteria cerebral de cabra precontraída con endotelina-1, no varió del obtenido sobre arteria basilar de conejo, pero la  $CE_{50}$  fue significativamente mayor (menor potencia) (Tabla 1).

#### 4.1.3.- Influencia de factores derivados del endotelio en la respuesta relajante de la arteria cerebral media aislada de cabra frente a $Mg^{2+}$

Ni la eliminación mecánica del endotelio ni la incubación con  $N^G$ -nitro-L-arginina  $10^{-5}$  M, inhibieron las relajaciones (componente fásico) resultantes de disminuir secuencialmente la concentración de  $Mg^{2+}$  en arterias precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$   $10^{-5}$  M. En el caso de las contracciones (componente tónico), la incubación con  $N^G$ -nitro-L-arginina  $10^{-5}$  M provocó únicamente un aumento significativo de la contracción alcanzada al eliminar el  $Mg^{2+}$  del medio de incubación (Figura 17).

La adición acumulativa de  $Mg^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-2}$  M) sobre arteria cerebral media de cabra precontraída con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) e incubada con indometacina ( $10^{-6}$  ó  $10^{-5}$  M), produjo relajaciones de magnitud dependiente de la concentración en todos los casos (Figura 18). El análisis estadístico mostró que en términos de  $CE_{50}$  el efecto de la incubación con indometacina no varió la respuesta relajante al  $Mg^{2+}$ , pero el  $E_{m\acute{a}x}$  fue significativamente menor para ambas concentraciones de indometacina (Tabla 2). Por otra parte, ni la incubación con  $N^G$ -nitro-L-arginina ni la eliminación mecánica del endotelio variaron el efecto relajante del  $Mg^{2+}$  (Figura 18 y Tabla 2).

#### 4.1.4.- Efecto de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a vasoconstrictores: $Ca^{2+}$ , endotelina-1, 5-hidroxitriptamina norepinefrina y prostaglandina $F_{2\alpha}$

##### a) Cabra

La adición acumulativa de  $Ca^{2+}$  ( $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M) provocó contracción concentración-dependiente de los segmentos de arteria cerebral media de cabra incubada en medio despolarizante libre de  $Ca^{2+}$  conteniendo 0, 0.1, 1 y 10 mM  $Mg^{2+}$  (Figura 19). El análisis estadístico mostró que en términos de  $E_{m\acute{a}x}$  la respuesta contráctil obtenida en medio 10 mM  $Mg^{2+}$  fue significativamente menor que la obtenida en medio 0.1 mM  $Mg^{2+}$ . La  $CE_{50}$  obtenida en medio 10 mM  $Mg^{2+}$  fue significativamente menor que la obtenida en medios 0,

0.1 y 1 mM  $Mg^{2+}$  (Tabla 3).

La adición acumulativa de endotelina-1 ( $10^{-11}$ - $3 \times 10^{-8}$  M) provocó contracción concentración-dependiente, que se desarrolló lentamente, de los segmentos de arteria cerebral media de cabra en solución Ringer-Locke conteniendo 0, 0.1, 1 y 10 mM  $Mg^{2+}$  (Figura 20). El análisis estadístico mostró que, en términos de  $E_{máx}$ , las respuestas obtenidas en las cuatro concentraciones de  $Mg^{2+}$  no fueron estadísticamente diferentes, pero la  $CE_{50}$  fue significativamente menor en el medio conteniendo 0.1 mM  $Mg^{2+}$  que en el medio 1 mM  $Mg^{2+}$  (Tabla 3).

La adición acumulativa de 5-hidroxitriptamina ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) provocó contracción concentración-dependiente de los segmentos de arteria cerebral media de cabra en solución Ringer-Locke conteniendo 0, 0.1, 1 y 10 mM  $Mg^{2+}$  (Figura 21). El análisis estadístico mostró que, en términos de  $E_{máx}$ , la respuesta contráctil obtenida en medio libre de  $Mg^{2+}$  no fue diferente de la obtenida en medio 1 mM  $Mg^{2+}$ , pero la  $CE_{50}$  fue significativamente menor. La incubación en medio 10 mM  $Mg^{2+}$  redujo significativamente la respuesta contráctil inducida por 5-hidroxitriptamina, en términos de  $E_{máx}$ , pero la  $CE_{50}$  no varió (Tabla 3).

La adición acumulativa de norepinefrina ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-4}$  M) al baño de órganos conteniendo 0, 1 y 10 mM  $Mg^{2+}$  provocó contracción concentración-dependiente de los segmentos cerebroarteriales de cabra (Figura 22). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas, en términos de  $CE_{50}$ , entre las respuestas obtenidas en las tres concentraciones de  $Mg^{2+}$ . La incubación en medio libre de  $Mg^{2+}$  y en medio 10 mM  $Mg^{2+}$  atenuó significativamente, en términos de  $E_{máx}$ , la respuesta contráctil (Tabla 3).

#### b) Humanos

La adición acumulativa de 5-hidroxitriptamina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) provocó contracción concentración-dependiente de segmentos de ramas de arteria cerebral media humana en solución Ringer-Locke conteniendo 0.1, 1 y 10 mM  $Mg^{2+}$  (Figura 23). El análisis estadístico mostró que, en términos de  $E_{máx}$ , la incubación en medio 10 mM  $Mg^{2+}$  redujo

significativamente la respuesta contráctil inducida por 5-hidroxitriptamina y la  $CE_{50}$  fue significativamente mayor que en el medio 1 mM  $Mg^{2+}$ . También la incubación en medio 0.1 mM  $Mg^{2+}$  redujo significativamente la respuesta contráctil en términos de  $E_{máx}$  pero sin variar la  $CE_{50}$  (Tabla 4).

La adición acumulativa de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-7}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) provocó contracción concentración-dependiente de segmentos de ramas de arteria cerebral media humana en medios 0.1, 1 y 10 mM  $Mg^{2+}$  (Figura 24). El análisis estadístico mostró que la incubación en medio conteniendo 10 mM  $Mg^{2+}$  redujo significativamente el  $E_{máx}$  e incrementó significativamente la  $CE_{50}$ . Cuando las arterias se incubaron en medio 0.1 mM  $Mg^{2+}$  el  $E_{máx}$  permaneció invariable pero la  $CE_{50}$  fue significativamente mayor que en medio 1 mM  $Mg^{2+}$  (Tabla 4).



## 4.2.- ESTUDIOS *IN VIVO*

### 4.2.1.- Influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de $Mg^{2+}$ al cerebro

Tras la administración intravenosa de sulfato magnésico (3 g/15 min) en cabras anestesiadas, la concentración de  $Mg^{2+}$  en plasma aumentó significativamente, alcanzando un máximo a los 15 min (259% respecto del valor control) y disminuyendo progresivamente hasta alcanzar un valor estable significativamente mayor que el control a los 120 min, el cual se mantuvo hasta el final del periodo de registro (180 min). Por el contrario, los niveles de  $Mg^{2+}$  en líquido cefalorraquídeo no se modificaron significativamente durante ni tras la infusión de sulfato magnésico (Figura 24 y Tabla 5).

### 4.2.2.- Efecto del sulfato magnésico sobre flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos en la cabra sin anestesiar

La administración intraarterial de dosis crecientes de sulfato magnésico (10, 30, 100 y 300 mg) en cabras sin anestesiar provocó, de forma inmediata y transitoria, incrementos dosis-dependientes en el flujo sanguíneo cerebral que resultaron estadísticamente significativos a partir de la dosis de 100 mg. No se apreciaron cambios significativos en la presión arterial media ni en la frecuencia cardíaca durante los aumentos del flujo sanguíneo cerebral, por lo cual se produjeron reducciones dosis-dependientes en la resistencia vascular cerebral (Figura 26). En la Tabla 6 se presentan los datos correspondientes a los cuatro parámetros registrados obtenidos con la dosis de 100 mg.

La infusión intravenosa de sulfato magnésico (0.3, 1 y 3 g/15 min) provocó aumentos del flujo sanguíneo cerebral en cabras sin anestesiar. Los cambios en presión arterial y frecuencia cardíaca no fueron significativos durante los aumentos del flujo sanguíneo cerebral, por lo cual se produjeron reducciones dosis-dependientes en la resistencia vascular cerebral (Figura 27). En la Tabla 7 se presentan los datos correspondientes a los cuatro parámetros registrados obtenidos con la dosis de 3 g/15 min a los 15 min de la infusión. Mientras las infusiones de 0.3 y 1 g alcanzaron un nivel estable

10 min después de la infusión, la de 3 g lo alcanzó a los 5 min. Estos cambios permanecieron durante al menos 10 min después de finalizar las infusiones.

#### **4.2.3.- Efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina**

##### *a) Administración intraarterial de sulfato magnésico*

La infusión de 5-hidroxitriptamina (10  $\mu\text{g}/\text{min}$ ) directamente en el sistema cerebroarterial de cabras sin anestesiarse provocó descenso significativo en el flujo sanguíneo cerebral que no estuvo acompañado de cambios significativos en presión arterial ni frecuencia cardíaca. Se produjo por lo tanto incremento significativo de la resistencia vascular cerebral (Tabla 8). De 15 a 20 min desde el inicio de la infusión el flujo sanguíneo cerebral se redujo a un  $48\pm 3\%$ , mientras que la resistencia vascular aumentó hasta un  $225\pm 23\%$ . Inyecciones de dosis crecientes de sulfato magnésico (10, 30, 100 y 300 mg) directamente en la arteria maxilar interna durante la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, provocó incrementos transitorios dosis-dependientes del flujo sanguíneo cerebral, sin cambios concomitantes en la frecuencia cardíaca ni en la presión arterial, y por tanto descensos en la resistencia cerebrovascular (Figura 28). El análisis estadístico mostró que la dosis más alta de sulfato magnésico (300 mg) revirtió la vasoconstricción inducida por 5-hidroxitriptamina hasta valores no diferentes estadísticamente de los valores control (Tabla 8).

Las infusiones de endotelina-1 (0.1 nmol/min ó 0.001 nmol/min) directamente en el sistema cerebroarterial, provocaron descenso significativo en el flujo sanguíneo cerebral sin estar acompañado por cambios significativos en la presión arterial ni en la frecuencia cardíaca. Se produjo por lo tanto incremento significativo en la resistencia vascular cerebral (Tablas 9 y 10). De 15 a 20 min desde el inicio de las infusiones, el flujo sanguíneo cerebral se redujo al  $55\pm 3\%$  (0.1 nmol/min) y al  $78.7\pm 6\%$  (0.001 nmol/min), mientras que la resistencia vascular cerebral aumentó al  $206\pm 11\%$  y al  $143\pm 13\%$ , respectivamente. Inyecciones de dosis crecientes de sulfato magnésico (10, 30, 100 y 300 mg) directamente

en la arteria maxilar interna durante la vasoconstricción cerebral inducida mediante endotelina-1, provocó incrementos transitorios y dosis-dependientes del flujo sanguíneo cerebral, sin cambios concomitantes en la frecuencia cardíaca ni en la presión arterial, y por tanto descensos en la resistencia cerebrovascular (Figuras 29 y 30). El análisis estadístico mostró que la respuesta vasodilatadora fue menor sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 0.1 nmol/min de endotelina-1 que en la inducida por 0.001 nmol/min. La dosis más alta de sulfato magnésico (300 mg) revirtió la vasoconstricción inducida por endotelina-1 0.001 nmol/min hasta un valor de flujo sanguíneo cerebral que no fue estadísticamente diferente del valor control, mientras que la vasoconstricción cerebral inducida por endotelina-1 0.1 nmol/min fue revertida parcialmente (Tablas 9 y 10).

La infusión continua de norepinefrina (10  $\mu$ g/min) directamente en el sistema cerebroarterial, provocó una inmediata reducción significativa del flujo sanguíneo cerebral, que alcanzó una meseta estable en 10 min al  $61\pm 3\%$ . No varió la presión arterial media ni la frecuencia cardíaca durante la reducción del flujo sanguíneo cerebral, indicando un incremento en la resistencia vascular hasta el  $176\pm 9\%$  (Tabla 11). Inyecciones de dosis crecientes de sulfato magnésico (10, 30, 100 y 300 mg) directamente en el lecho cerebroarterial durante la vasoconstricción cerebral inducida por norepinefrina, produjeron incrementos transitorios y dosis-dependientes del flujo sanguíneo cerebral. Puesto que no fueron significativos los cambios en la presión arterial media ni en la frecuencia cardíaca durante el aumento del flujo sanguíneo cerebral, se produjeron para todas las dosis descensos significativos dosis-dependientes en la resistencia vascular cerebral (Figura 31 y Tabla 11).

#### *b) Administración intravenosa de sulfato magnésico*

La infusión intravenosa de sulfato magnésico (3 g/15 min) durante la vasoconstricción cerebral inducida por infusión continua intraarterial de 5-hidroxitriptamina (10  $\mu$ g/min), provocó incremento del flujo sanguíneo cerebral y descenso de la resistencia cerebrovascular (Figura 32). Esta respuesta vasodilatadora fue significativa a los 5 min de la infusión, y a los 10 y 15 min no se apreció mayor aumento. A los 5 min de la infusión el

sulfato magnésico revirtió la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina (Tabla 12).

La infusión intravenosa de sulfato magnésico (3 g/15 min) durante la vasoconstricción cerebral inducida por infusión continua intraarterial de endotelina-1 (0.1 nmol/min), no provocó respuesta vasodilatadora alguna (Figura 33). El análisis estadístico mostró que el valor de flujo sanguíneo cerebral después de la infusión intravenosa de sulfato magnésico no fue diferente del valor de vasoconstricción inducido por endotelina-1, pero sí del valor de flujo sanguíneo cerebral control (Tabla 13).

La infusión intravenosa de sulfato magnésico (0.3, 1 y 3 g/15 min) durante la vasoconstricción cerebral inducida por infusión continua intraarterial de norepinefrina (10 µg/min), produjo incrementos en el flujo sanguíneo cerebral y descensos en la resistencia vascular cerebral (Figura 34), que fueron significativos para las tres dosis. En la Tabla 14 se presentan los datos correspondientes a los cuatro parámetros registrados obtenidos con la dosis de 3 g/15 min de sulfato magnésico a los 15 min de la infusión.

La infusión intravenosa de norepinefrina (30 µg/min) produjo un estado estable con descenso en el flujo sanguíneo cerebral ( $83\pm 1\%$ ), aumento de la presión arterial media ( $132\pm 3\%$ ) y de la resistencia vascular cerebral ( $159\pm 3\%$ ). La infusión intravenosa de la concentración más baja de sulfato magnésico (0.3 g/15 min) durante el estado estable inducido por norepinefrina, no produjo cambios significativos en el flujo sanguíneo cerebral, presión arterial media, frecuencia cardíaca ni resistencia vascular cerebral. Con la dosis de 3 g/15 min se registraron incrementos significativos en el flujo sanguíneo cerebral y descensos en la presión arterial media y resistencia vascular cerebral (Figura 35 y Tabla 15).

## ***5.- FIGURAS***

## Enzimas que dependen del $Mg^{2+}$



### **Glicolíticos**

Hexokinasa  
Fosfofructokinasa  
Fosfogliceratokinasa  
Fosfogliceromutasa  
Enolasa

### **Ruta del fosfogluconato**

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

### **Ciclo de Krebs**

Isocitrato deshidrogenasa específica de NAD  
Succinil-CoA-sintetasa  
Piruvato carboxilasa

### **Hidrolíticos**

ATPasas ( $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPasa y  $Ca^{2+}$ -ATPasas)  
5'-nucleotidasa  
Fosfatasa alcalina  
Fosfatasa ácida  
Leucina aminopeptidasa

### **Transferasas**

Piruvatokinasa  
Creatínfosfokinasa  
Kinasa de la cadena ligera de miosina  
Pirofosforilasa

### **Isomerasas**

Fosfomanosa isomerasa

Figura 1.- Relación de los principales enzimas cuya actividad depende del  $Mg^{2+}$ .

De especial interés en la actividad del músculo liso resultan las ATPasas responsables del transporte iónico a través de las membranas celulares, y la kinasa de la cadena ligera de la miosina responsable de la fosforilación de la miosina.

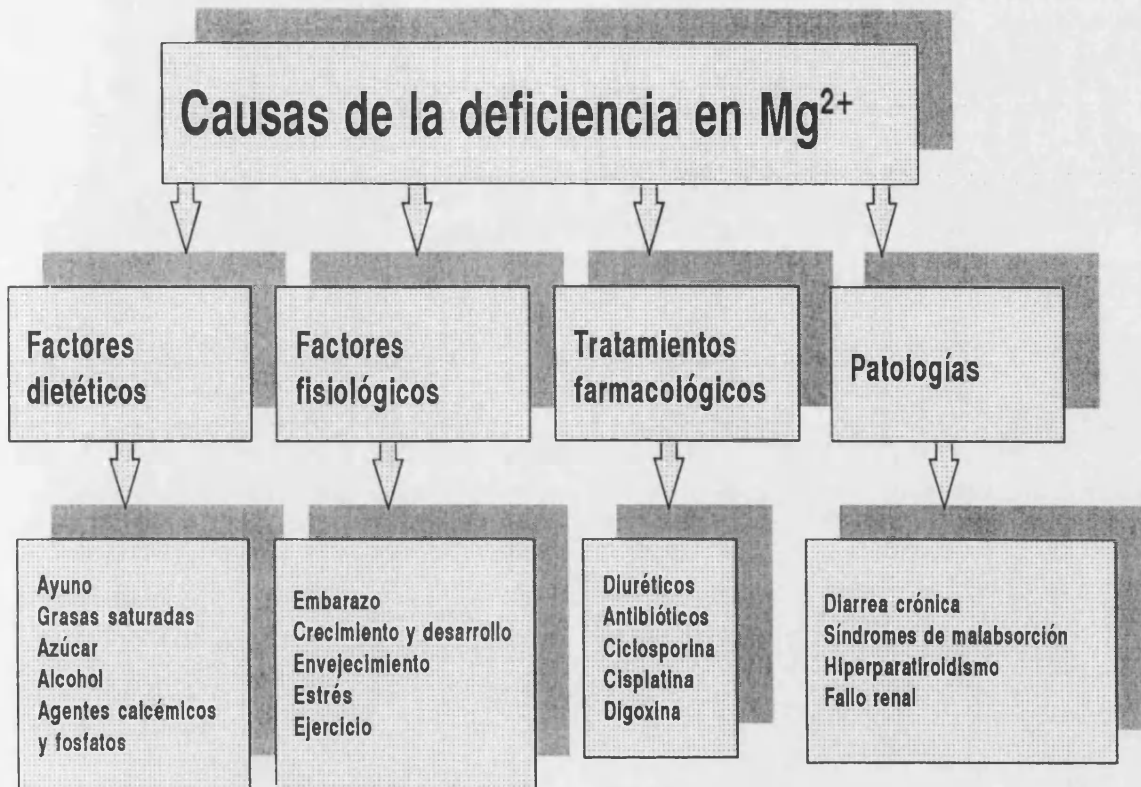
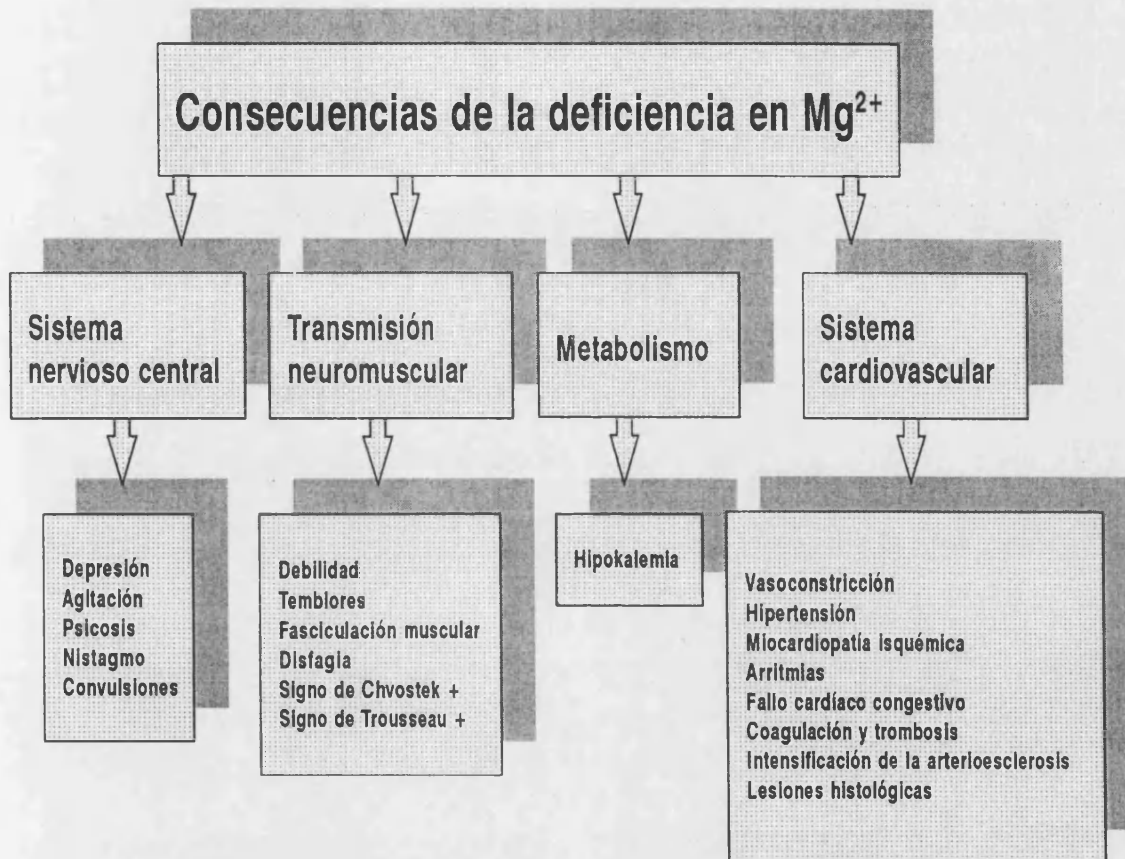


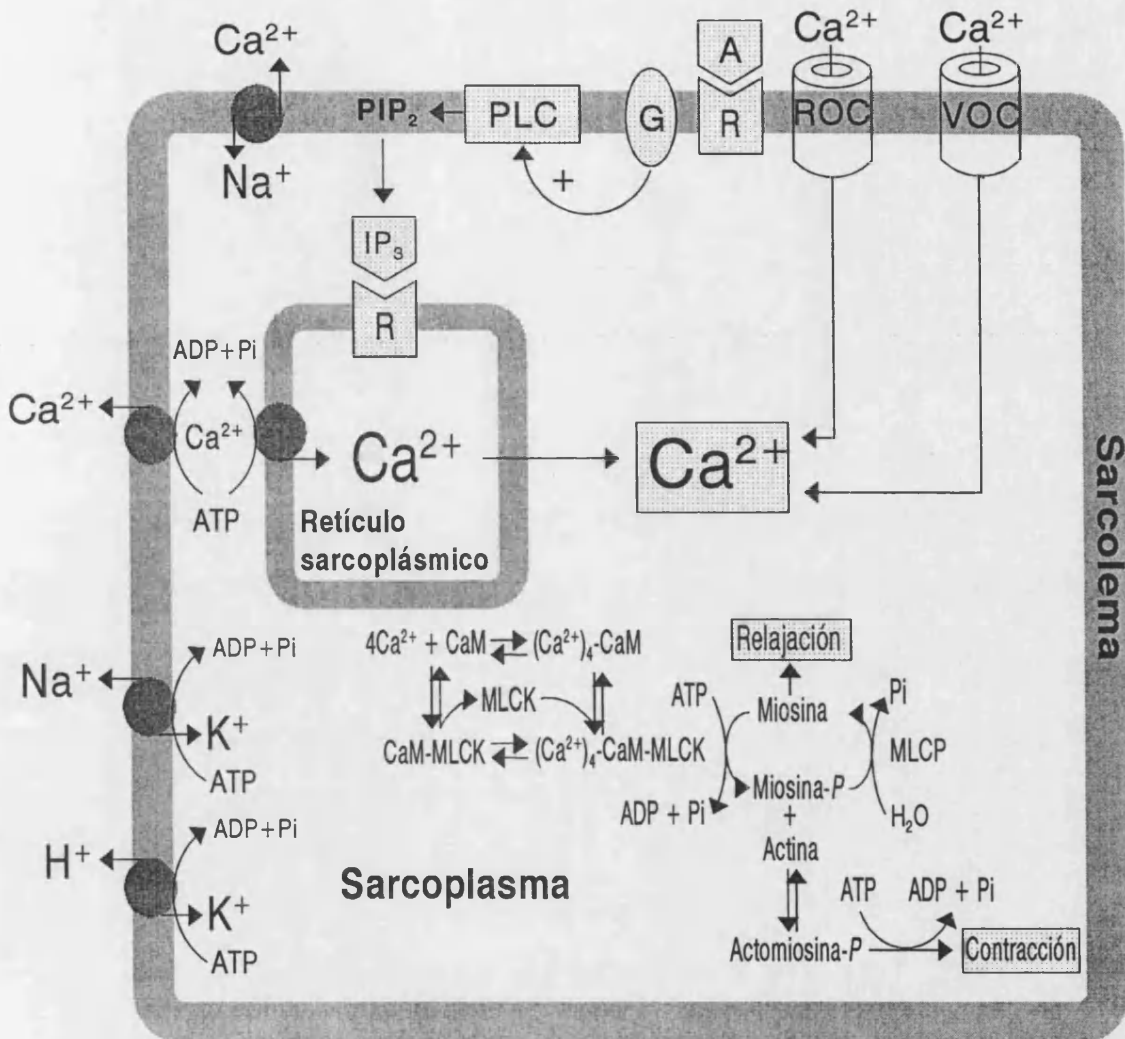
Figura 2.- Relación de las causas más frecuentes de la deficiencia en Mg<sup>2+</sup> en humanos.



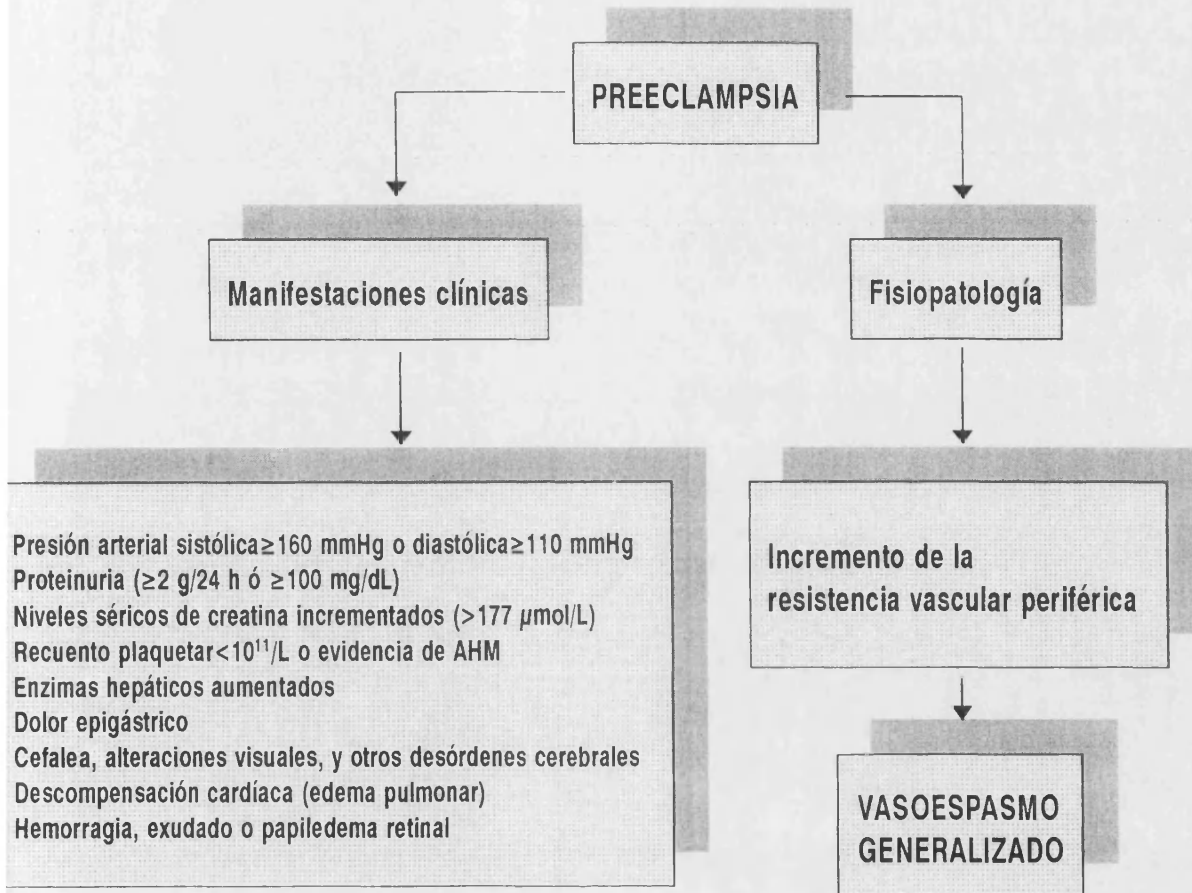
**Figura 3.-** Relación de las principales consecuencias asociadas a la deficiencia en Mg<sup>2+</sup>.

El sistema cardiovascular resulta especialmente afectado por el aumento de la resistencia vascular y de la presión arterial, responsables a su vez de la mayor parte de la mortalidad asociada a las enfermedades cardiovasculares (arritmias, miocardopatía isquémica, muerte súbita, etc.).



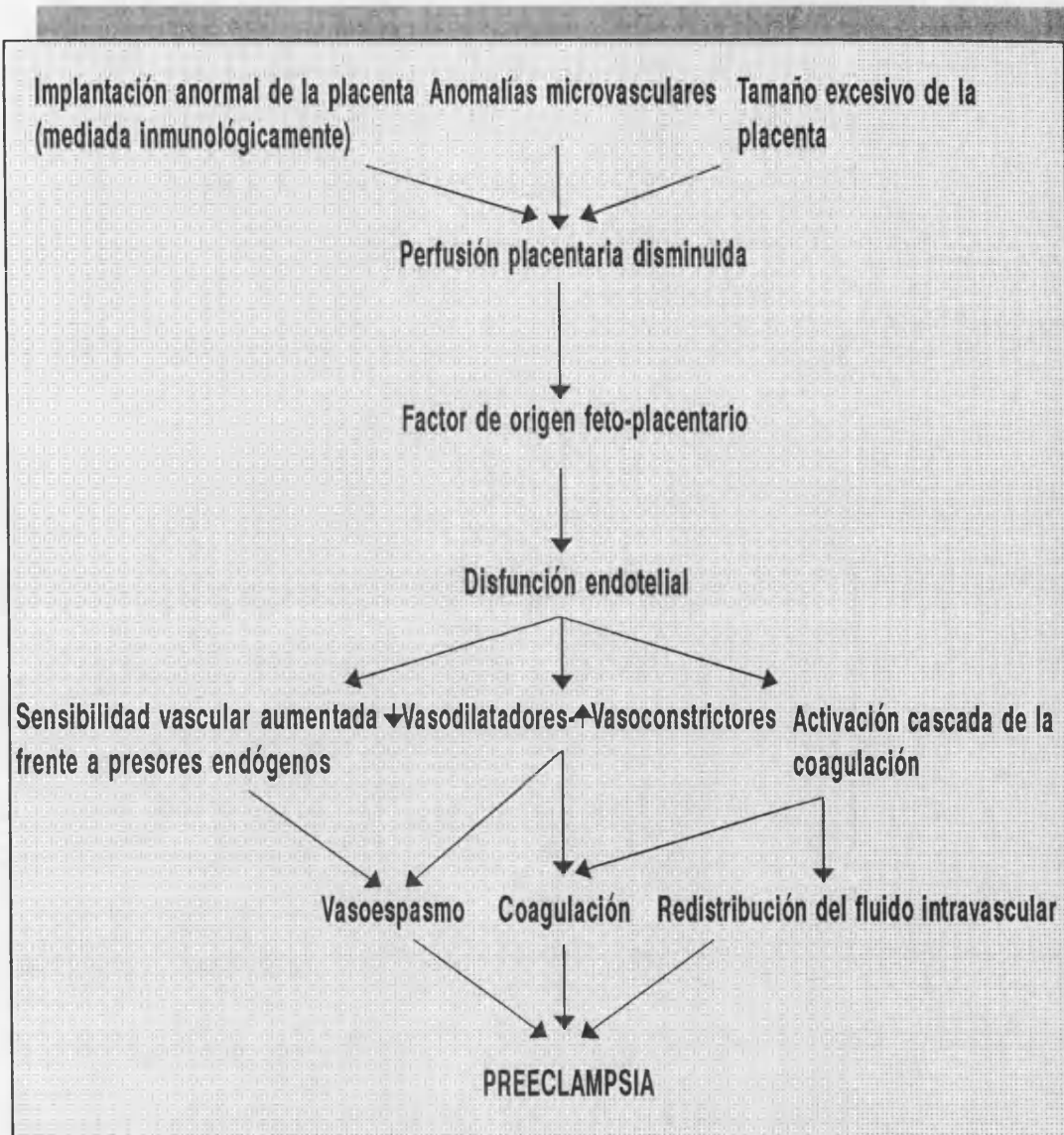


**Figura 4.-** Fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación del músculo liso y ATPasas implicadas en el transporte iónico transmembrana. La despolarización de la membrana origina la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VOC). La interacción de un agonista (A) con su receptor específico (R) origina la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de receptor (ROC), y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde las reservas intracelulares previa formación de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) a través de la vía proteína G-fosfolipasa C (PLC)-fosfatidil inositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ). La interacción  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaM)-kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) desencadena la contracción. La fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) revierte el proceso.



**Figura 5.-** Caracterización de la preeclampsia en función de las manifestaciones clínicas más relevantes y del principal factor implicado en su fisiopatología: el vasoespasmo generalizado.

AHM = anemia hemolítica microangiopática



**Figura 6.-** Representación esquemática de los principales sucesos implicados en la etiología y fisiopatología de la preeclampsia.

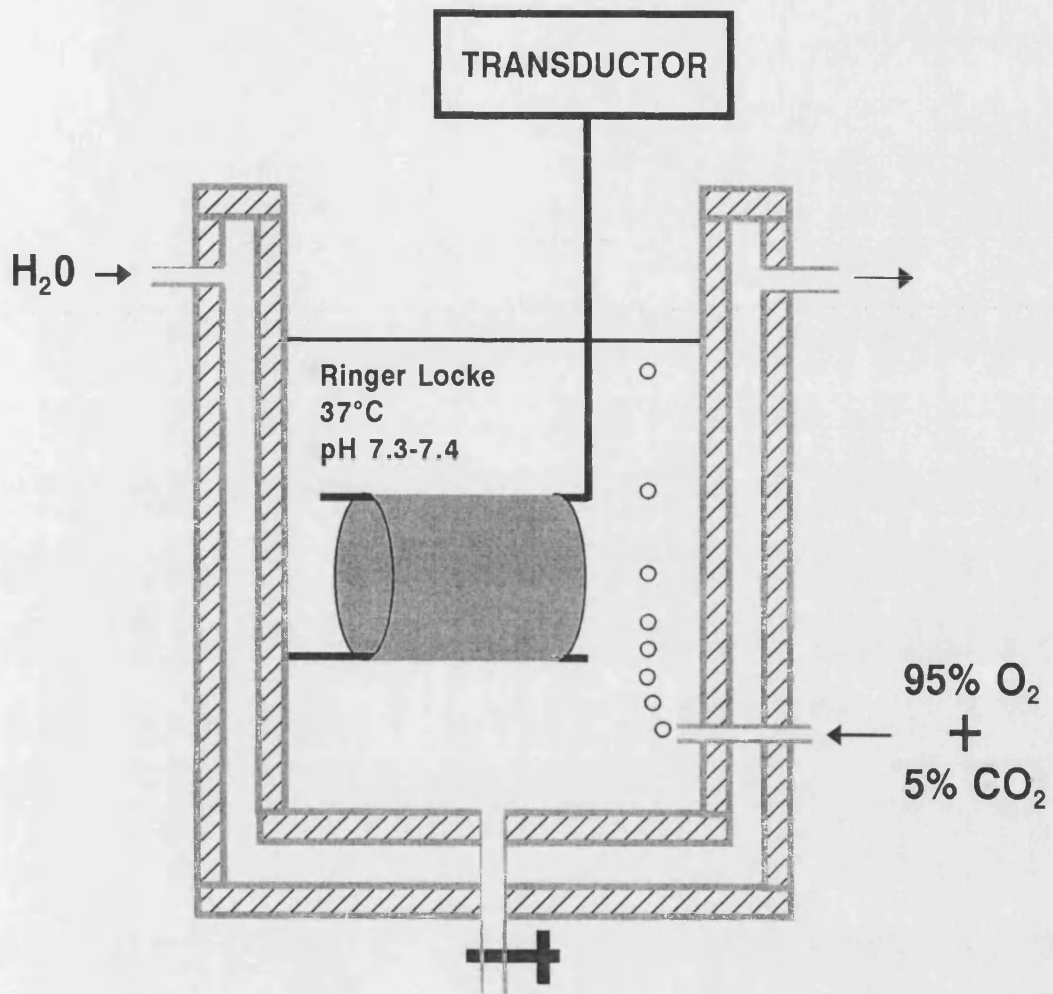
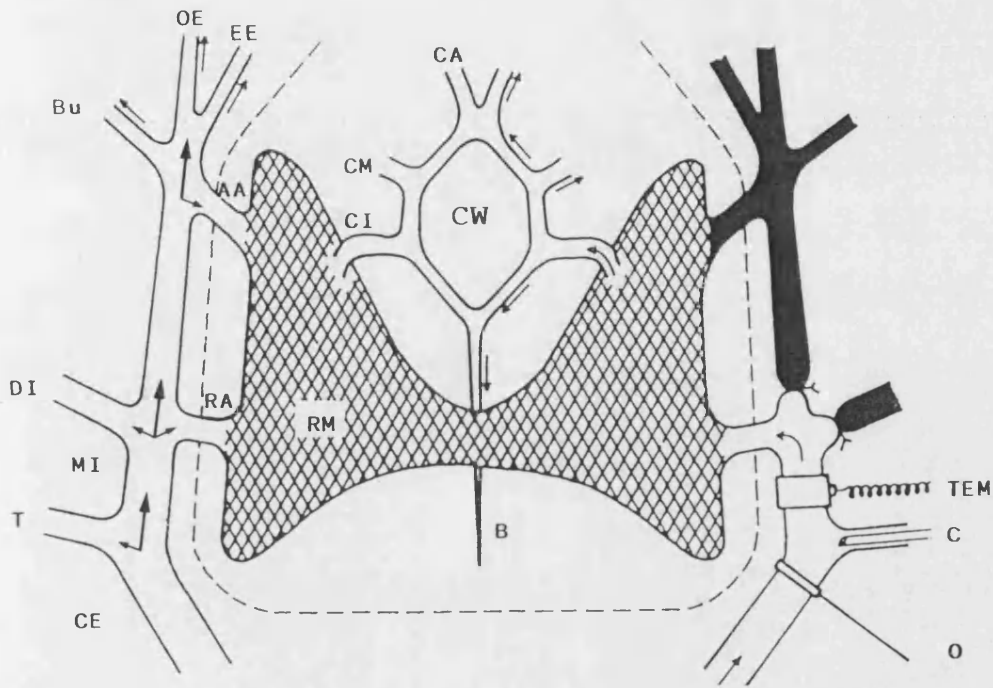


Figura 7.- Representación esquemática del sistema de registro de tensión isométrica en segmentos vasculares cilíndricos.



**Figura 8.-** Esquema de la circulación cerebral de la cabra en condiciones normales (izquierda) y después de la ligadura de las arterias maxilar interna (MI) y dental inferior (DI), junto con la inyección de trombina en la MI (derecha). Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo. CW=círculo de Willis. RM=rete mirabile. TEM=transductor electromagnético de flujo. C=catéter. O= ocluidor. RA=ramo anastomótico. AA=arteria anastomótica. CE=arteria carótida externa. CI=arteria carótida interna. CM=arteria cerebral media. CA=arteria cerebral anterior. B=arteria basilar. T=arteria temporal. BU=arteria buccinadora. OE=arteria oftálmica externa. EE=arteria etmoidal externa.

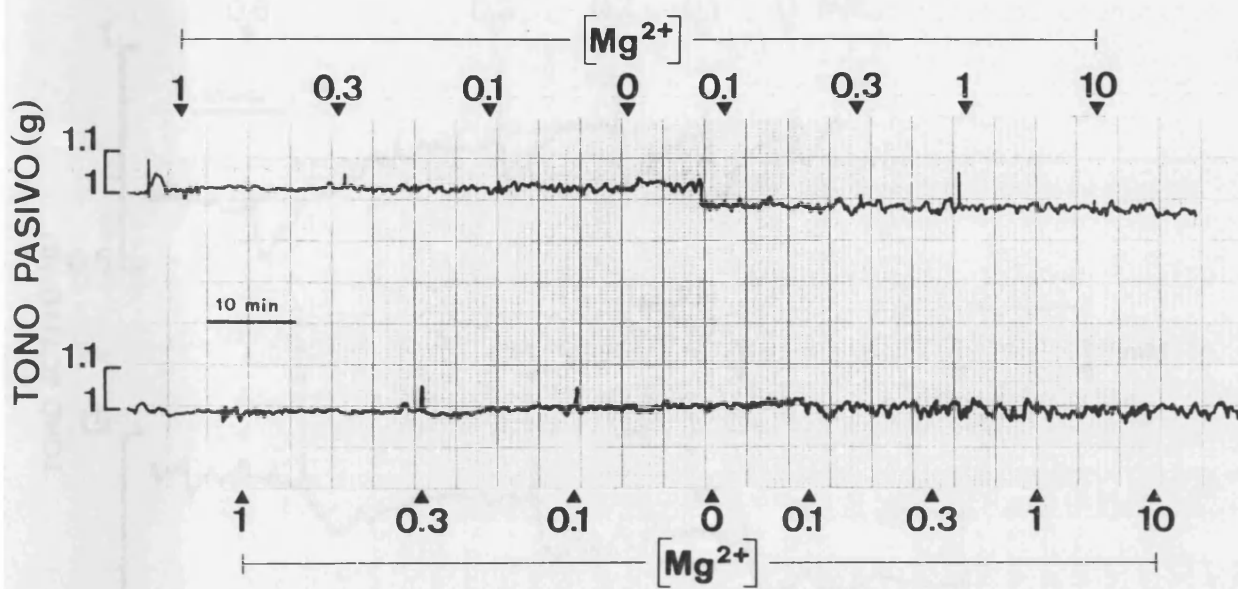
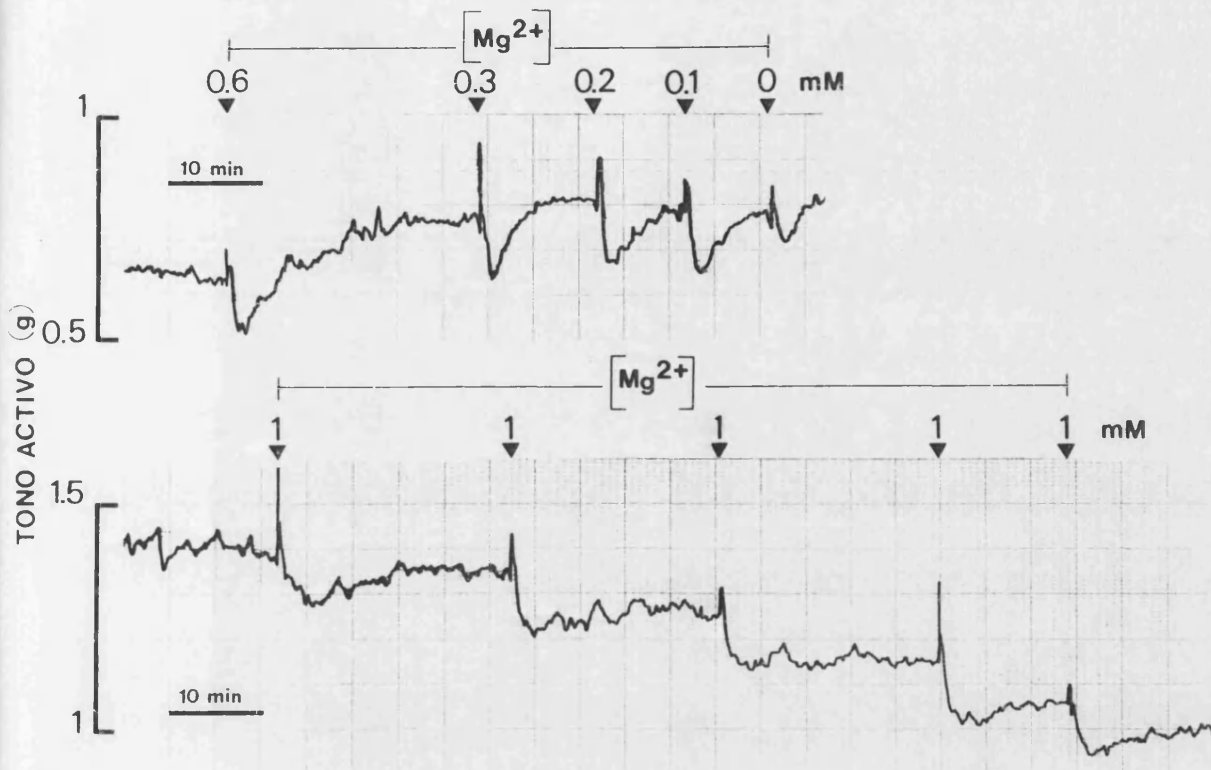
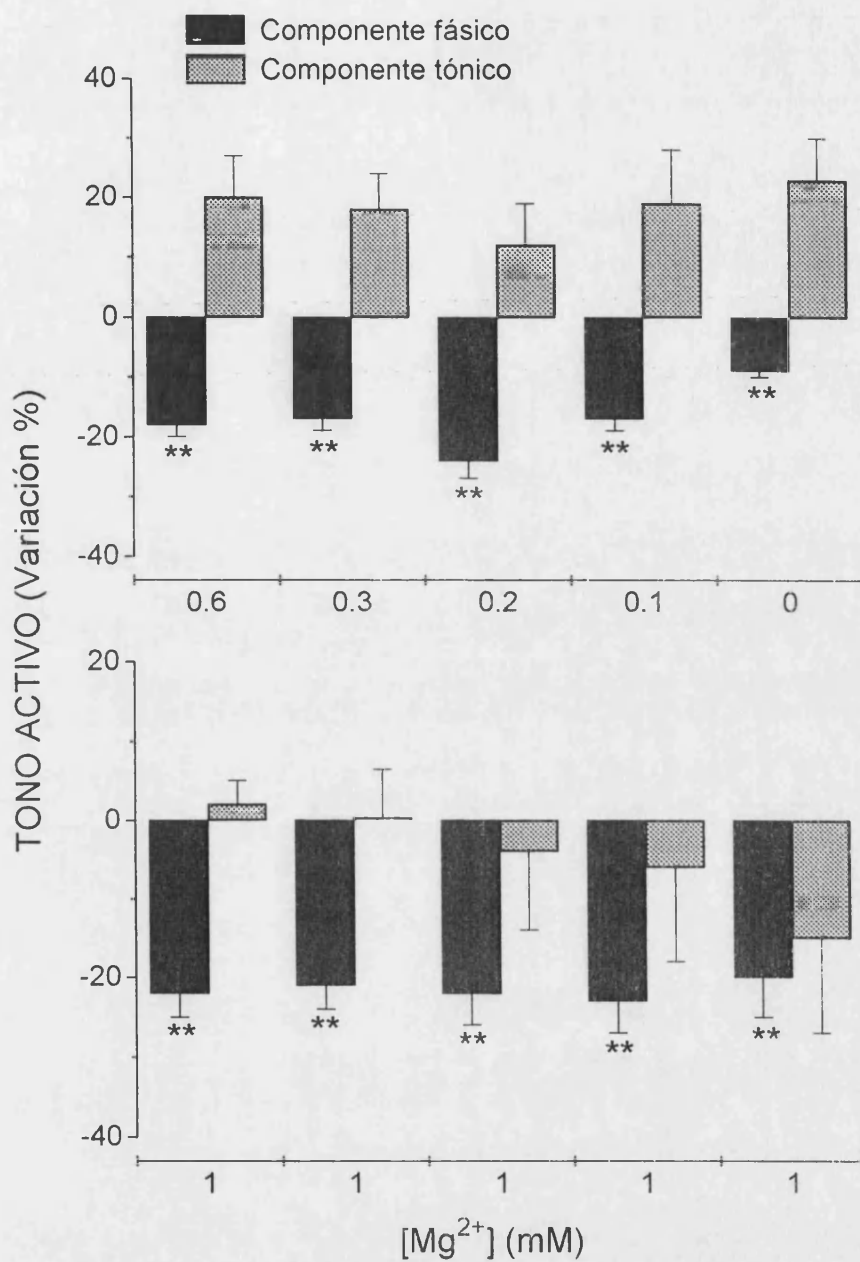


Figura 9.- Registro representativo del efecto de la sustitución secuencial del medio de incubación con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ , sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra sometidos a tono pasivo.



**Figura 10.-** Registro representativo del efecto de la sustitución secuencial del medio de incubación normal (1 mM  $Mg^{2+}$ ) por medios con concentraciones decrecientes de  $Mg^{2+}$ , sobre un segmento de arteria cerebral media de cabra precontraído con prostaglandina  $F_{2\alpha}$   $10^{-5}$  M (arriba). El registro inferior corresponde al trazado de un segmento sometido a las mismas condiciones pero en el que la concentración de  $Mg^{2+}$  se mantiene constante en todos y cada uno de los cambios (control).

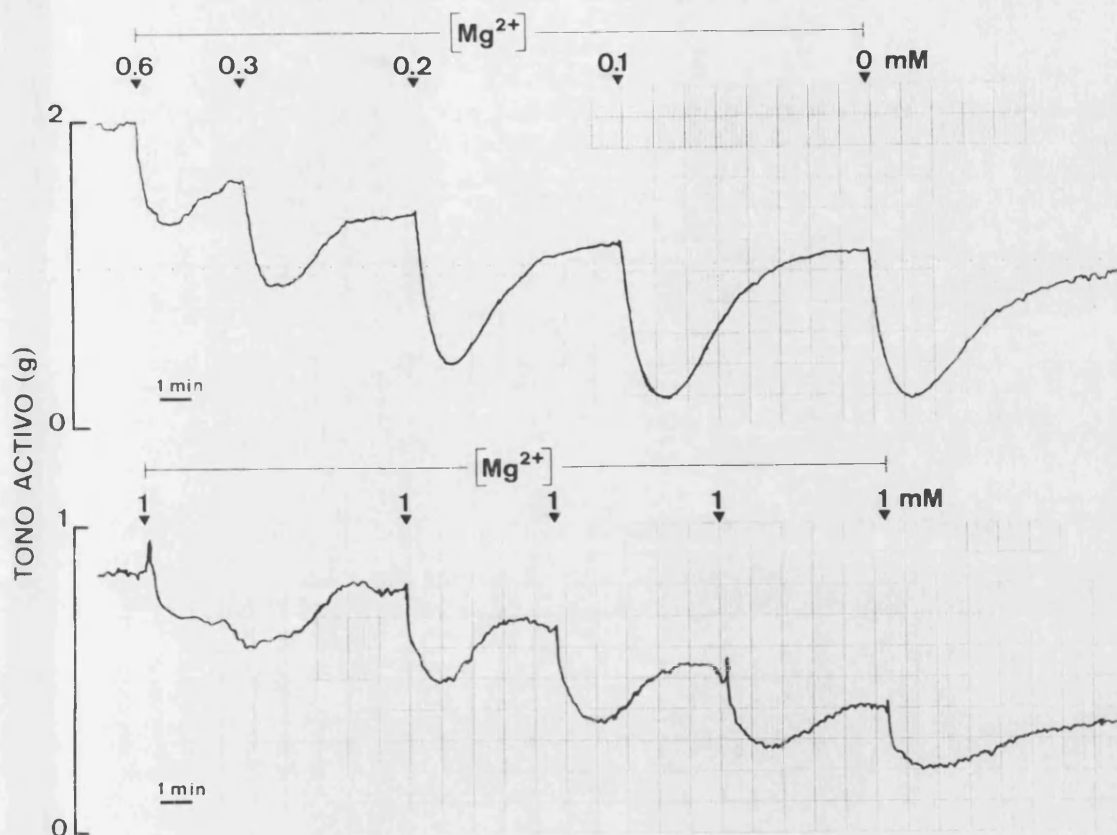




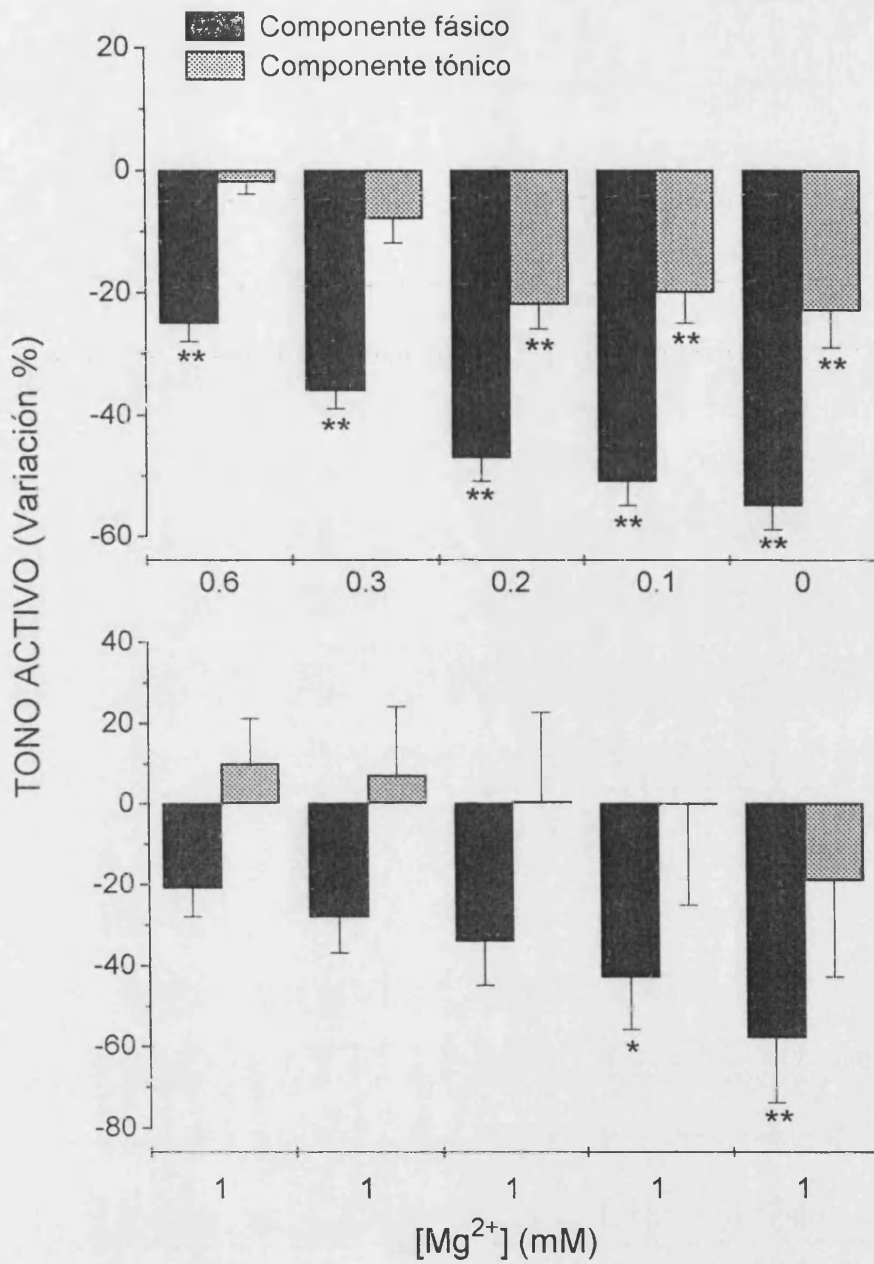
**Figura 11.-** Efecto de la sustitución secuencial del medio de incubación normal (1 mM  $Mg^{2+}$ ) por medios con concentraciones decrecientes (arriba) e iguales (abajo), sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra precontraídos con prostaglandina  $F_{2\alpha}$   $10^{-5}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de los valores obtenidos en 30 segmentos arteriales.

\*\* Significativamente menor que el control,  $p < 0.01$ .





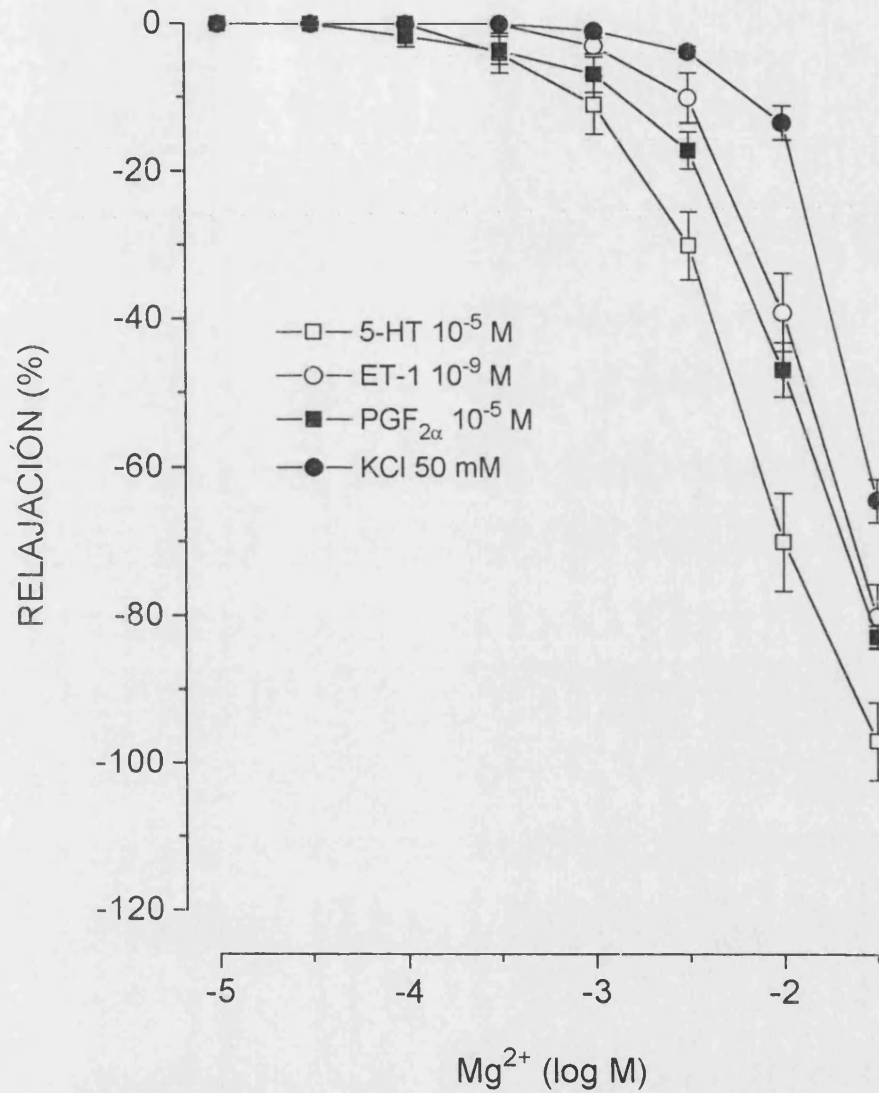
**Figura 12.-** Registro representativo del efecto de la sustitución secuencial del medio de incubación normal (1 mM  $Mg^{2+}$ ) por medios con concentraciones decrecientes de  $Mg^{2+}$ , sobre un segmento de arteria cerebral media de cabra precontraído con endotelina-1  $10^{-9}$  M (arriba). El registro inferior corresponde al trazado de un segmento sometido a las mismas condiciones pero en el que la concentración de  $Mg^{2+}$  se mantiene constante en todos y cada uno de los cambios (control).



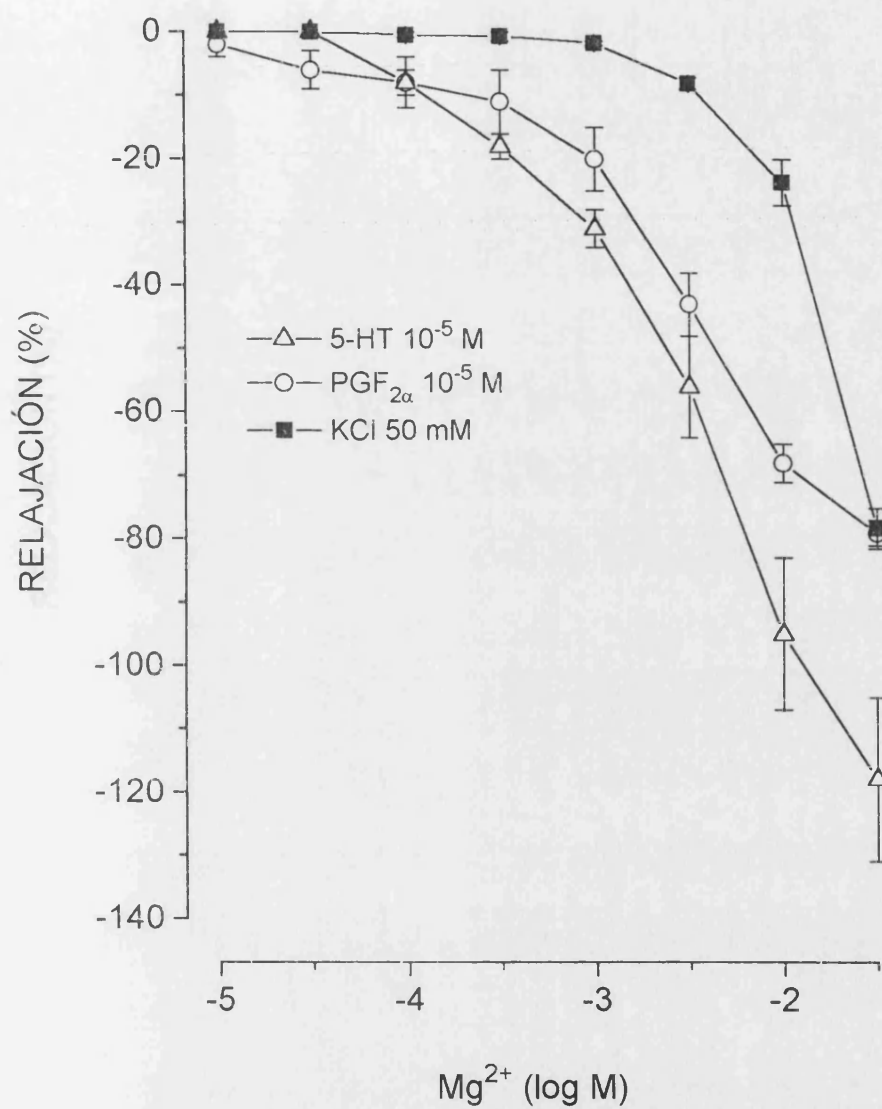
**Figura 13.-** Efecto de la sustitución secuencial del medio de incubación normal (1 mM Mg<sup>2+</sup>) por medios con concentraciones decrecientes (arriba) e iguales (abajo), sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra precontraídos con endotelina-1 10<sup>-9</sup> M. Los datos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 27 segmentos arteriales.

\* Significativamente menor que el control, p<0.05.

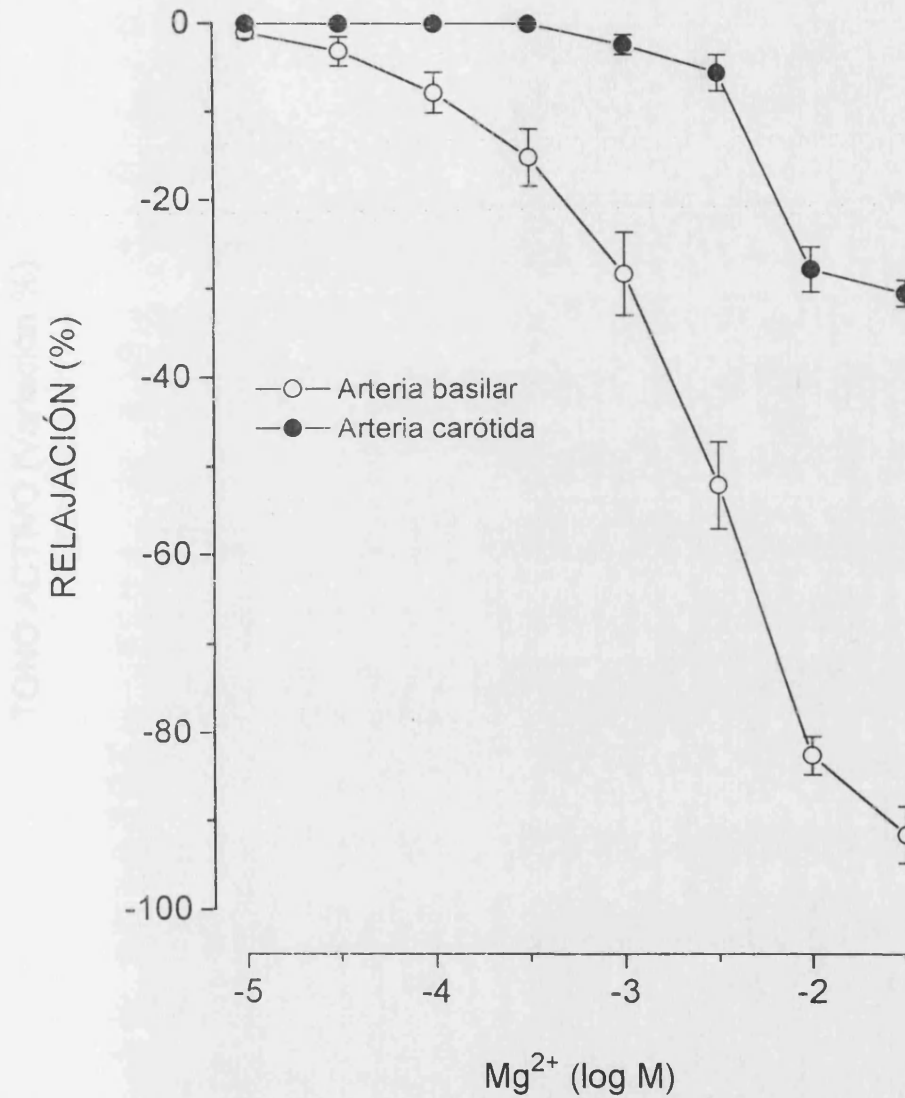
\*\* Significativamente menor que el control, p<0.01.



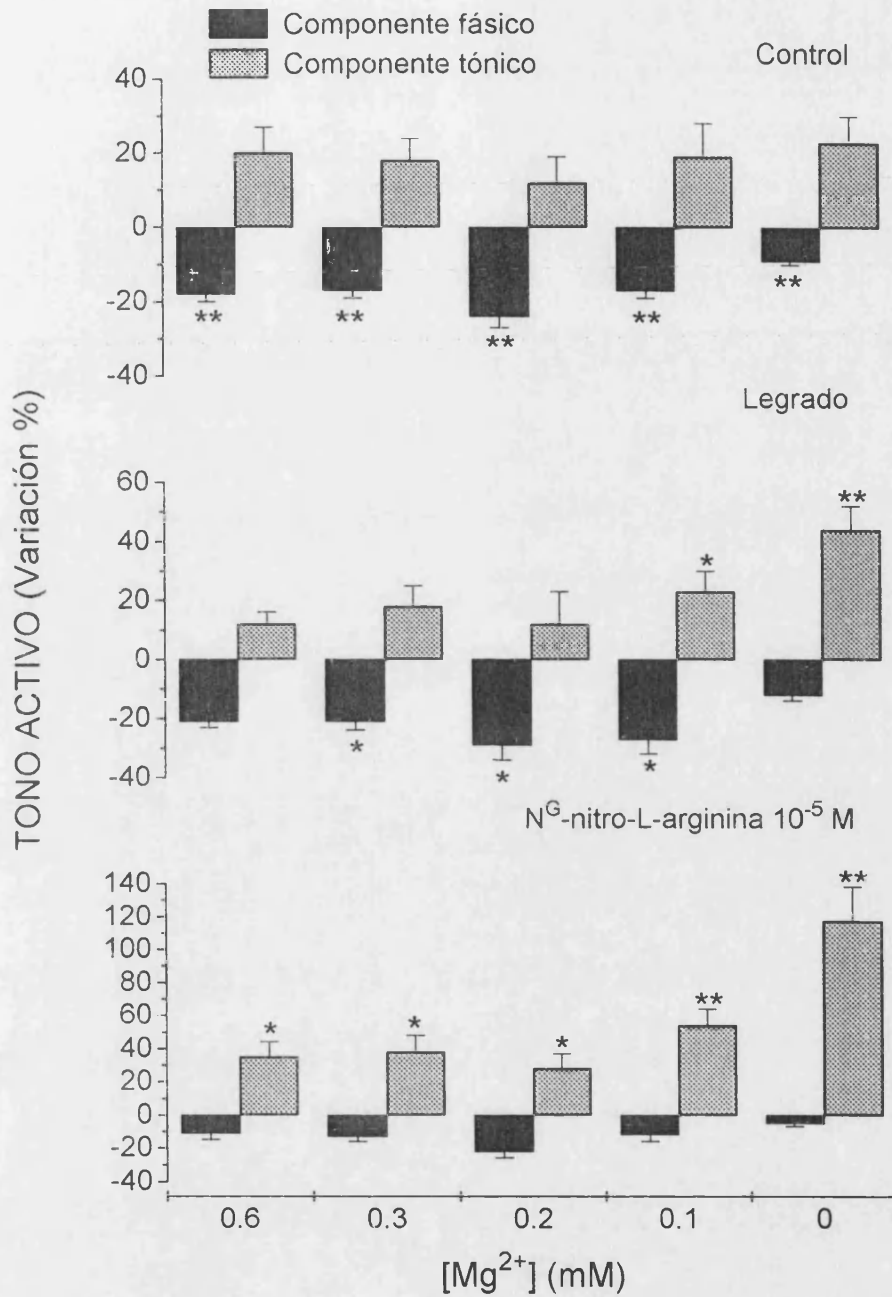
**Figura 14.-** Curvas concentración-respuesta de Mg<sup>2+</sup> sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra en medio libre de Mg<sup>2+</sup>, precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT), endotelina-1 (ET-1), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) o KCl. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media±EEM.



**Figura 15.-** Curvas concentración-respuesta de Mg<sup>2+</sup> sobre segmentos de ramas de arteria cerebral media humana en medio libre de Mg<sup>2+</sup>, precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) o KCl. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media±EEM.



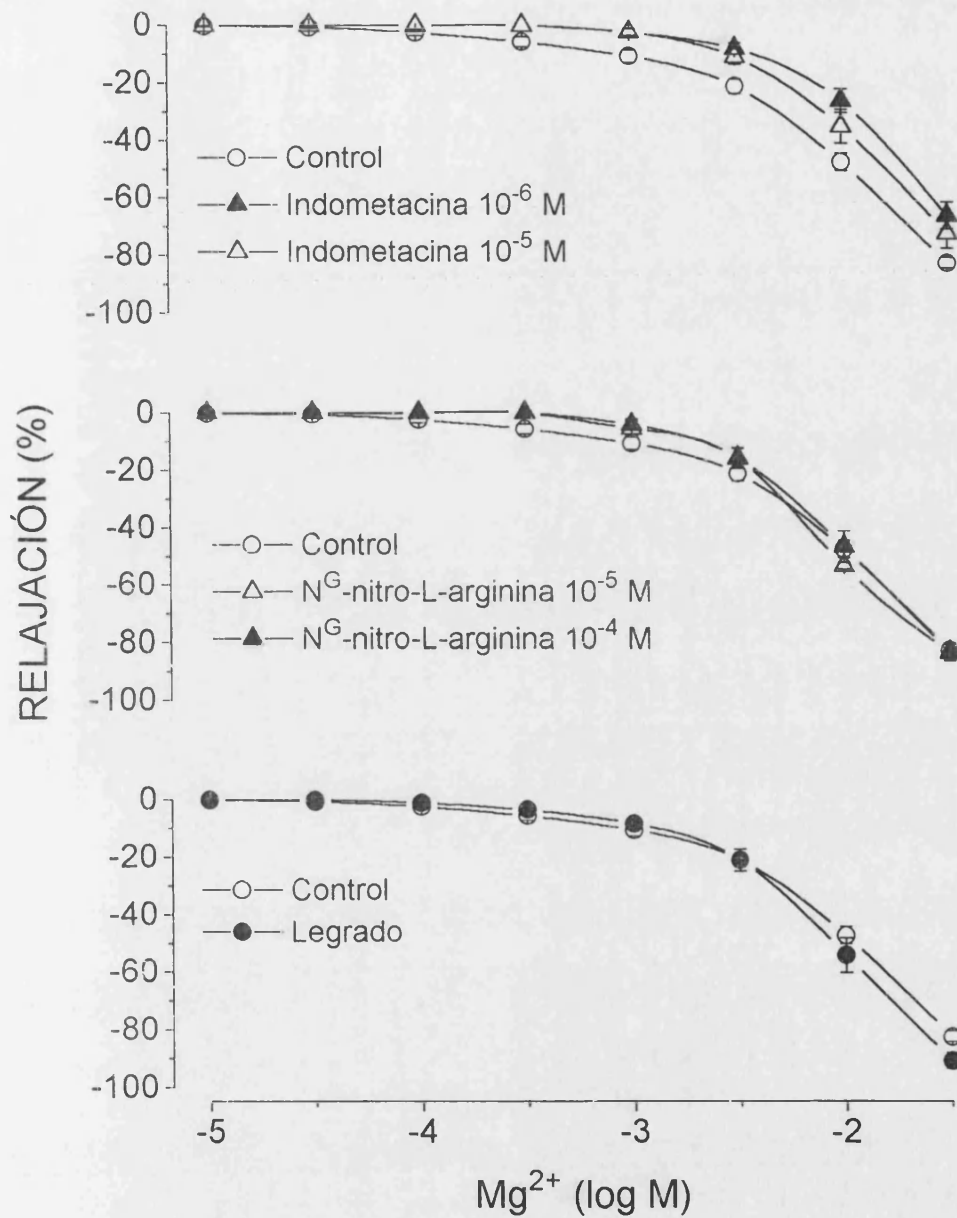
**Figura 16.-** Curvas concentración-respuesta de Mg<sup>2+</sup> sobre segmentos de arteria basilar y carótida de conejo en medio libre de Mg<sup>2+</sup>, precontraídos con endotelina-1 10<sup>-8</sup> M. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media±EEM.



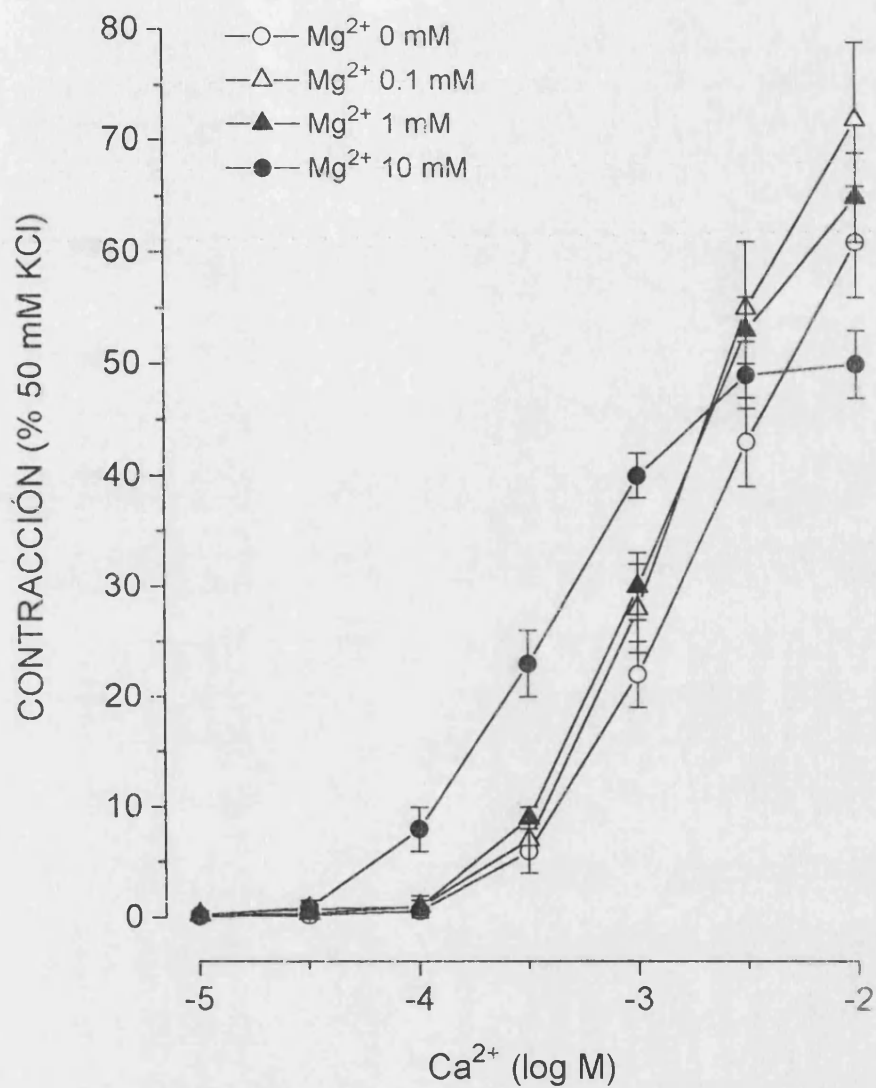
**Figura 17.-** Efecto de la sustitución secuencial del medio de incubación normal (1 mM Mg<sup>2+</sup>) por medios con concentraciones decrecientes de Mg<sup>2+</sup>, sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra precontraídos con prostaglandina F<sub>2α</sub> 10<sup>-5</sup> M (control) y sometidos a eliminación mecánica del endotelio (legrado) e incubación con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina. Los datos representan la media±EEM de los valores obtenidos en 30 (control), 8 (legrado) y 11 (incubación con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina) segmentos arteriales.

\* Estadísticamente significativo, p<0.05.

\*\* Estadísticamente significativo, p<0.01.

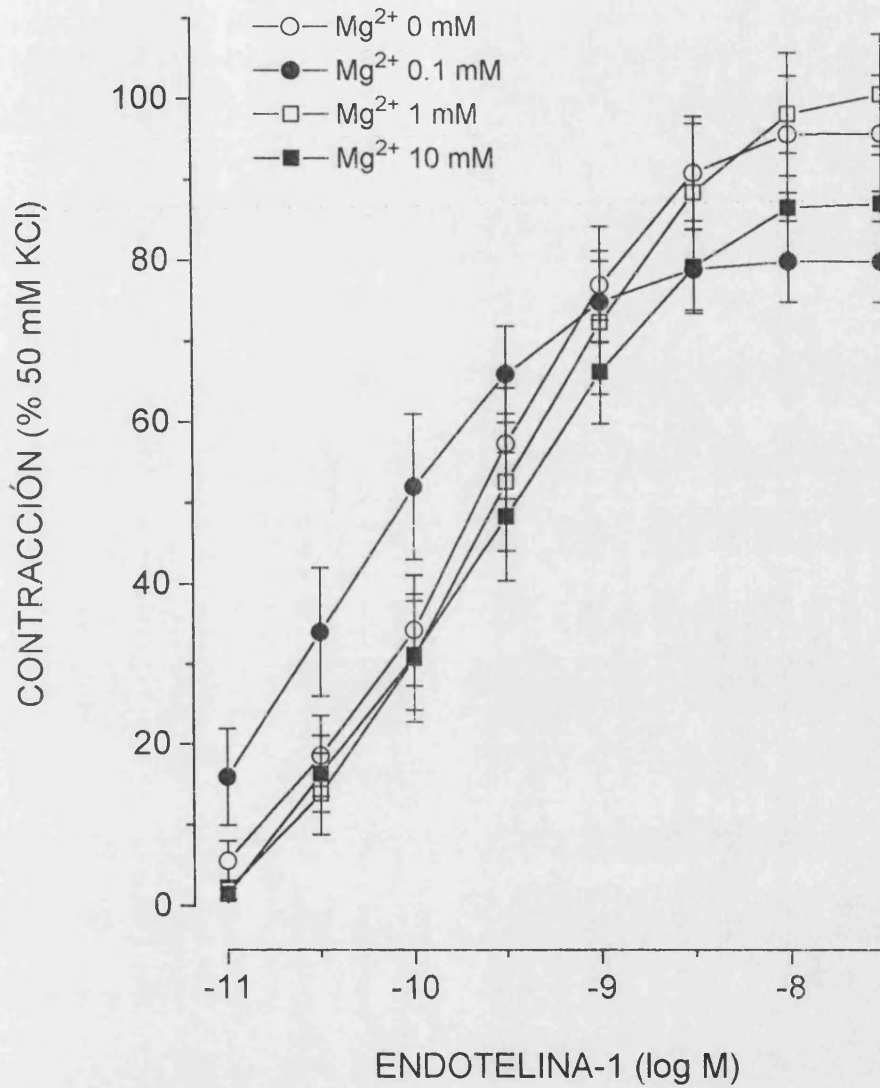


**Figura 18.-** Curvas concentración-respuesta de Mg<sup>2+</sup> sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra precontraídos con prostaglandina F<sub>2α</sub> 10<sup>-5</sup> M durante incubación con indometacina, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina o eliminación mecánica del endotelio (legrado). Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media±EEM.

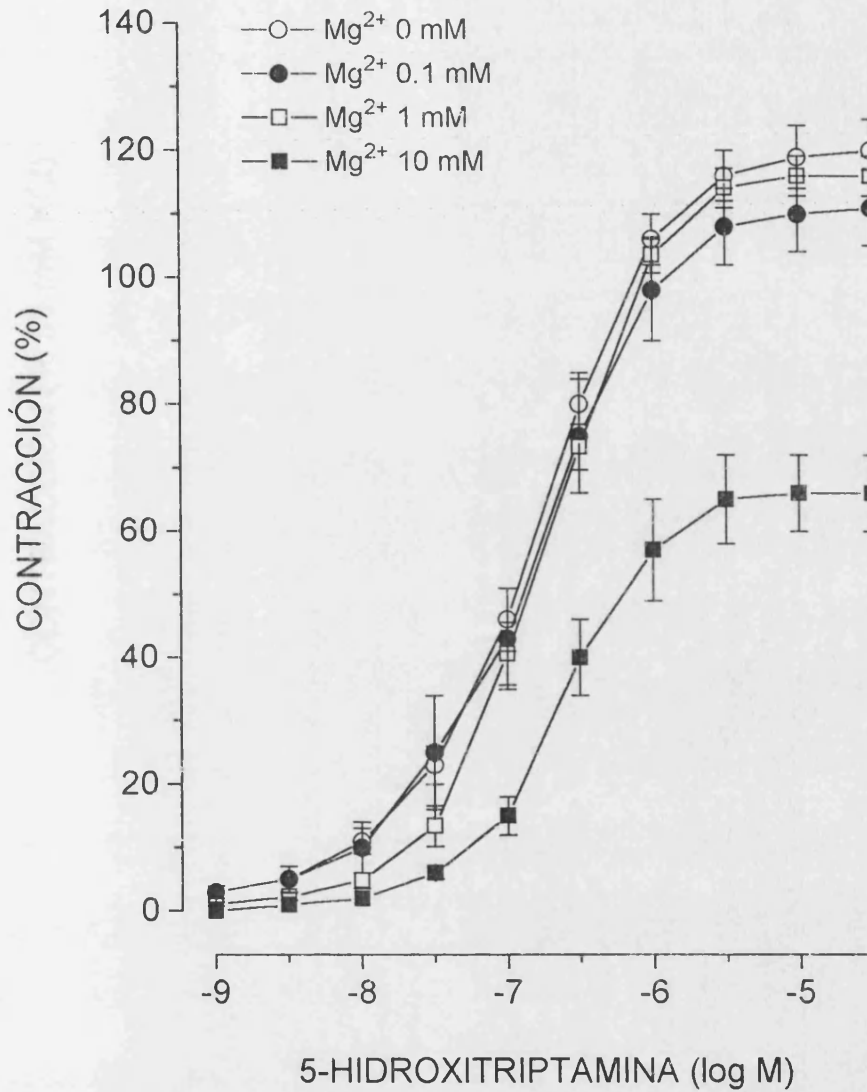


**Figura 19.-** Curvas concentración-respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra incubados en medio despolarizante libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , conteniendo distintas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$ . Los datos se expresan como porcentaje de la contracción provocada previamente por KCl 50 mM y representan la media  $\pm$  EEM.

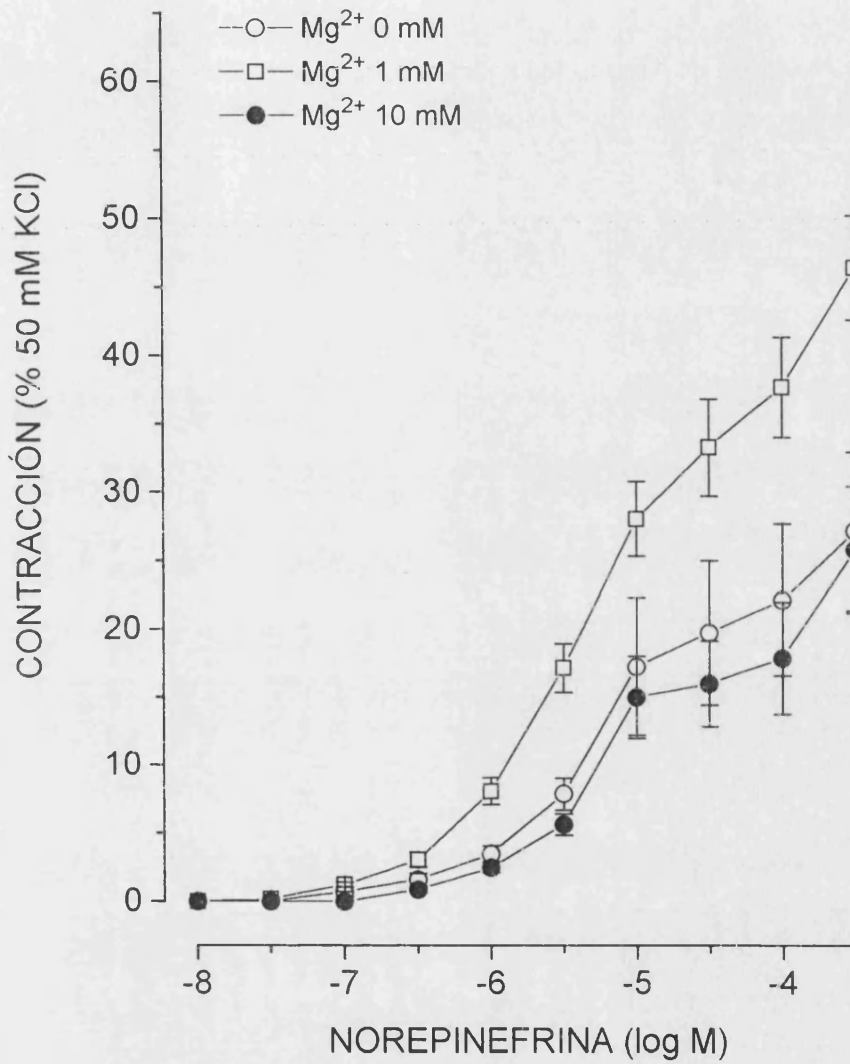




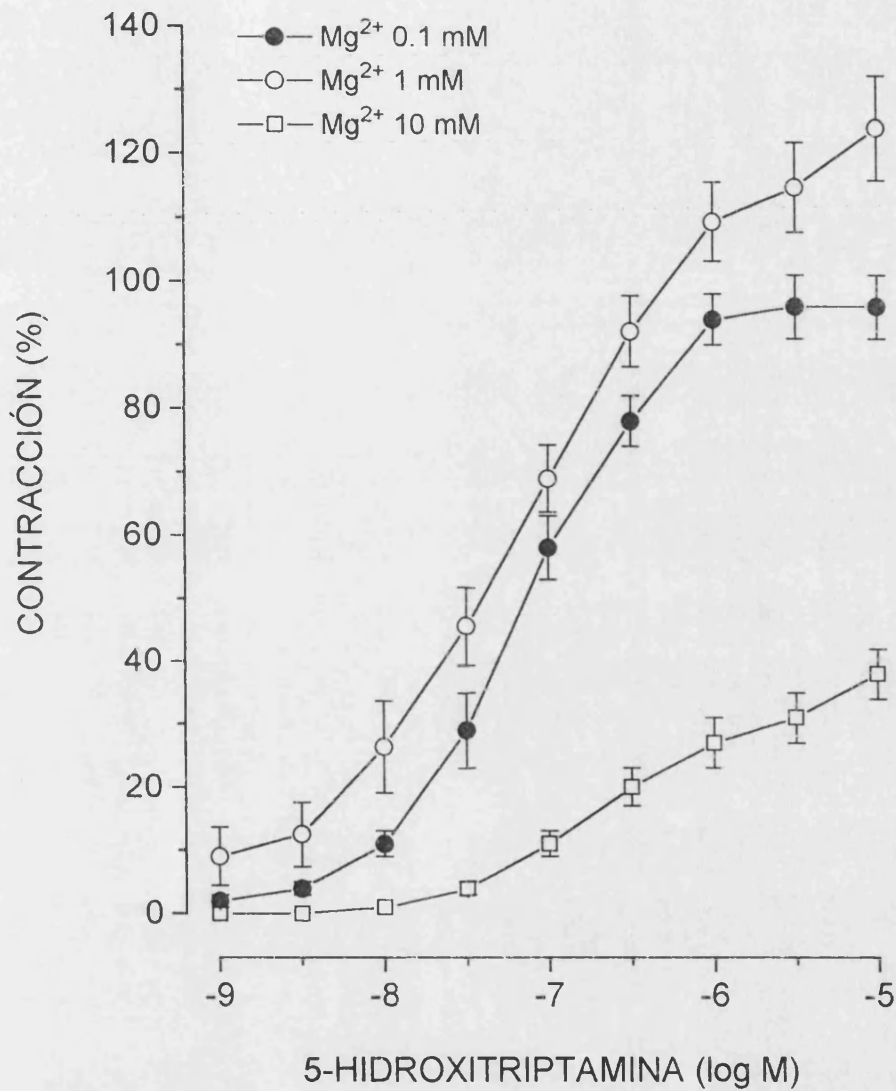
**Figura 20.-** Curvas concentración-respuesta de endotelina-1 sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra incubados en medios conteniendo distintas concentraciones de Mg<sup>2+</sup>. Los datos se expresan como porcentaje de la contracción provocada previamente por KCl 50 mM y representan la media±EEM.



**Figura 21.-** Curvas concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra incubados en medios conteniendo distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Los datos se expresan como porcentaje del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control y representan la media  $\pm$  EEM.

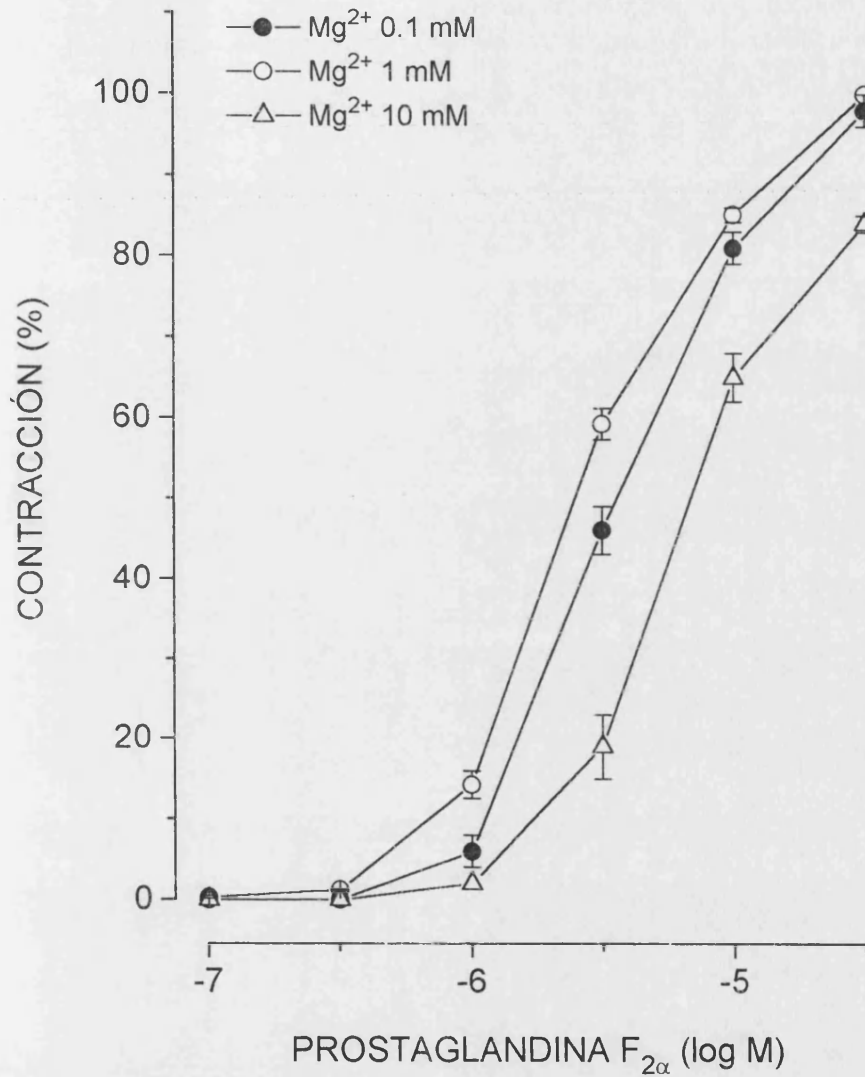


**Figura 22.-** Curvas concentración-respuesta de norepinefrina sobre segmentos de arteria cerebral media de cabra incubados en medios conteniendo distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Los datos se expresan como porcentaje de la contracción provocada previamente por KCl 50 mM y representan la media±EEM.

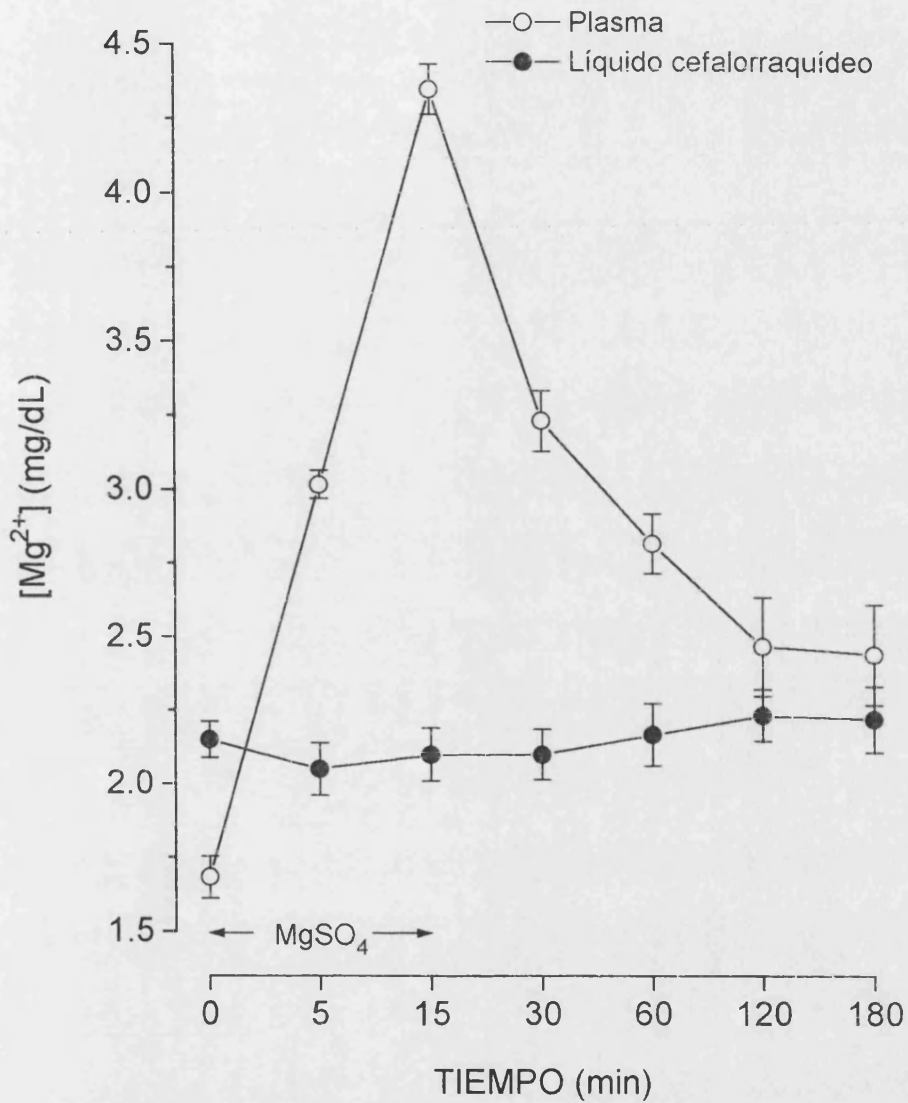


**Figura 23.-** Curvas concentración-respuesta de 5-hidroxitriptamina sobre segmentos de ramas de arteria cerebral media humana incubados en medios conteniendo distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Los datos se expresan como porcentaje del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control y representan la media  $\pm$  EEM.

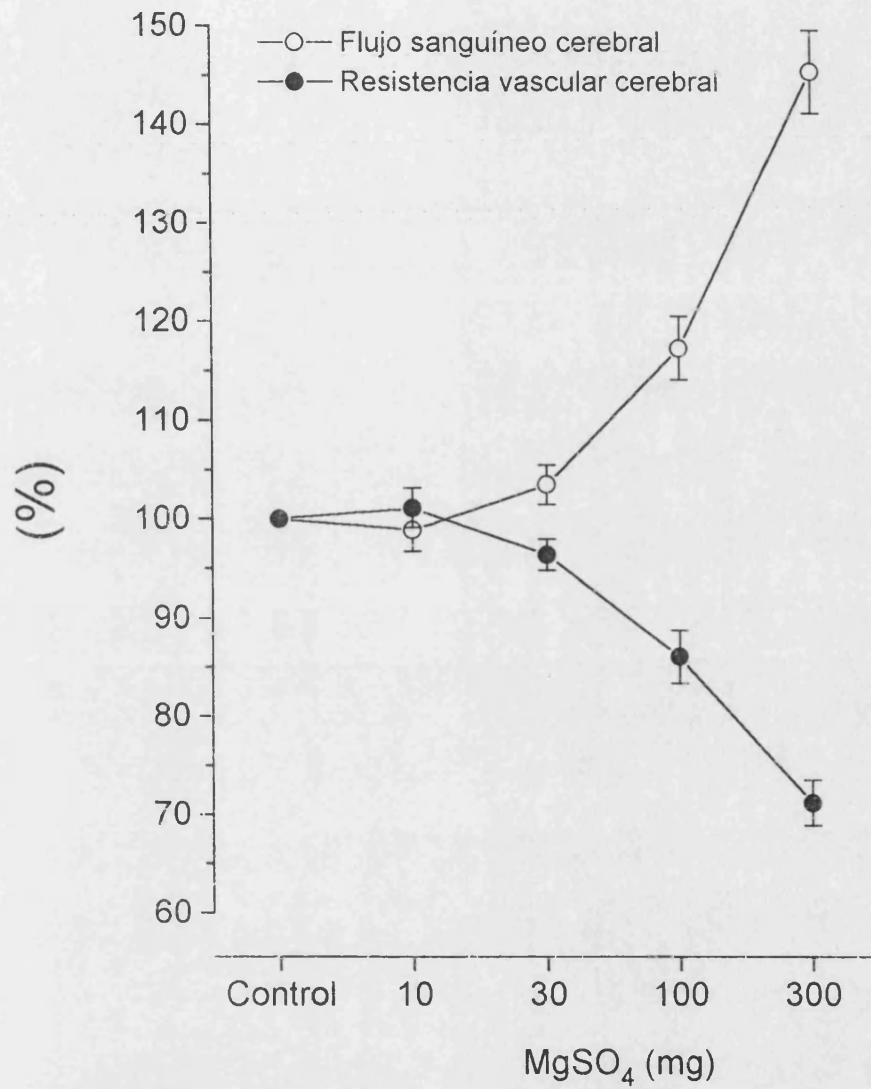




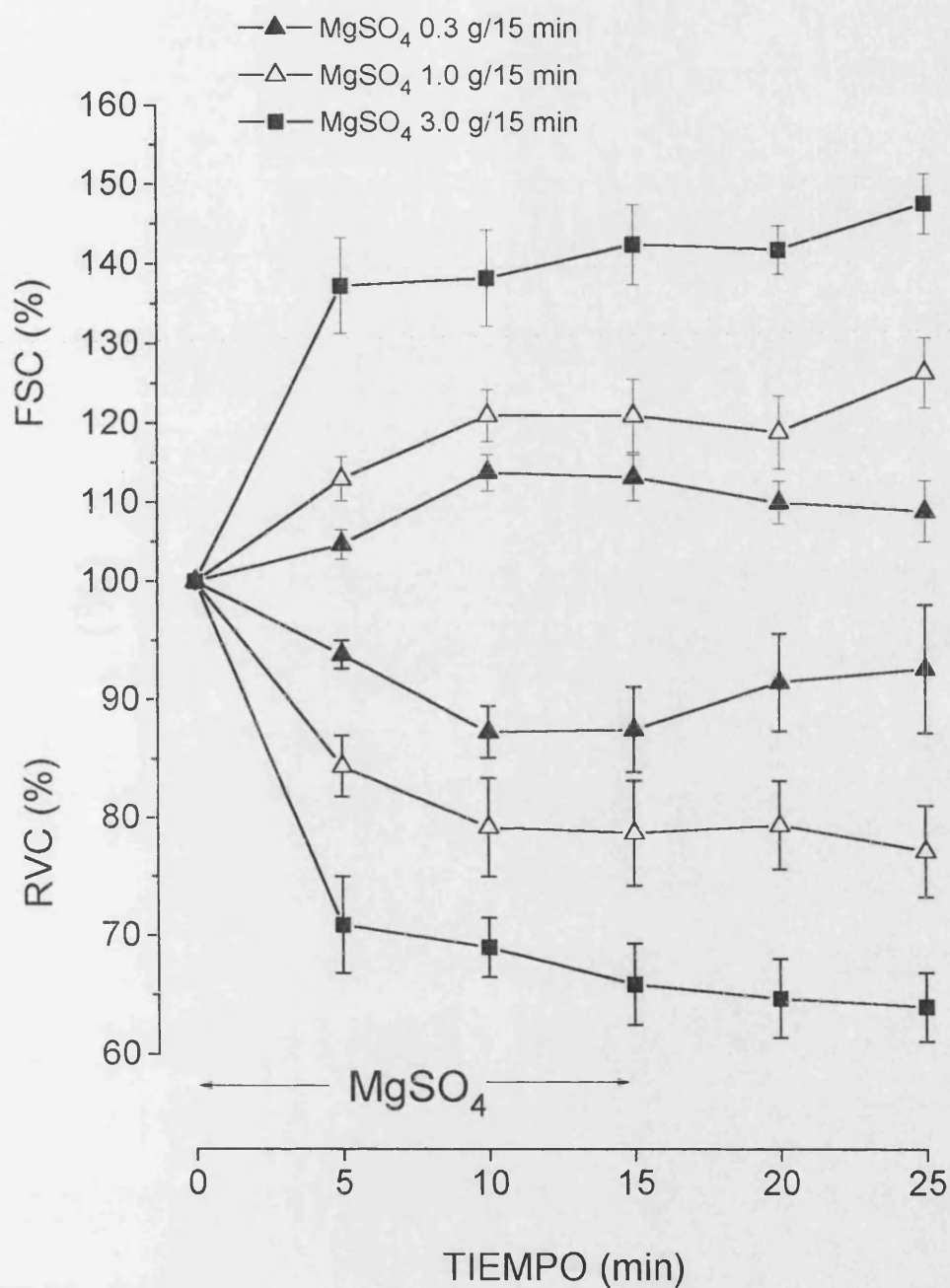
**Figura 24.-** Curvas concentración-respuesta de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  sobre segmentos de ramas de arteria cerebral media humana incubados en medios conteniendo distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Los datos se expresan como porcentaje del efecto máximo alcanzado en la correspondiente curva control y representan la media  $\pm$  EEM.



**Figura 25.-** Evolución temporal de los niveles de  $Mg^{2+}$  en plasma y líquido cefalorraquídeo tras administración de sulfato magnésico (3 g/15 min, vía intravenosa) en cabras anestesiadas. Los valores representan la media $\pm$ EEM.

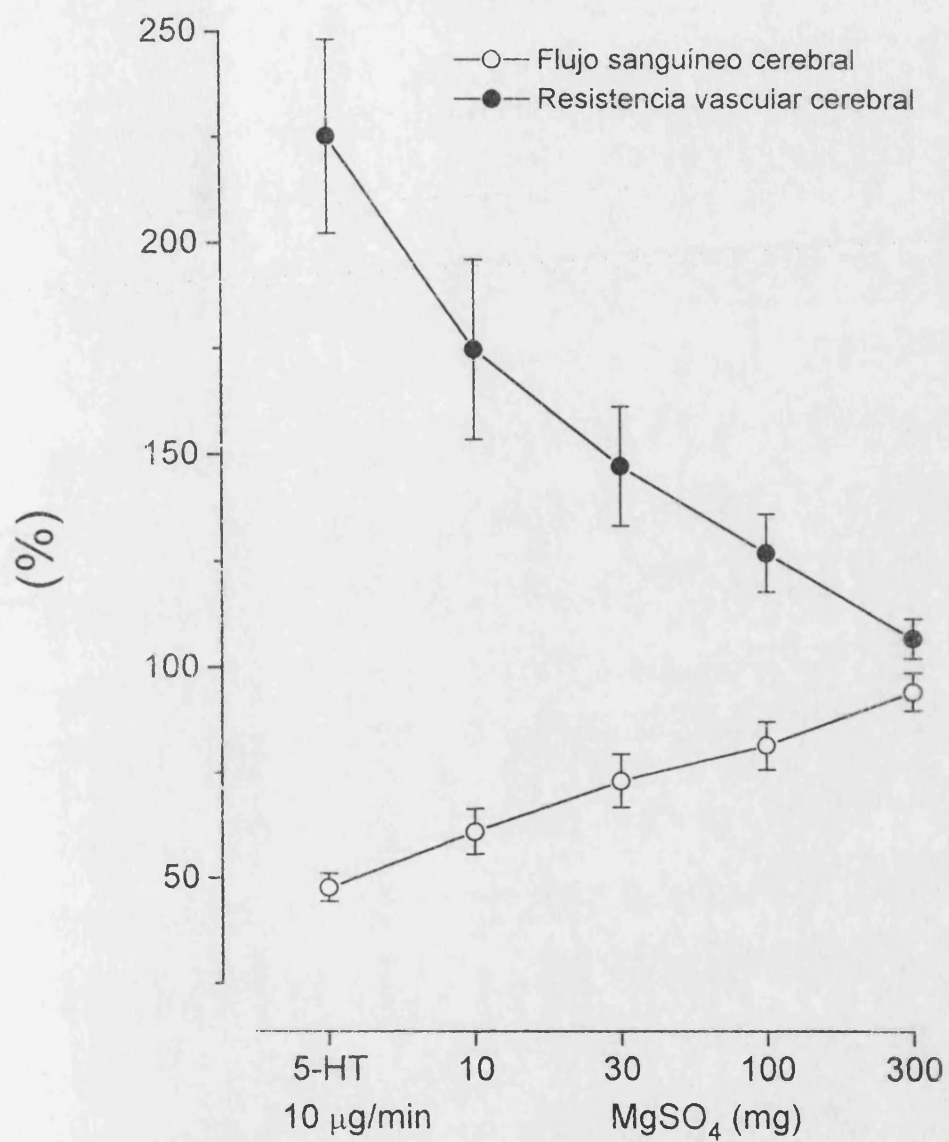


**Figura 26.-** Curvas dosis-respuesta de la administración intraarterial de dosis crecientes de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ ) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiadas. Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media  $\pm$  EEM.

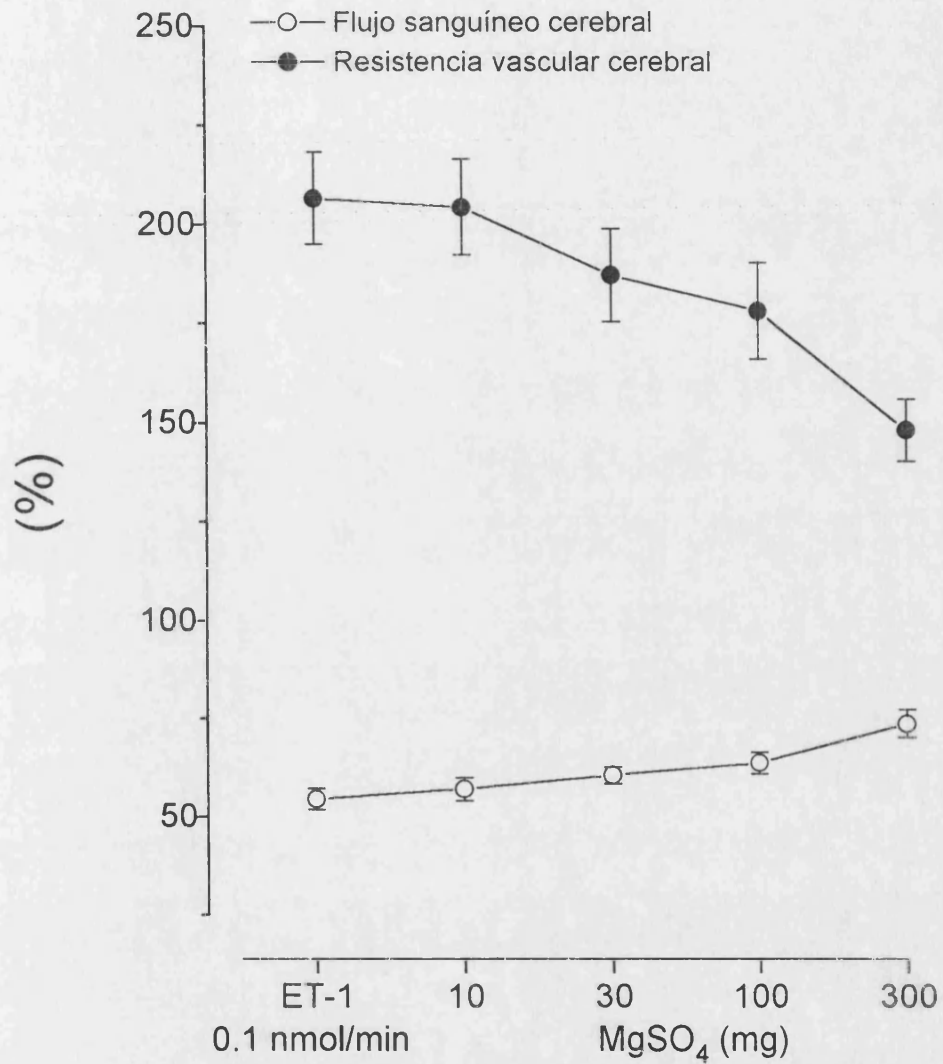


**Figura 27.-** Efecto de la infusión intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ ) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC) y resistencia vascular cerebral (RVC) en cabras sin anestésicar. Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media $\pm$ EEM.

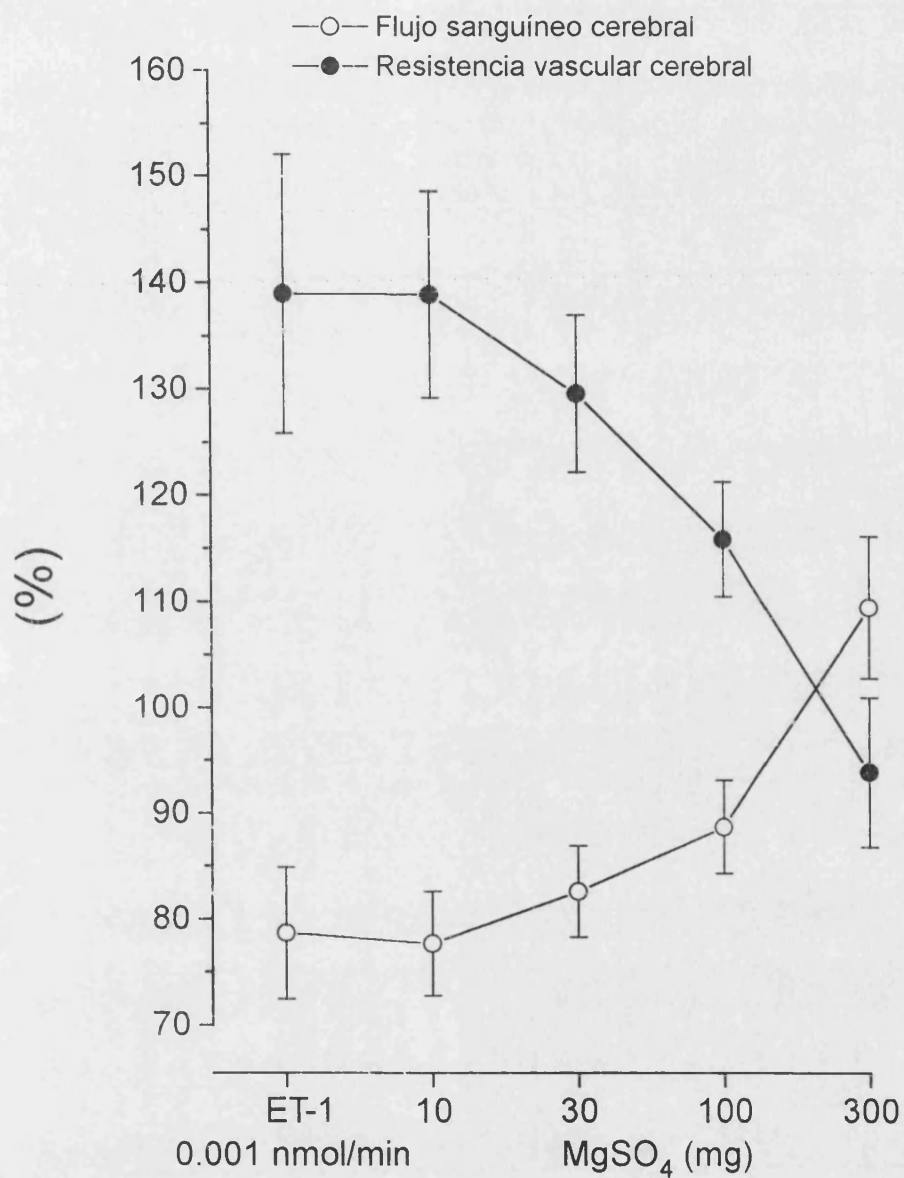




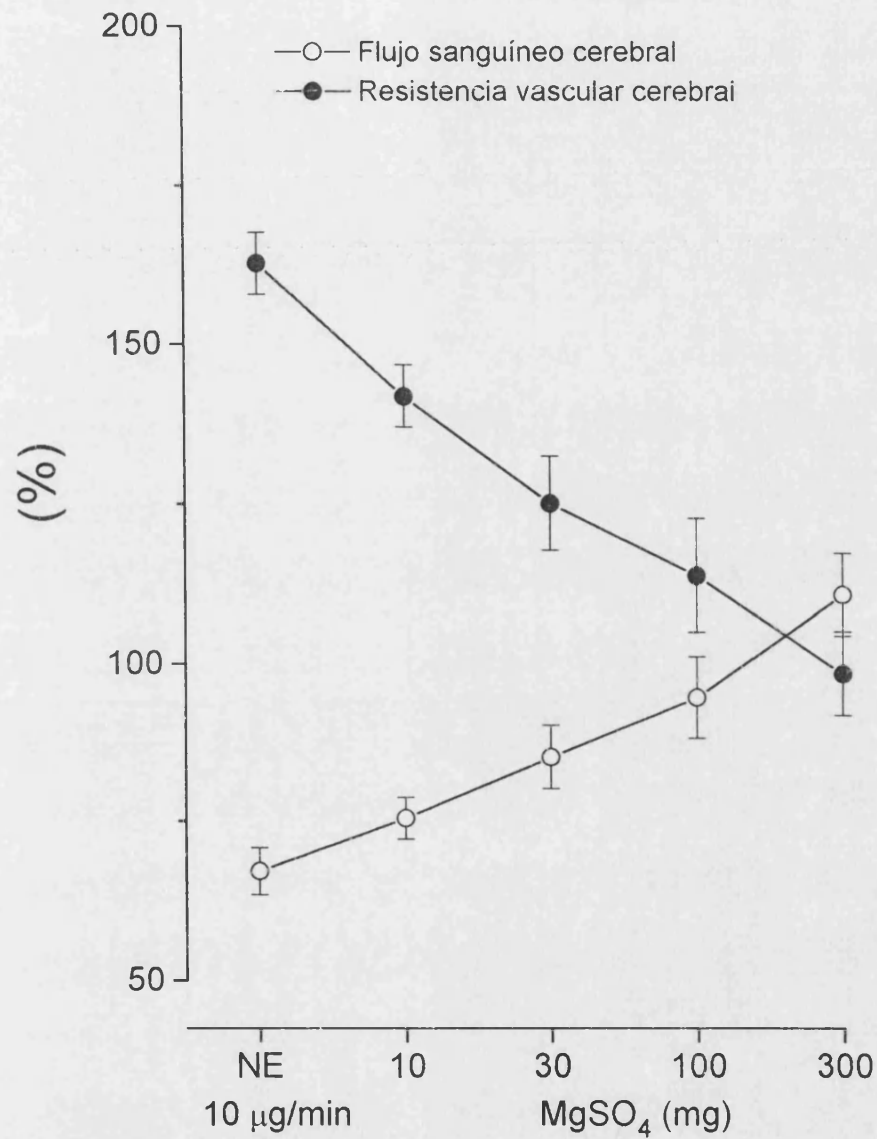
**Figura 28.-** Curvas dosis-respuesta de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ ) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiadas, a las que se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de 5-hidroxitriptamina (5-HT). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media  $\pm$  EEM.



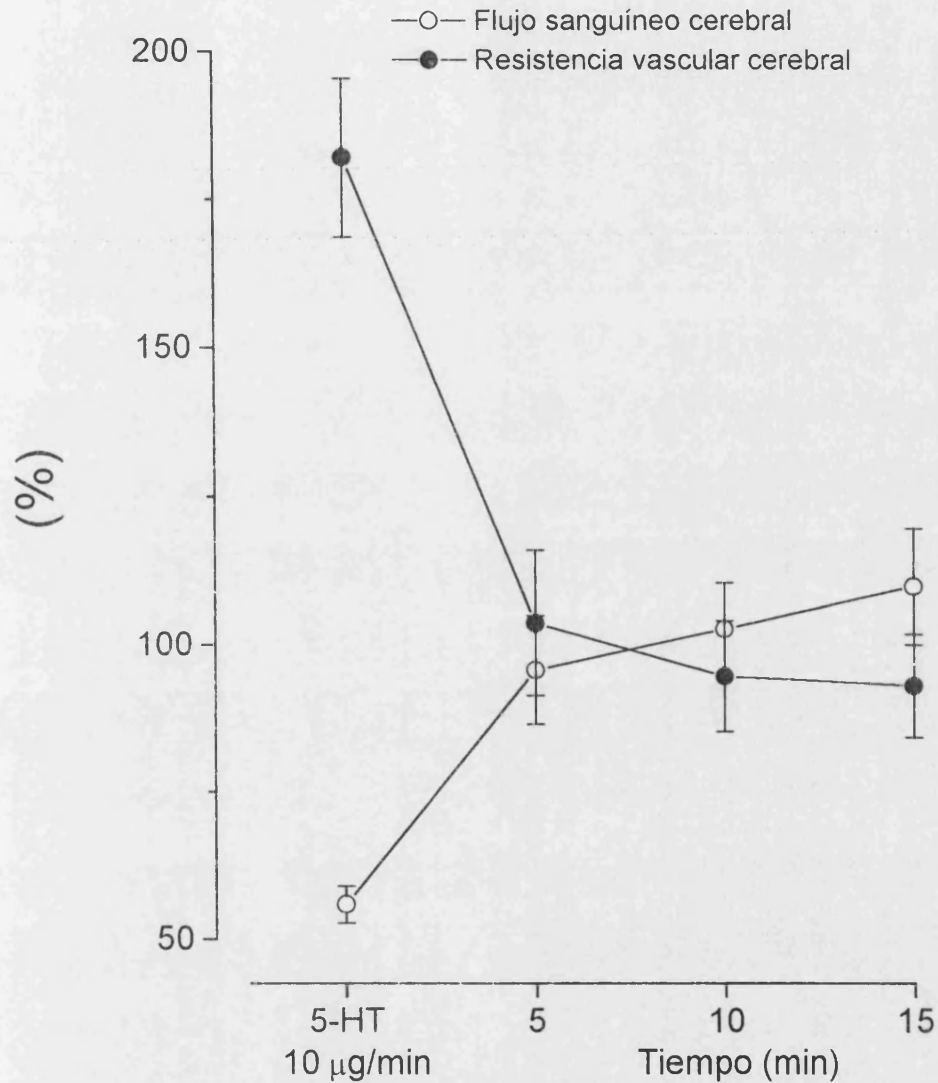
**Figura 29.-** Curvas dosis-respuesta de la administración intraarterial de sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiadas, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de endotelina-1 (ET-1). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media±EEM.



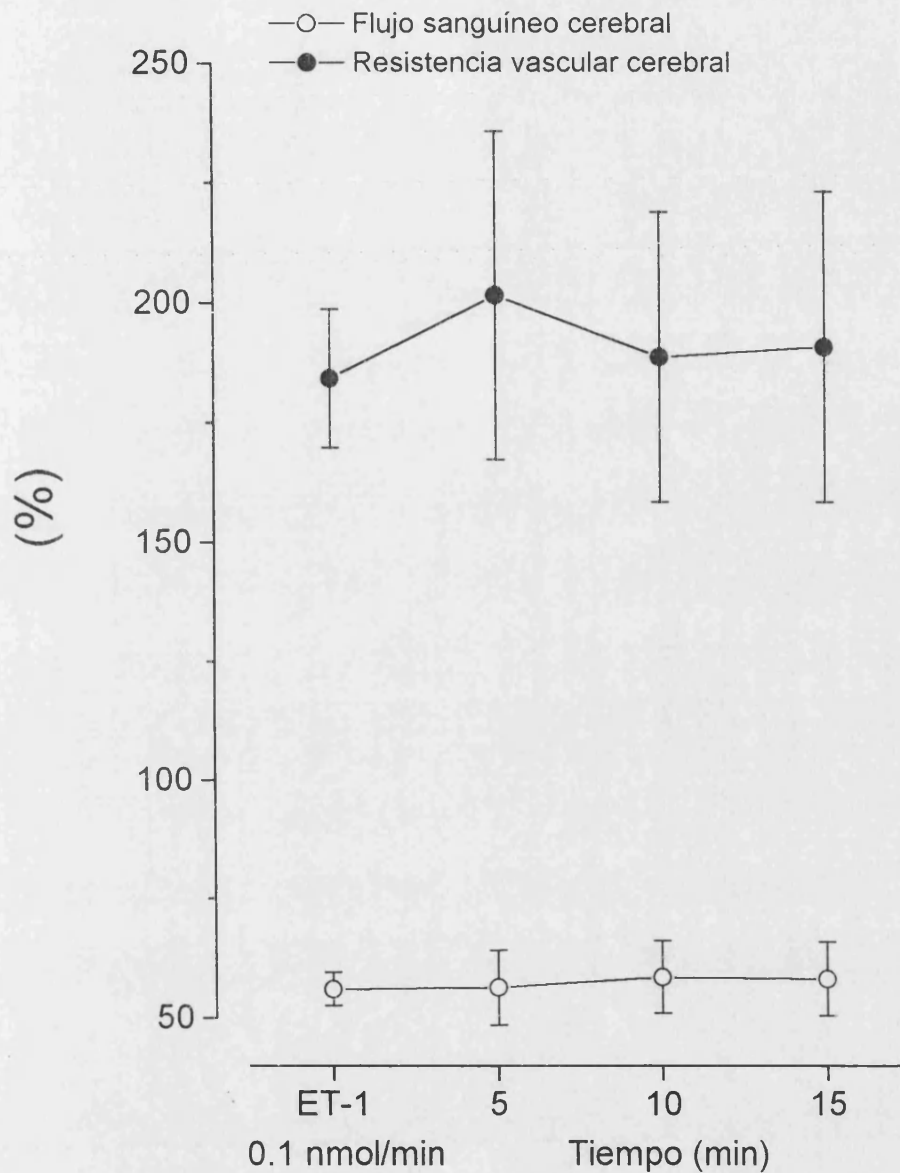
**Figura 30.-** Curvas dosis-respuesta de la administración intraarterial de sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de endotelina-1 (ET-1). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media±EEM.



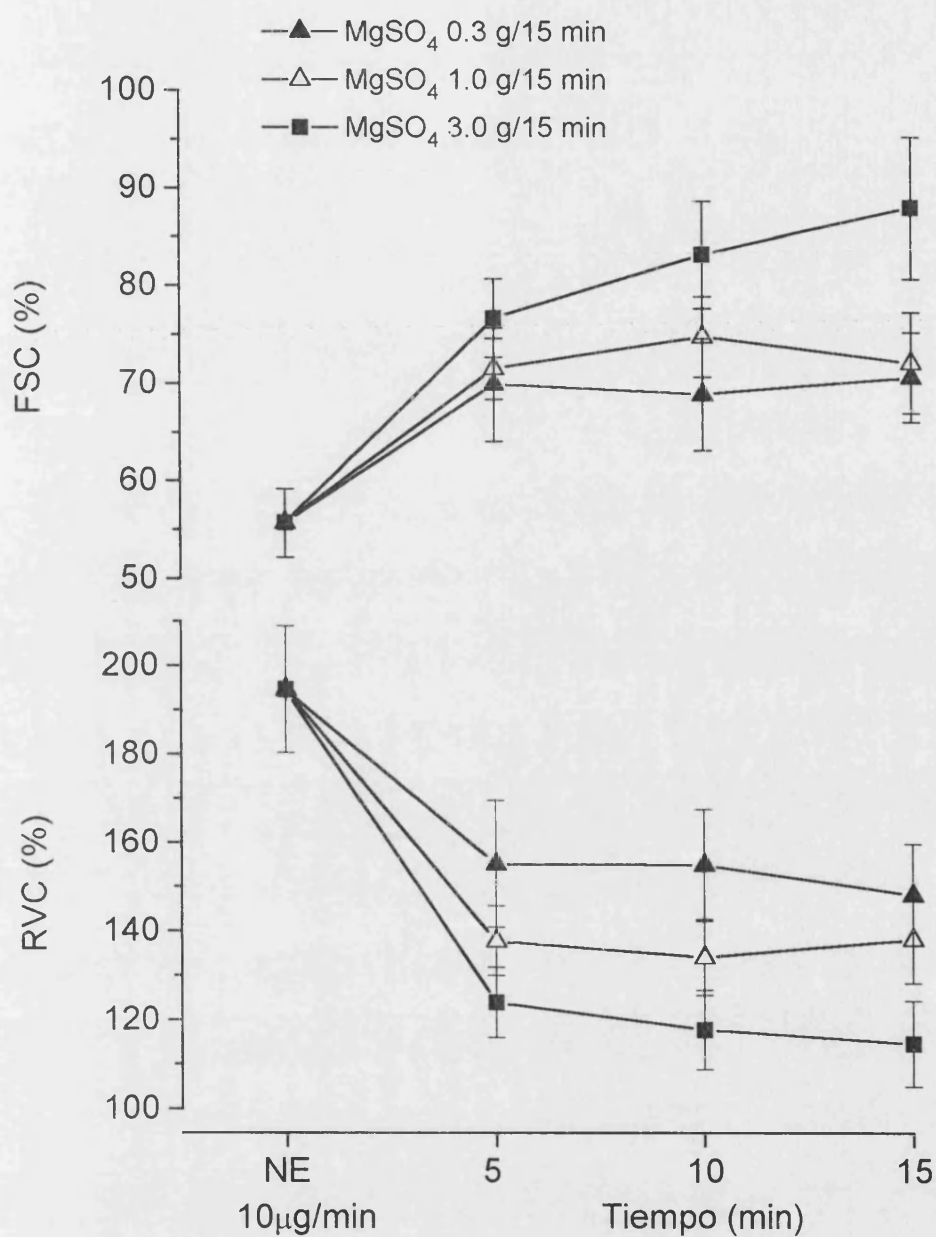
**Figura 31.-** Curvas dosis-respuesta de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ ) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC) y resistencia vascular cerebral (RVC) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de norepinefrina (NE). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media $\pm$ EEM.



**Figura 32.-** Efecto de la infusión continua intravenosa de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ ) (3 g/15 min) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de 5-hidroxitriptamina (5-HT). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media  $\pm$  EEM.

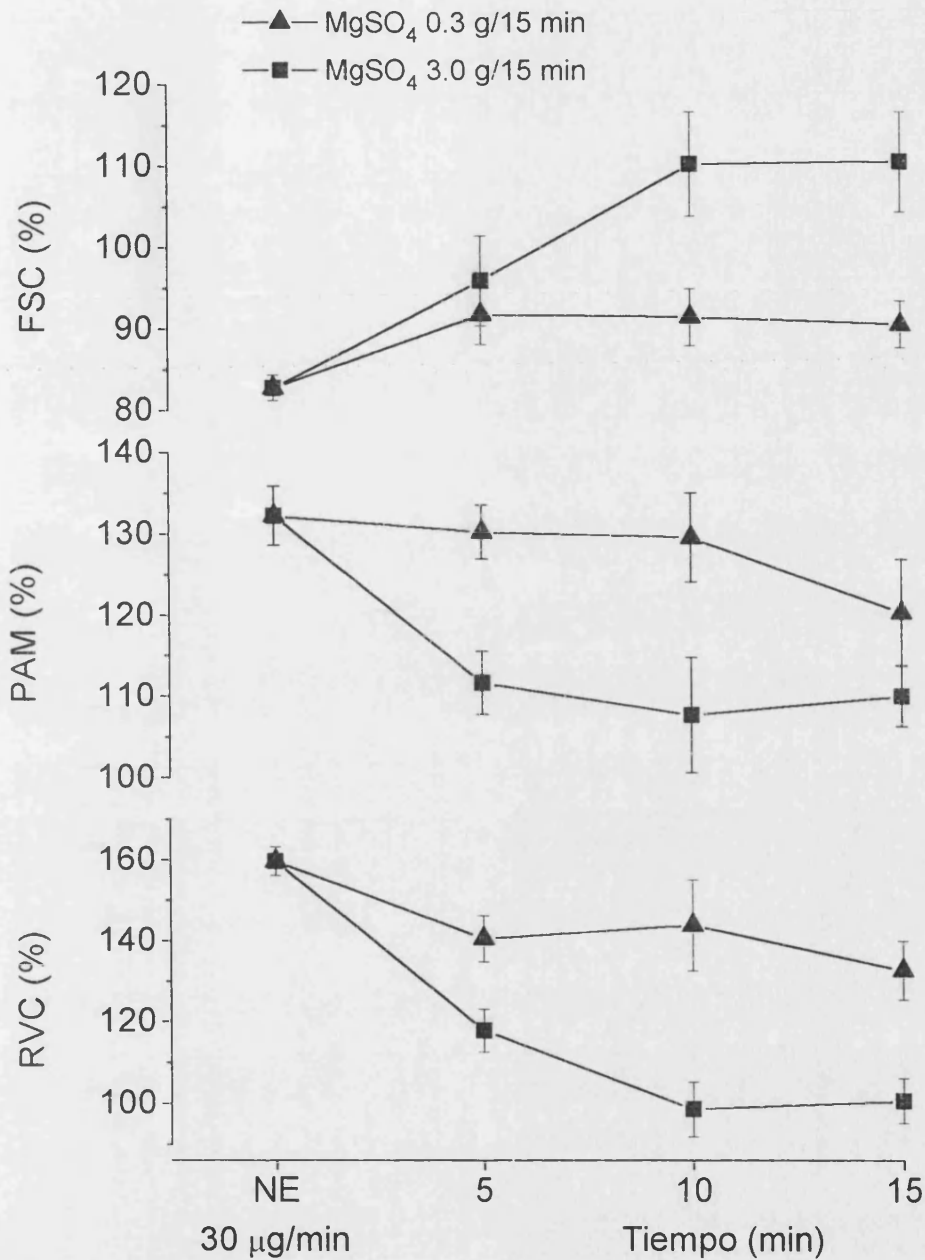


**Figura 33.-** Efecto de la infusión continua intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ ) (3 g/15 min) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiadas, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de endotelina-1 (ET-1). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media  $\pm$  EEM.



**Figura 34.-** Efecto de la infusión continua intravenosa de sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>) sobre flujo sanguíneo cerebral y resistencia vascular cerebral en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de norepinefrina (NE). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media ± EEM.





**Figura 35.-** Efecto de la infusión continua intravenosa de sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), presión arterial media (PAM) y resistencia vascular cerebral (RVC) en cabras sin anestesiadas, a las cuales se les ha inducido previamente vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intravenosa de norepinefrina (NE). Los datos se expresan porcentualmente respecto de los correspondientes valores control y representan la media ± EEM.



## ***6.- TABLAS***

**Tabla 1.-** Valores de concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) de  $Mg^{2+}$  en arteria cerebral media de cabra, basilar y carótida de conejo, y ramas de cerebral media humana precontraídas con 5-hidroxitriptamina (5-HT), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), endotelina-1 (ET-1) ó KCl.

Espece	Arteria	Estímulo	$CE_{50}$ (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	n
Cabra	Cerebral media	5-HT	$5.2(3.7-7.4)\times 10^{-3}$	$-97\pm 5.2$	8
		ET-1	$1.0(0.8-1.3)\times 10^{-2}$	$-80\pm 4.4$	8
		$PGF_{2\alpha}$	$7.2(5.0-10.4)\times 10^{-3}$	$-83\pm 1.5$	21
		KCl	$1.5(1.3-1.8)\times 10^{-2}^a$	$-64\pm 2.9^b$	11
Conejo	Basilar	ET-1	$1.8(1.3-2.7)\times 10^{-3}^e$	$-87\pm 1.8$	23
	Carótida	ET-1	$5.0(3.6-6.9)\times 10^{-3}^c$	$-30\pm 1.4^d$	6
Humano	Cerebral media	5-HT	$3.3(2.8-3.9)\times 10^{-3}$	$-118\pm 12.9^g$	10
		$PGF_{2\alpha}$	$3.4(2.1-5.7)\times 10^{-3}^f$	$-80\pm 1.8^b$	11
		KCl	$1.3(1.2-1.5)\times 10^{-2}^a$	$-77\pm 3.4^{b,h}$	11

Los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  se expresan como porcentaje del tono activo previo. Los valores de  $CE_{50}$  representan la media con sus límites de confianza del 95 % y los de  $E_{m\acute{a}x}$  representan la media $\pm$ EEM de los datos obtenidos en "n" segmentos arteriales.

<sup>a</sup> significativamente mayor que 5-HT y  $PGF_{2\alpha}$ ;  $p<0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente menor que 5-HT;  $p<0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que en basilar;  $p<0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente menor que en basilar;  $p<0.01$ .

<sup>e</sup> significativamente menor que el mismo estímulo en arteria cerebral media de cabra;  $p<0.01$ .

<sup>f</sup> significativamente menor que el mismo estímulo en arteria cerebral media de cabra;  $p<0.05$ .

<sup>g</sup> significativamente mayor que el mismo estímulo en arteria cerebral media de cabra;  $p<0.01$ .

<sup>h</sup> significativamente mayor que el mismo estímulo en arteria cerebral media de cabra;  $p<0.05$ .

**Tabla 2.-** Valores de concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) de  $Mg^{2+}$  en arteria cerebral media de cabra precontraída con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  durante incubación con indometacina,  $N^G$ -nitro-L-arginina y eliminación mecánica del endotelio (legrado).

Tratamiento	$CE_{50}$ (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	n
Control	$7.2(5.0-10.4) \times 10^{-3}$	$-83 \pm 1.5$	21
Indometacina $10^{-6}$ M	$11.8(9.7-14.5) \times 10^{-3}$	$-66 \pm 4.7^a$	8
Indometacina $10^{-5}$ M	$1.0(0.7-1.3) \times 10^{-2}$	$-72 \pm 5.0^b$	8
$N^G$ -nitro-L-arginina $10^{-5}$ M	$6.3(5.6-7.1) \times 10^{-3}$	$-83 \pm 1.6$	7
$N^G$ -nitro-L-arginina $10^{-4}$ M	$8.3(6.6-10.4) \times 10^{-3}$	$-83 \pm 3.1$	9
Legrado	$7.1(5.1-9.7) \times 10^{-3}$	$-91 \pm 2.7$	8

Los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  se expresan como porcentaje del tono activo previo. Los valores de  $CE_{50}$  representan la media con sus límites de confianza del 95 % y los de  $E_{m\acute{a}x}$  representan la media  $\pm$  EEM de los datos obtenidos en "n" segmentos arteriales.

<sup>a</sup> significativamente menor que el control;  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente menor que el control;  $p < 0.05$ .

**Tabla 3.-** Valores de concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) de  $Ca^{2+}$ , endotelina-1 (ET-1), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y norepinefrina (NE) en arteria cerebral media de cabra incubada en medios conteniendo distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ .

Vasoconstrictor	$[Mg^{2+}]$ (mM)	$CE_{50}$ (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	n
$Ca^{2+}$	0	$1.4(0.9-2.2) \times 10^{-3}$	$61 \pm 5.1$	12
	0.1	$1.3(0.8-2.1) \times 10^{-3}$	$72 \pm 6.5$	12
	1	$1.2(0.9-1.5) \times 10^{-3}$	$65 \pm 3.9$	12
	10	$3.4(2.7-4.3) \times 10^{-4}$ <sup>a</sup>	$50 \pm 3.0$ <sup>b</sup>	12
ET-1	0	$1.6(0.9-3.2) \times 10^{-10}$	$96 \pm 7.2$	10
	0.1	$0.5(0.2-1.4) \times 10^{-10}$ <sup>c</sup>	$80 \pm 5.3$	8
	1	$2.8(1.3-6.1) \times 10^{-10}$	$101 \pm 7.5$	10
	10	$2.2(1.1-4.7) \times 10^{-10}$	$87 \pm 7.1$	10
5-HT	0	$1.5(1.1-2.1) \times 10^{-7}$ <sup>d</sup>	$120 \pm 5.1$	22
	0.1	$1.4(0.6-3.3) \times 10^{-7}$	$111 \pm 6.4$	8
	1	$2.5(1.9-3.3) \times 10^{-7}$	$116 \pm 3.2$	16
	10	$2.8(1.7-4.9) \times 10^{-7}$	$66 \pm 6.2$ <sup>c</sup>	8
NE	0	$0.9(0.3-2.6) \times 10^{-5}$	$27 \pm 5.8$ <sup>c</sup>	8
	1	$6.4(5-8.3) \times 10^{-6}$	$46 \pm 3.8$	12
	10	$1.4(0.4-4.4) \times 10^{-5}$	$26 \pm 4.7$ <sup>d</sup>	8

Los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  se expresan, para  $Ca^{2+}$ , ET-1 y NE, como porcentaje de la contracción alcanzada tras exposición previa a KCl (50 mM), y para 5-HT, como porcentaje de la contracción máxima alcanzada en la correspondiente curva control. Los valores de  $CE_{50}$  representan la media con sus límites de confianza del 95 % y los de  $E_{m\acute{a}x}$  representan la media  $\pm$  EEM de los datos obtenidos en "n" segmentos arteriales.

<sup>a</sup> significativamente menor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  0, 0.1 y 1 mM,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente menor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  0.1 mM,  $p < 0.05$ .

<sup>c</sup> significativamente menor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  1 mM;  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente menor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  1 mM;  $p < 0.05$ .

**Tabla 4.-** Valores de concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) de 5-hidroxitriptamina (5-HT) y prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) en ramas de arteria cerebral media humana incubadas en medios conteniendo distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ .

Vasoconstrictor	$[Mg^{2+}]$ (mM)	$CE_{50}$ (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	n
5-HT	0.1	$6.6(4.3-10) \times 10^{-8}$	$96 \pm 5.1^a$	8
	1	$4.4(2.6-7.4) \times 10^{-8}$	$124 \pm 8.2$	15
	10	$1.6(1.4-1.8) \times 10^{-7}^c$	$38 \pm 4.4^b$	7
$PGF_{2\alpha}$	0.1	$3.3(3.2-3.6) \times 10^{-6}^c$	$98 \pm 2$	8
	1	$2.5(2.3-2.8) \times 10^{-6}$	$100 \pm 0$	16
	10	$5.3(4.6-6.1) \times 10^{-6}^c$	$84 \pm 3.3^b$	8

Los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  se expresan como porcentaje de la contracción máxima alcanzada en la correspondiente curva control. Los valores de  $CE_{50}$  representan la media con sus límites de confianza del 95 % y los de  $E_{m\acute{a}x}$  representan la media  $\pm$  EEM de los datos obtenidos en "n" segmentos arteriales.

<sup>a</sup> significativamente menor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  1 mM;  $p < 0.05$ .

<sup>b</sup> significativamente menor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  1 mM;  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que con el mismo vasoconstrictor en  $[Mg^{2+}]$  1 mM;  $p < 0.01$ .

**Tabla 5.-** Concentración de  $Mg^{2+}$  en plasma ( $[Mg^{2+}]_P$ ) y líquido cefalorraquídeo ( $[Mg^{2+}]_{LCR}$ ) tras administración intravenosa de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ , 3 g/15 min) en cabras anestesiadas. Los datos se expresan en valores absolutos (mg/dL), y su variación se expresa porcentualmente respecto de los valores control en cada uno de los compartimentos y representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en 6 experimentos.

Tiempo (min)	$[Mg^{2+}]_P$	Variación %	$[Mg^{2+}]_{LCR}$	Variación %	$\frac{[Mg^{2+}]_{LCR}}{[Mg^{2+}]_P}$
0 (Control)	1.7 $\pm$ 0.07		2.2 $\pm$ 0.06		1.3 $\pm$ 0.03
5	3.0 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	81 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.08	-5 $\pm$ 1	0.7 $\pm$ 0.03
15	4.4 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	162 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.08	-2 $\pm$ 3	0.5 $\pm$ 0.02
30	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	96 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.08	-2 $\pm$ 2	0.7 $\pm$ 0.03
60	2.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	69 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 3	0.8 $\pm$ 0.02
120	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	47 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.08	4 $\pm$ 3	0.9 $\pm$ 0.06
180	2.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	45 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.1	6 $\pm$ 4	0.9 $\pm$ 0.04

<sup>a</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

**Tabla 6.-** Efectos de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ , 100 mg) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse. Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en 7 experimentos.

	<u>Control</u>	<u>MgSO<sub>4</sub></u>	<u>Variación (%)</u>
FSC (ml/min x 100 g)	112.7 $\pm$ 5.6	132.4 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 3.2
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.06 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	-14 $\pm$ 2.7
FC (latidos/min)	82 $\pm$ 8	85 $\pm$ 7	4 $\pm$ 6
PA (mm Hg)	118.7 $\pm$ 4.1	119.1 $\pm$ 2.2	0.3 $\pm$ 2.0

<sup>a</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

**Tabla 7.-** Efectos de la administración intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 3 g/15 min), a los 15 min de la infusión, sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse. Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en 7 experimentos.

	<u>Control</u>	<u>MgSO<sub>4</sub></u>	<u>Variación %</u>
FSC (ml/min x 100 g)	112.7 $\pm$ 5.6	160.6 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	43 $\pm$ 5.4
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.06 $\pm$ 0.08	0.7 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	-34 $\pm$ 3.4
FC (latidos/min)	82 $\pm$ 8	88 $\pm$ 8	7 $\pm$ 3
PA (mm Hg)	118.7 $\pm$ 4.1	111.3 $\pm$ 4.4	-6 $\pm$ 4.3

<sup>a</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .



**Tabla 8.-** Efectos de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $MgSO_4$ , 300 mg) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de 5-hidroxitriptamina (5-HT)  $10 \mu g/min$ . Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	<b>Control</b>	<b>5-HT</b>	<b><math>MgSO_4</math></b>
FSC (ml/min x 100 g)	116.2 $\pm$ 5.1	55.6 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	109.2 $\pm$ 4.5 <sup>c</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.05 $\pm$ 0.07	2.36 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>
FC (latidos/min)	97 $\pm$ 7	96 $\pm$ 4	97 $\pm$ 5
PA (mm Hg)	119.3 $\pm$ 6.2	119.1 $\pm$ 2.3	117.3 $\pm$ 3.4
n	21	16	9

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que 5-HT,  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente menor que 5-HT,  $p < 0.01$ .

**Tabla 9.-** Efectos de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 300 mg) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de endotelina-1 (ET-1) 0.1 nmol/min. Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	<b>Control</b>	<b>ET-1</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b>
FSC (ml/min x 100 g)	116.2 $\pm$ 5.1	64.2 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	85.5 $\pm$ 3.6 <sup>a, c</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.05 $\pm$ 0.07	2.05 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>b, d</sup>
FC (latidos/min)	97 $\pm$ 7	76 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
PA (mm Hg)	119.3 $\pm$ 6.2	126.5 $\pm$ 3.8	130.3 $\pm$ 6.3
n	21	15	9

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que ET-1,  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente menor que ET-1,  $p < 0.01$ .

**Tabla 10.-** Efectos de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 300 mg) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de endotelina-1 (ET-1) 0.001 nmol/min. Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	<b>Control</b>	<b>ET-1</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b>
FSC (ml/min x 100 g)	116.2 $\pm$ 5.1	91.3 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 6.7 <sup>c</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.05 $\pm$ 0.07	1.5 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.99 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>
FC (latidos/min)	97 $\pm$ 7	112 $\pm$ 10	98 $\pm$ 8
PA (mm Hg)	119.3 $\pm$ 6.2	124.4 $\pm$ 1.1	119.2 $\pm$ 2.4
n	21	9	9

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que ET-1,  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente mayor que ET-1,  $p < 0.01$ .

**Tabla 11.-** Efectos de la administración intraarterial de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 300 mg) sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de norepinefrina (NE)  $10 \mu\text{g}/\text{min}$ . Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	<b>Control</b>	<b>NE</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b>
FSC (ml/min x 100 g)	118.1 $\pm$ 10.2	71.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	130.7 $\pm$ 6.5 <sup>c</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.04 $\pm$ 0.07	1.8 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>
FC (latidos/min)	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 6	98 $\pm$ 16
PA (mm Hg)	114.2 $\pm$ 5.1	121.8 $\pm$ 5.1	122.2 $\pm$ 6.2
n	16	16	7

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que NE,  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente mayor que NE,  $p < 0.01$ .

**Tabla 12.-** Efectos de la administración intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 3 g/15 min), a los 15 min de la infusión, sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de 5-hidroxitriptamina (5-HT) 10  $\mu\text{g}/\text{min}$ . Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	Control	5-HT	$\text{MgSO}_4$
FSC (ml/min x 100 g)	116.2 $\pm$ 5.1	55.6 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	127.5 $\pm$ 9.8 <sup>c</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.05 $\pm$ 0.07	2.36 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>
FC (latidos/min)	97 $\pm$ 7	96 $\pm$ 4	101.9 $\pm$ 7.3
PA (mm Hg)	119.3 $\pm$ 6.2	119.1 $\pm$ 2.3	114.7 $\pm$ 5.9
n	21	16	7

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que 5-HT,  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente menor que 5-HT,  $p < 0.01$ .

**Tabla 13.-** Efectos de la administración intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 3 g/15 min), a los 15 min de la infusión, sobre el flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de endotelina-1 (ET-1) 0.1 nmol/min. Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	<b>Control</b>	<b>ET-1</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b>
FSC (ml/min x 100 g)	116.2 $\pm$ 5.1	64.2 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	67.5 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>
RVC (min Hg x 100 g x min/ml)	1.05 $\pm$ 0.07	2.05 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
FC (latidos/min)	97 $\pm$ 7	76 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	84.3 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>
PA (mm Hg)	119.3 $\pm$ 6.2	126.5 $\pm$ 3.8	116.3 $\pm$ 4
n	21	15	6

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.05$ .

**Tabla 14.-** Efectos de la administración intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 3 g/15 min), a los 15 min de la infusión, sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiadas, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intraarterial de norepinefrina (NE) 10  $\mu\text{g}/\text{min}$ . Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	Control	NE	$\text{MgSO}_4$
FSC (ml/min x 100 g)	118.1 $\pm$ 10.2	71.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 7.3 <sup>c</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.04 $\pm$ 0.07	1.8 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
FC (latidos/min)	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 6	102 $\pm$ 8
PA (mm Hg)	114.2 $\pm$ 5.1	121.8 $\pm$ 5.1	110 $\pm$ 4.5
n	16	16	9

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente mayor que NE,  $p < 0.01$ .

<sup>d</sup> significativamente menor que NE,  $p < 0.01$ .

**Tabla 15.-** Efectos de la administración intravenosa de sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ , 3 g/15 min), a los 15 min de la infusión, sobre flujo sanguíneo cerebral (FSC), resistencia vascular cerebral (RVC), frecuencia cardíaca (FC) y presión arterial (PA) en cabras sin anestesiarse, a las cuales se les ha inducido previa vasoconstricción cerebral mediante infusión continua intravenosa de norepinefrina (NE) 30  $\mu\text{g}/\text{min}$ . Los datos representan la media $\pm$ EEM de los valores obtenidos en "n" experimentos.

	<b>Control</b>	<b>NE</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b>
FSC (ml/min x 100 g)	118.1 $\pm$ 10.2	97.7 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	130.7 $\pm$ 6.1 <sup>d</sup>
RVC (mm Hg x 100 g x min/ml)	1.04 $\pm$ 0.07	1.6 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.04 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>
FC (latidos/min)	94 $\pm$ 9	70 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	109 $\pm$ 10 <sup>d</sup>
PA (mm Hg)	114.2 $\pm$ 5.1	150.7 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	125.5 $\pm$ 3.8 <sup>e</sup>
n	16	7	7

<sup>a</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup> significativamente mayor que el valor control,  $p < 0.01$ .

<sup>c</sup> significativamente menor que el valor control,  $p < 0.05$ .

<sup>d</sup> significativamente mayor que NE,  $p < 0.01$ .

<sup>e</sup> significativamente menor que NE,  $p < 0.01$ .



## ***7.- DISCUSIÓN***

### 7.1.- Influencia de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre el tono de la arteria cerebral media aislada de cabra

Existen diferentes estudios experimentales que ponen de manifiesto una relación inversa entre la concentración de  $Mg^{2+}$  y el tono pasivo (basal o de reposo) de vasos aislados: la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$  produce incremento del tono (contracción), mientras que el aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$  produce descenso del tono (relajación). Estas observaciones se han realizado en tiras de aorta de rata (Altura y Altura, 1974; Turlapaty et al., 1981; Noguera y D'Ocón, 1993), vena porta de rata (Altura y Altura, 1977; Turlapaty et al., 1981), arterias coronarias de perro (Turlapaty y Altura, 1980), y venas y arterias umbilicales humanas (Altura et al., 1983). Por lo que respecta al lecho vascular cerebral, el único precedente del que tenemos conocimiento es el estudio de Altura y Altura (1980) en arterias basilar y cerebral media de gato, en el que la relación arriba mencionada se confirma. Sin embargo, los resultados del presente estudio no permiten confirmar dicha relación, ya que ni la reducción ni el aumento graduales de la concentración de  $Mg^{2+}$  alteraron el tono basal de la arteria cerebral media aislada de cabra. La posible explicación a esta discrepancia es desconocida en el momento actual. Los procedimientos y protocolos experimentales son similares a los utilizados por el resto de investigadores, con la única diferencia de la especie animal (cabra), utilizada por primera vez en este tipo de estudios. Aunque no puede descartarse completamente, parece arriesgado afirmar que esta sea la causa, en tanto en cuanto las arterias cerebrales de cabra exhiben propiedades vasomotoras cualitativamente similares a las de otras especies animales en respuesta a otros estímulos.

Una observación experimental importante realizada originalmente por Ku y Ann (1987, 1991) fue que la reducción de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  produjo una respuesta relajante en segmentos de arterias coronarias caninas sometidos a tono activo (previamente contraídos con algún vasoconstrictor). Investigaciones posteriores han confirmado la existencia de este hecho en otros lechos vasculares periféricos (Gold et al., 1990; Szabó et al., 1992a,b) y en el cerebral (Szabó et al., 1991b, 1992c). Ya que esta respuesta es diametralmente opuesta a la obtenida en segmentos sometidos a tono pasivo,

cabe preguntarse cuál es la que más fielmente pudiera reflejar lo que sucede en el estado fisiológico, es decir, en el animal completo.

Es bien conocido que el tono de los vasos cerebrales es el resultante de la interacción de factores de distinta naturaleza sobre la pared vascular: 1) neurogénicos (inervaciones simpática, parasimpática, serotoninérgica, etc.), 2) metabólicos (pH,  $K^+$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ , adenosina, etc.), 3) miogénicos (presión arterial, presión intracraneal, etc.), y 4) endoteliales (endotelina, NO, prostaciclina, etc.) (Edvinsson et al., 1993; Villringer y Dirnagl, 1995; Branston, 1995). Por lo tanto, parece evidente que la adición de un único agente vasoconstrictor a los segmentos arteriales aislados es una forma excesivamente simple de reproducir lo que sería el tono al que se encuentra sometida la pared cerebrovascular en el estado fisiológico. Sin embargo, es el procedimiento experimental universalmente aceptado para estudiar las propiedades relajantes de cualquier agente vasoactivo en este tipo de preparación experimental. Desde este punto de vista, la respuesta de las arterias cerebrales aisladas precontraídas en respuesta a la disminución de la concentración de  $Mg^{2+}$  (relajación), tendría más posibilidades de suceder *in vivo* que la respuesta de dichas arterias sometidas exclusivamente al tono basal (contracción). Sin embargo, esta conclusión entra en colisión con un hecho fisiológico sólidamente establecido: que el déficit en  $Mg^{2+}$  se asocia con incremento de la resistencia vascular e hipertensión (Mordes y Wacker, 1978; Altura, 1982).

Según algunos investigadores, la solución a la cuestión planteada pasa por la consideración del endotelio como factor fundamental en la respuesta relajante cerebroarterial frente a la disminución de la concentración de  $Mg^{2+}$ . Se ha observado que la respuesta relajante al déficit de  $Mg^{2+}$  es dependiente de endotelio y de  $Ca^{2+}$ , ya que desapareció en segmentos arteriales privados mecánicamente de endotelio (legrado) o incubados con inhibidores del EDRF, y también en ausencia de  $Ca^{2+}$ . Se ha formulado la hipótesis, por lo tanto, de que  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  ejercen acciones antagonistas mútuas sobre la pared vascular, de tal forma que el déficit de  $Mg^{2+}$  estimula la entrada de  $Ca^{2+}$  a un doble nivel: en el endotelio estimulando la producción de EDRF y la relajación, y en las células musculares lisas estimulando la contracción (Ku y Ann, 1987, 1991; Gold et al., 1990; Szabó et al., 1992a,b).

De este modo, el componente relajante serviría como factor protector frente a una vasoconstricción excesiva que pudiera producirse en respuesta al déficit de  $Mg^{2+}$ .

Uno de los objetivos del presente trabajo fue reproducir la respuesta relajante frente a la disminución de la concentración de  $Mg^{2+}$  para determinar su posible relación inversa de concentración-dependencia (a menor concentración de  $Mg^{2+}$  mayor respuesta relajante) y la influencia del agente inductor del tono activo. En nuestros experimentos, la reducción secuencial de la concentración de  $Mg^{2+}$  produjo una respuesta bifásica de los segmentos arteriales precontraídos con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  o endotelina-1: relajación transitoria (componente fásico) seguida de recuperación del tono (componente tónico). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Gold et al. (1990) en arteria y vena pulmonares bovinas precontraídas con fenilefrina. En otros estudios se ha observado una respuesta monofásica, ya que que la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$  produjo relajación sostenida de arterias coronarias precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , norepinefrina o BaCl (Ku y Ann, 1987, 1991), y en arteria cerebral media de gato (Szabó et al., 1991b) y cerebrales humanas (Szabó et al., 1992c) precontraídas con norepinefrina o prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , respectivamente. En nuestros experimentos la magnitud del componente fásico (relajación) no fue dependiente de la concentración de  $Mg^{2+}$  en segmentos precontraídos con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , pero sí se observó cierta relación inversa de concentración-dependencia en segmentos precontraídos con endotelina-1. Por el contrario, cuando se utilizó KCl como agente inductor del tono activo no se objetivaron cambios del tono activo.

Una de las observaciones más interesantes en estas series experimentales fue que el recambio del medio de incubación manteniendo constantes tanto la concentración del agente inductor del tono activo (prostaglandina  $F_{2\alpha}$  o endotelina-1) como la concentración normal de  $Mg^{2+}$  (1 mM), dió lugar a una respuesta bifásica prácticamente idéntica en su perfil a la que se obtuvo reduciendo la concentración de  $Mg^{2+}$ . En ninguno de los estudios previos realizados por otros investigadores se da cuenta de un hecho semejante; no sabemos si porque no se realizaron los experimentos adecuados o sencillamente porque el fenómeno no sucedió. Cabe la posibilidad de que la respuesta observada en nuestros experimentos sea consecuencia simplemente de la maniobra del recambio del baño, la cual conlleva retirar

momentáneamente el agente inductor del tono activo y volverlo a añadir unos segundos después. De este modo, el lavado del agente vasoconstrictor produciría la respuesta relajante transitoria, cuya duración estaría limitada por la aparición del efecto contráctil tras la readición del vasoconstrictor. El hecho de que las arterias precontraídas con KCl no experimenten ningún cambio de tono activo al cambiar el medio, posiblemente esté relacionado con su diferente mecanismo de acción: mientras que la contracción producida por prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y endotelina-1 se corresponde con el acoplamiento de tipo farmacomecánico, es decir, mediado por la activación de receptores específicos (Kennedy et al., 1982; Salom et al., 1993), la contracción producida por KCl se corresponde con el acoplamiento de tipo electromecánico, es decir, mediado por la despolarización de la membrana.

### **7.2.- Efecto relajante de $Mg^{2+}$ sobre arterias aisladas en función de la especie, el agente inductor del tono activo y el tipo de arteria**

Como se acaba de mencionar en el epígrafe precedente, la bibliografía da cuenta de dos tipos de respuesta relajante frente a cambios en la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$ : relajación de segmentos arteriales sometidos a tono pasivo en respuesta al incremento de la concentración de  $Mg^{2+}$ , y relajación de segmentos arteriales sometidos a tono activo en respuesta a la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$ . Existe un tercer tipo de protocolo experimental que resulta más apropiado para investigar la capacidad relajante del  $Mg^{2+}$ : añadirlo acumulativamente en segmentos arteriales sometidos a tono activo en medio libre de  $Mg^{2+}$ . Uno de los objetivos del presente trabajo fue investigar la capacidad relajante del  $Mg^{2+}$  aplicando este protocolo para determinar en qué medida dicha capacidad depende del agente inductor del tono activo (5-hidroxitriptamina, endotelina-1, prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y KCl), de la especie (cabra, conejo y humanos) y del tipo de arteria (cerebral y carótida). La única referencia de que disponemos sobre un trabajo similar es el estudio de Sjögren y Edvinsson (1986), aunque en este caso sólo se utilizó una especie animal (gato), dos vasoconstrictores (KCl y prostaglandina  $F_{2\alpha}$ ) y en cuanto al tipo de arteria, se utilizaron cerebral media, femoral y coronarias.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos demuestran que el  $Mg^{2+}$  actuó como un relajante vascular independientemente del agente vasoconstrictor elegido para inducir el tono activo. No obstante, en términos cuantitativos su capacidad relajante fue variable. Comparando los diferentes vasoconstrictores y valorando globalmente los resultados obtenidos en segmentos de arterias cerebrales de cabra y humanos, puede afirmarse que la mayor capacidad relajante de  $Mg^{2+}$  se puso de manifiesto en segmentos precontraídos con 5-hidroxitriptamina, y la menor en segmentos precontraídos con KCl. En arterias cerebrales de gato también se ha puesto de manifiesto la menor capacidad relajante del  $Mg^{2+}$  en segmentos precontraídos con KCl en comparación con los precontraídos con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Sjögren y Edvinsson, 1986).

En cuanto a las diferencias regionales, es decir, la sensibilidad de arterias procedentes de diferentes lechos vasculares frente a  $Mg^{2+}$ , nuestros resultados muestran que, tanto en términos de  $E_{m\acute{a}x}$  como de  $CE_{50}$ , las arterias cerebrales (basilar) de conejo exhibieron una respuesta relajante mayor que las arterias carótidas, ambas precontraídas con endotelina-1. Un resultado similar se obtuvo en el estudio de Sjögren y Edvinsson (1986), en el que las arterias cerebrales de gato exhibieron una respuesta relajante mayor que las arterias coronarias, ambas precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . Una observación de interés en este estudio es que la adición acumulativa de  $Mg^{2+}$  tuvo un efecto bifásico en arterias femorales precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ : relajación ligera a concentraciones bajas y contracciones a concentraciones altas. Valorados en su conjunto, los resultados parecen indicar cierta selectividad del  $Mg^{2+}$  por el lecho cerebrovascular. Esta misma selectividad se ha propugnado en los últimos años para los fármacos BECa, y por lo tanto podría ser una característica compartida por el  $Mg^{2+}$  y este grupo de fármacos. No obstante, estudios *in vivo* cuestionan en parte esta selectividad, ya que otros lechos vasculares tales como el coronario o el del músculo esquelético son tan sensibles a los fármacos BECa como el cerebral (véase la revisión de Alborch et al., 1995), y lo mismo podría suceder con respecto al  $Mg^{2+}$ .

Por motivos técnicos, las posibles diferencias interespecíficas en la capacidad relajante del  $Mg^{2+}$  no pudieron evaluarse sobre las arterias cerebrales de las tres especies investigadas

precontraídas con el mismo vasoconstrictor. Las comparaciones se establecieron entre arterias cerebrales de cabra y humanas precontraídas con 5-hidroxitriptamina, prostaglandina  $F_{2\alpha}$  o KCl, y entre arterias cerebrales de cabra y conejo precontraídas con endotelina-1. Además, existe una gran variabilidad en los resultados según se considere el  $E_{m\acute{a}x}$  o la  $CE_{50}$ , lo cual impide establecer una relación simple de la capacidad relajante de  $Mg^{2+}$  sobre las arterias cerebrales de las tres especies investigadas.

Una cuestión de gran interés es la comparación entre los efectos relajantes del  $Mg^{2+}$  y de los fármacos BECa. Este punto no ha sido incluido en el presente trabajo, pero ha sido investigado por nuestro grupo y procede su comentario. Se ha observado que nimodipina y nifedipina relajaron las arterias cerebrales humanas (Brandt et al., 1981; Jansen et al., 1991; Alborch et al., 1992). Como ya se ha mencionado, el  $Mg^{2+}$  también manifestó su acción relajante sobre este tejido, aunque, en términos comparativos, su potencia fue de tres a cuatro órdenes de magnitud menor que la de las dos dihidropiridinas. Sin embargo, en términos de  $E_{m\acute{a}x}$  los tres agentes fueron equiefectivos (Alborch et al., 1992). Resultados similares se han obtenido con nifedipina, verapamil y  $Mg^{2+}$  en arterias cerebrales aisladas de gato (Sjögren y Edvinsson, 1986). En estudios realizados *in situ* sobre arteriolas y vénulas piales de rata, fármacos BECa tales como nisoldipina y verapamil no tuvieron ningún efecto sobre el calibre vascular, mientras que nitrendipina y nimodipina se comportaron como potentes vasodilatadores. También el  $Mg^{2+}$  actuó como vasodilatador en esta preparación experimental, siendo de tres a cinco veces menos potente que los fármacos BECa (Altura et al., 1987).

### **7.3.- Influencia de los factores derivados del endotelio en la respuesta relajante de la arteria cerebral media aislada de cabra frente a $Mg^{2+}$**

Como ya se ha comentado, los resultados presentados reflejan dos tipos de respuesta relajante en arterias sometidas a tono activo: una (transitoria) como consecuencia de la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$ , y otra como consecuencia de la adición acumulativa de  $Mg^{2+}$  en medio libre de  $Mg^{2+}$ . A pesar de las serias dudas que ofrece la relevancia funcional de la primera de ellas, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la

hipótesis de que el endotelio, a través de algún mediador relajante conocido, pudiera participar en ambas respuestas.

La relajación transitoria en respuesta a la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$  no se vió afectada ni al eliminar mecánicamente el endotelio ni al incubarlo con  $N^G$ -nitro-L-arginina (inhibidor del enzima NO sintetasa), lo cual excluye la posibilidad de que el endotelio, a través de la liberación de NO, pudiera mediar dicha respuesta. Estos resultados difieren considerablemente de los obtenidos en trabajos previos. Utilizando arterias coronarias caninas precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  se ha observado que la eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio extracelular produjo una respuesta relajante siempre y cuando el endotelio estuviera intacto. Cuando las arterias fueron privadas mecánicamente de endotelio la respuesta resultó ser justamente la contraria, apareciendo una potente contracción. Por otra parte, la incubación con hemoglobina (inhibidor del EDRF) inhibió la relajación producida por la solución libre de  $Mg^{2+}$ . Estos resultados ponen de manifiesto la implicación del EDRF en la respuesta relajante producida por la ausencia de  $Mg^{2+}$  y, al mismo tiempo, la acción inhibitoria del  $Mg^{2+}$  sobre la producción de EDRF cuando el endotelio se encuentra intacto (Ann y Ku, 1986; Ku y Ann, 1987, 1991). Otras investigaciones han confirmado estas conclusiones. En arteria y vena pulmonar bovina aisladas precontraídas con fenilefrina se ha observado que la eliminación de  $Mg^{2+}$  del medio produjo respuesta bifásica: relajación seguida de recuperación del tono (contracción). En segmentos desprovistos de endotelio la relajación inicial desapareció, evidenciándose únicamente el componente contráctil. El tratamiento tanto con oxihemoglobina como con azul de metileno (inhibidores del EDRF) produjo inhibición de la relajación en segmentos con el endotelio intacto (Gold et al., 1990). También se ha observado que el tratamiento con inhibidores del EDRF o la ausencia de endotelio produjeron inhibición de la relajación obtenida al reducir gradualmente la concentración de  $Mg^{2+}$  en vena femoral (Szabó et al., 1992a) y en arteria mesentérica (Szabó et al., 1992b) de gato, y en arterias cerebrales de gato (Szabó et al., 1991b) y humanas (Szabó et al., 1992c) precontraídas con norepinefrina.

Por otra parte, la respuesta relajante obtenida al incrementar acumulativamente la concentración de  $Mg^{2+}$  en medio libre de  $Mg^{2+}$  tampoco se modificó tras el legrado o la



incubación con  $N^G$ -nitro-L-arginina, resultados que coinciden con los obtenidos en arteria cerebral media de perro precontraída con el análogo del tromboxano  $A_2$  U46619 (Belfort et al., 1994) y que ponen de manifiesto la independencia que dicha respuesta muestra respecto de la liberación de NO. Otro de los factores endoteliales relacionados con el  $Mg^{2+}$  es la prostaciclina, prostaglandina vasodilatadora que además inhibe la agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1979). La incubación de arteria cerebral media de cabra con indometacina (inhibidor de la síntesis de prostaglandinas), inhibió las relajaciones obtenidas al añadir  $Mg^{2+}$  de forma acumulativa. Estos resultados coinciden con evidencias experimentales que demuestran que el  $Mg^{2+}$  estimula la producción de prostaciclina en células endoteliales cultivadas de vena umbilical humana (Watson et al., 1986) y que es el mediador, al menos en parte, de las acciones vasculares del  $Mg^{2+}$  cuando éste se administra en humanos (Nadler et al., 1987). Sin embargo, también hay resultados en contra de esta mediación (O'Brien et al., 1990; Chesnut et al., 1990).

#### **7.4.- Efecto de la concentración extracelular de $Mg^{2+}$ sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a vasoconstrictores: $Ca^{2+}$ , endotelina-1, 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y prostaglandina $F_{2\alpha}$**

Como se ha mencionado en la Introducción, la concentración de  $Mg^{2+}$  influye no sólo sobre el tono, sino también sobre la reactividad de los vasos aislados frente a agonistas. Los trabajos realizados por Altura y colaboradores en las dos últimas décadas perfilan un esquema acerca de cómo se lleva a cabo esta influencia: la hipomagnesemia incrementa la reactividad vascular y la hipermagnesemia la atenúa. Obsérvese que esta relación coincide con la que se ha establecido entre la concentración de  $Mg^{2+}$  y el tono basal: la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$  produce incremento del tono (contracción), mientras que el aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$  produce descenso del tono (relajación). Por lo tanto, la doble influencia del  $Mg^{2+}$  sobre el tono y la reactividad vascular podría explicar las asociaciones hipomagnesemia-aumento de resistencia vascular-hipertensión e hipermagnesemia-reducción de resistencia vascular-hipotensión (véase la revisión de Altura et al., 1987). Sin embargo, el estudio detallado de la bibliografía pertinente revela hasta qué punto este esquema puede ser excesivamente simplista. De hecho, tanto el agonista como

el tejido objetos de estudio influyen decisivamente en el efecto modulador del  $Mg^{2+}$  sobre la reactividad vascular.

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido determinar el efecto de las variaciones en la concentración de  $Mg^{2+}$  sobre la respuesta de las arterias cerebrales aisladas frente a diferentes vasoconstrictores:  $Ca^{2+}$ , endotelina-1, 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . De particular interés son los resultados acerca de la capacidad de una elevada concentración de  $Mg^{2+}$  (10 mM) para atenuar la respuesta contráctil a estas sustancias, ya que todas ellas parecen estar implicadas en determinadas patologías que conllevan incremento de la resistencia vascular cerebral tales como, por ejemplo, el síndrome de preeclampsia-eclampsia o el vasoespasmo cerebral subsiguiente a la hemorragia subaracnoidea. La presunta capacidad inhibidora del vasoespasmo atribuida al  $Mg^{2+}$  podría, de este modo y al menos parcialmente, explicar su efecto beneficioso en algunas de estas patologías (Zaret, 1983; Sadeh, 1989).

La discusión correspondiente a este punto se realizará en dos partes: en primer lugar se compararán los resultados obtenidos con cada uno de los agonistas, y en segundo lugar se realizará una valoración conjunta de todos ellos.

#### a) $Ca^{2+}$

Los resultados obtenidos demuestran que la ausencia de  $Mg^{2+}$  no incrementó la respuesta contráctil de los segmentos de arteria cerebral media de cabra frente al  $Ca^{2+}$ . Por lo que sabemos, no existen referencias previas sobre la aplicación de un protocolo semejante en arterias cerebrales de otras especies. Los resultados difieren de los obtenidos en aorta de conejo, en los que las contracciones inducidas por  $Ca^{2+}$  se vieron incrementadas en presencia de  $Mg^{2+}$ , tanto en el umbral (menor sensibilidad) como en el efecto máximo (Jurevics y Carrier, 1973). La utilización de un protocolo similar en aorta de rata dió, cualitativamente, el mismo resultado: disminución de la sensibilidad y aumento de la contractilidad frente al  $Ca^{2+}$  (Altura y Altura, 1971). En un estudio comparativo con aorta y vena porta de rata se observó que el efecto del  $Mg^{2+}$  dependió del tejido investigado: mientras que la presencia

de  $Mg^{2+}$  disminuyó la sensibilidad y aumentó la contractilidad en aorta, en vena porta no se modificaron ninguno de los dos parámetros (Turlapaty et al., 1981).

Por otra parte, la incubación de los segmentos arteriales de cabra en medio con una concentración de  $Mg^{2+}$  diez veces superior al valor normal (10 mM  $Mg^{2+}$ ) redujo el efecto máximo de las contracciones inducidas por la adición acumulativa de  $Ca^{2+}$  y aumentó la sensibilidad de las arterias frente al  $Ca^{2+}$ . Investigaciones previas han demostrado que el  $Mg^{2+}$  fue capaz de inhibir la respuesta contráctil de la arteria basilar canina aislada inducida al añadir pequeñas cantidades de  $Ca^{2+}$  al medio de incubación carente de dicho ion (Allen et al., 1976). Resultados diferentes se han obtenido en otros estudios en los que la hipermagnesemia (4.8 mM  $Mg^{2+}$ ) redujo la sensibilidad de arteria aorta y vena porta de rata, pero mientras que en aorta no modificó el efecto máximo, en vena porta lo redujo (Turlapaty et al., 1981).

#### *b) Endotelina-1*

La respuesta frente a endotelina-1 de los segmentos arteriales de cabra incubados en las diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  permaneció relativamente estable: ni la incubación en medio libre de  $Mg^{2+}$  ni la incubación en medio con elevada concentración de  $Mg^{2+}$  modificaron la respuesta contráctil, en comparación con la respuesta obtenida en la concentración fisiológica de  $Mg^{2+}$  (1 mM). Por lo que sabemos, no existen otros estudios realizados sobre esta cuestión. Se ha demostrado que la respuesta contráctil provocada por endotelina-1 en arterias cerebrales depende en parte de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular por medio de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a las dihidropiridinas (VOCs de tipo L) (Jansen et al., 1989; Martín de Aguilera et al., 1990; Salom et al., 1991), y en parte de la activación intracelular de la proteína quinasa C (Encabo et al., 1992). Si, como se ha postulado, el  $Mg^{2+}$  actúa como un calcioantagonista, sería de esperar que una elevada concentración de  $Mg^{2+}$  redujera al menos parcialmente la respuesta a endotelina-1, como ocurre con fármacos BECa tales como nicardipina, nifedipina, nimodipina, verapamil y diltiazem (véase la revisión de Salom et al., 1995).

### c) 5-Hidroxitriptamina

Los resultados obtenidos en segmentos arteriales de cabra al añadir acumulativamente 5-hidroxitriptamina han mostrado que la ausencia de  $Mg^{2+}$  incrementó ligeramente la sensibilidad de las arterias frente a este agonista, aunque no se produjo un aumento significativo del  $E_{máx}$ , resultado que difiere del obtenido en trabajos previos en que la incubación en medio libre de  $Mg^{2+}$  potenció la respuesta contráctil frente a 5-hidroxitriptamina en arteria y vena mesentéricas de conejo, íleon de cobaya (Goldstein y Zsotér, 1978), arterias y venas umbilicales humanas (Altura et al., 1983), y arterias coronarias de perro (Turlapaty y Altura, 1980); sin embargo, dicha respuesta no se vió modificada en aorta de conejo (Altura y Altura, 1971). Mayor homogeneidad existe entre los resultados obtenidos acerca del efecto del aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$ . El efecto contráctil de 5-hidroxitriptamina se vió significativamente reducido tanto en los segmentos arteriales de cabra como de humanos cuando el medio de incubación contenía 10 mM  $Mg^{2+}$ , tal y como se ha observado en arterias y venas umbilicales humanas (Altura et al., 1983), arterias coronarias de perro (Turlapaty y Altura, 1980), arteria y vena mesentérica de conejo e íleon de cobaya (Goldstein y Zsotér, 1978) y arterias cerebrales caninas (Allen et al., 1976). En términos comparativos, el  $Mg^{2+}$  fue mucho más eficaz inhibiendo las contracciones provocadas por 5-hidroxitriptamina que las provocadas por endotelina-1.

### d) Norepinefrina

Al contrario de lo que sucedió con el resto de agonistas, la contracción de las arterias cerebrales aisladas de cabra frente a norepinefrina fue significativamente atenuada en ausencia de  $Mg^{2+}$ . Estos resultados confirman los obtenidos por otros investigadores en aorta de conejo (Altura y Altura, 1971; Jurevics y Carrier, 1973; Fujiwara et al., 1978). Por el contrario, la incubación en medio libre de  $Mg^{2+}$  incrementó la respuesta contráctil frente a norepinefrina en *taenia coli* de cobaya, *vas deferens* de rata (Takagi et al., 1972) y arterias coronarias de perro (Turlapaty y Altura, 1980). No puede afirmarse pues que la ausencia

de  $Mg^{2+}$  potencie la respuesta vascular contráctil a norepinefrina en todos los casos, y lo mismo se puede afirmar de reducciones más discretas de la concentración de  $Mg^{2+}$ . De hecho, se ha observado que una reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$  desde 1.2 a 0.8 mM no modificó la respuesta contráctil a norepinefrina en arteria mesentérica de gato (Szabó et al., 1991a). Se ha constatado también la capacidad de la concentración más elevada de  $Mg^{2+}$  para atenuar la respuesta contráctil de arteria cerebral media de cabra provocada por norepinefrina, lo cual concide con resultados previos en arteria mesentérica de gato (Szabó et al., 1991a), aorta de conejo (Fujiwara et al., 1978) y de rata (Noguera y D'Ocón, 1993), y en arterias cerebrales de gato (Sjögren y Edvinsson, 1988; Faragó et al., 1991).

#### e) Prostaglandina $F_{2\alpha}$

La concentración más alta de  $Mg^{2+}$  inhibió las contracciones de los segmentos arteriales humanos frente a prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , confirmando los resultados previos obtenidos en arterias femorales, coronarias y cerebrales de gato (Sjögren y Edvinsson, 1986, 1988). Sin embargo, el  $Mg^{2+}$  fue mucho menos eficaz inhibiendo las contracciones provocadas por prostaglandina  $F_{2\alpha}$  que las provocadas por 5-hidroxitriptamina en este mismo tejido.

La valoración de los resultados correspondientes a este epígrafe debe realizarse conjuntamente barajando dos elementos: el mecanismo de acción del  $Mg^{2+}$  y el mecanismo de acción de cada uno de los agonistas, atendiendo en este último caso tanto a la existencia y distribución de sus receptores en la pared cerebroarterial, como a la dependencia que la respuesta manifiesta respecto del  $Ca^{2+}$ .

Un hallazgo común para todos los agonistas investigados (incluido el  $Ca^{2+}$ ) es la ausencia de una mayor respuesta contráctil en ausencia de  $Mg^{2+}$  o en medio con una concentración de  $Mg^{2+}$  muy inferior (0.1 mM) al valor normal. Más bien al contrario, la respuesta fue incluso menor en arterias cerebrales de cabra incubadas en el medio 0 mM  $Mg^{2+}$  frente a norepinefrina, y en arterias cerebrales humanas incubadas en el medio 0.1 mM  $Mg^{2+}$  frente a 5-hidroxitriptamina. Estos resultados sugieren que, en condiciones normales, no existe una acción inhibidora del  $Mg^{2+}$  sobre el transporte de  $Ca^{2+}$  hacia el interior del

músculo liso estimulado por la presencia de los agonistas. Lógicamente, si dicha inhibición tuviera lugar, al suprimirla (retirando o reduciendo el  $Mg^{2+}$  del medio) la respuesta debería ser mayor, hecho que no ocurrió en ninguno de los casos. Este hecho tiene especial relevancia en el caso del  $Ca^{2+}$ , ya que podría explicar por qué la reducción de la concentración de  $Mg^{2+}$  no incrementa el tono de las arterias cerebrales sometidas a tono pasivo en nuestros experimentos. Sin embargo, este hecho parece estar en contradicción con algunas observaciones realizadas en cultivos de células musculares lisas procedentes de arterias cerebrales. En estudios de "patch-clamp" con miocitos de arteria basilar de rata se ha puesto de manifiesto que el  $Mg^{2+}$ , a concentración fisiológica ( $\sim 1$  mM), es capaz de reducir en un 17% el pico de la corriente a través de los canales de  $Ca^{2+}$  (Langton y Standen, 1993). En estudios con miocitos de arterias cerebrales caninas se ha objetivado la relación inversa entre la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  y la  $[Ca^{2+}]_i$ : reducciones de la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  incrementaron la  $[Ca^{2+}]_i$  (Altura et al., 1993).

Por el contrario, el efecto de la concentración mayor de  $Mg^{2+}$  sobre la respuesta contráctil a cada uno de los agonistas fue variable: desde una inhibición considerable (superior al 40% en el caso de 5-hidroxitriptamina y norepinefrina en arterias cerebrales de cabra, y alrededor del 70% en el caso de 5-hidroxitriptamina en arterias cerebrales humanas) a una ausencia de inhibición (endotelina-1 en arterias cerebrales de cabra), pasando por una inhibición discreta (alrededor de un 23% en el caso del  $Ca^{2+}$  en arterias cerebrales de cabra, y alrededor de un 16% en el caso de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en arterias cerebrales humanas). Posiblemente, la utilización de una concentración mayor de  $Mg^{2+}$  hubiera tenido un mayor efecto inhibitor sobre la respuesta a los agonistas más resistentes. Sin embargo, el resultado hubiera sido de escasa relevancia práctica en tanto en cuanto los niveles plasmáticos de  $Mg^{2+}$  con eficacia terapéutica en el tratamiento del síndrome de la preeclampsia-eclampsia se han estimado en 4-8 mg/dL (1.6-3.3 mM), en comparación con los niveles basales que se encuentran alrededor de 1.5-1.7 mg/dL (0.6-0.7 mM) (England et al., 1990; O'Brien et al., 1990; Sibai, 1990). La variabilidad registrada en nuestros resultados puede deberse a diferentes elementos: la dependencia del  $Ca^{2+}$  y la existencia y distribución de los receptores que median la respuesta contráctil.

En mayor o menor medida, todos los agonistas investigados estimulan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular hacia el interior del músculo liso cerebrovascular, ya que la respuesta se reduce en medio carente de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, este efecto inhibitor es variable en función tanto del agonista como de la especie animal de la que proceden las arterias cerebrales. A este respecto es curioso comprobar que las respuestas contráctiles más resistentes a la inhibición por el  $\text{Mg}^{2+}$  (las inducidas por endotelina-1 y prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ ), son también particularmente resistentes a la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio (véase la revisión de Alborch et al., 1995). Esta circunstancia estaría en favor de la hipótesis de que el  $\text{Mg}^{2+}$  actúa principalmente inhibiendo el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana y podría considerarse, de algún modo, un "calcioantagonista fisiológico" (Iseri y French, 1984; Altura et al., 1987).

Otro modo de determinar la dependencia que una respuesta desencadenada por un agonista manifiesta respecto del  $\text{Ca}^{2+}$ , consiste en reproducirla en presencia de fármacos BECa. Trabajos previos de nuestro grupo demuestran que las respuestas a todos y cada uno de los agonistas investigados son sensibles a la inhibición por fármacos BECa, especialmente de tipo dihidropiridínico (Salom et al., 1990, 1991, 1992; Alborch et al., 1992), lo cual confirma su dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$ . En un estudio comparativo realizado en arterias cerebrales humanas, la concentración mayor de  $\text{Mg}^{2+}$  (10 mM) tuvo el mismo efecto inhibitor sobre las contracciones inducidas por 5-hidroxitriptamina que la concentración de  $10^{-5}$  M de nicardipina y nimodipina, lo cual indica que el  $\text{Mg}^{2+}$  es unas 1.000 veces menos potente que ambas dihidropiridinas. Sin embargo, la mencionada concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  fue mucho menos eficaz inhibiendo las contracciones producidas por prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ , lo cual pone de manifiesto una vez más la influencia del estímulo contráctil (Alborch et al., 1992).

Otro elemento a considerar es la existencia y distribución de los receptores que median la respuesta cerebroarterial a los agonistas. La 5-hidroxitriptamina actúa directamente sobre receptores específicos triptaminérgicos postsinápticos, e indirectamente estimulando la liberación de norepinefrina desde las terminaciones nerviosas perivasculares (Diéguez et al., 1981). La norepinefrina también se ha demostrado que actúa sobre  $\alpha$ -adrenoreceptores postsinápticos y presinápticos (Alborch y LLuch, 1989). Aunque la endotelina-1 parece

tener un papel modulador de la neurotransmisión adrenérgica en algunos vasos sanguíneos (Wiklund et al., 1988; Tabuchi et al., 1990; Bucher et al., 1991), otros estudios no confirman tal acción (Crockcroft et al., 1991), que además no ha sido descrita en arterias cerebrales. La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  también parece estar desprovista de una acción neuromoduladora, actuando únicamente sobre un receptor postsináptico sensible al tromboxano (Kennedy et al., 1982; Uski et al., 1984). Teniendo en cuenta que el  $Mg^{2+}$  puede bloquear los VOCs tanto de tipo L (postsináptico) como de tipo N (presináptico), cabe la posibilidad de que fuera menos eficaz inhibiendo la respuesta a agonistas que actúan sólo a nivel postsináptico: endotelina-1 y prostaglandina  $F_{2\alpha}$ .

#### **7.5.- Influencia de la barrera hemato-encefálica en el transporte de $Mg^{2+}$ al cerebro**

El aumento de los niveles plasmáticos de  $Mg^{2+}$  tras administración sistémica de sulfato magnésico en cabras no se acompañó de aumento significativo de los niveles de  $Mg^{2+}$  en líquido cefalorraquídeo. Idénticos resultados se han obtenido por Hankins y colaboradores en 1990 en esta misma especie y en ratas (Olsen et al., 1971), indicando que la concentración de  $Mg^{2+}$  en líquido cefalorraquídeo permaneció casi totalmente independiente de los niveles en plasma, y por tanto que la barrera hemato-encefálica es prácticamente impermeable al  $Mg^{2+}$ . Sin embargo otras investigaciones han puesto de manifiesto que el transporte de  $Mg^{2+}$  al cerebro se produce en cantidades pequeñas pero significativas en perros (Oppelt et al., 1963), y en pacientes con preeclampsia después del tratamiento con sulfato magnésico (Thurnau et al., 1987). Por último, en ratas adultas y en fetos se ha objetivado una correlación significativa entre los niveles de  $Mg^{2+}$  en plasma y en líquido cefalorraquídeo, con incrementos en este último compartimento de hasta el 26% (Hallak et al., 1992; Hallak y Cotton, 1993).

La disparidad de resultados, por tanto, no permite extraer una conclusión inequívoca con respecto a la capacidad del  $Mg^{2+}$  para cruzar la barrera hemato-encefálica. Esta cuestión es de crucial importancia a la hora de considerar no sólo el posible efecto directo del  $Mg^{2+}$  sobre la función de los vasos cerebrales, sino también la posible utilidad del  $Mg^{2+}$  en la terapéutica de determinadas enfermedades que afectan al lecho cerebrovascular (hemorragia



subaracnoidea, infarto cerebral agudo, preeclampsia-eclampsia, etc.). En el caso de que el  $Mg^{2+}$  atravesara la barrera hemato-encefálica, su beneficio terapéutico podría deberse a su acción sobre el sistema nervioso central; por contra, si la barrera hemato-encefálica se mostrara prácticamente impermeable al  $Mg^{2+}$  habría que aceptar que el posible beneficio de la terapia con  $Mg^{2+}$  se debería no a su acción sobre el tejido cerebral, sino a la mencionada acción sobre la hemodinámica cerebral. Nuestros resultados, tanto los obtenidos *in vitro* como los obtenidos en este apartado, están en concordancia con la segunda de estas alternativas.

#### **7.6.- Efecto del sulfato magnésico sobre flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros fisiológicos en la cabra sin anestesiarse**

El  $Mg^{2+}$ , administrado en forma de sulfato magnésico y con independencia de la vía de administración (directamente en el sistema de aporte cerebroarterial o sistémicamente), provocó aumento del flujo sanguíneo cerebral en cabras conscientes sin cambios concomitantes en presión arterial ni frecuencia cardíaca. En cuanto a la presión arterial y frecuencia cardíaca, nuestros resultados coinciden con los de otros estudios previos en mujeres gestantes normotensas (Thiagarajah et al., 1985; O'Brien et al., 1990; Armson et al., 1992) e hipertensas (O'Brien et al., 1990), en ovejas gestantes (Chestnut et al., 1988) y ratas no gestantes (Aisenbrey et al., 1992), y demuestran que la acción vasodilatadora del  $Mg^{2+}$  resulta de un descenso en la resistencia vascular cerebral por su acción directa sobre las arterias cerebrales, en concordancia con su acción relajante sobre las arterias cerebrales aisladas. Estos resultados son similares a los descritos en monos gestantes (Thiagarajah et al., 1985), los cuales mostraron que el sulfato magnésico incrementó el flujo sanguíneo uterino sin alterar la presión de perfusión y rendimiento cardíaco, indicando un descenso en la resistencia vascular uterina. En otros estudios con distintos lechos vasculares tales como mesenterio (Altura et al., 1987; Nishio et al., 1989) y músculo esquelético de rata (Altura et al., 1987; Nagai et al., 1988), la administración sistémica de sulfato magnésico produjo descenso de la presión arterial media, sistólica y diastólica, así como de la frecuencia cardíaca, lo cual suscita la cuestión de si el mecanismo de la autorregulación pudiera estar implicado en la respuesta microvascular. Sin embargo, la evolución del calibre vascular y de

la presión arterial no se correlacionan *pari passu*, lo cual apoya la hipótesis del efecto dilatador directo sobre los microvasos antes que una respuesta secundaria a la hipotensión (Nagai et al., 1988; Nishio et al., 1989).

El mecanismo por el cual el  $Mg^{2+}$  incrementa el flujo sanguíneo cerebral es una cuestión a debatir. Como ya se ha mencionado, parece que la barrera hemato-encefálica es impermeable al  $Mg^{2+}$ , y por tanto el efecto vasodilatador se debe probablemente a su acción directa sobre la pared cerebroarterial. Podría actuar a nivel endotelial estimulando la producción de prostaciclina, hecho que se ha puesto de manifiesto en nuestros estudios *in vitro*. El  $Mg^{2+}$  estimula *in vitro* la producción de prostaciclina por el endotelio de venas umbilicales humanas (Watson et al., 1986). La prostaciclina es también producida por y liberada desde las células endoteliales en el cerebro (Pickard, 1981). Parece razonable suponer que el  $Mg^{2+}$  actúe, al menos en parte, a través de este mecanismo. Además, parte del  $Mg^{2+}$  podría alcanzar las células musculares lisas y actuar sobre el intercambio de  $Ca^{2+}$  produciendo relajación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro* y permiten afirmar que el  $Mg^{2+}$  actúa directamente sobre las arterias cerebrales causando su relajación y vasodilatación cerebral.

#### **7.7.- Efecto del sulfato magnésico sobre la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina**

Una de las aplicaciones del  $Mg^{2+}$  (en forma de sulfato magnésico) que más investigaciones ha suscitado es su posible utilidad en la prevención y tratamiento de la preeclampsia-eclampsia, desorden de la gestación que se caracteriza por el vasoespasmo generalizado (National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy, 1990). Estudios angiográficos y tomográficos computerizados han demostrado que el vasoespasmo afecta al cerebro (Will et al., 1987; Lewis et al., 1988). Existen evidencias experimentales que sugieren que la supresión del vasoespasmo es la principal estrategia terapéutica en la preeclampsia-eclampsia. El mecanismo de acción por el cual el  $Mg^{2+}$  previene y controla las convulsiones eclámpticas se podría explicar por su actuación como antagonista del  $Ca^{2+}$ , atenuando el vasoespasmo

cerebral (Zaret, 1983) tal y como se ha descrito para fármacos BECa (Haws y Heistad, 1984; Salom et al., 1990).

Se estudió la capacidad *in vivo* de  $Mg^{2+}$  para contrarrestar una vasoconstricción cerebral mantenida. Un modelo simple de vasoespasma cerebral prolongado fue la infusión de 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 o norepinefrina directamente en el lecho cerebroarterial de la cabra, que hizo posible un descenso del flujo sanguíneo cerebral con un incremento en la resistencia vascular cerebral que se mantuvo el tiempo suficiente para valorar la potencial acción del  $Mg^{2+}$  como agente anticonstrictor. El modelo *in vivo* desarrollado en la cabra permitió trabajar con el animal sin anestésicos, con lo que se evitaron las posibles interferencias de los anestésicos sobre la reactividad vascular.

La administración de  $Mg^{2+}$  (en forma de sulfato magnésico) directamente en la circulación cerebroarterial o sistémicamente, incrementó el flujo sanguíneo cerebral y revirtió la vasoconstricción cerebral provocada por infusión intraarterial de 5-hidroxitriptamina, norepinefrina y la dosis más baja de endotelina-1. Hay estudios previos que coinciden con estos resultados: el sulfato magnésico revirtió parcialmente el vasoespasma provocado en arteria basilar de gato (Kapp et al., 1970) y de rata (Ram et al., 1991). En ratas sometidas a isquemia focal, el sulfato magnésico incrementó el flujo sanguíneo en el área isquémica (Chi et al., 1990). También en humanos se ha descrito dilatación de los vasos de pequeño calibre distales a la arteria cerebral media (Belfort y Moise, 1992). Por el contrario, la infusión intravenosa de sulfato magnésico no modificó la hipoperfusión tardía subsiguiente a un periodo de isquemia cerebral global en ratas (Grøgaard et al., 1988).

La respuesta vasoconstrictora a endotelina-1 fue mucho menos afectada por  $Mg^{2+}$  que la respuesta a 5-hidroxitriptamina y a norepinefrina. El  $Mg^{2+}$  administrado directamente en la circulación cerebroarterial o sistémicamente, revirtió la reducción de flujo sanguíneo cerebral provocada por 5-hidroxitriptamina o norepinefrina, mientras que por vía intraarterial no revirtió completamente la reducción de flujo sanguíneo cerebral provocada por la dosis más alta de endotelina-1 y no tuvo efecto vasodilatador cuando se administró

por vía intravenosa. Estos resultados confirman los obtenidos *in vitro*, en los que las contracciones inducidas por la adición acumulativa de 5-hidroxitriptamina o norepinefrina se vieron reducidas significativamente en medio hipermagnesémico, mientras que las inducidas por endotelina-1 se mostraron resistentes al efecto inhibitor del  $Mg^{2+}$ .

El mecanismo por el cual el  $Mg^{2+}$  contrarresta la contracción provocada por 5-hidroxitriptamina, endotelina-1 y norepinefrina *in vivo* puede estar relacionado con el lugar en el cual actúa el  $Mg^{2+}$  en el lecho cerebrovascular. El  $Mg^{2+}$  administrado sistémicamente podría actuar bloqueando la entrada de  $Ca^{2+}$  resultante de la activación de las células musculares lisas cerebrovasculares por los estímulos ensayados. Para ello sería necesario que al menos una parte del  $Mg^{2+}$  circulante alcanzara las células musculares lisas, como se ha sugerido anteriormente.

Cuando se infundió por vía intravenosa, la norepinefrina provocó descenso sostenido de flujo sanguíneo cerebral e incremento de la presión arterial y resistencia vascular cerebral. La administración intravenosa de sulfato magnésico atenuó la vasoconstricción cerebral y la respuesta presora inducida por norepinefrina. Los resultados acerca del efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la presión arterial concuerdan con los obtenidos previamente en conejos normales y gestantes normotensos (Lee et al., 1984, 1985) y ratas (Aisenbrey et al., 1992), y sugieren que el  $Mg^{2+}$  podría ser usado como un agente primario antihipertensivo. En efecto, se observó un descenso significativo en la presión arterial después de infusión de sulfato magnésico en gestantes hipertensas (Dyckner y Wester, 1983; Bhatia et al., 1987; England et al., 1990). Sin embargo, otros autores están en desacuerdo, ya que el sulfato magnésico ha mostrado tener sólo un efecto hipotensor transitorio en gestantes hipertensas (Cotton et al., 1984) y en ovejas gestantes normo e hipertensas (Dandavino et al., 1977; Ayromlooi et al., 1980). La valoración global de los resultados obtenidos tanto en la experimentación animal como en ensayos clínicos controlados no permiten, por lo tanto, confirmar ni refutar la hipótesis de que la administración de  $Mg^{2+}$  sea eficaz reduciendo la presión arterial (Whelton y Klag, 1989).

Se ha sometido a debate los efectos beneficiosos del sulfato magnésico en el tratamiento de la preeclampsia-eclampsia, los cuales podrían ser debidos, al menos en parte, a su capacidad para reducir los niveles circulantes de catecolaminas o para contrarrestar su respuesta vascular. Con respecto a lo primero, el sulfato magnésico ha mostrado reducir los niveles circulantes de dopamina y epinefrina pero no de norepinefrina tanto en ratones gestantes como no gestantes (Lee et al., 1985). En pacientes con hipertensión y proteinuria gestacional severa, el sulfato magnésico no cambió los niveles en plasma venoso de epinefrina y norepinefrina, pero redujo los de dopamina (England et al., 1990). Estas evidencias demuestran que la interacción directa norepinefrina/Mg<sup>2+</sup> a nivel vascular es la causa principal de la capacidad del Mg<sup>2+</sup> para contrarrestar las acciones de norepinefrina y que tales interacciones no son exclusivas del lecho cerebrovascular, también se aplica a la vasculatura periférica. De acuerdo con la antedicha evidencia y considerando que la norepinefrina actúa sobre  $\alpha$ -adrenoreceptores (Alborch y Luch, 1989) se puede concluir que el Mg<sup>2+</sup> contrarresta la acción de norepinefrina por interferir en el influjo de Ca<sup>2+</sup> transmembrana subsecuente a la activación de los  $\alpha$ -adrenoreceptores. Los efectos se registran no sólo en el músculo liso vascular cerebral sino también en el periférico, que conduce a la inhibición de la vasoconstricción cerebral y respuesta presora respectivamente, provocadas por norepinefrina.

Estos resultados están a favor de la hipótesis de que los efectos beneficiosos del sulfato magnésico en el tratamiento de preeclampsia-eclampsia se derivan, al menos en parte, de su capacidad para reducir la resistencia vascular cerebral contrarrestando la acción de espasmógenos circulantes. Por otra parte, el Mg<sup>2+</sup> podría interferir el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por la isquemia secundaria a la vasoconstricción cerebral, evitando la lesión y muerte neuronal no sólo en el síndrome de la preeclampsia-eclampsia, sino también en otras enfermedades cerebrovasculares tales como la hemorragia subaracnoidea, el *ictus* isquémico (infarto cerebral agudo) y el traumatismo encefálico (Sadeh, 1989).

## **8.- CONCLUSIONES**

- 1.- Los cambios en la concentración de  $Mg^{2+}$  no afectan al tono de las arterias cerebrales aisladas de cabra. En arterias sometidas exclusivamente a tono pasivo ni la disminución ni el aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$  modifican la tensión vascular, descartándose por lo tanto las asociaciones hipomagnesemia-incremento del tono vascular e hipermagnesemia-descenso del tono vascular. En arterias sometidas a tono activo inducido farmacológicamente la respuesta depende del agente vasoconstrictor, ya que en arterias precontraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  o endotelina-1 la disminución de la concentración de  $Mg^{2+}$  da lugar a una respuesta bifásica (relajación seguida de contracción), mientras que en arterias precontraídas con KCl no se registra ninguna respuesta apreciable. La respuesta bifásica inducida por el déficit en  $Mg^{2+}$  no parece tener especial significación ya que se reproduce simplemente cambiando el medio de incubación y manteniendo constante la concentración de  $Mg^{2+}$ .
- 2.- El  $Mg^{2+}$  es un factor desencadenante de relajación vascular en arterias aisladas previamente contraídas en medio libre de  $Mg^{2+}$ , condición que se pone de manifiesto independientemente del agente inductor del tono activo, de la especie y del tipo de arteria. No obstante, su capacidad relajante no es la misma en todos los casos y depende de los tres factores mencionados: 1) es más potente en arterias cerebrales precontraídas con 5-hidroxitriptamina que con cualquiera de los otros vasoconstrictores ensayados, especialmente KCl; 2) en una misma especie (conejo) es más potente en arterias cerebrales (basilar) que en arterias extracerebrales (carótida); 3) no puede establecerse una relación simple de la capacidad relajante del  $Mg^{2+}$  entre arterias cerebrales de distintas especies, ya que depende del agente vasoconstrictor y del parámetro que se considere para su estimación ( $CE_{50}$  para la potencia y  $E_{m\acute{a}x}$  para la eficacia).

- 3.- El NO no parece tener ningún papel mediador ni en la respuesta relajante inducida por el déficit en  $Mg^{2+}$  sobre arterias cerebrales de cabra sometidas a tono activo, ni en la respuesta relajante inducida por la adición de  $Mg^{2+}$  en arterias previamente contraídas e incubadas en medio libre de  $Mg^{2+}$ . Por el contrario, alguna prostaglandina vasodilatadora (posiblemente prostaciclina) sí podría estar implicada en la respuesta relajante inducida por la adición de  $Mg^{2+}$ .
- 4.- La influencia de la concentración de  $Mg^{2+}$  sobre la respuesta contráctil de las arterias cerebrales aislada depende del estímulo y de la especie que se consideren. En arterias cerebrales de cabra tanto endotelina-1 como  $Ca^{2+}$  se muestran más resistentes al efecto inhibitor de altas concentraciones de  $Mg^{2+}$  que 5-hidroxitriptamina y norepinefrina, mientras que en arterias cerebrales humanas prostaglandina  $F_{2\alpha}$  se muestra más resistente al efecto inhibitor de altas concentraciones de  $Mg^{2+}$  que 5-hidroxitriptamina. En ningún caso puede afirmarse que el déficit en  $Mg^{2+}$  potencie la respuesta contráctil inducida por los vasoconstrictores ensayados.
- 5.- La barrera hemato-encefálica parece impermeable al  $Mg^{2+}$ , ya que el aumento de los niveles plasmáticos de  $Mg^{2+}$  no se ve acompañado del aumento significativo de los niveles de  $Mg^{2+}$  en líquido cefalorraquídeo. No obstante cabe la posibilidad de que una parte del  $Mg^{2+}$  circulante pudiera alcanzar el músculo liso cerebroarterial.
- 6.- Independientemente de la vía por la que se administre (directamente en el lecho cerebroarterial o sistémicamente), el sulfato magnésico provoca aumento del flujo sanguíneo cerebral como consecuencia de la reducción de la resistencia vascular cerebral, es decir, por su acción directa sobre las arterias cerebrales, lo cual está en concordancia con la capacidad del  $Mg^{2+}$  para relajar las arterias cerebrales aisladas precontraídas.



- 7.- Independientemente de la vía por la que se administre (directamente en el lecho cerebroarterial o sistémicamente), el sulfato magnésico es capaz de revertir la vasoconstricción cerebral inducida por 5-hidroxitriptamina y norepinefrina, pero no por endotelina-1, lo cual pone una vez más de manifiesto la resistencia de este estímulo al efecto inhibitor del  $Mg^{2+}$ . Además, el sulfato magnésico se muestra como un eficaz agente antihipertensor ya que es capaz de atenuar el incremento de presión arterial inducido por norepinefrina.



## ***9.- BIBLIOGRAFÍA***

Aisenbrey GA, Corwin E, Catanzarite V. Effect of magnesium sulfate on the vascular actions of norepinephrine and angiotensin II. *Am J Perinat* 1992; 9:477-480.

Alborch E, Lluch S. Sympathetic activity in the cerebral vessels. En: *Neurotransmission and Cerebrovascular Function II*. Seylaz J, Sercombe R, eds. Amsterdam: Elsevier, 1989; p117.

Alborch E, Salom JB, Perales A, Torregrosa G, Miranda FJ, Alabadí JA, Jover T. Comparison of the anticonstrictor action of dihydropyridines (nimodipine and nicardipine) and  $Mg^{2+}$  in isolated human cerebral arteries. *Eur J Pharmacol* 1992; 229:83-89.

Alborch E, Salom JB, Torregrosa G. Calcium channels in cerebral arteries. *Pharmac Ther* 1995; 68:1-34.

Allen GS, Gross CJ, Henderson LM, Chou SN. Cerebral arterial spasm. Part 4: *In vitro* effects of temperature, serotonin analogues, large nonphysiological concentrations of serotonin, and extracellular calcium and magnesium on serotonin-induced contractions of the canine basilar artery. *J Neurosurg* 1976; 44:585-593.

Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *TIBS* 1994; 19:362-368.

Altura BM. Magnesium and regulation of contractility of vascular smooth muscle. *Adv Microcirc* 1982; 11:77-113.

Altura BM, Altura BT. Influence of magnesium on drug-induced contractions and ion content in rabbit aorta. *Am J Physiol* 1971; 220:938-944.

Altura BM, Altura BT. Magnesium and contraction of arterial smooth muscle. *Microvasc Res* 1974; 7:145-155.

Altura BM, Altura BT. Extracellular magnesium and contraction of vascular smooth muscle. En: *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*. R Casteels, T Godfraind and JG Rüegg (Eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press: Lovaina (Belgium) 1977; pp 137-144.

Altura BM, Altura BT. Magnesium and vascular tone and reactivity. *Blood Vessels* 1978; 15:5-16.

Altura BT, Altura BM. Withdrawal of magnesium causes vasospasm while elevated magnesium produces relaxation of tone in cerebral arteries. *Neurosci Lett* 1980; 20:323-327.

Altura BM, Altura BT. Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscles: relationship to some vascular diseases. *Fed Proc* 1981; 40:2672-2679 (a).

Altura BM, Altura BT. General anesthetics and magnesium ions as calcium antagonists on vascular smooth muscle. En: *New Perspectives on Calcium Antagonists*. G.B. Weiss (Ed.) American Physiological Society: Bethesda 1981; pp 131-145 (b).

Altura BM, Altura BT. Role of magnesium ions in contractility of blood vessels and skeletal muscles. *Magnesium-Bull* 1981; 3 (1a):102-114 (c).

Altura BM, Altura BT. Magnesium, electrolyte transport and coronary vascular tone. *Drugs* 1984; 28 (Supl. 1):120-142 (a).

Altura BM, Altura BT. Microcirculatory actions and uses of naturally-occurring (magnesium) and novel synthetic calcium channel blockers. *Microcirc Enoloth Lymph* 1984; 1:185-220 (b).

Altura BT, Altura BM. Endothelium-dependent relaxation in coronary arteries requires magnesium ions. *Br J Pharmac* 1987; 91:449-451.

Altura BM, Altura BT, Carella A. Magnesium deficiency-induced spasms of umbilical vessels: relation to preeclampsia, hypertension, growth retardation. *Science* 1983; 221:376-478.

Altura BM, Altura BT, Carella A, Gebrewold A, Murakawa T, Nishio A.  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  interaction in contractility of vascular smooth muscle:  $Mg^{2+}$  versus organic calcium channel blockers on myogenic tone and agonist-induced responsiveness of blood vessels. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65:729-745.

Altura BM, Altura BT, Carella A, Turlapaty PDMV.  $Ca^{2+}$  coupling in vascular smooth muscle:  $Mg^{2+}$  and buffer effects on contractibility and membrane  $Ca^{2+}$  movements. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60:459-482.

Altura BM, Altura BT, Gebrewold A. Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium-deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science* 1984; 223:1315-1317.

Altura BT, Zhang A, Altura BM. Sodium-calcium exchange mechanism in vascular smooth muscle tissue as revealed by manipulating external magnesium. *Magnesium Trace Elements* 1990; 9:163-175.

Altura BM, Zhang A, Altura BT. Magnesium, hypertensive vascular diseases, atherogenesis, subcellular compartmentation of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and vascular contractility. *Miner Electrolyte Metab* 1993; 19:323-336.

Anderson B, Jewell PA. The distribution of carotid and vertebral blood in the brain and spinal cord of the goat. *Quart J Exptl Physiol* 1956; 41:462-474.

Ann HS, Ku DD. Magnesium inhibits basal release of endothelin-derived relaxing factor in canine coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 1986; 130:353-455.

Armson BA, Samuels P, Miller F, Verbalis J, Main EK. Evaluation of maternal fluid dynamics during tocolytic therapy with ritodrine hydrochloride and magnesium sulfate. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:758-765.

Ayromlooi J, Tobias M, Desiderio D. Studies of circulation and acid-base balance in pregnant sheep: II. The effect of magnesium sulfate infusion. *Int J Gynaecol Obstet* 1980; 18:224-229.

Baik YH, Kim JH, Kim JK, Kim YI. Effects of calcium channel blockers on contractile responses to vasoconstrictors and endothelium-induced relaxation in porcine cerebral arteries. *Chonnam J Med Sci* 1988; 1:93-101.

Baldwin BA, Bell PR. The anatomy of the cerebral circulation of the sheep and goat. The dynamic distribution of the blood supplied by the carotid and vertebral arteries to the cranial regions. *J Anat (London)* 1963; 97:203-215.

Bathia RK, Bottoms SF, Sokol RJ. Pre-eclampsia, magnesium sulfate and blood pressure evaluation during labor: a preliminary consideration. *Am J Perinat* 1987; 4:352-355.

Belfort MA, Moise KJ Jr. Effect of magnesium sulfate on maternal brain blood flow in preeclampsia: A randomized, placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:661-666.

Belfort MA, Saade GR, Moise KJ, Kirshon B, Vanhoutte PM. Magnesium sulfate and diphenylhydantoin relax canine middle cerebral artery contracted with the thromboxane-A<sub>2</sub> analogue U46619 by different mechanisms: implications for the management of eclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1994; 13:51-60.

Brandt L, Andersson K-E, Edvinsson L, Ljunggren B. Effects of extracellular calcium and of calcium antagonists on the contractile responses of isolated human pial and mesenteric arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1:339-347.

Branston NM. Neurogenic control of the cerebral circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7:338-349.

Bucher B, Paya D, Stoclet J-C. Modulation of [<sup>3</sup>H] noradrenaline release by endothelin-1 in the rat tail artery. *Neurochem Int* 1991; 18:455-459.

Buljubasic N, Flynn NM, Marific FJ, Rusch NJ, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Effects of isoflurane on K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> conductance in isolated smooth muscle cells of canine cerebral arteries. *Anesth Analg* 1992; 75:590-596.

Catanzarite V, Quirk JG, Aisenbrey G. How do perinatologists manage preeclampsia? *Am J Perinatol* 1991; 8:7-10.

Chapman RW, Santiago TW, Edelman NH. Effects of graded reduction of brain blood flow on ventilation in unanesthetized goats. *J Appl Physiol* 1979; 47:104-111.

Chestnut DH, Thompson CS, McLaughliu GL, Weiner CP. Does the intravenous of ritodrine or magnesium sulfate alter the hemodynamic response to hemorrhage in gravid ewes ?. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:1467-1473.

Chestnut DH, Weiner CP, Thompson CS, Debruyne CG. Does indomethacin alter the hemodynamic response to magnesium sulfate infusion and hemorrhage in gravid ewes?. *Obstet Gynecol* 1990; 76:1076-1082.

Chi OZ, Pollak P, Weiss HR. Effects of magnesium sulfate and nifedipine on regional cerebral blood flow during middle cerebral artery ligation in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1990; 304:196-205.

Colden-Stanfield M, Schilling WP, Eskin SG, Navarro LT, Kunze DL. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 1987; 61:632-640.

Cotton DB, Gonik B, Dorman KF. Cardiovascular alterations in severe pregnancy-induced hypertension: Acute effects of intravenous magnesium sulfate. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:162-165.

Crockcroft JR, Clarke JG, Webb DJ. The effect of intraarterial endothelin on resting blood flow and sympathetically mediated vasoconstriction in the forearm of man. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31:521-524.

Dandavino A, Wood JR Jr., Murayama K, Brinkman CR III, Assali NS. Circulatory effects of magnesium sulfate in normotensive and renal hypertensive pregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127:769-774.

Daniel PM, Dawes JDK, Prichard MML. Studies of the carotid rete and its associated arteries. *Phil Trans Roy Soc London* 1953; B237:173-208.

Dawson EB, Frey MJ, Moore TD, McGanity WJ. Relationship of metal metabolism to vascular disease mortality rates in Texas. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:1188-1197.

Diéguez G, Gómez B, Lluch S. Analysis of the cerebrovascular effects of 5-hydroxytryptamine in unanesthetized goats. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 216:599-603.

Dinsdale HB. Does magnesium sulfate treat eclamptic seizures? Yes. *Arch Neurol* 1988; 45:1360-1361.

Donaldson JO. Eclamptic hypertensive encephalopathy. *Semin Neurol* 1988; 8:230-233.

Donaldson JO. The brain in eclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1994; 13:115-133.

Dyckner T, Wester PO. Effect of magnesium on blood pressure. *Br Med J* 1983, 286:1847-1849.



- Edelman NH, Epstein NS, Cherniak N, Fishman AP. Control of cerebral blood flow in the goat; role of the carotid rete. *Am J Physiol* 1972; 223:615-619.
- Edvinsson L, Mackenzie ET, McCulloch J. *Cerebral Blood Flow Metabolism*. Raven Press: New York, 1993.
- Encabo A, Ferrer M, Marin J, Villamor J, Balfagón G. Vasoconstrictive responses elicited by endothelin in bovine cerebral arteries. *Gen Pharmacol* 1992; 23:263-267.
- England MJ, Panz VR, Joffe BI, Touyz RM, Shires R, Seftel HC. The effect of magnesium sulphate infusion on circulating catecholamine levels in severe gestational proteinuric hypertension. *S Afr Med J* 1990; 78:688-690.
- Faragó M, Dóra E, Horváth I, Szabó C, Kovách AGB. Contractile and endothelium-dependent dilatory responses of cerebral and mesenteric arteries at various  $Mg^{2+}$  levels. *J Vasc Med Biol* 1989; 1:85A.
- Faragó M, Szabó C, Dóra E, Horváth I, Kovách AGB. Contractile and endothelium-dependent dilatory responses of cerebral arteries at various extracellular magnesium concentrations. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11:161-164.
- Féléto M, Rasetti C, Duhault J. Magnesium modulates endothelial dysfunction produced by elevated glucose incubation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:470-478.
- Fujiwara S, Ito Y, Itoh T, Kuriyama H, Suzuki H. Diltiazem-induced vasodilatation of smooth muscle cells of the canine basilar artery. *Br J Pharmacol* 1982; 75:455-467.
- Fujiwara M, Kitagawa H, Kurahashi K. Effects of magnesium on contractile responses induced by electrical transmural stimulation and noradrenaline in rabbit thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 1978; 63:51-56.

Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 228:373-376.

Gaitz JP, Bamford CR. Unusual computed tomographic scan in eclampsia. *Arch Neurol* 1982; 39:66.

Ganitkevich VY, Isenberg G. Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance. *J Physiol* 1990; 426:19-42.

Gold ME, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chandhuri G, Ignarro LJ. Antagonistic modulatory roles of magnesium and calcium on release of endothelium-derived relaxing factor and smooth muscle tone. *Circ Res* 1990; 66:355-366.

Goldstein S, Zsotér TT. The effect of magnesium on the response of smooth muscle to 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 1978; 62:507-514.

Grøgaard B, Gerdiu B, Arfors KE. Inability of flunarizine, lidoflazine or magnesium to counteract delayed hypoperfusion after forebrain ischaemia in the rat. *Acta Neurochir* 1988; 95:136-142.

Günther J, Dhein S, Rösen R, Klaus W, Fricke V. Nitric oxide (EDRF) enhances the vasorelaxing effect of nitrendipine in various isolated arteries. *Basic Res Cardiol* 1992; 87:452-460.

Hallak M, Berman RF, Irtenkauf SM, Evans MI, Cotton DB. Peripheral magnesium sulfate enters the brain and increases the threshold for hippocampal seizures in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1605-1610.

Hallak M, Cotton DB. Transfer of maternally administered magnesium sulfate into the fetal compartment of the rat: Assessment of amniotic fluid, blood and brain concentrations. *J Obstet Gynecol* 1993; 169:427-431.

Hankins GDV, Snyder RR, Hauth JC, Gilstrap III LC, Wians FH, Van dellen AF. Magnesium sulfate pharmacokinetics: pregnant *Capra hircus* model. *Am J Perinatol* 1990; 7:49-53.

Haws CW, Heistad DD. Effects of nimodipine on cerebral vasoconstrictor responses. *Am J Physiol* 1984; 247:H170-176.

Himpens B, Missiaen L, Casteels R.  $Ca^{2+}$  homeostasis in vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 1995; 32:207-219.

Huang QF, Gebrewold A, Altura BT, Altura BM.  $Mg^{2+}$  protects against PCP-induced cerebrovasospasms and vascular damage in rat brain. *Magnesium Trace Elem* 1990; 9:44-46 (a).

Huang QF, Gebrewold A, Altura BT, Altura BM. Magnesium ions prevent phencyclidine-induced cerebrovasospasms and rupture of cerebral microvessels: direct in-vivo microcirculatory studies on the rat brain. *Neurosci Lett* 1990; 113:115-119 (b).

Iseri LT, French JH. Magnesium: Nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 1984; 108: 188-193.

Janis RA, Silver PJ, Triggle DJ. Drug action and cellular calcium regulation. *Adv Drug Res* 1987; 16:309-591.

Jansen I, Fallgren B, Edvinsson L. Mechanisms of action of endothelin on isolated feline cerebral arteries: in vitro pharmacology and electrophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:743-747.

Jansen I, Tfelt-Hansen P, Edvinsson L. Comparison of the calcium entry blockers nimodipine and flunarizine on human cerebral and temporal arteries. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 40:7-15.

- Jensen PE, Mulvany MJ, Aalkjaer C. Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between  $[Ca^{2+}]_i$  and force in rat resistance arteries. *Pflügers Arch* 1992; 420:536-543.
- Jurevics HA, Carrier O Jr. Effect of magnesium on responses of aortas from normal and reserpine-treated rabbits. *Am J Physiol* 1973; 225:1479-1485.
- Kaplan PW, Lesser RP, Fisher RS, Repke JT, Hanley DF. NO, magnesium sulfate should not be used in treating eclamptic convulsions. *Arch Neurol* 1988; 45:1361-1364.
- Kapp J, Mahaley MS Jr, Odom GL. Experimental evaluation of potential spasmolytic. *J Neurosurg* 1970; 32:468-472.
- Kennedy I, Coleman R, Humphery P, Levy G, Lumley P. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins* 1982; 24:667-689.
- Kent TA, Jazayeri A, Simard M. Calcium channels and nifedipine inhibition of serotonin-induced  $[^3H]$  thymidine incorporation in cultured cerebral smooth muscle cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12:139-146.
- Kirby JC, Jaindl JJ. Cerebral CT findings in toxemia of pregnancy. *Radiology* 1984; 151:114.
- Ku DD, Ann HS. Magnesium deficiency produces endothelium-dependent vasorelaxation in canine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 241:961-966.
- Ku DD, Ann HS. Differential effects of magnesium on basal and agonist-induced EDRF relaxation in canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:999-1006.
- Langton PD, Standen NB. Calcium currents elicited by voltage steps and steady voltages in myocytes isolated from the rat basilar artery. *J Physiol* 1993; 469:535-548.

Lauler DP. Introduction magnesium-coming of age. *Am J Cardiol* 1989; 63:16-36.

Lee MI, Bottoms SF, Sokol RJ. Effects of pregnancy and magnesium sulfate infusion on blood pressure and plasma catecholamines. *Am J Perinat* 1985; 2:325-327.

Lee MI, Todd HM, Bowe A. The effects of magnesium sulfate infusion on blood pressure and vascular responsiveness during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149:705-708.

Lerman A, Hildebrand FL, Margulies KB, O'Murchu B, Perrella MA, Heublein DM, Schwab TR, Burnett JG. Endothelin: A new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin Proc* 1990; 68:1441-1455.

Levine BS, Coburn JW. Magnesium, the mimic/antagonist of calcium. *New Engl J Med* 1984; 310:1253-1255.

Lewis LK, Hinshaw DB Jr., Will AD, Hasso AN, Thompson JR. CT and angiographic correlation of severe neurological disease in toxemia of pregnancy. *Neuroradiology* 1988; 30:59-64.

Lindheimer MD. Magnesium sulfate and preeclampsia or eclampsia. *Arch Neurol* 1989; 46:1164-1165.

Long CJ, Stone TW. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels* 1985; 22:205-208.

Martín de Aguilera E, Irurzun A, Vila JM, Aldasoro M, Galeote MS, Lluch S. Role of endothelium and calcium channels in endothelin-induced contraction of human cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1990; 99:439-440.

Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1711-1716.

McGiff JC, Carroll MA. Eicosanoids in preeclampsia-eclampsia: the effects of magnesium. *Hypertens pregnancy* 1994; 13:217-226.

Michelakis E, Tewari K, Simard JM. Calcium channels in smooth muscle cells from cerebral precapillary arterioles activate at more negative potentials than those from basilar artery. *Pflügers Arch* 1994; 426:459-461.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30:293-320.

Mordes JP, Wacker WEG. Excess magnesium. *Pharmacol Rev* 1978; 29:273-300.

Mulvany MJ, Nilsson H, Flatman JA. Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *J Physiol* 1982; 332:363-373.

Nadler JL, Goodson S, Rude RK. Evidence that prostacyclin mediates the vascular action of magnesium in humans. *Hypertension* 1987; 9:379-383.

Nagai I, Gebrewold A, Altura BT, Altura BM. Magnesium salts exert direct vasodilator effects on rat cremaster muscle microcirculation. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1988; 294:194-214.

National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:1689-1712.

Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990; 259:G3-G18.

Nilsson H, Jensen PE, Mulvany MJ. Minor role for direct adrenoceptor-mediated calcium entry in rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 1994; 31:314-321.

Nishimura J, Khalil RA, Drenth JP, Van Breemen G. Evidence for increased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in norepinephrine-activated vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 259:H2-H8.

Nishio A, Gebrewold A, Altura BT, Altura BM. Comparative vasodilator effects of magnesium salts on rat mesenteric arterioles and venules. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1989; 298:139-163.

Noguera MA, D'Ocón. Modulatory role of magnesium on the contractile response of rat aorta to several agonists in normal and calcium-free medium. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45:697-700.

Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:724-727.

O'Brien WF, Williams MC, Benoit R, Sawai SK, Knuppel RA. The effect of magnesium sulfate infusion on systemic and renal prostacyclin production. *Prostaglandins* 1990; 40:529-538.

O'Donnell ME, Owen NE. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiol Rev* 1994; 74:683-721.

Oike M, Inoue Y, Kitamura K, Kuriyama H. Dual action of FRG8653, a novel dihydropyridine derivative, on the  $\text{Ba}^{2+}$  current recorded from the rabbit basilar artery. *Circ Res* 1990; 67:993-1006.

Olsen OM, Sorenson SL. Stability of  $[\text{Mg}^{++}]$  in cerebrospinal fluid during plasma changes and during hypercapnia in young and adult rats. *Acta Physiol Scand* 1971; 82:466-469.

Oppelt WW, Macintyre I, Rall DP. Magnesium exchange between blood and cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 1963; 205:959-962.

Pickard JD. Role of prostaglandins and arachidonic acid derivatives in the coupling of cerebral blood flow to cerebral metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1:361-384.

Pritchard JA. Magnesium sulfate in the treatment of eclampsia. *Arch Neurol* 1989; 46: 947-948.

Ram Z, Sadeh M, Shacked I, Sahar A, Hadani M. Magnesium sulfate reverses experimental delayed cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 1991; 22:922-927.

Reimann C, LLuch S, Glick G. Development and evaluation of an experimental model for the study of the cerebral circulation in the unanesthetized goat. *Stroke* 1972; 3:322-328.

Reinhart RA. Clinical correlates of the molecular and cellular actions of magnesium on the cardiovascular system. *Am Heart J* 1995; 121:1513-1521.

Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1200-1204.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Calcium and activation of the release of endothelium-derived relaxing factor. En: Calcium Antagonists Pharmacology and Clinical Research. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988; 522:226-233.

Rude RK. Physiology of magnesium metabolism and the important role of magnesium in potassium deficiency. *Am J Cardiol* 1989; 63:31G-34G.

Sadeh M. Action of magnesium sulfate in the treatment of preeclampsia-eclampsia. *Stroke* 1989; 20:1273-1275.

Saleh AA, Bottoms SF, Welch RA, Ali AM, Mariona FG, Mammen EF. Preeclampsia, delivery, and the hemostatic system. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157:331-336.



Salom JB, Torregrosa G, Alborch E. Endothelins and the cerebral circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7:131-152.

Salom JB, Torregrosa G, Barberá MD, Jover T, Alborch E. Endothelin receptors mediating contraction in goat cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1993; 109:826-830.

Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alabadi JA, Alborch E. Comparison of the contractile effects of endothelin-1 and sarafotoxin S6b in goat isolated cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1992; 106:95-100.

Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alabadi JA, Alvarez C, Alborch E. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  entry blockers on  $\text{CaCl}_2^-$ ,  $\text{KCl}^-$  and noradrenaline-induced contractions of goat cerebral arteries. *Eur J Pharmacol* 1990; 177:1-8.

Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alabadi JA, Alvarez C, Alborch E. Effects of endothelin-1 on the cerebrovascular bed of the goat. *Eur J Pharmacol* 1991; 192:39-45.

Schiff E, Ben-Baruch G, Peleg E, Rosenthal T, Alcalay M, Devit M, Mashiach S. Immunoreactive circulating endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:624-628.

Schilling WP, Elliot SJ.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol* 1992; 262:H1617-H1630.

Seelig M. Cardiovascular consequences of magnesium deficiency and loss: pathogenesis, prevalence and manifestations- Magnesium and chloride loss in refractory potassium repletion. *Am J Cardiol* 1989; 63:4G-21G.

Seelig JM, Wei EP, Kontos HA, Choi SC, Becker DP. Effect of changes in magnesium ion concentration on cat cerebral arterioles. *Am J Physiol* 1983; 245:H22-H26.

Sheehan HL, Lynch JB. *Pathology of Toxaemia of Pregnancy*. Edinburg: Churchill Livingstone, 1973.

Seidel MF, Simard JM, Hunter SF, Campbell GA. Isolation of arteriolar microvessels and culture of smooth muscle cells from cerebral cortex of guinea pig. *Cell Tissue Res* 1991; 265:579-587.

Sibai B. Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:1141-1145.

Simard JM. Calcium channel currents in isolated smooth muscle cells from the basilar artery of the guinea pig. *Pflügers Arch* 1991; 417:528-536.

Singer HA, Peach MJ. Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 1982; 4(Supl. II):II-19-II-25.

Sjögren A, Edvinsson L. Vasomotor effects of magnesium: A comparison with nifedipine and verapamil of *in vitro* reactivity in feline cerebral and peripheral arteries. *Magnesium* 1986; 5:66-75.

Sjögren A, Edvinsson L. The influence of magnesium on the release of calcium from intercellular depots in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Toxicol* 1988; 62:17-21.

Smith JB, Gragoe EJ, Smith L. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiport in cultured arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:11988-11994.

Spedding M, Paoletti R. III. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol Rev* 1992; 44:363-376.

Stitt FW, Clayton DG, Crawford MD, Morris JN. Clinical and biochemical indicators of cardiovascular disease among men living in hard and soft water areas. *Lancet* 1973; 1:122-126.

Szabó C, Bérczi V, Schneider F, Kovách AGB, Monos E. Role of endothelium in the response of the vein wall to magnesium withdrawal. *Pflügers Arch* 1992; 420:140-145 (a).

Szabó C, Faragó M, Dóra E. Effect of small changes in extracellular magnesium concentration on the tone of feline mesenteric arteries: involvement of endothelium. *Acta Physiol Hun* 1992; 79:295-303 (b).

Szabó C, Faragó M, Dóra E, Horváth I, Kovách AGB. Influence of extracellular magnesium on the contractile and endothelium-dependent dilatory responses of feline mesenteric arteries. *Acta Physiol Hun* 1991; 78:19-26 (a).

Szabó C, Faragó M, Dóra E, Horváth I, Kovách AGB. Endothelium-dependent influence of small changes in extracellular magnesium concentration on the tone of feline middle cerebral arteries. *Stroke* 1991; 22:785-789 (b).

Szabó C, Hardebo JE, Salford LG. Role of endothelium in the responses of human intracranial arteries to a slight reduction of extracellular magnesium. *Exp Physiol* 1992; 77:209-211 (c).

Tabuchi Y, Nakamaru M, Rakugi H, Nagano M, Higashimori K, Mikami H, Ogihara T. Effects of endothelin on neuroeffector junction in mesenteric arteries of hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 15: 739-743.

Takagi K, Takaganagi I, Liao CS. The effect of calcium and magnesium ions on drug-receptor interactions. *Eur J Pharmacol* 1972; 19:330-342.

Takayasu M, Bassett JE, Dacey RG. Effects of calcium antagonists on intracerebral penetrating arterioles in rats. *J Neurosurg* 1988; 69:104-109.

Takayasu M, Dacey RG. Calcium dependence of intracerebral arteriolar vasomotor tone and constrictor responses in rats. *Stroke* 1989; 20:778-782.

Taylor RN, Varma M, Teng NNH, Roberts JM. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocr Metab* 1990; 71:1675-1677.

Thiagarajah S, Harbert GM Jr., Bourgeois FJ. Magnesium sulfate and ritodrine hydrochloride: Systemic and uterine hemodynamic effects. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153:666-674.

Thulin T, Fagher B, Grabowski M, Ryding E, Elmquist D, Johansson B. Cerebral blood flow in patients with severe hypertension, and chronic effects of felodipine. *J Hypertens* 1993; 11:83-88.

Thurnau GR, Kemp DB, Jarvis A. Cerebrospinal fluid levels of magnesium in patients with preeclampsia after treatment with intravenous magnesium sulfate: a preliminary report. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157:1435-1438.

Toda N, Okamura T. Different susceptibility of vasodilator nerve, endothelium and smooth muscle function to  $Ca^{++}$  antagonists in cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261:234-239.

Turlapaty PDMV, Altura BM. Extracellular magnesium ions control calcium exchange and content of vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1978; 52:421-423.

Turlapaty PDMV, Altura BM. Magnesium deficiency produces spasms of coronary arteries: relationship to etiology of sudden death ischemic heart disease. *Science* 1980; 208:198-200.

Turlapaty PDMV, Weiner R, Altura BM. Interactions of magnesium and verapamil on tone and contractility of vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1981; 74:263-272.

Uski TK, Andersson K-E, Brandt L, Ljunggren B. Characterization of the prostanoid receptors and of the contractile effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> in human pial arteries. *Acta Physiol Scand* 1984; 121:369.

Villringer A, Dirnagl V. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7:240-276.

Watson KV, Moldow CF, Ogburn PL, Jacob HS. Magnesium sulfate: Rationale for its use in preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:1075-1078.

Weglicki WB, Phillips TM, Freedman AM, Cassidy MM, Dickens BJ. Magnesium-deficiency elevates circulating levels of inflammatory cytokines and endothelin. *Mol Cell Biochem* 1992; 110:169-173.

West GA, Leppla DC, Simard JM. Effects of external pH on ionic currents in smooth muscle cells from the basilar artery. *Circ Res* 1992; 71:201-209.

Whelton PK, Klag MJ. Magnesium and Blood Pressure: review of the epidemiologic and clinical trial experience. *Am J Cardiol* 1989; 63:26G-30G.

Wiklund NP, Öhlen A, Cederqvist B. Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in the guinea pig femoral artery. *Acta Physiol Scand* 1988; 134:311-312.

Will AD, Lewis KL, Hinshaw DB Jr, Jordan K, Cousins LM, Hasso AN, Thompson JR. Cerebral vasoconstriction in toxemia. *Neurology* 1987; 37:1555-1557.

Wyatt DG. Blood flow and blood velocity measurement *in vivo* by electromagnetic induction. *Med Biol Eng Comput* 1984; 22:193-211.

Zaret GM. Possible treatment of pre-eclampsia with calcium channel blocking agents. *Med Hypoth* 1983; 12:303-319.

Zhang A, Altura BT, Altura BM. Endothelial-dependent sexual dimorphism in vascular smooth muscle: role of  $Mg^{2+}$  and  $Na^+$ . *Br J Pharmacol* 1992; 105:305-310 (a).

Zhang A, Cheng TPO, Altura BM. Magnesium regulates intracellular free ionized calcium concentration and cell geometry in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1134:25-29 (b).

Zhang A, Cheng TPO, Altura BT, Altura BM.  $Mg^{2+}$  and caffeine-induced intracellular  $Ca^{2+}$  release in human vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1993; 109:291-292.

Zawadzki JV, Cherry PD, Furchgott RF. Comparison of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by A23187 and by acetylcholine. *Pharmacologist* 1980; 22:271.



Reunido e Tribuna que suscribe, en el día de la fecha,  
acuerdo de la sala, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Teresa Jover Menqual  
la calificación de Apto "cum laude"

Valencia, a 9 de MAYO de 1996

El Secretario,

El Presidente

