

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Fisiología animal



TESIS DOCTORAL

**Mecanismo de acción de algunos extractos tisulares
hidrosolubles en músculo liso intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carlos Enrique Gil-Rodrigo Montaner

DIRECTOR:

Juan Manuel de Gandarias Bajón

Madrid, 2015

Carlos Enrique Gil-Rodrigo Montaner

TP
1981
070



v - 58 - 224302 - 0

MECANISMO DE ACCION DE ALGUNOS EXTRACTOS TISULARES
HIDROSOLUBLES EN MUSCULO LISO INTESTINAL

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Carlos Enrique Gil-Rodrigo Montaner
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-8042-1981

CARLOS ENRIQUE GIL-RODRIGO MONTANER

"MECANISMO DE ACCION DE ALGUNOS EXTRACTOS TISULARES
HIDROSOLUBLES EN MUSCULO LISO INTESTINAL"

Director: Juan Manuel de Gandarias y Bajón
Catedrático. Director del Departamento de
Fisiología y Bioquímica de la Facultad de
Medicina de la Universidad de Bilbao.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología
Año,



Abstract correspondiente a la Tesis Doctoral que bajo el título: " Mecanismo de acción de algunos extractos tisulares hidrosolubles en músculo liso intestinal", presenta D. Carlos Enrique Gil-Rodrigo Montaner para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Utilizando un método basado en el de Somogyi (Somogyi, (1945). J. Biol.Chem. 160:62), Gandarias (Gandarias, (1959). Rev.Clín.Española, 71:16) obtuvo, a partir de varios órganos procedentes de varias especies animales, un material biológico hidrosoluble muy activo sobre la fibra lisa vascular y no vascular. Mediante dicha metódica se ha obtenido un extracto esplénico bovino y se ha investigado su mecanismo de acción sobre músculo liso intestinal (íleon de cobaya). Los resultados sugieren que este tipo de extracto alberga un factor activo, distinto de la histamina, capaz de interactuar con receptores H_1 -histamínicos dando lugar al marcado efecto contráctil consignado en íleon de cobaya. Por otro lado, se ha estudiado la influencia del extracto esplénico sobre el nivel de nucleótidos cíclicos (AMP-cíclico y GMP-cíclico) en la fibra muscular anotándose un descenso brusco de GMPc que contrasta con lo descrito en la literatura para agonistas H_1 -histamínicos, y un descenso mucho más lento para el nivel de AMPc que concuerda con el efecto, consignado por otros autores, que la histamina despierta sobre preparaciones de músculo liso intestinal.



"MECANISMO DE ACCION DE ALGUNOS EXTRACTOS TISULARES
HIDROSOLUBLES EN MUSCULO LISO INTESTINAL"

Tesis que presenta D.Carlos Enrique
Gil-Rodrigo Montaner para optar al
Grado de Doctor en Farmacia.



D. JUAN MANUEL DE GANDARIAS Y BAJON, Catedrático de Fisiología
y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Au-
tónoma de Bilbao,

CERTIFICA:

Que todos los experimentos y trabajos que se citan en
esta Tesis Doctoral, han sido realizados por D. Carlos
Enrique Gil-Rodrigo Montaner bajo mi dirección y ase-
soramiento en los laboratorios de este Departamento.

Y para que así conste, firmo la presente en Bilbao a uno de
Septiembre de mil novecientos setenta y nueve.



Fdo. Juan Manuel de Gandarias y Bajón

DEDICADO:

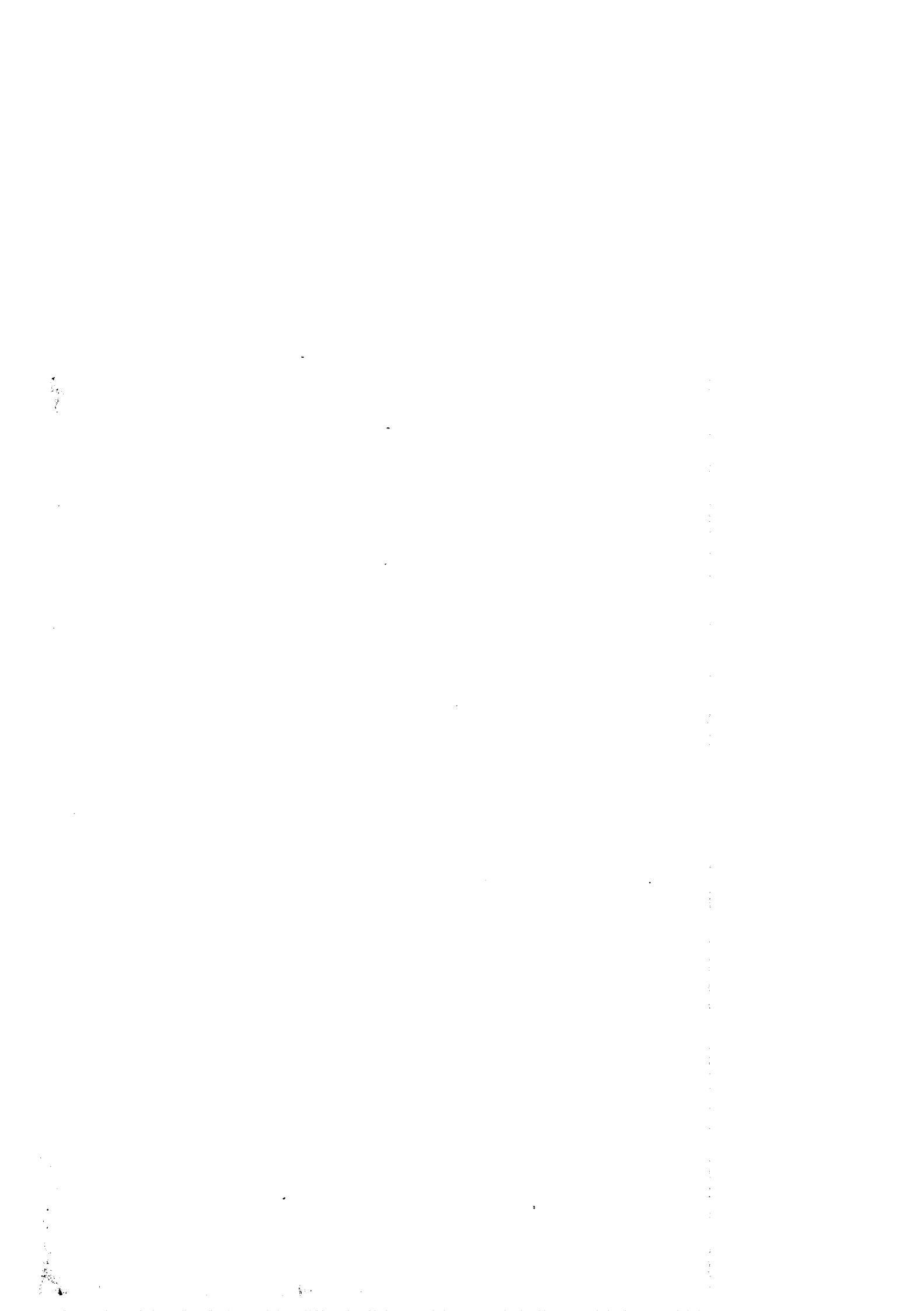
A mi Padre

INDICE

INDICE

	<u>Páginas</u>
1.- PROLOGO	2
2.- INTRODUCCION.	
- Razones de la Tesis	9
- Bibliografía	20
3.- REVISION TEORICA.	
I. Extractos tisulares	23
II. Prostaglandinas	33
III. Nucleótidos cíclicos	55
. Bibliografía	115
4.- MATERIAL Y METODOS.	
- Material.	
I. Animales de experimentación	155
II. Productos químicos	155
III. Instrumentación	158
- Métodos.	
I. Preparación del extracto esplénico	162
II. Baño de órganos aislados	163
III. Determinación de histamina	173
IV. Determinación de nucleótidos cíclicos	176
V. Determinación de proteínas	191
VI. Cálculos	191
- Bibliografía	197

	<u>Páginas</u>
5.- RESULTADOS.	
I. Distribución esquemática	200
II. Resultados obtenidos	201
A. Pruebas Fisio-farmacológicas	201
1. Pruebas con extracto esplénico	202
2. Pruebas con histamina	209
3. Pruebas de antagonismo con antihistamínicos .	212
4. Pruebas con serotonina	221
5. Pruebas de antagonismo con antiserotonínicos.	224
B. Determinaciones bioquímicas	231
1. Determinación de histamina	233
2. Determinación de nucleótidos cíclicos	251
C. Resumen	313
6.- DISCUSION	316
7.- CONCLUSIONES	323



1. PROLOGO

PROLOGO

La tesis doctoral que tras esta introducción, se presenta a la consideración del tribunal, con el título de: "MECANISMO DE ACCION DE ALGUNOS EXTRACTOS TISULARES HIDROSOLUBLES EN MUSCULO LISO INTESTINAL", fué iniciada en el Departamento de Fisiología y Bioquímica de esta Universidad de Bilbao, bajo la dirección del Profesor Doctor D. JUAN MANUEL DE GANDARIAS Y BAJON, titular de la cátedra y director de dicho Departamento.

Los primeros conocimientos en Fisiología, Bioquímica y Farmacología, materias en las que queda enmarcado nuestro trabajo, los obtuvo el doctorando en los obligados estudios de la Licenciatura, en las aulas de la Facultad de Farmacia de la centenaria Universidad de Santiago de Compostela, donde tuvimos la suerte de ser alumnos de profesores de la talla de la Doctora D^a PILAR FERNANDEZ OTERO, Catedrático director del Departamento de Fisiología, el Doctor D. MANUEL RUIZ AMIL, Catedrático director del Departamento de Bioquímica y del Doctor D. RAFAEL CADORNIGA, Catedrático director del Departamento de Farmacia Galénica. Ellos, a través de sus enseñanzas, supieron mantener y desarrollar nuestra incipiente vocación científica.

Al término de la licenciatura, obtuvimos la distinción de ser incorporados al Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Universidad de Bilbao, gracias a la confianza depositada en nosotros por su director (y entonces Vicerrector de Investigaciones Científicas) el Doctor GANDARIAS. Fué en esta época, Enero de 1.976, cuando junto a los primeros pasos docentes el doctorando abordó las cuestiones que constituyen la temática de este trabajo bajo la dirección del Dr. GANDARIAS.

El contenido del mismo se entronca con natural continuidad

en la línea de investigación personal y departamental de nuestro director de tesis. Efectivamente, es en un trabajo del mencionado Profesor GANDARIAS de 1.959, Revista Clínica Española. Año XX, Tomo LXXIV, nº 6, cuando se da comienzo a una serie de esfuerzos investigadores que apoyados en la misma línea por una ininterrumpida tradición de tesis y tesinas, culminan en un estado de la cuestión que queda recogida en el discurso de entrada del Dr. GANDARIAS en la Real Academia de Medicina de Bilbao en Octubre de 1.971. Posteriormente, el Dr. L.F. AINZ, bajo la dirección del Dr. GANDARIAS, realizó una serie de trabajos en este mismo contexto, que bajo el título: "Efectos de algunos extractos tisulares hidrosolubles sobre músculo liso vascular y no vascular", presentó como tesis Doctoral ante el correspondiente tribunal en la Universidad de Bilbao en 1.974. Tomando, pues, como punto de partida el estado vigente de conocimientos y acumulación de datos que se recogen en dichos trabajos, comenzamos nuestra tarea de proseguir avanzando en la misma dirección. Quede, así, constancia de que esta disertación doctoral constituye un trabajo más en una serie que se remonta a 1.959 y se mantiene ininterrumpida hasta nuestros días, y de la que no será ésta, nuestra investigación, la última que se emprenda en un campo que ofrece, sin duda, muy ricos filones para la ciencia médica básica.

En relación con su importancia y actualidad puede advertirse cierto paralelismo, por analogía, entre el tema que hemos emprendido y el de la investigación de las prostaglandinas, de cuya naturaleza como cuestión frontera e importancia entre la comunidad mundial de científicos, podría dar una idea el hecho de ser tema que ha merecido la distinción con el galardón Nobel para su iniciador y principal mantenedor, U.S. VON EULER.

En cuanto a la metodología, se ha seguido la tradición de

las ciencias experimentales de la acumulación de datos relevantes mediante el doble proceso de experimentación-medición, como base de todo intento explicativo en forma de hipótesis, coherente con otras debidamente sustentadas, y conformes con una rigurosa contrastación empírica. En este sentido, y a modo de indicador del volumen teórico y experimental emprendido en estos tres años de trabajo, se ofrece la cifra de cerca del centenar de animales sacrificados y más de 850 citas bibliográficas empleadas para la elaboración del mismo lo que, por razones obvias de espacio, nos ha impedido su transcripción íntegra habiendo, por ello, recurrido a la supresión de títulos de los que disponemos a fin de aclarar a los futuros lectores cualquier duda que pueda surgir al respecto. Ello puede servir como muestra de la fundamentada base teórico-empírica en que se apoya el cuerpo de conclusiones.

La mayor novedad que se ofrece en nuestra elaboración, en relación con las acumulaciones precedentes, es que se trata de la primera investigación en que sistemáticamente se emprende el estudio del mecanismo de acción de los extractos que nos ocupan a nivel de la musculatura lisa.

Este estudio se ofrece hoy en esta Facultad de Madrid como tesis doctoral; en el sentido de que ésta como requisito docente y administrativo es siempre una obra de juventud, no dudamos que adolecerá de defectos inherentes a la inexperiencia del doctorando. Permítasenos, en este sentido, dejar constancia de que se trata de la primera obra amplia de investigación que ofrecemos a la crítica científica especializada. Dada la firmeza de nuestra vocación universitaria, no será la última, pues la continuidad en la misma dirección temática (en que aún tantas lagunas reclaman explicación) y en otras nuevas que se ofrezcan a la curiosidad científica de este investigador, será el ob-

jetivo de quien hizo de la carrera docente universitaria libre e ilusionada elección de juventud.

Al término de estas pocas palabras como presentación y justificación de un contenido, debemos y deseamos en este prólogo dejar constancia de un breve testimonio de gratitud.

Y el primero ha de ser para el Prof. Dr. D. JUAN MANUEL GANDARIAS, director de esta tesis doctoral. Esta ha sido redactada en el seno del Departamento que él dirige, y en cual hemos venido colaborando como profesor encargado de curso durante estos tres años de nuestra carrera de investigador y docente. Sea, por ello, nuestra primera constancia pública de gratitud por la confianza depositada en el doctorando cuando, en su día, aceptó su ofrecimiento de colaboración y la tutela de su trabajo doctoral, sin más base que sus propias esperanzas en un graduado con vocación. De esta confianza hemos querido dar cumplida cuenta con la única moneda digna a nuestro alcance: el trabajo. Que los resultados que hoy se plasman en las líneas que siguen satisfagan en lejana medida dicha confianza intelectual sería para nosotros la mejor y más anhelada forma de compensar los desvelos del Prof. GANDARIAS. Y ya en lo referente, en concreto, a este trabajo, nuestro agradecimiento a sus constantes y valiosas sugerencias, sus estímulos en los no escasos momentos de desaliento, y el haber introducido al doctorando en una tradición investigadora que él mismo iniciara y tan prometedores frutos está generando.

Queremos también dejar constancia de nuestro agradecimiento al Dr. D. LUIS FERNANDO AINZ de quien hemos recibido una enorme ayuda humana y profesional. El resolvió innumerables problemas técnicos y aportó, en momentos decisivos, muchas y buenas ideas; al Dr. D. JUAN JOSE GOIRIENA DE GANDARIAS, por su con-

tinuo interés y colaboración; a D. KEPA ZUBELDIA, por sus interesantes consejos matemáticos y técnicos, así como por su incomparable ayuda en el terreno de la informática. Él fué quien realizó todos los programas de ordenador utilizados en el presente trabajo; al Doctor D. ERNESTO CASIS, a quien debemos la estandarización del sistema automatizado utilizado para la determinación de proteínas que nos permitió ganar en precisión y economizar en tiempo, a LOLY CAMPOS y MARGARITA OLASCOAGA, por su importante ayuda en la realización experimental, a MARI CARMEN GARCIA y MARILU URIBECHEBERRIA, por colaborar en la ingrata labor de clasificación, enumeración y transcripción de la bibliografía consultada y a cuantas personas, en el Departamento de Fisiología y Bioquímica han permitido que se realice esta tesis: el personal docente e investigador del mismo y a los estudiantes habituales colaboradores en él.

Por último, mi reconocimiento a la Universidad de Bilbao, a través de cuyas dotaciones financieras canalizadas al Departamento, ha sido posible emprender una, siempre costosa, investigación empírica como la que hoy se presenta.

A todos somos deudor de cuanto de aprovechable encuentre el lector en estas páginas, y sólo el autor es responsable de los errores y lagunas que puedan hallarse. De éstas, solo podemos ofrecer como disculpa la de su inevitable presencia en toda obra humana, y más aún en las que, como en este caso, son las de iniciación de una carrera investigadora. Para paliarlas se ha puesto cuanto trabajo, celo y entusiasmo ha podido aportar el doctorando, junto con el caudal de conocimientos que sus maestros de ayer y hoy acertaron a transmitirle. Y es, por ello, su mayor ilusión el no haberles defraudado ofreciendo el juicio del tribunal

un trabajo que merezca, ante su autorizada opinión, una benévola acogida.

2. INTRODUCCION

RAZONES DE ESTA TESIS

Hay que comenzar destacando que el origen de la presente línea de investigación lo constituye el trabajo publicado por el Profesor GANDARIAS en 1.959 (11). En él se refiere por vez primera, la acción neta que ejercen algunos extractos orgánicos hidrosolubles de bazo y páncreas sobre la presión arterial de gatos y conejos a los que se infunden mínimas proporciones de filtrados desproteinizados a distintos pH.

Los motivos que indujeron esta vía concreta de investigación quedan perfectamente reflejados por las propias palabras del Profesor GANDARIAS en su discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina de Bilbao y que transcribimos a continuación:

"Nos tentaba la curiosidad de las circulaciones esplénica, pancreática y hepática, y nos acuciaba el presentimiento de una correlación entre estos funcionalismos y las glándulas adrenales. Procedimos a explorar la presión arterial en gatos y conejos íntegros, descerebrados, adrenoprivos, reserpinizados, etc., y tras muchas variantes experimentales fuimos recompensados con resultados que iban mucho más allá de lo experimentado."

En la fecha, ya lejana, en que se publicó este trabajo, la bibliografía existente era muy escasa. Unicamente un artículo de VOGT en 1.958 (18) en el que se afirmaba la acción hipotensora de ciertos extractos tisulares. Hay que remontarse hasta los años 1.964-67 para encontrar literatura referente al empleo de extractos de bazo, pulmón y otros ór-

ganos. (12)

Existe, sin embargo, una línea de investigación que tiene indudables analogías con la que nos ocupa en este momento, pero que por diversos motivos resulta absolutamente independiente de la misma. Se trata de las investigaciones que han ocupado a la escuela escandinava de Fisiología durante las últimas décadas desde que en 1.935, VON EULER (15) comen-
za el estudio sistemático de los efectos de determinados ex-
tractos a los que denominó prostaglandinas y vesiglandinas
por su origen a partir de próstata y vesículas seminales
respectivamente.

El descubrimiento de las prostaglandinas se atribuye con plena justificación al científico sueco U.S. VON EULER (15) si bien es cierta la existencia previa de diversos tra-
bajos sobre los efectos farmacológicos de extractos de pró-
stata y semen, que indudablemente hay que asimilar a las
prostaglandinas. Así por ejemplo las publicaciones de BATTEZ
y BOULET en 1.913 (4), pioneras en este sentido, a las que
siguieron las de KURZROK y LIEB en 1.930 (16), GOLDBLATT en
1.933 (13) y COKCRILL, MILLER y KURZROK en 1.935 (9).

Pero es, sin embargo, VON EULER (15, 19-21) entre 1.934
y 1.936 el que establece sin lugar a dudas que el principio
activo que denominó prostaglandina, pertenecía a un grupo
completamente nuevo de sustancias naturales, con importantes
acciones fisiológicas y farmacológicas.

El problema de la identificación química de estas sustan-
cias es abordado por BERGSTROM en 1.947 (15) en una serie de
trabajos que son recompensados en 1.960 (5) con el aisla-
miento e identificación de las dos primeras prostaglandinas

conocidas. Existen como ya se ha dicho diferencias sustanciales entre ambas líneas de investigación.

En primer lugar, los productos utilizados por los autores escandinavos han sido siempre de carácter liposoluble, actualmente detectados como ácidos prostanóicos, muy emparentados con el ácido araquidónico (14). En cambio, los extractos esplénicos, pancreáticos, etc. de GANDARIAS son obligatoriamente productos hidrosolubles a causa del método de extracción por trituración del tejido con desproteinizantes del tipo de los utilizados en el método de FOLIN-CI-COALTEU (10, 14). Estos extractos no sólo son hidrosolubles sino que incluso son mucho más activos después de recoger la fracción tratada con liposolventes como el cloroformo (12).

Además, mientras los extractos de la escuela escandinava son obtenidos preferentemente a partir de semen, próstata o vesículas seminales, los utilizados por GANDARIAS no procedían nunca de dichos órganos, empleándose a tal fin, bazo, páncreas y pulmón principalmente (12).

Finalmente, los efectos de ambos tipos de extractos son también divergentes. Las prostaglandinas casi en su generalidad se muestran sistemáticamente hipotensoras mientras que por el contrario los extractos hidrosolubles ejercen efectos hipotensores o hipertensores según las circunstancias que se detallarán en apartados siguientes (12). Sobre otras diferentes preparaciones de músculo liso, los efectos son similares pero difíciles de clasificar.

Ante los primeros resultados encontrados, GANDARIAS pensó en la posible intervención de circuitos funcionales en los que estuvieran implicadas las glándulas adrenales (14). Con el fin de esclarecer esta problemática desde un

punto de vista general, se decidió a investigar los efectos de sus extractos orgánicos en animales (gatos y conejos) normales y adrenoprivos, encontrando efectivamente un antagonismo de efecto total. Los resultados obtenidos de esta forma fueron los siguientes:

Los extractos ácidos de bazo y páncreas inyectados en animales íntegros inducen un descenso de la presión arterial muy drástico, a diferencia de las discretas hipotensiones logradas por los extractos liposolubles de origen prostático.

Los extractos alcalinos de la misma procedencia, despiertan una hipertensión manifiesta en los animales inyectados.

Repitiendo los experimentos antes citados en animales adrenoprivos logran efectos diametralmente opuestos, es decir que los extractos ácidos inyectados promueven hipertensión y los alcalinos en cambio hipotensión. Los efectos hipertensores de los extractos ácidos en animales adrenoprivos no resultan afectados por la inyección de ergotamina.

Partiendo de estos resultados, varios colaboradores del Profesor GANDARIAS continuaron esta línea de investigación. En posteriores trabajos (14) se extendió el campo experimental a otros extractos además de los anteriormente descritos, sobre todo a los de procedencia pulmonar, planteándose la cuestión de averiguar si los efectos hipo o hipertensores se ejercen mediados a través de los receptores adrenérgicos descritos por AHLQUIST (1, 2).

A tal fin se trató de esclarecer si los inhibidores de receptores alfa, beta o alfa-beta son capaces de impedir las respuestas hipertensoras. Así mismo, empleando estimu-

lantes de receptores alfa, beta y alfa-beta se procuró discriminar si conseguían anular la acción hipotensora desplegada por los extractos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (3, 11)

Los extractos de otros tejidos, particularmente pulmón eran igualmente activos.

Los estimulantes alfa (Noradrenalina), beta (Aleudrina) o alfa-beta (Adrenalina) no impiden el efecto hipotensor desplegado por los extractos ácidos en animales íntegros.

En consecuencia, todo parece indicar que los extractos orgánicos, tanto ácidos como básicos, actúan sobre la fibra lisa vascular por mecanismos distintos a los adrenérgicos de la tesis de AHLQUIST.

Resultados completamente superponibles a los anteriormente citados se obtuvieron en pruebas con extractos y fármacos estimulantes y bloqueantes adrenérgicos en animales adreno-privos, si bien teniendo en cuenta el efecto invertido sobre la presión arterial que se observa en este tipo de animales (14).

A la vista de estos resultados se plantearon nuevos trabajos con el propósito de discernir qué parte de las glándulas suprarrenales era responsable de la inversión de los efectos causados por los extractos. En este sentido, se trataron varios animales con dosis altas de reserpina a lo largo de 12 días, con lo que se produce una deplección de las catecolaminas, equivaliendo esta situación a la de una adrenomeductomía y simpatectomía químicas (12).

Se pudo observar que en gatos reserpinizados crónicos aparecía una hipotensión muy marcada, incluso inferior en

algunos casos a la registrada en algunos gatos adrenoprivos. La inyección endovenosa de un extracto ácido a un gato reserpinizado desencadena una elevación considerable de la tensión arterial, acontecimiento que puede compararse al hallado en animales adrenoprivos. Parece razonable pensar, por tanto, que es la médula la porción adrenal responsable del sentido hipo o hipertensor de las respuestas a que venimos aludiendo (12). Sin embargo, AINZ (3) trabajando con ratas íntegras, vagotomizadas, demeduladas y adrenalectomizadas, obtiene siempre una respuesta hipertensora que dificulta la interpretación de las observaciones anotadas por GANDARIAS en otro tipo de animales (gatos y conejos).

Otra fase posterior e independiente de los trabajos experimentales realizados con extractos orgánicos hidrosolubles la constituye el estudio de su actividad sobre las preparaciones de musculatura lisa no vascular.

Para tales investigaciones se utilizaron segmentos de yeyuno de gato, yeyuno y duodeno de conejo, duodeno de rata y útero de rata, cobaya y coneja vírgenes. Los extractos ácidos se mostraron hipotonizantes sobre intestino delgado salvo en yeyuno de conejo y duodeno de rata en los cuales ejerce un efecto hipertonizante (3), mientras que los básicos resultaron fuertemente hipertonizantes, no pudiendo bloquearse su efecto con una dosis adecuada de atropina (3, 12).

Sobre cuernos uterinos de cobayas y conejas vírgenes los efectos observados fueron muy semejantes. Los extractos ácidos eran hipotonizantes mientras que los básicos resultaban hipertonizantes, mostrándose en este sentido particularmente activo el extracto básico de pulmón (12, 17).

En útero de rata, en cambio, la respuesta a Extractos ácidos y básicos es siempre hipertonizante (3).

Recientemente BROWN y cols. (7) han obtenido, a partir de corteza renal de conejo, un extracto hidrosoluble que desarrolla un efecto hipertonizante sobre preparaciones aisladas de aorta de conejo, estómago de rata e íleon de cobaya. Varias de las características de este extracto concuerdan con el descubierto por GANDARIAS.

Estos autores, mediante pruebas fisiológicas, farmacológicas y bioquímicas, descartan la posibilidad de que la sustancia activa sea una prostaglandina, renina, angiotensina, catecolamina, serotonina, bradiquinina, nucleótido, un pequeño producto orgánico de metabolismo local o un ion.

Una de las diferencias fundamentales entre el extracto de BROWN y cols. y el de GANDARIAS estriba en que la acción del primero de ellos resulta inhibida por un alfa-bloqueante como la fenoxibenzamida mientras que el segundo resiste perfectamente la presencia de antagonistas alfa-adrenérgicos.

A la vista de todo el conjunto de resultados, obtenidos por el Prof. GANDARIAS y los seguidores de su línea de investigación, que han quedado reseñados se intentó una primera interpretación de los datos (12).

El criterio de AHLQUIST sobre receptores no podría aceptarse en términos generales ya que no permitía explicar el hecho de que los extractos hidrosolubles desplieguen los efectos ya transcritos: hipotensión o hipertensión, según el pH del producto inyectado y la situación del animal, con o sin glándulas adrenales o reserpinizado crónico. Era preciso convenir que dichos extractos provocaban las reacciones

vasomotoras consignadas a través de otros mecanismos.

Si bien, la descripción que acabamos de realizar contiene las bases fundamentales en que nos apoyamos para la elaboración del presente trabajo; creemos necesario, dado su interés, aludir al estudio realizado por el Dr. E. Casis (8) acerca del comportamiento de este tipo de extractos sobre la función hemostática.

Sus resultados atañen primordialmente a tres procesos: agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis.

Sobre la agregación plaquetaria señala un efecto inductor de la misma, por parte del extracto, parangonable en ciertos aspectos, dadas las propiedades elásticas de la tromboasteni-
na, al efecto contráctil desplegado sobre musculatura lisa.

Sobre coagulación, el resultado es altamente interesante puesto que el extracto está dotado de un notable efecto anticoagulante achacable a la posible presencia, en el mismo, de una sustancia heparinoide o a un tipo de heparina cuya acción parece fundamentalmente dirigida al factor Xa.

Sobre la fibrinólisis el extracto carece de efecto alguno.

Este era el estado de las investigaciones sobre extractos orgánicos hidrosolubles, en el momento de dar comienzo al presente trabajo. Inicialmente nos propusimos investigar el mecanismo de acción de este tipo de extractos sobre la musculatura lisa no vascular. Básicamente nos planteamos dos cuestiones a resolver:

- 1ª/ ¿Actúan a nivel de receptores conocidos distintos de los adrenérgicos y colinérgicos descartados en trabajos precedentes?.

- 2ª/ Disparan algún cambio en el nivel intracelular de

"segundos mensajeros" (Nucleótidos cíclicos)?

Para conseguir respuestas a ambas preguntas nos impusimos un programa de trabajo desglosado en dos fases: a/ que comprende estudios fisio-farmacológicos y b/ que integra estudios de tipo bioquímico.

Era necesario hallar, previamente, una pieza de músculo liso no vascular que nos permitiese desarrollar ambas fases con las máximas garantías. Consideramos que debía reunir, al menos, dos condiciones fundamentales:

- 1/ que las respuestas a los fármacos que íbamos a utilizar frente al extracto fueran perfectamente conocidas.
- 2/ que su tono basal fuera reducido y estable a fin de que nos permitiera estudiar de un modo fiable las posibles variaciones del nivel intracelular de nucleótidos cíclicos tras la adición del extracto.

Una pieza tal es el íleon de cobaya. Una vez elegida la pieza muscular podíamos comenzar a desarrollar las dos fases en las que habíamos dividido nuestro trabajo.

FASE a.- En el transcurso de esta fase pretendíamos averiguar:

1/- El efecto del extracto hidrosoluble de bazo de vaca acidificado sobre esta preparación, efecto que aún se desconocía.

2/- Comparar dicho efecto con el propiciado por la histamina y la serotonina, agentes cuya actividad en el íleon de cobaya eran sobradamente conocidos.

3/- Efecto de fármacos antihistamínicos bloqueantes de receptores H_1 y de antiserotonínicos bloqueantes de receptores D sobre la actividad desplegada por el extracto esplénico ácido.

4/- Interrogantes derivadas del desarrollo de los anteriores planteamientos.

FASE b.- En la que deseábamos investigar:

1/- Presencia de nucleótidos cíclicos en el extracto.

2/- Niveles intracelulares de cAMP y cGMP en la fibra muscular tras exponerla a la acción del extracto.

De todos nuestros resultados damos cuenta en el apartado correspondiente.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - AINZ, L.F. (1974): "Efectos de algunos extractos hidrosolubles sobre músculo liso vascular y no vascular". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Bilbao.
- 2 - AHLQUIST, R.P. (1948): "A study of the adrenotropic receptors" *Am. J. Physiol.* 153:586-600.
- 3 - AHLQUIST, R.P. (1966): "The adrenergic receptor". *J. Pharm. Sci.* 55:-359-367.
- 4 - BATTEZ, G., BOULET, L. (1913): "Action de l'extrait de prostate humaine sur la vessie et sur la pression arterielle". *C.R. Seanc. Soc. — Biol.* 74:8-9.
- 5 - BERGSTROM, S. (1960): "The isolation of the prostaglandin E from sheep prostate glands". *Acta Chem. Scand.* 14:1701-1705.
- 6 - BERGSTROM, S., SJOVALL, J. (1960): "The isolation of prostaglandin F - from sheep prostate glands. *Acta Chem. Scand.* 14:1693-1700.
- 7 - BROWN, C.B., DRUM, D.E., HOLLENBERG, N.K. (1977): "A smooth muscle active factor isolated from renal cortex of the rabbit". *Am. J. Physiol.* -232 (2):F84-F91.
- 8 - CASIS, E. (1979): "Efectos de algunos extractos tisulares sobre distintos aspectos de la hemostasia". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Bilbao.
- 9 - COCKRILL, J.R., MILLER, E.G., KURZROK, R. (1935): "The substance in human seminal fluid affecting uterine muscle". *Am. J. Physiol.* 112: --557-580.
- 10 - COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. (1957): En: "Methods in enzymology". Vol. III, pp.:85-86. Academic Press Inc. Publishers N.Y.
- 11 - GANDARIAS J.M. (1959): *Revista Clínica Española*. Año XX, Tomo LXXIV, Nº 6.
- 12 - GANDARIAS, J.M. (1971): "Regulación de la presión arterial: nuevas -- aportaciones". Real Academia de Medicina del Distrito de Bilbao. Dis curso para la recepción pública de Académico electo.
- 13 - GOLDBLATT, M.W. (1933): "A depressor substance in seminal fluid". *J. - Soc. Chem. Ind. (London)* 52:1056-1057.
- 14 - GONZALEZ, J.A. (1970): "Influencias de distintos extractos orgánicos sobre la motilidad de la musculatura lisa". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

- 15 - IDRION, E.W. (1972): Prostaglandins. Springer-Verlag. (Berlin).
- 16 - KURZROK, R., LIEB, C. (1930): "Biochemical studies of human semen. The action of semen on the human uterus". Proc. Soc. Exp. Biol.-28:268-272, N.Y.
- 17 - PAMO, J.M. (1969): "Influencia de los extractos orgánicos ácidos sobre la actividad motórica de piezas intestinales". Facultad de Medicina de Salamanca.
- 18 - VOGT, W. (1953): "Naturally occurring lipid-soluble acids of pharmacological interest". Pharmac. Rev. 10:407-435.
- 19 - VON EULER, U.S. (1934): "Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen. Arch. Exp. Path. Pharmac. 175:78-84.
- 20 - VON EULER, U.S. (1935): "Über die spezifische blutdruckenkende Substanz des menschlichen Prostata und Samenblasensekretes. Klin. Wschr. 14:1182-1183.
- 21 - VON EULER, U.S. (1936): "On the specific vasodilating and plain-muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin)". J. Physiol. 88:213-234

· 3.- REVISION

))

I. EXTRACTOS TISULARES

A. INTRODUCCION

El interés por la farmacología de los extractos tisulares se inició probablemente con la autoobservación de BROWN SEQUARD de 1.889, que abrió por entonces un campo científico nuevo y lleno de posibilidades (647).

Los extractos de órganos y tejidos ocuparon pronto un lugar importante en la investigación terapéutica de la época, a la que preocupó en un principio la separación de preparaciones útiles de otras muchas de dudoso interés. De esta forma, persisten con plena vigencia en el arsenal terapéutico actual, algunos extractos de órganos y tejidos tiroideo, muscular, esplénico, prostático, etc., mientras que otros, carentes de justificación experimental, no han podido resistir una revisión objetiva (647). En cualquier caso, el interés experimental por este tipo de preparaciones goza hoy día de un notable crecimiento a la vista de los resultados verdaderamente espectaculares de algunos de ellos.

Los extractos tisulares utilizados en el presente trabajo fueron preparados conforme a la metódica inaugurada por GANDARIAS en el 1.959 (261). El procedimiento de extracción es sencillo. El material biológico procede de páncreas, bazo, hígado y pulmón de diversos animales, gato, rata, conejo y bóvidos. Trozos de estos órganos son triturados y desproteinizados, recogiendo el filtrado o el centrifugado que se emplea directamente o se somete, en algunos casos, a tratamiento con liposolventes, aprovechándose únicamente la fracción hidrosoluble. Los extractos, tratados o no con cloro-

formo, siempre extraídos con medios hidrosolubles, presentan un pH determinado, que resulta ajustable a voluntad. Se utilizan extractos ácidos o alcalinos con pH de 5 para los primeros y 9 para los segundos, que son usualmente administrados por vía endovenosa a los animales de experimentación.

Hay que destacar que los métodos seguidos tienden a simplificar las extracciones por un lado, y a seguir una sistemática de trabajo que procure evitar la formación de "artefactos químicos", que inevitablemente aparecían utilizando métodos de extracción más drásticos.

Es precisamente esta peculiar metódica de extracción lo que personaliza esta línea de investigación y la diferencia de otras emparentadas con ella pero que tienen como base productos de naturaleza obligadamente diferente a causa de las condiciones del método de extracción.

Así, por ejemplo, se pueden citar diversos extractos tisulares de carácter igualmente hidrosoluble, pero cuyos métodos de extracción excesivamente rigurosos no excluyen, sino que incluso favorecen la posibilidad de aparición de los artefactos químicos anteriormente citados, así como de las clásicas sustancias activas contaminantes de tales extractos como son la colina, histamina, etc. A pesar de ello y como punto de referencia, en la presente revisión se va a dedicar una importante atención al estudio de la farmacología de estos extractos, de los que puede considerarse como prototipo el preparado comercial del Instituto Bioquímico Hermes conocido con el nombre de Esplenhormón, cuyas propiedades farmacológicas y composición química han sido extensamente estudiadas (38, 595, 647, 700).

También se va a dedicar una especial atención en este

capítulo, al estudio de un grupo de sustancias de origen tisular y carácter liposoluble descubiertas por la escuela escandinava de VON EULER (762) y que se conocen con el nombre de prostaglandinas o PGs a causa de su origen prostático. Hay que dejar bien claro en principio la absoluta independencia entre esta línea de investigación, y la seguida por GANDARIAS y colaboradores (289, 564) con el empleo de los extractos hidrosolubles que han promovido este trabajo. Tanto por su origen y acciones, como por su composición química y su carácter hidro o liposoluble, ambos tipos de sustancia guardan una perfecta independencia.

Sin embargo, las PGs van a ser consideradas a título comparativo y para acentuar más aún las diferencias y contrastes que separan ambas vertientes científicas.

Finalizaremos esta revisión destacando los aspectos a nuestro juicio más interesantes relativos a los nucleótidos cíclicos adenosin 3':5' monofosfato cíclico (cAMP) y guanosin 3':5' monofosfato cíclico (cGMP) descubiertos por SUTHERLAND y cols. entre 1.957-60 (598, 714) y ASHMAN y cols. en 1.963 (34, 594) respectivamente. Ambos nucleótidos han recibido la denominación de "segundos mensajeros" siendo al parecer parte del mecanismo de acción de múltiples agentes (p. ej.: Hormonas y Neurotransmisores) entre los que pudiera hallarse el extracto objeto de nuestro trabajo.

B. EXTRACTOS ESPLÉNICOS

Aunque se han utilizado extractos esplénicos terapéuticamente en algunos procesos patológicos, su actividad farmacológica ha permanecido imprecisa y mal sistematizada durante largo tiempo (38).

MARTORELL (498) inició probablemente los estudios en este campo al establecer ciertas propiedades de este extracto en la arterioesclerosis. A partir de este momento comienza una serie de investigaciones tendentes a esclarecer las propiedades farmacológicas de estos extractos, entre las que hay que citar las efectuadas por SALVA (647); JURADO GRAU (389); STAMPA (700); BALASCH y SANTOS (38).

La mayoría de estos trabajos se realizaron tomando como base un extracto esplénico de origen equino preparado comercialmente por un laboratorio farmacéutico (Instituto Bioquímico Hermes: Esplenhormón). Los resultados obtenidos se consideran a continuación.

a/.- Métodos de extracción.

Se han empleado diversos métodos de extracción, todos ellos de características muy similares.

FAZEKAS (233), en sus estudios sobre posibles acciones de los extractos esplénicos similares a las mineralocorticoides, preparaba los extractos a partir de bazo de cerdo. El método seguido, fué el de SNINGLE y PFIFFNER (718) para la preparación de extracto de córtex suprarrenal.

El procedimiento seguido por SALVA (647) para la obtención del extracto de bazo es como sigue: La extracción se lleva a cabo mediante autólisis ácida de la pulpa esplénica de buey o caballo; el líquido resultante se filtra, se calienta de nuevo a 70° C para desproteinizar, se filtra de nuevo y se fija a pH 6.5 con un amortiguador. Como conservador se adiciona fenol y se esteriliza por Tyndalización.

PUJOL CARDUS (595) prepara el extracto a partir de un kilogramo de órgano fresco de origen equino. Se corta con

una máquina trituradora y seguidamente se tratan dos litros con una solución 0.2 N de ácido clorhídrico a ebullición durante 10 minutos a la presión atmosférica. Se filtran los residuos no solubilizados y se Tyndalizan a 70° C a fin de evitar la descomposición del mismo. (Se trata del preparado comercial Esplenhormón, de Laboratorios Hermes).

COBBIN y THORP utilizaron tres métodos distintos para preparar el extracto de bazo (166):

-1^{er} Método: El bazo de buey, de unos tres kilogramos de peso, era descapsulado, pasado por una trituradora manual y congelado en seco. Una muestra se extraía en un aparato Soxhelt con los siguientes solventes purificados, éter de petróleo, éter y finalmente acetona. La fracción acetónica se evaporaba secándola y quedaba un residuo alquitranado de color marrón oscuro (2.37 mg/lgr. de bazo fresco).

-2º Método: Una preparación congelada en seco de 17 Kgrs. de bazo de buey era pulverizada en un mortero, llevada a un Soxhlet y extraída con éter anhidro. A continuación se verificaba una extracción en frío con acetona anhidra eliminándola a presión reducida. El residuo era disuelto en agua destilada. Las impurezas se extraían primero con éter frío y después con un poco de éter de petróleo (40 a 80°). La solución acuosa era entonces evaporada por secado a baja presión y almacenada por debajo de los 3° C. La fracción resultante era de 0.33 mgr. por cada gr. de bazo fresco. Aunque este procedimiento daba un producto menos potente que el anterior, el extracto era muy soluble en agua, habiendo menos contaminación por ello.

-3^{er} Método: El bazo de buey (22.5 Kgrs) era congelado en seco y se sometía a la acción de solventes, primero éter

y luego acetona en un Soxhlet. El extracto de acetona era evaporado secándose a presión reducida. El residuo se disolvía en éter de petróleo y se extraía con agua hasta que no aparecía más material colorado en el agua, que después se evaporaba a baja presión. La fracción restante de 1.5 mgrs. de material soluble en agua se obtenía a partir de un gr de bazo fresco.

b/.- Composición química.

CHANG y GARDUM (147) han descrito la presencia de colina, acetilcolina, ácido adenílico e histamina en extractos procedentes de équidos y bóvidos, pero se trata de extractos obtenidos por autólisis ácida.

La presencia de compuestos proteícos parece completamente descartada dado el comportamiento negativo del extracto frente a algunos reactivos típicos de proteínas como el biuret, xantoproteico, ácido túngstico, tricloroacético, etc. (647).

En el extracto de bazo utilizado por BALASCH y SANTOS (38); se determinó por técnicas cromatográficas la presencia de bases púricas entre ellas adenina y adenosina.

Posteriormente en el mismo tipo de extracto se han encontrado hasta 16 aminoácidos diferentes, todos ellos representativos de un extracto de órgano de origen animal. Los aminoácidos serina, treonina, valina, metionina, espártico y glutámico son los que se encuentran en mayor proporción. El triptófano en cambio no aparece como era de esperar, ya que la hidrólisis ácida lo destruye (700). Sin embargo en trabajos anteriores se había descrito la presencia de triptófano (309, 486, 595).

c/.- Acciones:

Van a considerarse en primer lugar, por tener una mayor

relación con el presente trabajo, los efectos sobre músculo liso y en segundo término el resto de las acciones..

Musculatura lisa

1.- Intestino.

El extracto hidrosoluble de bazo que nos ocupa provoca sobre la preparación de duodeno aislado de rata una contracción que es revertida por la acción de un espasmolítico (38). Se ha empleado incluso terapéuticamente en algunas formas de atonía intestinal (647).

2.- Utero.

El extracto hidrosoluble de bazo, incluso a dosis elevadas no muestra efecto alguno sobre el útero aislado de cobaya (647). En otros trabajos sobre la misma preparación y con el mismo preparado se obtuvo una ligera contracción uterina (38), que los autores atribuyen a la presencia en el extracto de pequeñas cantidades de histamina.

3.- Aparato Cardiovascular.

Se han utilizado diversas preparaciones experimentales a tal fin. Empleando una preparación de LOEWEN TRENDELENBURG se ha podido comprobar que el extracto hidrosoluble de bazo determina un aumento de flujo de perfusión del tren posterior de la rana, por una dilatación activa de los vasos (38, 647).

Sobre presión arterial en gato anestesiado, el extracto esplénico hidrosoluble se muestra como hipotensor (38) efecto que cede por atropinización, lo que permite atribuirle un carácter muscarínico (647). El efecto hipotensor mostrado por los extractos es incluso capaz de hacer ceder la hipertensión experimental provocada en algunos animales como por ejemplo conejos (431).

REIN, MARTENS, y BUCHRL (611) mantuvieron la hipótesis de que el bazo libera una sustancia que llegada al hígado provoca la liberación de un producto activo sobre el corazón del tipo de la estrofantina (113). Este principio liberado por el bazo puede ser incluso activo directamente sobre el miocardio sin pasar por el hígado (612).

Por otro lado existen pruebas de que el extracto de bazo estimula el músculo papilar ventricular del gato (166), y en opinión de COBBIN y THORP (167) este efecto no se debe a la posible presencia en el extracto de colina, acetil colina, histamina, catecolaminas, etc. sino más bien a la hipotética presencia de una sustancia de tipo esteroide parecida a la digital.

Así mismo se ha encontrado que los extractos esplénicos protegen al corazón de las lesiones tireotóxicas, debido posiblemente a la presencia de un factor cardioactivo (499). Estudios realizados con respirómetros de WARBURG para medir el consumo de oxígeno basal del miocardio lo encuentran elevado en un 50% en presencia de extractos de bazo.

Otras acciones

1.- Glucemia

El extracto esplénico tiene un efecto hipoglucemiante en el gato, reduciendo los niveles de glucosa un 12% por término medio (647).

Igual efecto se ha encontrado en perro y conejo (38), al administrar el extracto por vía endovenosa (234).

Desde un punto de vista clínico incluso, se ha comprobado por RATHERY, COSMULESCO y GRIGNON (605) la utilidad de asociar los extractos a la insulina en el tratamiento de algu-

nas formas de diabetes. También se han utilizado los extractos (498) para el tratamiento de ciertas formas de *gan-grena* en pacientes diabéticos.

2.- Colesterinemia

Probando los extractos sobre conejos en ayunas se ha encontrado que provocan una disminución acusada del colesterol, que llega incluso a significar un 30% del valor ordinario (814).

3.- Acción lipotrópica

Parece demostrado (38) que el extracto influye en la movilización y depósito de grasas neutras, encontrándose que previene la infiltración grasa del hígado, efecto que los autores consideran debido al contenido en colina y metionina del extracto.

4.- Acción mineralocorticoide

FAZEKAS (233) encontró en conejos sanos intactos que la administración de extracto esplénico elevaba el nivel de Na plasmático, disminuyendo a su vez el nivel de K, apareciendo estos efectos con dosis semejantes a las usuales de DOCA para el peso de los animales.

5.- Secreción gástrica

Normaliza la secreción gástrica descompensada previamente tanto por defecto como por exceso, como se ha comprobado en 105 enfermos de gastritis por SCHLIEPHAKE y RENK (647).

6.- Piel

El extracto esplénico parece tener acción sobre ciertas dermatosis, especialmente eczema, dermatitis seborreica, urticaria y dermatitis herpetiforme (647).

7.- Acción protectora de radiaciones ionizantes

Los animales tratados con extracto esplénico mostraron una mayor resistencia a la irradiación gamma que los testigos, demostrables por una mayor actividad regeneradora de los megacariocitos de la médula (386, 707).

8.- Acción sobre la formación de anticuerpos

Parece desprenderse una acción favorable en este sentido de los experimentos realizados sobre cobayas por BAYLE DE JESSE (46) y JAGOBSEN ROBSON Y MAYO (en ref.: 38), que puede explicarse a través de un efecto trófico sobre los órganos productores de anticuerpos.

II. PROSTAGLANDINAS

Aunque existen algunos precedentes plenamente válidos como los de BATTEZ y BOULET en 1.913 (45) y KURZROK y LIEB en 1.930 (449) es sin embargo perfectamente lícito el atribuir el descubrimiento de las prostaglandinas al científico sueco U.S. VON EULER.

Hacia 1.935, GOLDBLATT (288) y VON EULER (761) descubrieron de forma simultánea, pero independiente, las propiedades del líquido seminal al actuar sobre diversas preparaciones de músculo liso. VON EULER (766) realizó sus experimentos con extractos de vesículas seminales humanas y ovinas, encontrando que la actividad era debida a la presencia de ciertas sustancias ácidas de carácter lipídico a la que denominó "prostaglandinas" (PG), diferenciándolas en principio de las "vesiglandinas" extraídas a su vez de vesículas seminales de monos y que solo mostraban efectos vasculares.

La escuela escandinava comenzó entonces una serie de estudios exhaustivos acerca de las propiedades farmacológicas de estas sustancias que podían resumirse en un efecto depresor de la presión arterial junto a una acción estimulante de la musculatura lisa extravascular (761 a 765). Posteriormente quedó establecida por ELIASSON la intervención de las PGs en las funciones de reproducción, al comprobar que por vía vaginal estimulan las contracciones del útero humano no grávido, especialmente durante la ovulación (220).

El problema del aislamiento y purificación de estas sustancias fué abordado por BERGSTROM en 1.947 y no fué sino hasta 1.960 cuando pudieron aislarse las dos primeras prostaglandinas (65, 66). Estos compuestos se distinguían por su diferente solubilidad, siendo uno de ellos más soluble en éter mientras que el otro lo era en buffer de fosfato, por lo que fueron llamadas PG E y F respectivamente.

Estudios posteriores en este mismo sentido han abocado al exhaustivo conocimiento que hoy poseemos acerca de la constitución química de las PGs.

Paulatinamente se han ido incluyendo en este grupo, al irse perfeccionando los métodos analíticos, una serie de sustancias lipídicas caracterizadas por sus acciones sobre el músculo liso. Tal ocurre con el "darmstoff" liberado espontáneamente por el intestino de rana (760) o la "irina" contenida en el iris del conejo (7, 8), la "medulina" de LEE (460), que aparece en la médula renal de conejo o los líquidos extraídos del líquido menstrual o de los distintos niveles del cerebro (10). Hoy en día no cabe duda de la naturaleza de las PGs presentes en todas estas hipotéticas fracciones lipídicas (761).

En las últimas décadas las PGs han sido objeto de un intenso estudio multidisciplinario que ha dado origen a una inmensa cantidad de literatura relacionada con la caracterización, propiedades fisiológicas, farmacológicas, así como posibles implicaciones químicas.

1.- Localización de las prostaglandinas

Se han encontrado prostaglandinas en casi todos los tejidos en los que se ha investigado, si bien en algunos en concentraciones prácticamente despreciables (361).

Se han aislado prostaglandinas del líquido seminal (65, 66), pulmón (12), timo (64), cerebro (648, 353), riñón (461), iris (9), placenta (399), tejido adiposo (9, 602, 681), ovarios, tubo digestivo (53), líquido amniótico y menstrual (222, 766), etc.

El mayor contenido en prostaglandinas corresponde al líquido seminal, donde alcanzan valores de 100 mg/ml. correspondientes a la mayor parte de los variantes, aunque sin embargo el líquido seminal de algunos animales como caballo, buey, perro y conejo, no contiene prostaglandinas (766).

Lee y colaboradores (460) han aislado tres lípidos acídicos biológicamente activos en la médula renal del conejo. Uno de ellos, al que llaman "medulina" parece similar a las prostaglandinas y posee un efecto activador del músculo liso vascular, pero sin acción extravascular. Los otros dos principios tienen acciones semejantes a las prostaglandinas en diversas preparaciones del músculo liso. También aparece una sustancia de características similares a las prostaglandinas y de efecto vasodilatador en la sangre venosa de niños afectados de diversos procesos como hipertensión renovascular (218) e isquemia aguda renal inducida unilateral en perros (503).

Las cifras de prostaglandinas en sangre aparecen elevadas en sujetos con procesos neoplásicos secretores, como carcinoma de tiroides (68, 798), carcinoma broncogénico (656) y feocromocitoma (656).

Hay que destacar también el hecho de que no sólo han sido encontradas en el bazo, sino que hay cierta evidencia en favor de una liberación de los mismos a partir de dicho órgano bajo estimulación nerviosa, al menos en el perro (185, 236). Un fenómeno de las mismas características se ha encontrado en diafragma de rata (602), y pániculo adiposo epididimal de rata (602, 681).

2.- Extracción

Las extracciones de las prostaglandinas se efectúan por medio de solventes lipídicos.

El tejido se homogeniza en 4 volúmenes de etanol al 96%. Se centrifuga y se extrae el residuo con otros 4 volúmenes de etanol al 96% (649). En esta etapa suele añadirse una cierta cantidad de prostaglandinas marcadas con isótopos radioactivos, ^3H ó bien ^{14}C , con objeto de efectuar una estimulación del volumen obtenido por dilución del isótopo (359). Igualmente es recomendable que la extracción se efectúe en atmósfera de nitrógeno para evitar la formación no enzimática de pros-

taglandinas durante la misma (558), a partir de los ácidos precursores. El residuo se desecha.

Posteriormente se evapora el etanol hasta su completa desecación. El extracto es repartido entre agua a pH 5, acidificada con ácido cítrico y un volumen igual de acetato de etilo. Se desecha el residuo ácido y las fases obtenidas con acetato de etilo se mezclan, par posteriormente lavarlas con 1/20 volúmenes de agua destilada para eliminar el exceso de ácido. El resultante se concentra con una evaporación hasta un volumen menor a una temperatura inferior a los 45° C.

El concentrado de acetato de etilo se extrae con un volumen igual de buffer de fosfato pH 8.0 por dos veces consecutivas y se rechaza la fase de acetato de etilo. La fase acuosa se ajusta al pH 4,5 con ácido cítrico y finalmente se extrae dos veces con acetato de etilo. Posteriormente el acetato de etilo se lava con agua (1/20 volumen) y se evapora hasta su completa desecación. El desecado se disuelve en un pequeño volumen de etanol al 67% en agua y en un volumen igual de petróleo. Después de agitar se extrae el etanol y se vuelve a extraer con un volumen igual de petróleo. Finalmente, se desecha la fase de petróleo y la fase de etanol se evapora hasta su completa desecación.

3.- Estructura

Todas las prostaglandinas tienen un esqueleto básico común de 20 átomos de carbono, denominado ácido prostanoico. Dicho compuesto consta de un anillo de 5 átomos de carbono y de dos cadenas alifáticas laterales.

Dentro de este esquema común cada grupo de prostaglandinas se diferencian entre sí por la presencia de varios grados de insaturación y por las distintas sustituciones posibles, tanto en el anillo como en las cadenas laterales (341).

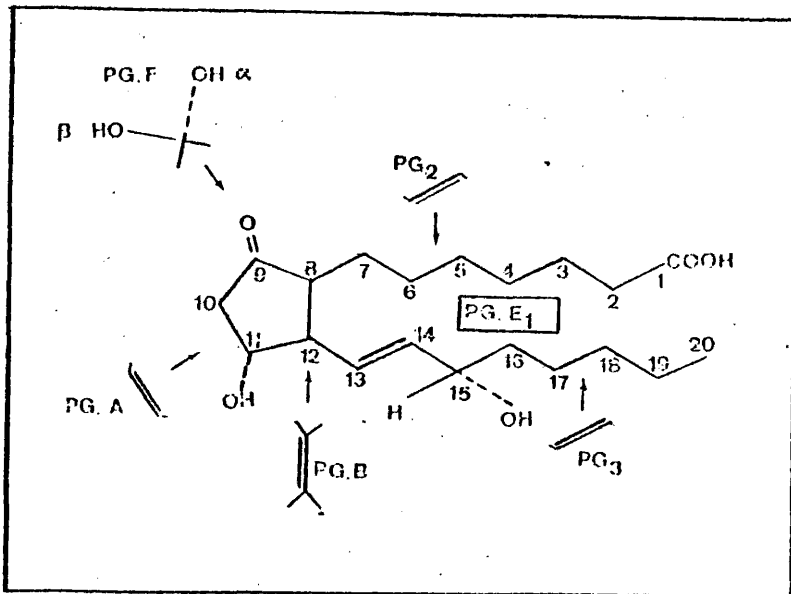


Figura : 3.1

Tanto desde el punto de vista estructural como funcional se han dividido las prostaglandinas en varios subgrupos que se distinguen por una letra mayúscula, estos son: A, B, C, D, E, F, G, H, I, existiendo gran cantidad de variantes dentro de cada subgrupo. La serie A por ejemplo, que puede considerarse como un producto de deshidratación de las del grupo E, consta de la PGA_1 , A_2 , dehidro- A_1 , etc..., lo cual quiere decir que no exageramos al pensar que su número sea superior al millar.

Las prostaglandinas del grupo E se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo en posición 11 y un grupo cetónico en posición 9 (341).

El grupo F difiere del E por la presencia de un grupo hidroxilo en posición 9, en lugar del cetónico.

Las prostaglandinas A y B pueden considerarse como productos de deshidratación de las pertenecientes al grupo E, con formación de dobles enlaces en posiciones 10-11 y 12-8 respectivamente.

Las prostaglandinas de la serie 1 (A_1 , B_1 , E_1 , F_1) tienen un único doble enlace en la posición 13-14, mientras que las series 2 y 3 tienen 2 y 3 dobles enlaces en posiciones 5-6 y 17-18 (341).

El grupo hidroxilo de carbono 9, en las prostaglandinas F, presenta estereoisomería dando lugar a dos tipos de prostaglandinas F: las alfa y las beta. En la naturaleza solo se conocen las pertenecientes al tipo alfa.

Finalmente mencionaremos por su importancia biológica, sobre todo en los procesos de agregación plaquetaria, la prostaglandina I_2 (519) derivada, como las demás de los endoperóxidos cíclicos G_2 y H_2 , cuya estructura, establecida por JOHNSON y cols. (383), posee un ciclopentano y por ello se la conoce también como prostaciclina.

Las fórmulas más importantes aparecen representadas en la figura: 3.2 (359).

4.- Biosíntesis

A partir de tejidos procedentes de animales bovinos MIYAMOTO y cols. (516) consiguieron en 1.974 solubilizar el sistema enzimático Prostaglandin:sintetasa diferenciando, merced a cromatografía en DEAE-celulosa, dos componentes del sistema. Uno de los componentes convierte a los los ácidos precursores en endoperóxidos (PGG y PGI), mientras que el otro transforma PGI en PGE.

Estos dos enzimas han recibido los nombres de prostaglandina-endoperóxido:sintetasa (EC.1.14.99.1) y prostaglandina-endoperóxido:isomerasa (EC.5.3.99.3) respectivamente.

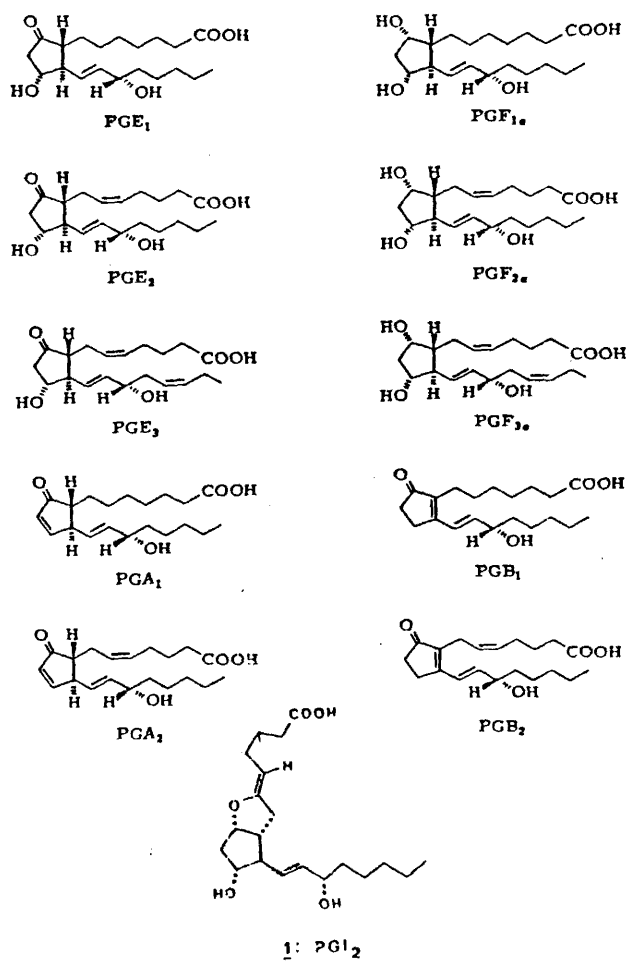


Figura: 3.2

Se consideran como prostaglandinas "primarias" a las PGE_1 , PGE_2 , PGE_3 y $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, $PGF_{3\alpha}$ (50) que dan lugar a las series PG-1, PG-2, PG-3, respectivamente. Cada serie utiliza un ácido precursor, así la serie 1 procede del ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico (dihomo-gamma-linolénico), la serie 2 parte del ácido 5, 8, 11, 14-eiccsatetraenóico (ácido araquidónico) y la serie 3 utiliza como precursor el ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanóico. El sistema de la prostaglandina:sintetasa se encarga de catalizar la biosíntesis de las tres series. Dada la mayor importancia biológica de las prostaglandinas de la serie 2 utilizaremos este grupo como modelo explicativo del proceso biosintético.

Cabe distinguir dos etapas: (vease figura, 3.3)

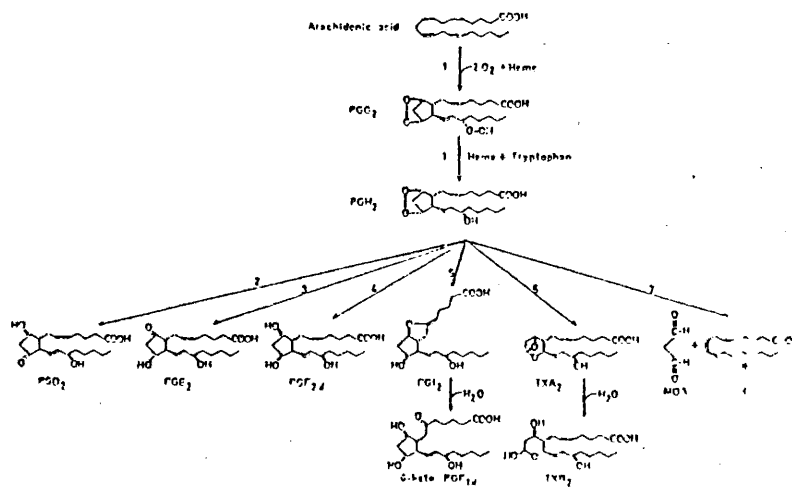
1ª Etapa: Esta primera etapa es catalizada por el enzima prostaglandina-endoperóxido:sintetasa (335, 515) cuyo Pm ronda los 125.000 daltons (756) y que posee dos actividades catalíticas ya que actúa como ciclooxigenasa y como peroxidasa (756).

Mediante la primera de las dos actividades el enzima transforma el ácido araquidónico en el endoperóxido PGG_2 y merced a la función peroxidasa la PGG_2 se transforma en PGI_2 .

Esta primera etapa constituye un paso común en el que se generan los endoperóxidos que actuando como sustratos de distintos enzimas darán lugar a las diferentes prostaglandinas de la serie 2.

2ª Etapa: La acción del enzima prostaglandina-endoperóxido E:isomerasa sobre PGI_2 dá lugar a la formación de PGE_2 . Este enzima ha sido parcialmente purificado y la reacción caracterizada por OGINO y cols. (559). El glutatión estabiliza al enzima y actúa como cofactor de la isomerización (559).

Además de esta ruta RAZ y cols. (608) han propuesto otra vía de formación de PGE_2 que parte de PGG_2 . Según esta proposición, la PGG_2 se transformaría en PGE_2 a través de un metabolito intermedio distinto de la PGI_2 , el 15-hidroperoxi- PGE_2 . No obstante, parece poco probable la



Figura, 3.3. : Biosíntesis de Prostaglandinas.

(Tomada de la ref.: 651)

existencia de esta 2ª ruta (651).

En microsomas procedentes de útero de cobaya se ha detectado un factor enzimático termoestable capaz de convertir PGI_2 en $\text{PGF}_{2\alpha}$ (803), este factor recibe el nombre de prostaglandina-endoperóxido $\text{F}\alpha$:reductasa.

En las plaquetas de varias especies animales, se ha descrito la existencia de un enzima denominado tromboxano:sintetasa o bien prostaglandina-endoperóxido-tromboxanoA:sintetasa (320, 547, 710) capaz de catalizar la transformación de PGI_2 en tromboxano B_2 a través de la formación de un metabolito intermediario inestable que es el tromboxano A_2 . Parece ser que este enzima cataliza, así mismo, la conversión de PGI_2 en ácido 12-hidroxi-5, 8, 10, heptadecatrienóico (H.H.T.) y malondialdehído (MDA) (202, 802).

En esta segunda etapa se sintetizan, también, dos PGS cuyo denominador común lo constituye el importante efecto inhibitor que despliegan sobre la agregación plaquetaria. Estas son la PGD_2 (695) y la PGI_2 conocida en un principio como PGX (519).

Al parecer 2 ó 3 proteínas se encargan de catalizar la conversión de endoperóxidos en PGD. Una de estas proteínas fué detectada en pulmón, estómago e intestino de rata (557) y posteriormente se la ha identificado como un enzima glutatión-S:transferasa (331). Este enzima cataliza la reacción de transferencia y es aparentemente independiente de la reacción de isomerización que también tiene lugar durante la transformación de PGI_2 en PGD_2 (331). Parece ser que la seroalbúmina aumenta la formación de PGD_2 presumiblemente porque despliega actividad "isomerasa" (317). Esta conversión de un potente agregante plaquetario como la PGI_2 en PGD_2 (inhibidor de la agregación plaquetaria) por seroalbúmina puede tener un importante papel en el control de la agregación plaquetaria.

En cuanto a la PGI_2 , se forma a partir de PGI_2 por acción del enzima prostaglandina-endoperóxido I:isomerasa, 6,9-oxociclase o prostaciclina:

sintetasa (519). La PGI_2 es inestable y en solución acuosa se transforma rápidamente en 6-ceto-PGF_{1 α} perdiendo su capacidad como inhibidor de la agregación plaquetaria (304).

Cabe añadir, por último, la detección y parcial purificación de dos enzimas a partir de suero de conejo, la PGA:isomerasa encargado de convertir la PGA en PGC (592) y la PGC:isomerasa que transforma la PGC en PGB (591). Estas enzimas no han sido localizados en otros tejidos ni en suero humano.

5.- Acciones

1. Aparato reproductor

Aunque los efectos más notables de las PG sobre el aparato reproductor ocurren en la hembra, también en los animales machos se han descubierto acciones de cierta importancia.

A.- Animales macho.

En uno de los primeros trabajos realizados en torno a las PGs, GOLDBLATT en 1.935 sugirió la posibilidad de que contribuyesen a la vasodilatación del aparato reproductor masculino durante el coito (288).

Posteriormente se ha encontrado que la PG E₁ provoca la contracción de conductos deferentes y vesículas seminales, reforzando incluso las respuestas contráctiles previas de estos órganos bajo estimulación de nervios hipogástricos, contribuyendo en consecuencia a la eyaculación (221, 188).

De alguna forma, las PGs parecen tener cierta relación con la infertilidad de origen masculino. En un estudio estadístico entre 21 hombres sin descendencia se encontró un nivel seminal de PGE inferior al 50% del normal (125)

B.- Animales hembra.

Se conoce el efecto a diversos niveles del aparato reproductor femenino.

Sobre la vagina provocan un incremento en la motilidad en dependencia con el momento del ciclo menstrual. Además supone una vía de administración fisiológica durante el coito, absorbiéndose en cantidad suficiente hacia la sangre para luego provocar una relajación del cuello y cuerpo uterinos (652), especialmente durante la ovulación.

Los efectos sobre endometrio dependen de que los estudios sean "in vivo" o "in vitro".

En útero humano aislado las PGs E, A y B provocan una relajación según el momento del ciclo uterino, especialmente durante la ovulación, mientras que la PGF contrae el miometrio sobre todo al final del ciclo o durante el embarazo (123, 653). Las preparaciones del útero aislado de rata, cobaya y coneja se contraen por adición de las PGs F y E.

En experimentos "in vivo" sobre útero de coneja las PGs provocan una intensa relajación (62). Sobre útero humano grávido la PGE_1 produce un incremento de las contracciones (126), llegando incluso las PGE_2 y $F_{2\alpha}$ a provocar el aborto por idéntico mecanismo (127, 223, 633). Se han descrito igualmente para la $PGF_{2\alpha}$ efectos oxitócicos especialmente en el inicio del parto (124, 170), por lo que se ha llegado a ensayar su uso farmacológico en la inducción del parto mediante el empleo de la $PGF_{2\alpha}$ (225) y la PGE_2 (224).

II. Aparato circulatorio

Se distinguen tres aspectos diferentes según los niveles de actuación de las prostaglandinas.

A.- Arterial.

Las PGs de los grupos A y E son potentes vasodilatadoras (61, 136),

ocasionando una disminución de las resistencias periféricas que se traduce en un aumento del flujo sanguíneo por diversos territorios, salvo en la mucosa nasal, a cuyo nivel provocan vasoconstricción. El efecto parece ser directo sobre la fibra lisa vascular ya que no es inhibido por propanol, metisergida, atropina o antihistaminicos (539, 693).

Las PGF_{2 α} en cambio son vasoconstrictoras generales, provocando una elevación de la presión arterial en casi todas las especies animales salvo perro y rata (536). Se ha sospechado un mecanismo indirecto para este efecto, a través de un fenómeno de venoconstricción (212), pero es probable una causa directa, ya que no resulta inhibido por la fenoxibenzamina ni por la metisergida (536).

B.- Venoso

Como se acaba de citar la PGF_{2 α} es venoconstrictora ocasionando en consecuencia un aumento del retorno venoso que repercute en un aumento de la presión arterial (212). Tiene además un efecto inhibitorio sobre la permeabilidad de las paredes venulares (801).

Las PGE aumentan en cambio la permeabilidad de las paredes venulares con la consiguiente facilidad para el edema (356, 395).

C.- Corazón

Han sido muchos los efectos descritos sobre el corazón, entre los que merecen destacarse reacciones de cronotropismo e inotropismo positivos.

Las PGA, A y F producen un fuerte efecto inotropo positivo que es posiblemente dependiente de la concentración local del calcio (342).

En voluntarios humanos a los que se inyectó PGE por vía endovenosa se registró un cuadro general de reacciones, entre las que destaca por su regularidad la aparición de una fuerte taquicardia (63).

III. Aparato digestivo.

Cabe considerar dos aspectos distintos, referentes a las secreciones y a la motilidad del tracto gastro-intestinal.

1.- Secreciones.

Las PG en general son fuertes inhibidoras de la secreción gástrica (617, 618, 782). Son sobre todo las PG de los grupos A y E, las que muestran una actividad más acusada en este sentido.

La PGE₁ inhibe las secreciones gástricas producidas por histamina, 2-desoxi-glucosa o ingesta de alimentos. (618, 619). Los resultados en la secreción inducida por pentagastrina son contradictorios. Algunos trabajos parecen indicar que no consigue inhibirla, al menos en humanos (366), mientras que otros consiguen lo contrario.

La PGE₂ por su parte inhibe la secreción inducida por la histamina así como la causada por la ingesta de alimentos.

La PGA, consigue inhibir la secreción inducida por la ingesta, pero no la debida a la pentagastrina. Algunos autores han referido que también inhibe la secreción histamínica (683), pero otros lo niegan.

La causa de este efecto parece ser directa, indirecta o una mezcla de ambas. El mecanismo indirecto se supone a partir de los efectos hipotensores generales, debido a las PG (52), con disminución del flujo sanguíneo local a través de la mucosa gástrica. Apoya esta idea el hecho de que la única PG que no inhibe la secreción gástrica (la PG_{2F}), es precisamente la única que no causa hipotensión (341). En cualquier caso el mecanismo indirecto parece de escasa importancia en el caso de la PGE₁ (376). Por otro lado también hay evidencia de una acción directa de las PG sobre las células parietales gástricas (52, 358, 782). Parece ser que una cierta cantidad de PGE₁ es liberada por la mucosa gástrica juntamente a la secreción ácida tras estimulación vagal (52,

168). Por otra parte la secreción por estimulación vagal se cree medida a través de la formación de AMP cíclico. Por este motivo se ha supuesto que la acción de las PG sobre la secreción gástrica pudiera deberse a una modificación en el mecanismo de secreción vagal a causa de un efecto antagónico sobre la adenilciclasa en las células parietales gástricas (358). Así, se ha podido comprobar que las PG inhiben la formación de AMP cíclico por la adenilciclasa (782), pero sin embargo en el cobaya el efecto resulta contrario, habiéndose encontrado una estimulación de dicho sistema enzimático (571).

La secreción pancreática resulta estimulada por acción de las PG y al parecer el mecanismo responsable sería de nuevo el de la adenilciclasa (637).

2.- Motilidad.

Se dispone de pruebas realizadas in vivo e in vitro.

A.- In vivo.

Son fundamentalmente experiencias realizadas en humanos a los que se administraron las PG con preferencia por vía oral. Los resultados obtenidos con la PGE_1 (366, 513), indican una acción estimulante de la motilidad traducida en forma de disminución del tiempo de tránsito intestinal verificada radioscópicamente (513), junto con síntomas diarreicos.

En ocasiones la hipermotilidad aparece desordenada (513), encontrándose movimientos antiperistálticos, regurgitación de bilis al estómago y vómitos (366).

B.- In vitro.

En preparaciones aisladas in vitro con intestino de diversas especies, las PG de las clases E y F se comportan como potentes estimulantes de la motilidad (54, 55, 62, 360, 361). En cambio las PG A y B solo poseen en este sentido una débil acción (11, 52, 364, 460, 784).

Se han estudiado igualmente los efectos parciales sobre las fibras musculares de dirección longitudinal y los ejercicios sobre las fibras circulares.

Las PGE y PGF son estimulantes para las fibras longitudinales, pero el efecto es de más rápido desarrollo con las PGE (62, 361). Sobre las fibras circulares en cambio, las PGF se muestran estimulantes, mientras que por su parte las PGE son inhibitoras (52, 54) (242).

Parece que estos efectos sobre la musculatura lisa intestinal obedecerían a un mecanismo directo y no a una respuesta mediada por los nervios colinérgicos (517).

Sin embargo las contracciones desencadenadas en íleon de cobaya pueden ser bloqueadas, al menos parcialmente, por atropina (357), hioscina y tetrodotoxina (54), todo lo cual parece indicar la existencia de al menos un pequeño componente nervioso en la respuesta contráctil de una fibra lisa intestinal a las PG.

IV. Aparato respiratorio.

Los efectos investigados han sido sobre todo los relacionados con el músculo liso de las distintas porciones del aparato respiratorio. Se han realizado a este propósito estudios in vivo e in vitro.

A.- In vivo.

Los estudios realizados se han centrado principalmente sobre la musculatura bronquial, encontrándose que las PGs son en general broncodilatadoras.

Las PGE₁ y PGF_{2α} consiguen incluso inhibir la broncoconstricción provocada por estimulación vagal o por administración de histamina (492).

En su aspecto cuantitativo el efecto depende de la vía de administra-

ción, mostrándose más activas en forma de aerosoles, como han podido comprobarse en diversas especies animales (457).

En el gato en cambio, la administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta la resistencia bronquial al paso del aire (492).

En humanos se han realizado pruebas en voluntarios, tanto sujetos normales como asmáticos. Administradas en forma de aerosol, producen una considerable broncodilatación en los asmáticos, pero su efecto es escaso en individuos sanos (146).

B.- In vitro.

Los estudios han sido realizados sobre preparaciones aisladas de diversos animales y con preferencia con músculo liso traqueal y bronquial.

El músculo liso traqueal es relajado por las PG E y F, sobre todo las primeras. Puede relajar contracciones previas provocadas por acetilcolina, histamina, bario y ergotamina (361, 492).

El efecto sobre el músculo liso bronquial varía según la PG que se utilice. En preparaciones con bronquios de origen humano, las PGE_1 y E_2 resultaron relajantes y las $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el contrario provocaron broncocontricción (170, 684, 717).

Los efectos consignados en las preparaciones in vitro parece indicar un efecto directo de las PG en el músculo liso respiratorio, pero la ingurgitación vascular como efecto indirecto podría explicar el aumento de resistencia a la circulación aérea en algunos experimentos in vivo (538, 643).

V. Sistema nervioso.

Aunque el establecimiento de relaciones más precisas entre algunas funciones del sistema nervioso y las prostaglandinas es aún algo precipitado, se han descubierto sin embargo hechos muy demostrativos.

Se han encontrado cantidades significativas de algunas PGs, como $PG_{1\alpha}$, E_1 , E_2 y sobre todo $PG_{2\alpha}$, en niveles muy diversos del sistema nervioso central y periférico. Así por ejemplo se han encontrado en el cerebro (169, 353, 400), en la médula espinal (353, 363), e incluso en algunos nervios periféricos (604). En vista de estos resultados HORTON ha sugerido la actuación de las PGs como neurotransmisores en distintas estructuras del SNC. (359).

En este sentido es interesante consignar la liberación de PGs por el sistema nervioso tanto de forma espontánea como por estimulación eléctrica y química (601-603). También se ha observado la liberación de PGs por diversos órganos bajo estimulación nerviosa a través de nervios adrenérgicos en glándulas adrenales (236, 682), bazo (236) y diafragma (602).

Los efectos de las PGs sobre el sistema nervioso central son de naturaleza varia, pero en términos generales puede hablarse de dos tipos de efectos, uno sedante como el logrado por la PGE_1 y uno contrario facilitador de las vías motrices producido principalmente por la $PGF_{2\alpha}$ (352, 362, 365).

VI. Sistema endocrino.

Se conocen hasta el momento efectos de las PG sobre una serie de glándulas de secreción interna.

1 Hipófisis.

En las ratas, las PG E_1 y E_2 provocan un incremento en la liberación de hormona del crecimiento hacia la circulación. La PG A_1 incrementa en cambio la síntesis de la hormona aunque carece de efecto sobre su liberación (490). Este efecto parece mediado por el sistema AMP-cíclico-adenilciclase (816).

2 Tiroides.

Una gran variedad de PGs tienen actividad sobre la glándula tiroidea.

Las PG E_1 , E_2 , $F_{1\alpha}$, E_1 estimulan la actividad metabólica de la glándula (116). La más activa en este sentido es la PGE, que compite en su efecto con la TSH probablemente porque las dos actúan a través del sistema de la adenilciclasa (116, 396) (560, 815).

3 Corteza adrenal.

En ratas hipofisectomizadas, las PG F_1 tiene un efecto contrario en la oveja (239, 251).

En estudios *in vitro* con córtex de rata, se ha encontrado que la PG E_2 mimetiza los efectos de la ACTH, provocando una elevación en la tasa de producción de corticosterona. Esta semejanza de acciones se debe probablemente a que ambos sistemas actúan a través del mecanismo de la adenilciclasa (239).

4 Médula adrenal.

En experiencias realizadas en perros, ha podido observarse que la PG E_1 produce una discreta liberación de catecolaminas de origen medular (402), aunque no se ha podido dilucidar si el efecto es directo o mediado por la intervención del sistema nervioso.

5 Páncreas endocrino.

Los niveles plasmáticos de insulina aparecen elevados en el ratón tras la administración de PG E_1 , efecto que también pudiera estar tramitado por el mecanismo del AMP cíclico (84).

6 Ovario.

Un importante efecto sobre el ovario es la acción luteolítica desarrollada por la PGE₂ (82, 416, 573), que se encuentra en preparaciones "in vivo" (426), de numerosas especies animales como ratas (51), conejos (310), hamsters (385), cobayas (82), ovejas (43) y monos (431).

En cambio, en preparaciones "in vitro" aparecen a veces efectos contrarios, como los obtenidos con las PG E_1 , E_2 y $F_{2\alpha}$ que resultan en

parte similares a los ejercidos por la LH en el ovario, al inhibir la formación de progesterona (6, 433).

Este efecto mimetizante del de la LH se debe posiblemente a la intervención de las PG en el sistema AMP-cíclico (433, 497).

El mecanismo responsable del efecto luteolítico de la $PGF_{2\alpha}$ no se conoce con seguridad. Se ha supuesto debido a un efecto secundario al vasoconstrictor que posee la misma $PGF_{2\alpha}$ (574), pero no se han encontrado muestras de isquemia en los ovarios tratados. Se ha pensado también en un efecto dependiente en este sentido de la LH, e incluso de alguna otra hormona hipofisaria (51) pero no hay pruebas definitivas. En cualquier caso es posible que la $PGF_{2\alpha}$ juegue un papel fisiológico importante en el proceso de regresión del cuerpo lúteo.

VII. Tejido adiposo.

Se han efectuado diversos estudios con preparaciones in vitro e in vivo.

A. In vitro.-

La PGE_1 desarrolla una intensa actividad antilipolítica capaz de inhibir la acción movilizadora de las grasas que ejercen la adrenalina, noradrenalina, corticotropina, TSH etc., como ha podido constatarse en experimentos realizados en el pániculo adiposo del epididimo de rata (703). Todo parece indicar que la prostaglandina citada actúa por inhibición del sistema de la adenilciclase, y por consiguiente de la tasa disponible de AMP-cíclico (702), pero seguramente el mecanismo de actuación es mucho más complejo ya que en ausencia de una hormona lipolítica, incrementa la concentración de AMP-cíclico sin que se acompañe de estímulo de la lipólisis (120).

B. In vivo.-

Los efectos en perros íntegros dependen de las dosis administradas

de PGE_1 . A dosis bajas se comporta como lipolítica, mientras que a dosis medias y altas muestra su típico efecto antipolítico (60). Pero estas acciones in vivo no son muy claras ya que de alguna forma parece que el mecanismo de respuesta depende de la localización del depósito graso o de la especie animal considerada (359).

Las respuestas antipolíticas constatadas han sido completamente ratificadas en humanos, tanto en estudios in vivo como en in vitro, aunque parece existir igualmente una dependencia con la dosis empleada (59). Precisamente en razón de esta acción antipolítica de la PGE_1 se ha suscitado la problemática, aún sin confirmar, de la posible implicación de esta sustancia en la génesis de la obesidad (313), así como de la posibilidad de utilizar antagonistas de la misma en la terapéutica del mismo proceso (359).

VIII. Sangre.

Los efectos más notables se refieren a los consignados en plaquetas. Las prostaglandinas afectan a la función plaquetaria bien favoreciendo o bien inhibiendo la formación de agregados.

Entre las prostaglandinas netamente agregantes se encuentran los endoperóxidos PGG_2 y PGH_2 (319, 800) y los tromboxanos (Txs) TXA_2 y TXB_2 (318).

Otras prostaglandinas que inducen la agregación o, al menos, intervienen en ella son la PGE_2 (112) y $PGF_{2\alpha}$ (692).

Entre las que inhiben la agregación plaquetaria incluimos la PGE_1 (422), la PGD_2 (695) y la más potente de las tres que es la PGI_2 (519). Esta última se sintetiza fuera de la plaqueta, concretamente en el endotelio vascular (519), habiéndose sugerido la posibilidad de que esta prostaglandina sea responsable de la capacidad de resistencia de la pared vascular a la adhesión de las plaquetas (519). Quizás el equilibrio entre formación de PGI_2 por el endotelio vascular y endoperóxidos

y tromboxanos en las plaquetas sea crucial en el control de la formación de trombos (304).

IX. Sistema urinario.

La PGE_1 muestra un efecto diurético por inhibición de la vasopresina como ha podido observarse en el túbulo colector del conejo (561).

Por otra parte, como las PGE_1 , también las PGE_2 y A_1 producen un incremento en el volumen de orina, que se acompaña de un aumento en la excreción urinaria de sodio, potasio y cloro (336).

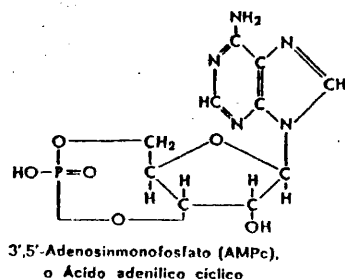
En opinión de LEE (459) la PGA_2 es en realidad la hipotética "hormona natriurética" a la que con anterioridad se atribuía una inhibición en la absorción de sodio en respuesta a incrementos en el volumen de fluido extracelular. Esta hipótesis, sin embargo, necesita de más comprobaciones.

III. NUCLEOTIDOS CICLICOS

Cuando, en la década de los años 50, el equipo de investigación que dirigía E.W. SUTHERLAND, realizaba una serie de trabajos encaminada a dilucidar el mecanismo de la acción hiperglucemiante de la adrenalina y glucagon, descubrieron la existencia de un factor termoestable que inducía la conversión de la fosforilasa b (inactiva) en fosforilasa a (activa).

Este factor de bajo peso molecular resultó ser el ácido adenílico cíclico también conocido como 3':5' adenosín monofosfato cíclico o cAMP (598, 714).

La estructura de este nucleótido fué descubierta prácticamente al mismo tiempo por COOK, LIPKIN y MARKHAM (162, 479) y el grupo de SUTHERLAND (599, 712, 713). Es una molécula procedente del adenosín trifosfato (ATP), en la que, por pérdida de un grupo pirofosfato, queda el último grupo fosfato unido a las posiciones 3' y 5' de la ribosa formando un enlace fosfodiéster.



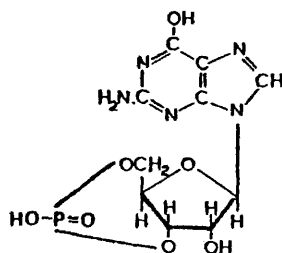
Desde que SUTHERLAND y RALL descubrieron que el cAMP es un intermediario clave en la acción glucogenolítica del glucagon y adrenalina, este nucleótido cíclico ha sido implicado como mediador de la acción de

varias hormonas y otros agentes en una gran variedad de tejidos de animales mamíferos, (323, 589, 620, 621) lo que le ha valido la denominación de "2º mensajero".

Como veremos en el transcurso de la presente revisión, el cAMP ha resultado ser un importante factor regulador que controla una gran variedad de acontecimientos biológicos.

En 1.963 ASIMAN y cols. (34, 594) identificaron por primera vez en la naturaleza un segundo nucleótido mediante la inyección del isótopo P^{32} a ratas. El análisis posterior de la orina procedente de estos animales condujo a la detección de un nucleótido marcado que resultó ser el ácido guanílico cíclico también llamado 3':5'-guanosín monofosfato cíclico o cGMP.

De modo similar al cAMP, procede del guanosín trifosfato (GTP) por pérdida de un grupo pirofosfato y posterior formación de un enlace fosfodiéster entre el fosfato residual y las posiciones 3' y 5' de la ribosa.



Tuvieron que transcurrir varios años antes de que comenzaran a realizarse los primeros estudios serios acerca de su importancia biológica. De hecho, es a partir de 1.970 cuando se publican varios artículos y revisiones que sugieren que el cGMP desempeña una función similar a la del cAMP (270, 282, 287, 370, 589, 672).

Una de las cuestiones que ha preocupado a los investigadores de este tema ha sido la distribución de los nucleótidos cíclicos en la naturaleza. Los primeros resultados que se obtuvieron, en este sentido, fueron conseguidos mediante el uso de técnicas enzimáticas, (36, 104, 121, 122, 281, 286, 321, 322, 373, 441, 745) pudiéndose comprobar que tanto el cAMP como el cGMP se hallan ampliamente distribuidos en los tejidos animales; corroborándose, así mismo, que la distribución del cGMP es comparable a la del cAMP, (287).

No obstante, las dificultades de las técnicas enzimáticas restringieron en gran medida el número de laboratorios que se ocuparon del tema. Este obstáculo fué paliado gracias al desarrollo de las técnicas de Radioinmunoanálisis aplicadas al estudio de los nucleótidos cíclicos por STEINER y cols. en 1.972 (704) y a las posteriores modificaciones para mejorar su sensibilidad, (129, 131, 193, 249, 294, 326), que han permitido, incluso, estudiar la presencia de estas moléculas en procariotas (ej.: bacterias y otros microorganismos, (572, 616)).

Casi paralelamente a la labor de detección, comenzó el estudio de su metabolismo. Así, SUTHERLAND y RALL en 1.962, (600, 715), descubrieron que el enzima adenil:ciclase cataliza la formación de cAMP a partir de ATP y en 1.969, (324, 373, 669, 796) se demostró la existencia de un enzima Guanil ciclase, responsable de la biosíntesis de cGMP a partir de GTP.

En cuanto al catabolismo, ya en 1.958 SUTHERLAND y cols. (122, 713), indicaron que el cAMP resultaba degradado por una fosfodiesterasa que hidroliza el nucleótido hasta 5'-AMP.

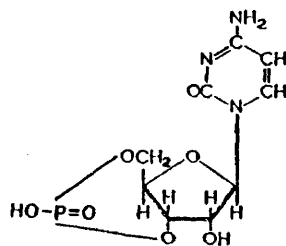
La preparación enzimática, que utilizaron, presenta una elevada especificidad por el enlace 3':5'-fosfodiéster, en cambio, no resulta tan específica en cuanto a discriminar el tipo de anillo púrico que porta el nucleótido cíclico; de hecho, se ha comprobado que dicha preparación

enzimática hidroliza, también, al cGMP rindiendo 5'-GMP e incluso a nucleótidos pirimidínicos tales como cUMP y cIMP (productos comerciales), (150, 534). En un apartado posterior nos ocuparemos de un modo más amplio del metabolismo de los nucleótidos cíclicos.

El hecho de que ambos nucleótidos cíclicos estén implicados en un gran número de reacciones bioquímicas responsables del mantenimiento de la homeostasis de la vida animal ha dado lugar a numerosas interpretaciones hipotéticas acerca de su papel regulador; siendo de destacar, entre ellas, la hipótesis conocida con el nombre de "YIN-YANG", (283-285, 287), que especula con la posibilidad de que el cAMP y el cGMP poseen un efecto regulador opuesto en muchos de los sistemas biológicos con control bidireccional.

Realmente las pruebas experimentales no han conseguido certificar de un modo concluyente esta hipótesis, pero si dejan entrever que, al menos, estos dos nucleótidos cíclicos poseen gran importancia como biomoléculas reguladoras.

Finalizaremos esta breve introducción aludiendo a otro nucleótido cíclico que en los últimos años ha adquirido una cierta relevancia como posible biomolécula reguladora; se trata de un nucleótido pirimidínico, el ácido citidílico cíclico o 3':5' citidín monofosfato cíclico (cCMP). De forma similar al cAMP y cGMP, porta un grupo fosfato formando un enlace fosfodiéster 3':5' con la ribosa:



El primero que detectó este nucleótido en la naturaleza fué BLOCH en 1974, utilizando cultivos de células leucémicas de ratón (L-1210), (85-87). Observó, así mismo, que la adición de cCMP a un medio de cultivo de estas células, dispara su crecimiento. Por otro lado, parece existir un mayor nivel de cCMP durante el proceso de regeneración hepática en animales parcialmente hepatectomizados (86,87).

Tras los primeros hallazgos de BLOCH, el tema se halla en franca expansión, hasta el punto de que recientemente se ha señalado la presencia, en una gran variedad de tejidos, de una fosfodiesterasa que hidroliza preferentemente al cCMP, (148, 438).

El enzima ha sido parcialmente purificado y caracterizado, por ejemplo, se conoce que cierta concentración de Fe^{2+} propicia la actividad óptima del enzima, los iones Mn^{2+} y Mg^{2+} son menos efectivos, e inoperantes el Zn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} , (438), por otra parte, la teofilina y un derivado de la xantina, claros inhibidores de las cAMP y cCMP-fosfodiesterasas, inhiben también a la cCMP-fosfodiesterasa pero en menor proporción (438).

KUO y cols. han estudiado la actividad de esta fosfodiesterasa durante el proceso de regeneración hepática y han hallado que, dicha actividad es un 40% inferior respecto a la que presentan los animales con el hígado intacto, (438), lo cual, explicaría de un modo plausible el aumento del nivel de cCMP observado por BLOCH, (87).

Mucho más polémica está resultando la búsqueda de un enzima citidil:ciclasa; así, mientras CECH e IGNARRO, (144, 145) dicen haber detectado, en varios tejidos de animales mamíferos, una actividad tal, responsable de la transformación de CTP en CMP; GAION y KRISHNA, en abierta réplica a los autores antes citados, utilizando su mismo método e iguales condiciones de experimentación indican que lo que CECH e IGNARRO identifican como cCMP tras la acción de la presunta citidil:ciclasa, no es

cCMP sino una mezcla de 5' CMP, CDP y un producto no identificado, poniendo en tela de juicio la existencia de esta ciclasa, (257).

Actualmente se investiga, además de su metabolismo, su distribución en los tejidos animales habiéndose obtenido resultados positivos en todos los tejidos estudiados, (128, 533). En este sentido, CAILLA y cols. (130), han desarrollado recientemente un método radioinmunológico que permite analizar, con gran precisión, el contenido de cCMP.

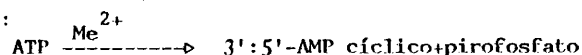
A la vista de estos resultados se ha empezado a especular con la posibilidad de que este nucleótido cíclico posea, al igual que el cAMP y cGMP, alguna función biológica, habiéndose señalado como probable su intervención en la proliferación celular, (86, 87, 130, 438).

A modo de epílogo, cabe añadir el gran auge, reflejado en la infinidad de artículos publicados, que en estos últimos años ha alcanzado la investigación de nucleótidos cíclicos, propiciado en gran parte, por el desarrollo de técnicas más sencillas, precisas y asequibles y por el indudable interés que despierta la regulación íntima de los procesos bioquímicos intracelulares.

1- Metabolismo.

A/-Biosíntesis.

a/ cAMP: En 1.962, SUTHERLAND y cols. (600, 715) fueron los primeros en descubrir la existencia de un enzima adenil:ciclasa (ATP-Pirofosfato-Liasa (ciclante), E.C. 4.6.1.1.) que cataliza la siguiente reacción:



Enzima que requiere de la presencia en el medio de un catión divalente, generalmente el Mg^{2+} (715). Se halla ampliamente distribuída en la naturaleza, (522, 616, 620) y suele encontrarse normalmente, fuertemente unida a la membrana plasmática (187, 587, 715), constituyendo el 0,005% del contenido protéico de la misma, (549). También se ha hallado este

tipo de actividad enzimática, en mayor o menor grado, en otros orgánulos de la célula: microsomas, (332), núcleo, (468, 698), y retículo sarcoplásmico, (229).

Aunque la forma más frecuente del enzima suele ser la forma particulada, también se han detectado formas solubles en algunos microorganismos (337, 345, 410, 723, 728) y en testículo de rata adulta, (100).

El principal problema para el estudio de la adenil:ciclasa ha sido precisamente conseguir solubilizarla y purificarla en forma aún más activa; para ello se han desarrollado métodos basados en el uso de detergentes no-iónicos y que han sido objeto de sendas revisiones escritas por PERKINS, (570) y JARD y cols. (379).

Los primeros que consiguieron solubilizar el enzima fueron SUTHERLAND y cols. (715), utilizando el detergente Triton X-100. Posteriormente con ese mismo detergente y con Lubrol-PX, se han conseguido mejores resultados en distintos tejidos (32, 77, 245, 384, 464, 465, 471, 588, 627, 632, 641, 719, 759). Recientemente, PILASKI y cols. (582), han logrado solubilizar el enzima a partir de células de corteza adrenal de rata con lubrol 12A9 con solo un 25% de pérdida de actividad respecto a la actividad enzimática original.

Estos sistemas de solubilización y purificación han permitido establecer algunas de las propiedades físicas y cinéticas de la adenil:ciclasa que intentaremos resumir a continuación.

-Propiedades Fisico-Químicas.

Los valores más frecuentes de peso molecular (P.M.) para la adenil:ciclasa solubilizada oscilan entre 100.000 y 200.000, (32, 314, 379, 463, 549, 550, 552, 583, 597, 723), aunque también se han publicado valores de hasta 670.000, (793), que como los mismos autores indican puede deberse a contaminación con otros componentes protéicos de la membrana.

BRAUN y DODS (100), han encontrado que los testículos de rata contienen, además de la forma enzimática asociada a la membrana (P.M.=191.000), (552), otra forma de adenil:ciclase soluble, proteína de aspecto globular y simétrico, cuyo peso molecular es de unos 56.000 daltons, (552) y cuya característica esencial es su incapacidad para responder a estímulos hormonales.

No es el único caso en el que se describe una adenil:ciclase de tan bajo peso molecular; de hecho, existen un par de precedentes en la bibliografía consultada en los que se describen adenil:ciclasas de bajo peso molecular. Por un lado TAKAI y cols. (723), han obtenido a partir de "Brevibacterium Liquefaciens" una forma del enzima con un peso molecular de 92.000 y han descubierto que está constituida por dos subunidades de 46.000 daltons que en solución se asocian formando un dímero. Por otro lado, NEER, (549) ha puesto de manifiesto la existencia de una pequeña proteína de 38.000 daltons que posee actividad adenil:ciclásica en médula renal de rata. No obstante, estos dos enzimas se obtienen por solubilización con detergentes, a diferencia del enzima de testículo de rata que es soluble.

El origen y la función que compete a esta forma hidrosoluble de la adenil:ciclase es, hoy en día, pura especulación.

Otros dos parámetros interesantes son el Radio de Stokes (Rs) y el Coeficiente de Sedimentación (Cs); parámetros que, al igual que el peso molecular, varían dependiendo del tipo de detergente y preparación biológica utilizados.

La mayoría de los valores publicados hasta el momento oscilan entre 28 y 71 Amstrongs de Rs y entre 3 y 7.5 Svedberg de Cs para adenil:ciclase procedente de tejido tiroideo de buey (32), tejido renal de perro (550), de rata (548), de cerdo (379), testículo de rata (552), linfoma de rata (314) y "Brevibacterium liquefaciens" (723).

El enzima, desarrolla, al parecer, su actividad catalítica óptima a un pH que ronda el valor 8,3 para la forma solubilizada, (32, 570) y el valor 7,5 para la forma nativa (ligada a la membrana) (32, 94, 535, 570). Es un enzima francamente termolábil (32, 570, 590, 697) fenómeno que puede ser paliado por la adición de GTP o su análogo el Guanilil-5'-imidodifosfato (Gpp (NH)p) y el fluoruro sódico (FNa) (590, 697).

-Propiedades cinéticas.

La adenil:ciclasa requiere para alcanzar su actividad óptima, de la presencia en el medio de cationes divalentes.

SUTHERLAND y cols. (419, 530, 600, 713, 715), han observado que el enzima presenta una especial predilección por el Mg^{2+} . De hecho, parece ser que el auténtico sustrato del enzima es el complejo Mg^{2+} -ATP, (76, 210). Además, se ha establecido que el Mg^{2+} libre (en presencia de ATP en exceso) incrementa la actividad catalítica del enzima, (76, 210, 716) y modifica la capacidad estimuladora que las hormonas y los guanil nucleótidos ejercen sobre las adenil:ciclasa (14, 76, 210, 697, 716, 799).

Existen varios trabajos que han corroborado la dependencia del enzima por el Mg^{2+} , (32, 94, 552), habiéndose aceptado, en general, que el enzima requiere el Mg^{2+} como componente del sustrato y que, además, posee un lugar activador en su estructura que interactúa directamente con el Mg^{2+} libre (74). Sin embargo, se han descrito algunos sistemas adenil:ciclasa que para alcanzar su actividad óptima dependen del Mn^{2+} , es el caso del sistema enzimático operante en espermatozoide maduro, (509) y en un cultivo mutante de "Neurospora Crassa" (240, 241). La descripción más reciente, dentro de la literatura consultada, corresponde a la adenil:ciclasa "soluble" descubierta por BRAUN y DODS, (100) en testículo de rata. Estas ciclsas apenas tienen actividad en presencia de Mg^{2+} como catión único.

Otro catión divalente que influye en la actividad de la adenil:ciclasa es el calcio (Ca^{2+}). El Ca^{2+} despliega una serie de efectos que

pueden concretarse como sigue: Inhibe, al parecer, a la adenil:ciclasa procedente de preparaciones de células rotas; en cambio, cuando se trabaja con preparaciones de células intactas un aumento en el nivel de Ca^{2+} incrementa la respuesta hormonal (216). En el caso concreto de la adenil:ciclasa procedente de cerebro se observa una conducta bifásica, siendo activada a bajas concentraciones de Ca^{2+} e inhibida en presencia de elevadas concentraciones de dicho catión, (99, 107, 488, 767).

Algunos autores conceden al Ca^{2+} un relevante papel durante el acoplamiento del complejo Hormona-Receptor con el sistema de la adenil:ciclasa, (661).

Otros, han detectado una proteína de bajo peso molecular con gran afinidad por el Ca^{2+} . La unión del Ca^{2+} a dicha proteína provoca un incremento en la actividad de la adenil:ciclasa "in vitro", (105, 107). Esta proteína llamada "proteína moduladora" (Modulator protein) o "proteína reguladora Ca^{2+} -dependiente" (Ca^{2+} -Dependent Regulator, CDR) ha resultado ser la misma que activa a la fosfodiesterasa (107) y que fué descubierta por CHEUNG (152, 153), KAKIUCHI y cols. (390).

Recientemente VANDERMEERS y cols. (755), han puesto de relieve que la "proteína moduladora" con el solo concurso del Ca^{2+} no es capaz de activar a la adenil:ciclasa; según estos autores, es necesaria la presencia de Mg^{2+} para formar el complejo ternario Ca^{2+} - Mg^{2+} -CDR, auténtico activador del enzima.

La adenil:ciclasa presenta una K_m para el complejo Mg^{2+} -ATP próxima a los valores 0.3 - 0.4 mM (32, 94, 211, 570, 597, 727).

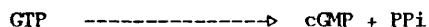
Se ha estudiado, también, el comportamiento de este enzima frente al ATP (sin catión) y otros nucleótidos, habiéndose observado que el ATP desprovisto de la influencia del catión divalente produce inhibición de la actividad enzimática, (74) y, sin embargo, un derivado análogo al ATP, concretamente la adenosina-5'-0-tiotrifosfato (AMP-PPS)

posee un efecto activador de la adenil:ciclasa (521).

El nucleótido que incide decisivamente sobre la actividad de la adenil:ciclasa es el GTP. ROBBELL y cols. (626, 628) descubrieron que el GTP potencia el efecto del glucagon sobre el sistema adenil:ciclasa hepático. Varios trabajos posteriores han corroborado claramente el efecto activador y estabilizador que el GTP y su análogo 5'-guanilil imido difosfato (Gpp (NH) p) ejercen sobre la adenil:ciclasa de diversa procedencia (75, 92, 179, 327, 429, 466, 467, 482, 609, 626, 628, 629, 646). Otros guanin nucleótidos como el guanosín 5'-tetrafosfato GTP_4 , GDP, GMP y cGMP tienen también, en general, un efecto activador sobre este enzima (368).

Un caso particular lo constituye el sistema adenil:ciclasa de tiroides puesto que prefiere al ITP frente al GTP (59, 189, 190).

b/ cGMP: Este nucleótido se biosintetiza a partir de GTP de acuerdo con la reacción siguiente:



Los productos de la reacción fueron identificados por GARBERS y cols. (265) utilizando una preparación enzimática procedente del pulmón de rata.

En un principio se pensó que esta reacción era dirigida por el enzima adenil:ciclasa, pero SUTHERLAND y cols. (324, 373), demostraron claramente la existencia de un enzima distinto encargado de catalizar la biosíntesis de cGMP, siendo PRICE, ASIMAN y MELLICOW (594) los que propusieron para este enzima el nombre de Guanil:ciclasa (GTPpirofosfato-liasa (ciclante) -EC.4.6.1.2.).

A diferencia de la adenil:ciclasa, la guanil:ciclasa se encuentra en dos formas: "soluble" y "particulada" (324). La proporción de una y otra forma varía según el tejido y la especie objeto de estudio, así,

p. ej.: tras la ruptura celular, se obtiene el enzima soluble prácticamente en su totalidad en las plaquetas (93); mientras que la forma particulada impera en otras preparaciones, p. ej.: riñón (248) y esperma (298).

Ambas formas ostentan, sin embargo, una actividad parecida, que alcanza un grado óptimo tan solo en presencia de un catión divalente. A diferencia de la adenil ciclase, la guanil:ciclase muestra su preferencia por el catión Mn^{2+} en lugar del Mg^{+2} (324, 373).

Todos los tejidos procedentes de animales mamíferos poseen guanil:ciclase salvo el esperma (279); también, se ha detectado el enzima en otros organismos del reino animal (287, 415), incluyendo insectos (138, 238), bacterias, (487, 572, 688, 711), moluscos (340, 709), pájaros (709) y peces (709), no descartándose la posibilidad de hallarlo en las plantas ya que se ha detectado cGMP en el reino vegetal (312).

En el interior de la célula la forma particulada del enzima se distribuye entre la membrana plasmática (299, 412, 709), retículo endoplásmico (623), mitocondria (540) y núcleo (56, 685, 795) y la forma soluble se localiza en el citoplasma. Según algunos autores, podría proceder de la forma particulada (287, 470, 795). Existen evidencias experimentales que apoyan este punto de vista; p. ej.: los detergentes, que mimetizan el papel que desempeñan los lípidos de la membrana, activan a la guanil:ciclase "soluble" (551) y en contrapartida, si a la forma particulada la privamos de la influencia de los componentes de la membrana, varias características diferenciales entre dichas formas desaparecen (248, 262, 795).

Otros autores, basándose en casos experimentales en los que se anotan diferencias funcionales de ambas fracciones (155, 175, 176, 293, 411-415, 528), sugieren la presencia, en varios de los tejidos estudiados de las dos formas y añaden que ambas son controladas independientemente entre sí (413, 414).

Propiedades Físico-Químicas

El peso molecular varía con la especie, el tejido y la forma enzimática de modo que para la forma soluble se han objetivado los siguientes pesos moleculares en las siguientes especies: Rata, médula renal 154.000 (551), pulmón 70.000 (155) y 110.000 (264), "Caulobacter Crescentus" 140.000 (711), "Escherichia coli" 30.000 (487); y para la forma particulada: Erizo de mar, esperma 182.000 (262) y pulmón de rata 900.000 (155).

A pesar de la disparidad de los valores hallados, en general, se atribuye a la forma soluble un peso molecular aproximado de 150.000 y a la particulada un peso molecular que ronda los 300.000 daltons (413, 529, 532).

Otras características físicas investigadas han sido el radio de stokes (Rs) y el coeficiente de sedimentación (Cs). Concretamente, NEER (551, 553) ha calculado ambos parámetros utilizando como preparación biológica médula renal de rata, estimándolos, para la forma soluble, en: $RS=54$ Amsg y $Cs=6.3s$.

La guanil:ciclasa es un enzima termolábil cuyo pH óptimo oscila entre 7.4 y 8.0 (324).

Propiedades cinéticas

La guanil:ciclasa, de forma similar a la adenil:ciclasa, posee una necesidad absoluta de cationes divalentes (Me^{2+}), lo cual puede deberse a que el verdadero sustrato del enzima es el complejo: Me^{2+} -GTP.

Cuantitativamente las necesidades metálicas del enzima varían ampliamente dependiendo de su procedencia de la presencia de moduladores en el medio y del propio catión divalente.

La naciente literatura sobre el tema, allá por el año 1.959, estableció de un modo definitivo que las guanil:ciclasas procedentes de

gran variedad de tejidos de animales mamíferos muestran una especial predilección por el Mn^{2+} (324, 373, 796).

Posteriormente se ha demostrado que la guanil:ciclasa "Soluble" procedente de pulmón (155), hígado (412), corazón (411), bazo (155), plaquetas (276), paratiroides (215) y linfocitos (199), no solo prefiere el catión Mn^{2+} , sino que, además, lo necesita en concentraciones que superan el nivel normal necesario para coadyuvar la interacción sustrato-centro catalítico del enzima; ello, ha permitido postular la existencia de un locus activador en su molécula, (155), de modo que parte del Mn^{2+} se invertirá en formar el complejo Me^{2+} -GTP y el excedente interactuará directamente a nivel del "locus" activador.

El Ca^{2+} y el Mg^{2+} poseen cierta efectividad, alcanzándose con ellos, cotas de entre el 10 y el 40% de la actividad que el enzima soluble desarrolla en presencia de concentraciones óptimas de Mn^{2+} (93, 155). Por otro lado, utilizando concentraciones de Mn^{2+} inferiores a la óptima, ha podido evidenciarse que la adición de Ca^{2+} al medio de incubación proporciona un incremento adicional de la actividad enzimática "soluble" (155, 411). Así mismo, en idénticas condiciones, el Mg^{2+} activa a la fracción "soluble" (198, 412).

El efecto desplegado por el Ca^{2+} y el Mg^{2+} sobre la fracción "particulada" resulta más confuso. En ausencia de Mn^{2+} ambos cationes resultan inefectivos sobre la forma particulada procedente de pulmón (155) y esperma (266); mientras que en presencia de bajas concentraciones (sub-óptimas) de Mn^{2+} se anota un efecto inhibitor del Ca^{2+} sobre el enzima sin purificar (extracto crudo) (155, 411), una neta inefectividad sobre el enzima purificado (412) y un efecto estimulador sobre el enzima solubilizado (773). Por su parte el Mg^{2+} , en condiciones idénticas, incrementa la actividad de la forma "particulada" (412, 708).

Dada la efectividad que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} parecen poseer, al menos parcialmente, sobre la actividad de la guanil:ciclasa; la anterior

hipótesis puede ampliarse indicando que el enzima necesita la presencia en el medio de dos cationes divalentes para conseguir la actividad óptima; uno de los cationes formará el complejo Me_1^{2+} -GTP y el otro Me_2^{2+} intervendrá a nivel de locus activador del enzima (155, 263, 266, 268).

Otros cationes como el Fe^{2+} , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} poseen cierta efectividad sobre la guanil:ciclasa "soluble" (93, 215, 744). En cambio, el Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} son netamente inhibidores (93, 324, 744).

La mayoría de las guanil:ciclasas solubles ostentan una cinética clásica Michaeliana con una K_m para el complejo Mn^{2+} -GTP que oscila entre 10 y 65 μM (90, 155, 276, 411, 412, 708) y las formas particuladas presentan cooperatividad positiva y una K_m de entre 70 y 300 μM (90, 155, 194, 198, 295, 412, 685, 743).

El enzima resulta inhibido en general por el ATP (176, 195, 199, 215, 324, 470, 741) siendo más sensible a este efecto la forma soluble que la forma particulada. Sólo, en la bibliografía consultada, se ha descrito un caso en el que el ATP tiene efecto activador, es el caso de la guanil:ciclasa uterina (685).

Otros nucleótidos presenta, así mismo, un efecto inhibitor, por ejemplo: el Adenosín 5'-tetrafosfato ATP_4 y su homólogo derivado de la guanina GTP_4 , inhiben competitivamente el enzima (368). El ADP, AMP, GDP, e ITP, también lo inhiben (324, 368). Parece ser que estos nucleótidos interactúan en el enzima a un nivel distinto del centro catalítico.

B/- Catabolismo.

Los nucleóticos cíclicos son degradados, al parecer, por una única clase de enzimas llamadas fosfodiesterasa (PDE), (3':5' nucleótido cíclico-5'-nucleótido:hidrolasa; EC. 3.1.4.17) (713).

La PDE por hidrolisis del enlace 3'-O-fosfato convierte los nucleótidos cíclicos en 5'-AMP y 5'-GMP. Posteriormente, al menos en el caso del

cAMP, el metabolito 5'-AMP es degradado hasta Inosina, a través de la formación de cGMP y/o 5'-IMP, según GULYASSY (308) y FERGUSON y cols. (235). Según trabajos más recientes realizados por WOMBACHER (809) la ruta seguida implicaría a dos enzimas: una 5'-nucleotidasa que transformaría el 5'-AMP en adenosina y una adenosina:desanimasa que se encargaría de la conversión de la adenosina en el producto final Inosina.

También se ha detectado la existencia de un enzima 5'- nucleótido fosfodiesterasa capaz de hidrolizar a varios adenín nucleótidos incluyendo la ruptura del cAMP hasta 5'-AMP (404, 453); pero sin lugar a dudas la PDE es el enzima más relevante implicado en la degradación de nucleótidos cíclicos siendo este su único efecto metabólico conocido lo que permite entrever con verosimilitud la importancia de la misma como punto de control de los niveles intracelulares de cAMP y cGMP.

Múltiples formas de la PDE

La nucleótido cíclico PDE se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y está virtualmente presente en todas las células vivas en varias formas moleculares (57, 134, 159, 391, 394, 520, 583, 587, 630, 640, 737, 738, 753) que difieren en:

- propiedades cinéticas
- especificidad por el sustrato
- distribución tisular
- estabilidad
- y necesidades iónicas.

Dada la multiplicidad de formas descritas puede decirse, en principio, que cada tejido e incluso quizás cada célula parece poseer su propio patrón y proporción de los diferentes isoenzimas.

A pesar de ello, APPLEMAN y cols., (26, 604), mediante cromatografía en DEAE-celulosa de extractos procedentes de hígado de rata detec-

Caron tres tipos de actividades fosfodiesterásicas, que les sirvió para establecer una clasificación que es la más ampliamente aceptada y utilizada hoy día.

Estos investigadores clasificaron la fosfodiesterasa en tres tipos o formas que se corresponden con las fracciones o picos eluidos de la columna cromatográfica.

Fosfodiesterasa tipo I.

Es una forma citoplasmática que hidroliza específicamente al cGMP (26, 640).

Otros investigadores han observado, en diversos tejidos, la presencia de PDE con un comportamiento cinético que permite incluirla en este grupo. No obstante, no resultan tan específicas para el cGMP y también hidrolizan al cAMP (18, 29, 57, 204, 496, 518, 566, 639, 666, 739, 791), aunque en menor proporción, de hecho se alude a la PDE I como forma enzimática de elevada K_m --- ("High K_m ") para el cAMP, es decir de baja afinidad para cAMP y elevada afinidad para el cGMP (108, 292, 350, 496, 639, 751, 789).

En el caso descrito por APPLEMAN y cols. (26, 640), el cAMP no afecta a la actividad hidrolítica que esta fracción ejerce sobre el cGMP. Sin embargo, en la forma "High K_m ", que hidroliza a ambos nucleótidos, estos actúan, aparentemente, como inhibidores competitivos (108, 349, 791).

Por su parte, DONNELLY (639) señala que el cAMP se comporta como inhibidor competitivo cuando el cGMP actúa como sustrato a hidrolizar; en cambio, al invertir los papeles de ambos nucleótidos, el cGMP actúa como inhibidor no competitivo de la hidrólisis de cAMP; lo cual sugiere, según DONNELLY la existencia de 2 o más lugares de unión para el cGMP y sólo uno para el cAMP, al menos en la PDE procedente de tejido cardíaco de animales bovinos.

La PDE es sensible a la proteína reguladora Ca^{2+} -dependiente (Ca^{2+} -dependent regulator protein, CDR) también llamada, proteína moduladora

(Modulator protein) (152), salvo en tejido pulmonar humano (58), de rata (237), de cobaya (186), eritrocitos de rata (567) y glándula pineal de buey (657).

La existencia de esta proteína moduladora o CDR fué descubierta independientemente por CHEUNG (152, 153) y KAKIUCHI y cols. (390) a partir de cerebro de animales mamíferos.

GOREN y ROSEN (291) observaron la presencia de un factor similar en corazón y TEO y cols. (731) lo purificaron, demostrando que el activador es una proteína que necesita Ca^{2+} para activar a la PDE (730).

Su Pm oscila entre 15.000 y 20.000 daltons (190, 388, 472, 730, 731, 781, 804), tiene carácter ácido y es termoestable (152, 153, 291, 390, 730, 731).

Hoy día se sabe que el CDR se halla ampliamente distribuido en el Reino animal. En vertebrados aparece en todos los tejidos estudiados salvo en leucocitos humanos (152, 190, 291, 390, 394, 472, 473, 696, 731, 808, 812). Se ha localizado, también, en varias especies de animales invertebrados (270-272) y en concentraciones especialmente elevadas en espermatozoides de varias especies incluyendo desde animales invertebrados al hombre (387).

Dentro de la célula, parece ser, que la mayor proporción se localiza en la fracción microsómica y en orden decreciente en fracción mitocondrial y nuclear (278).

La cantidad presente en muchos tejidos sobrepasa el nivel límite necesario para activar a toda la fosfodiesterasa (771, 219) y viene a representar del 1 al 2% de las proteínas solubles del cerebro (754).

Además de regular la actividad de la PDE I ostenta otras funciones reguladoras: a/activa a la adenil:ciclasa (105, 107, 154); b/ activa a una proteína-quinasa, que depende del Ca^{2+} , tanto en músculo liso como en músculo esquelético y que se encarga de fosforilar la cadena ligera

de la miosina (181, 770, 812); precisamente y en virtud de esa función y de que ambas proteínas ligan el Ca^{2+} se ha especulado con una posible identidad entre CDR y troponina C, pero existen claras evidencias que demuestran diferencias tanto funcionales (la troponina C no activa a la ATP-asa ni a la fosfodiesterasa (705) aunque DEDMAN y cols. (191) utilizando altas concentraciones han conseguido un efecto activador sobre la PDE) como estructurales (192). DABROWSKA y cols. (181) especulan con la posibilidad de que el papel desempeñado por la troponina C en músculo esquelético, como detector del trasiego de Ca^{2+} , sea desempeñado en músculo liso por el CDR. c/ dispara la fosforilación de una proteína kinasa del cerebro (667). d/ activa a la ATP-asa Ca^{2+} -dependiente de la membrana de los hematíes (290, 380). e/ recientemente, WELSH y cols. (792) han sugerido que el CDR desempeña un papel en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis.

Es posible imaginar que este tipo de moléculas protéicas de gran afinidad por el Ca^{+2} signifiquen un modelo integrador del mecanismo de acción del Ca^{2+} de modo que la unión del catión a varias proteínas podría regular varias funciones.

El estudio de diversas proteínas de este tipo demuestra que contienen secuencias aminoacídicas comunes, especialmente en las zonas de anclaje del Ca^{2+} (189).

Remitiéndonos al papel que la proteína reguladora (CDR) desempeña sobre la PDE I, podemos decir que la activación de esta forma enzimática por el Ca^{+2} requiere la previa formación del complejo Ca^{2+} -CDR (392, 472, 730), para lo cual, el Ca^{2+} se une en dos lugares del CDR, uno de ellos de gran afinidad por el Ca^{2+} y a cuyo nivel se unen de 2 a 3 moléculas del catión por mol de proteína y otro de baja afinidad que capta de 1 a 2 moléculas Ca^{2+} por mol de proteína. (348, 420, 472, 730, 731, 780, 781).

La formación del complejo Ca^{2+} -CDR lleva asociado un cambio conformacional del CDR (348, 480, 780) lo que ha podido apreciarse por el aumento del porcentaje de arrollamiento helicoidal en la proteína (480); de hecho, en ausencia de Ca^{2+} existe un 35% de estructura helicoidal que en presencia de Ca^{2+} se incrementa hasta un 75% (420, 480, 780, 781) dicho incremento presumiblemente favorece la interacción del complejo Ca^{2+} -CDR con la PDE (480). TESHIMA y KAKIUCHI (735) sugieren que la interacción tiene lugar entre 2 moléculas de CDR y 1 molécula del enzima. El efecto de esta interacción puede, también, ser un cambio conformacional en la PDE (108, 393, 480, 780).

Además, del cambio conformacional, el complejo Ca^{2+} -CDR modifica los parámetros cinéticos del enzima. Estas variaciones aún hoy día, no están nada claras. Hay autores que describen que el Ca^{2+} -CDR desciende la K_m del enzima por el cAMP (108, 291, 753), otros, un aumento de $V_{m\acute{a}x}$ (584, 785, 789, 797) y otros aluden a una variación de ambos parámetros (153, 392, 731).

TEO y cols. (731) han tratado de explicar parte de las diferencias en base a la concentración de Ca^{2+} -CDR de modo que a bajas concentraciones aumenta la $V_{m\acute{a}x}$ para cAMP y a elevadas concentraciones disminuye la K_m para cAMP.

Es muy importante tener en cuenta que, a pesar de que el complejo Ca^{2+} -CDR induce en el enzima modificaciones cinéticas tendentes a favorecer la hidrólisis de cAMP, la PDE I es esencialmente más específica para cGMP que para cAMP, por lo tanto, el complejo Ca^{2+} -CDR es evidente que en la mayoría de los tejidos ejerce un control prioritario sobre el nivel de cGMP.

Precisamente, fueron KAKIUCHI y cols. (392) los primeros en indicar que el Ca^{2+} regula de un modo más directo la hidrólisis de cGMP que la de cAMP, aumentando la afinidad (descenso de K_m) y la velocidad máxima

del enzima para el cGMP. Posteriormente se ha establecido que la PDE I, bajo la influencia del complejo Ca^{2+} -CDR, hidroliza en mayor proporción (394, 427) con mayor velocidad (108) y especificidad (25) al cGMP en varios tejidos. Ultimamente MOSS y cols. (526) han corroborado el efecto del Ca^{2+} -CDR sobre la K_m para el cGMP (hígado de rata) aunque añaden que el efecto sobre la velocidad de hidrólisis resulta incierto.

A la vista de estas consideraciones de tipo cinético, resulta atractiva la extrapolación hipotética, planteada por UZUNOV y cols. (274, 751), de los fenómenos propiciados por Ca^{2+} -CDR sobre PDE I "in vitro", a las células "in vivo". Según estos autores (278) el CDR es liberado de las zonas membranosas de la célula al citoplasma merced a una fosforilación mediada por una proteína:quinasa cAMP-dependiente. Esta observación unida a otras observaciones de tipo experimental tales como que la estimulación transináptica provoca, en algunas células, una activación sostenida de la adenil:ciclasa (306); con la consiguiente elevación del nivel de cAMP, a la que sigue un aumento de concentración de CDR en el citoplasma (752) que en buena lógica sería debido al efecto liberador que la proteína:quinasa cAMP-dependiente ejerce sobre el CDR; les ha permitido postular un modelo que explicaría, en parte, la misión del CDR en la célula "in vivo".

Un estímulo capaz de incrementar la actividad de la adenil:ciclasa haría ascender el nivel de cAMP. El cAMP además de interactuar con aquellos componentes celulares a fin de llevar a cabo la respuesta fisiológica, favorecería la liberación de CDR (a través de la proteína:quinasa). El CDR liberado se uniría al Ca^{2+} y el complejo resultante activaría a la PDE con lo que se potenciaría la hidrólisis de cAMP.

Esta secuencia de fenómenos constituiría un mecanismo de "Feed-Back" disparado por el aumento intracelular del cAMP con el fin de modular su propia concentración y evitar el acúmulo de dicho nucleótido en la célula (278, 751).

En general, la PDE I presenta una cinética Michaeliana (282, 349, 518), anotándose, en algunos casos (204), un comportamiento distinto posiblemente debido a la variedad de métodos de purificación utilizados (518, 757) y su peso molecular oscila entre 150.000 y 270.000 (29, 58, 338, 350, 394, 473, 511, 524, 657, 666, 735).

Fosfodiesterasa tipo II.

Hidroliza tanto al cAMP como al cGMP. Las afinidades del enzima por ambos sustratos son relativamente bajas y aproximadamente iguales.

En un principio, esta fracción fué detectada en extractos de hígado de rata (640) y posteriormente en otros tejidos (1, 58, 73, 203, 338, 349, 732, 789).

A pH=8.0 ambos nucleótidos se comportan como inhibidores competitivos (640), sin embargo, al variar el pH hasta valores próximos a 7.4 dicho comportamiento desaparece, observándose, a cambio, que pequeñas concentraciones de cGMP activan la hidrólisis de cAMP, pero no viceversa (48, 49, 73, 231, 246, 338, 423, 494, 640, 732). Se localiza en el citoplasma celular, siendo en ocasiones sensible a la proteína moduladora (CDR) (205, 216, 369) y a otros activadores de tipo protéico, presumiblemente, enzimas proteolíticos (706); en este sentido, MOSS y cols. (526) han demostrado que la quimotripsina activa a la fosfodiesterasa.

Su Pm es de 400.000 daltons en cerebro, riñón y tejido adiposo de rata (737, 738) y de 260.000 en pulmón humano (58).

DONELLY (206) ha sugerido, recientemente, que quizás la PDE II no es un isoenzima diferente sino, más bien, una mezcla de la PDE-I con varias proteínas reguladoras.

Fosfodiesterasa tipo III.

Es prácticamente específica para el cAMP y por ello se le denomina PDE "Low Km" (elevada afinidad por el cAMP) (26, 640, 810).

Ha sido detectada en muchos tejidos animales (26, 205, 206, 216, 306, 369, 657, 786, 790), en algunos de los cuales se presenta asociado a la membrana (1, 58, 478, 495, 640, 737, 738, 810).

El cGMP se comporta, en ocasiones, como inhibidor de esta forma enzimática (26, 640) siendo inefectivo en otras (369, 657).

Es insensible al complejo Ca^{2+} -CDR (58, 205, 206, 389, 657, 786, 790, 810) presenta una cinética anómala (25), no lineal, que sugiere la presencia de varios lugares de interacción para el sustrato con "cooperatividad negativa" (58, 786, 790). A su vez, el enzima, parece existir en varias formas cuyos pesos moleculares, calculados mediante columnas de gel de Sephadex, oscilan entre 110.000 y 400.000 daltons (56, 378, 576, 640, 666, 737, 738, 742).

Otras formas enzimáticas.

Además de estas tres formas a las que hemos hecho referencia se han descrito otras formas de actividad fosfodiesterásica en varias especies (213, 249, 339, 511, 522, 523) entre las que cabe destacar la descripción de GARDNER y cols. (269); según estos autores, en útero de rata existe una única forma de fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis de cGMP y cAMP.

Ciertamente, a pesar de la ingente cantidad de artículos y revisiones publicados en relación con este tema, no existe un concepto claro acerca del polimorfismo que presenta este enzima (o sistema enzimático). Ya en 1.976 VAN INWEGEN y cols. (757) indicaron que la diversidad de métodos utilizados en el estudio de la fosfodiesterasa puede diversificar, como de hecho ha ocurrido, las propiedades y características del enzima lo que complica y dificulta las interpretaciones a la hora de extrapolar los resultados obtenidos "in vitro" a la célula "in vivo". Muchos autores, ante la imposibilidad de conseguir una interconversión entre los distintos tipos, piensan que se trata de formas claramente diferentes.

En cambio, PICHARD y CHEUNG (575) han hallado que las distintas formas de la fosfodiesterasa procedentes de plaquetas humanas, hígado de rata y cerebro de vaca son interconvertibles entre sí. En base a este y otros estudios PICHARD y KAPLAN (577) han postulado un modelo capaz de explicar varias de las diferencias halladas entre las dos formas más importantes y abundantes de nucleótido cíclico PDE que son las fracciones I y III. El modelo implica que el enzima se halla simultáneamente en varios grados de asociación y disociación que están en equilibrio. La forma disociada posee mayor afinidad para el cGMP y la asociada, en cambio, para el cAMP. Así pues, las diferentes formas descritas en la literatura representarían distintos grados de asociación de un mismo enzima.

En general, la nucleótido cíclico PDE suele necesitar para su actividad óptima de cationes divalentes como el Mg^{2+} , Mn^{2+} y/o Ca^{2+} (152, 390, 730, 786). Es un enzima termolábil (26, 49, 153, 307, 391, 511, 525, 544, 645, 706, 713, 726, 740, 753, 779), aunque SANKARAN y cols. (657) han descrito una forma procedente de glándula pineal de vaca que calentada a 80° C durante 2 minutos sólo pierde un 22% de actividad.

Por último, añadiremos que además de las proteínas activadoras de la PDE, a las que hemos aludido, existen proteínas endógenas que desarrollan un efecto inhibitor (213, 421, 772, 778).

2.- Regulación del metabolismo. Control del nivel intracelular del cAMP y cGMP: relación con el funcionalismo tisular.

El nivel basal intracelular de los nucleótidos cíclicos viene determinado por un equilibrio dinámico entre los procesos de síntesis y degradación. Existen numerosos agentes (Hormonas, Neurotransmisores, etc.) que alteran dicho equilibrio; bien modificando la actividad de la adenil y guanil ciclasas o bien influyendo sobre las fosfodiesterasas, el efecto subsiguiente es una variación del nivel intracelular de nucleó-

tidos cíclicos capaz de disparar los mecanismos celulares encargados de dirigir algunas de las respuestas funcionales para las que el tejido, integrado por dichas células, ha sido genéticamente destinado.

La mayoría de estas respuestas funcionales se desencadenan como consecuencia de la interacción de dichos agentes con receptores específicos situados en la membrana celular y que actúan como puentes de transmisión de mensajes entre el medio pericelular y el interior de la célula; creemos acertado, por tanto, dedicar el presente epígrafe a una descripción del estado actual de los conocimientos sobre los distintos tipos de receptores, incluyendo en cada apartado específico su influencia en el funcionalismo de los distintos tejidos y su posible vinculación con los sistemas adenil y guanil ciclasa.

Puesto que la presente Tesis utiliza como material de trabajo la musculatura lisa, en cada caso, le dedicaremos una especial atención, limitándonos en lo que concierne a otros tejidos a destacar algunos de los aspectos a nuestro juicio más sobresalientes.

A.- Receptores

1/ Adrenérgicos.

a.- Tipos: Fue AHLQUIST (2) quién clasificó los receptores adrenérgicos en dos tipos: Alfa y Beta, según el rango de potencia desplegado por un grupo de agentes simpatomiméticos (alfa-adrenalina, noradrenalina, alfa-metil noradrenalina, alfa-metil adrenalina e isoprenalina).

Esta clasificación simplista realizada por AHLQUIST se complicó cuando en 1.967 LANDS y cols. (452) observaron que a nivel del músculo cardíaco la adrenalina desarrollaba una potencia efectora similar a la noradrenalina, a través de receptores beta, mientras que en músculo liso la adrenalina posee una mayor potencia que la noradrenalina; ello les permitió postular la existencia de dos subgrupos de receptores beta a los que llamaron receptores beta₁ y beta₂. Los primeros estarían

ubicados en el corazón y los segundos en la musculatura lisa.

Posteriormente nuevas descripciones experimentales han sugerido la presencia de varios subgrupos de receptores beta (102, 325). Recientemente BARNETT, RUGG y NAHORSKI (42) han corroborado la clasificación de LANDS y cols. (452) indicando la existencia de sólo dos tipos de receptor beta (β_1 y β_2), cuya relación, en tejido pulmonar de rata, es de 1/3. Según estos autores sólo existen estos dos subtipos y explican las diferencias anotadas por otros autores (102, 325) en base a la variabilidad de proporciones de uno y otro subtipos de tejido a tejido.

Una importante ayuda en favor de la existencia de, al menos, dos subtipos de beta-receptor lo ha constituido el hallazgo de un agonista selectivo de receptores β_2 llamado Procaterol (372).

También, se han anotado diferencias entre los receptores alfa de distintos tejidos (41, 70, 455); concretamente, LANGER (475) propuso la existencia de dos subtipos de receptores alfa: α_1 y α_2 , post-sinápticos y pre-sinápticos respectivamente.

Recientemente WOOD y cols. (811) y MALTA y cols. (493) indican que la clasificación de LANGER (455) puede resultar demasiado simplista dada la heterogeneidad existente dentro de cada subtipo y estiman que la misma sirve tan sólo como una primera aproximación.

b.-Efectos metabólicos y funcionales.

Los receptores alfa median la respuesta contráctil en toda la musculatura lisa excepto en el tracto intestinal, en el que median relajación (salvo en esfínteres) y los beta median la relajación de toda la musculatura lisa incluido el tracto intestinal (252, 458). De un modo general se asocia el efecto estimulante con los receptores alfa y el inhibidor con receptores beta (2-4) a pesar de que ambos median relajación en intestino.

La interacción catecolaminas-receptor alfa conduce a una rápida respuesta relajante en colon de conejo previamente contraído por carbamilcolina (20, 21); respuesta presumiblemente independiente del sistema cAMP / adenil:ciclasa, aunque se ha observado, tras un período de latencia de 60 segundos, un descenso del nivel de cAMP incluso cuando el líquido de perfusión es deficiente en calcio (19).

La respuesta subsiguiente a la estimulación alfa parece mediada por el gradiente Na/K de membrana; de hecho, se ha visto que los agentes como la quinidina, que estabilizan la membrana, bloquean el efecto alfa (98), en consecuencia el descenso del nivel del cAMP sería únicamente un fenómeno metabólico de tipo secundario (23). Esta falta de correlación entre el receptor alfa y el sistema cAMP/adenil ciclasa ha podido apreciarse, así mismo, en otros tejidos (35, 644).

Por otro lado, varios autores han establecido que la estimulación alfa-adrenérgica conduce, en algunos tejidos, a un incremento significativo del nivel de cGMP (16, 17, 277, 407, 675) pero las posibles implicaciones funcionales de dicho incremento están aún por dilucidar.

En cuanto a la interacción catecolaminas-receptor beta, ANDERSSON en 1.972 (23) ha publicado un interesante trabajo-revisión en el que fundándose en investigaciones previas realizadas por otros autores y en sus propias experiencias postula que la relajación beta-adrenérgica del músculo liso resulta mediada por el cAMP. Sin embargo, se desconoce la naturaleza de los fenómenos bioquímicos y fisiológicos responsables de la traducción de la señal hormonal en un cambio del tono muscular. En otros tejidos el aumento de cAMP propiciado por la beta-estimulación desencadena una cascada de reacciones de fosforilación (véase apartado:3) que provocan cambios sobre funciones celulares tales como la glucogenólisis, lipólisis, transporte iónico, etc. (636). Se ha sugerido una secuencia similar capaz de mediar la respuesta beta-relajante en músculo liso (670) y controlar la distribución del calcio (22). No obstante,

han aparecido varias publicaciones que ponen en tela de juicio la posible veracidad de esta hipótesis (78, 200, 430).

Entre las razones esgrimidas por estos autores cabe destacar el hecho de que no siempre existe correlación entre la relajación propiciada por un beta-agonista, por ejemplo la isoprenalina, y la elevación del nivel de cAMP e incluso ASAKAWA, RUIZ y HO (28) han descrito que el receptor beta ubicado en adipocitos de rata, no sólo influye sobre el nivel de cAMP sino que también eleva el nivel de cGMP, lo que parece ser un efecto indirecto concomitante a la elevación de cAMP. De todas formas es una observación aislada.

Ultimamente se ha comprobado que el incremento de la concentración de cAMP y el descenso del tono muscular depende con igual magnitud de las dosis de isoprenalina (355) siendo, ambos efectos, mediados por el receptor beta y bloqueados con propranolol. Estas respuestas se verifican rápidamente lo que plantea un serio inconveniente a un mecanismo como el del sistema cAMP/adenil:ciclasa; sin embargo, parece ser que la producción de cAMP y las subsiguiente secuencia de fosforilaciones se lleva a cabo en un tiempo inferior a los cinco segundos (tiempo mínimo de observación que permite la metódica actual) siendo más rápida que la aparición de la respuesta relajante (662) lo que concuerda con la hipótesis de que el cAMP media la beta-relajación en la musculatura lisa.

SCHEID y cols. (662) a comienzos de 1.979 han aportado pruebas en favor de esta hipótesis habiendo comprobado experimentalmente que: 1/ la cAMP-Proteín kinasa aumenta la actividad ATPásica propiciando el funcionamiento de la bomba Na/K, 2/ al aumentar la cantidad de proteína kinasa activa, la actividad ATPásica se aproxima a un valor máximo 3/ Este efecto estimulante es bloqueado por una proteína inhibidora de la Proteín kinasa lo que indica, según estos autores, que la cAMP-Proteín kinasa cataliza específicamente la fosforilación de esta ATPasa

provocando el cambio descrito.

A la vista de estos resultados proponen el siguiente modelo teórico de acción del agonista beta-adrenérgico en la musculatura lisa: 1/ La interacción del agonista (isoprenalina) con el beta-receptor dispara un incremento del nivel de cAMP 2/el cAMP activa a la proteína kinasa, 3/ la Proteína kinasa activada cataliza la fosforilación de la ATPasa encargada de la bomba Na/K con lo que aumenta la actividad de la bomba y con ello asciende la concentración del K intracelular y disminuye el Na extracelular, 4/ la entrada masiva del Na aceleraría la salida del calcio desde el citoplasma al espacio extracelular, 5/ la variación de la distribución del calcio podría ser la causa del descenso del tono muscular.

El control beta-adrenérgico del nivel intracelular de cAMP se lleva a cabo a través de la adenil:ciclase (37, 545, 664); aunque una serie de estudios de la que puede considerarse como pionero a AMER (15) sugieren que las catecolaminas actúan también inhibiendo a la fosfodiesterasa (143).

2/ Colinérgicos.

a.- Tipos: DALE (182, 183) basándose en el efecto desplegado por la muscarina y la nicotina sobre las sinapsis colinérgicas clasificó los receptores de la acetil colina en receptores muscarínicos y nicotínicos. Los receptores muscarínicos se distribuyen preferentemente en musculatura autónoma: Corazón y músculo liso; tejidos en los que las respuestas colinérgicas son aparentemente mediadas sólo por receptores muscarínicos. Los nicotín-receptores se hallan preferentemente en la unión neuromuscular o "placa motora". En cerebro y ganglios existen ambos tipos de receptores (462).

Del mismo modo que se acepta que los receptores nicotínicos no son idénticos en ganglios y músculo esquelético, existen evidencias de que los receptores muscarínicos en músculo liso pueden estar constituidos

por más de un tipo o clase (115).

b.- Efectos metabólicos y funcionales.

La acetilcolina despliega en la musculatura lisa un efecto contráctil que va acompañado de un aumento del nivel de cGMP.

Fueron SCHULTZ y cols. en 1.972 (673, 674) los primeros en señalar que la acetilcolina incrementa el nivel de cGMP en conducto deferente de rata actuando sobre receptores muscarínicos. Por su parte LEE y cols. (462) establecieron en el mismo año que varios agentes muscarínicos disparan incrementos de cGMP en fleón de cobaya.

Los bloqueantes nicotínicos como el tetrametilamonio no modifican en modo alguno este efecto de la acetilcolina; sin embargo, los bloqueantes muscarínicos como la atropina bloquean este efecto sobre el cGMP (462).

El estudio del comportamiento en otros tejidos ha permitido observar, así mismo, la implicación del cGMP en las respuestas colinérgicas sobre todo en tejido cardiovascular (270, 409), sistemas secretores (397, 484, 699), cultivos de neuronas (501) y tejido nervioso (302).

En ciertas células resultantes de hibridaciones se ha observado que el carbacol, agonista muscarínico, provoca una inhibición rápida y transitoria de la adenil:ciclasa seguida de una lenta recuperación (entre 20 y 30 horas) de la actividad hasta alcanzar cotas del 200 al 300% de la actividad basal normal (546).

Respecto a los receptores nicotínicos cabe señalar que NESTLER, BEAM y GREENGARD (554) han demostrado, recientemente, que la activación de estos receptores, en músculo estriado, también dispara incrementos de la concentración intracelular de cGMP.

3/ Dopaminérgicos.

a.- Tipos: Existen varias publicaciones que señalan la existencia de receptores dopaminérgicos en tejidos de varias especies (132, 173, 374)

entre ellos musculatura lisa vascular (279, 280, 568), esófago (188, 527, 606) e intestino delgado (305).

No se ha podido demostrar de un modo concluyente la existencia de subgrupos de dopamín-receptores; sin embargo, han comenzado a aparecer publicaciones que aportan las primeras pruebas en favor de ello. A comienzos de 1979 KEBABIAN y CALNE (404) han propuesto, siguiendo un criterio bioquímico y farmacológico, la división de receptores dopaminérgicos en dos subtipos D-1 y D-2, aunque no descartan la posibilidad de que existan subcategorías de cada tipo de receptor. Esta clasificación está siendo corroborada por nuevos artículos que tratan el tema; entre ellos cabe destacar el reciente trabajo de CREESE, USDIN y SNYDER (174) quienes aportan pruebas de que los guanin nucleótidos pueden regular a un tipo de receptor dopaminérgico, presumiblemente el tipo D-1, mientras que son inoperantes sobre otro tipo de receptor (D-2).

b.- Efectos metabólicos y funcionales.

Una de las acciones metabólicas de la dopamina, posiblemente mediada por receptores D-1 (404), es incrementar la producción de cAMP a través de la estimulación de un sistema adenil:ciclase sensible a la dopamina (405, 110) que se encuentra ampliamente distribuido y particularmente en tejido nervioso (173, 302, 374). Este mecanismo dopamina/cAMP parece implicado en los fenómenos electrofisiológicos desarrollados durante la transmisión nerviosa en ganglio cervical superior (302, 469). Por otro lado, la activación de este tipo de receptor en la glándula paratiroides (animales bovinos), provoca un incremento de cAMP y liberación de paratohormona (109).

En intestino delgado los receptores dopaminérgicos median el descenso de motilidad intestinal (305) lo cual, está de acuerdo con el hecho de que aumente el nivel de cAMP.

Otras respuestas fisiológicas desencadenadas por la dopamina son, al

parecer, independientes del sistema adenil:ciclasa. Así, por ejemplo, se ha observado que el efecto inhibitor de la dopamina sobre la secreción de prolactina por parte de las células mamotropas de la hipófisis anterior es independiente de dicho sistema enzimático y se verifica a través de los receptores D-2 (404). También los receptores ubicados en los cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y en los terminales de las mismas en cuerpo estriado y que reciben el nombre de "autorreceptores" parecen ser independientes del sistema cAMP adenil:ciclasa puesto que su destrucción selectiva no conlleva una pérdida de actividad de la adenil:ciclasa sensible a dopamina ni en la sustancia nigra (406) ni en cuerpo estriado (432). Los autorreceptores pueden constituir un grupo de dopamín-receptores distintos de los tipos D-1 y D-2 (404), y pueden participar en el control retroactivo inhibitor de la liberación y síntesis de dopamina a nivel terminal y del cuerpo celular, y de la velocidad de emisión de impulsos en la célula dopaminérgica.

4/Triptaminérgicos.

a.- Tipos: La 5-Hidroxi-Triptamina (5-HT) o serotonina ejerce efectos característicos sobre la musculatura lisa que parecen indicar la presencia de receptores específicos para la 5-HT en dicho tejido. Partiendo de los estudios realizados en íleon de cobaya (133, 254, 255, 622), GADDUM y PICARELLI (256) propusieron la existencia en dicha preparación de dos lugares distintos de actuación para la 5-HT: 1/ que es específicamente bloqueada por LSD (dietil amida del ácido Lisérgico) y fármacos similares (ej.: Metisergida) y 2/ que resulta bloqueado por la atropina y morfina. Los primeros han recibido el nombre de receptores D y están ubicados en la célula muscular y los segundos se denominan receptores M y se hallan en las fibras nerviosas ya que la eliminación del plexo mesentérico (565) descende la capacidad de respuesta 5-HT en unas diez veces y la actividad remanente de la 5-HT sobre la célula muscular

se bloquea mediante LSD o fármacos similares. La efectividad general del LSD y sus análogos sugiere que los receptores de 5-HT de los diferentes músculos lisos son similares si no idénticos (96).

Unos años después BROWNLEE y JOHNSON (111) trabajando, también, con íleon de cobaya no consiguieron obtener respuesta al bloquear con atropina el receptor "M" lo que hacía dudosa la existencia de receptores "D" y la clasificación de GADDUM y PICARELLI (256). A comienzos del presente año COSTA y FURNESS (172) han explicado esta contradicción que al parecer depende de la zona de íleon utilizada. Así mientras GADDUM y PICARELLI (256) utilizaban la porción terminal del íleon BROWNLEE y JOHNSON, utilizaban la porción media y según COSTA Y FURNESS (172), la porción más cercana a la unión ileocecal (unos 4 cm) responde a la acción directa de la 5-HT, en cambio, a partir de dicho punto la preparación apenas responde a la 5-HT. El hecho es que la mayoría de los autores aceptan la clasificación propuesta por GADDUM y PICARELLI (256) para tejidos periféricos.

b.- Efectos metabólicos y funcionales.

La serotonina provoca la contracción de la musculatura lisa gastrointestinal (133, 171, 172, 254, 256, 565, 622, 794) y en general de toda la musculatura lisa (5, 103, 141, 157) aunque se han descrito algunas excepciones; por ejemplo: relaja bronquios y bronquiolos humanos (103,500) y tráquea de cabra (140). Este efecto hipertonizante depende en algunos casos de la presencia de calcio extracelular (794) mientras que en otros casos es independiente (135, 157).

Algunos autores han consignado de un modo fehaciente que el efecto contráctil desplegado por la 5-HT en ciertas preparaciones de músculo liso va acompañado de un incremento en el nivel de cAMP (157, 401). Se ha descrito algo similar en otro tipo de preparaciones biológicas (655).

En lo que concierne al sistema nervioso central, BLOOM y cols. (89) han observado que la administración de 5-HT a las distintas áreas del cerebro provoca una inhibición o una aceleración de la actividad bioeléctrica en casi todas ellas, lo que indica la amplia distribución de receptores serotoninérgicos en el cerebro; no obstante en este órgano no cabe aplicar la clasificación en receptores "M" y "D" válida para tejidos periféricos puesto que tanto la 5-HT como los agonistas y antagonistas triptaminérgicos actúan de un modo muy diferente en el sistema nervioso central (315).

Existen, al menos, dos tipos de receptores en el cerebro: 1/ receptores presinápticos, localizados en neuronas del núcleo dorsal del Rafe que contienen 5-HT, y 2/ receptores postsinápticos, localizados en neuronas que reciben 5-HT ubicadas en áreas receptoras de proyecciones nerviosas procedentes de dicho núcleo. Estos receptores disminuyen la actividad bioeléctrica de las neuronas afectadas, es decir, son de carácter inhibitorio y aunque también existen receptores estimuladores, parece ser que la acción primordial de la 5-HT en las sinapsis es la inhibición (316).

Varios trabajos han demostrado la existencia de adenil:ciclase sensible a la serotonina (768, 769), aunque se pensó que dicha adenil:ciclase podría responder tanto a serotonina como a dopamina. Hoy día, parece clara la existencia de una adenil:ciclase ciertamente específica para la serotonina y diferente de la adenil:ciclase ligada a receptores dopaminérgicos (227, 228) que está conectada con receptores triptaminérgicos postsinápticos y cuya actividad se incrementa en presencia de 5-HT con el consiguiente ascenso de la concentración de cAMP (227, 228).

Otra acción interesante de la 5-HT, posiblemente mediada por receptores "D" (510), es su actividad agregante sobre las plaquetas. El receptor triptaminérgico plaquetario posee cierta similitud con re-

ceptores ubicados en espina dorsal, corteza cerebral y formación reticular, lo cual puede ser interesante a fin de utilizar una preparación más asequible como modelo de estudio de receptores triptaminérgicos (296).

La interacción de la 5-HT con el receptor triptaminérgico plaquetario provoca la inhibición de la adenil:ciclase con lo que disminuye el contenido intraplaquetario de cAMP; ello podría ser parte del mecanismo por el que la serotonina dispara la agregación plaquetaria (663).

De todas formas, muchos autores han descrito que los agentes agregantes, al margen de que afecten o no al nivel de cAMP, elevan el nivel de cGMP habiéndose sugerido la posibilidad, en base a la hipótesis "Yin-Yang" (284, 287), de que este nucleótido medie el efecto opuesto al del cAMP, actuando en algún estadio de la agregación plaquetaria (271).

5/ Histaminérgicos.

a.- Tipos: Numerosos estudios farmacológicos han conducido a la conclusión de que existen receptores de histamina en varios tejidos que pueden clasificarse en dos tipos: Receptores H_1 (33) y receptores H_2 (79).

Recientemente ANGUS y cols. (24) han sugerido la posibilidad de que exista un tercer tipo de receptor para la histamina de características similares al receptor H_2 pero con algunas diferencias estéricas.

b.- Efectos metabólicos y funcionales.

La histamina funciona como un neurotransmisor en el sistema nervioso de los animales mamíferos (677, 678) y además ostenta múltiples efectos en tejidos periféricos entre los que cabe destacar: Su actividad sobre la musculatura lisa, a nivel de la cual despliega efectos distintos; así, contrae algunos músculos lisos como, por ejemplo, íleon, tráquea y bronquios de cobaya (33) y tráquea de perro (343), relaja los vasos que irrigan tráquea y riñón de perro (39, 343) e inhibe la motilidad uterina de rata (79).

El efecto contráctil se verifica a través de receptores H_1 (33). El efecto inhibitor sobre la motilidad uterina es mediado por receptor H_2 (69, 79) y el efecto vasodilatador tiene, al parecer, dos vertientes, por un lado una vasodilatación rápida mediada por H_1 y por otro una vasodilatación lenta y más prolongada mediada por H_2 (39, 343).

Su actividad sobre la secreción gástrica se realiza a través de receptores H_2 (79, 214). El incremento de secreción gástrica que promueve la histamina al interactuar con receptores H_2 puede anularse mediante antagonistas específicos de H_2 , entre los que destacaremos por su utilidad terapéutica la cimetidina (101), fármaco de probada eficacia como gastroprotector.

Su actividad sobre la función cardíaca es, también, notable. En preparaciones aisladas (ej.: corazón aislado de cobaya) incrementa el ritmo cardíaco (79, 244). Dicho incremento es mediado primordialmente por receptores H_2 . Los receptores H_1 median en todo caso la depresión del ritmo cardíaco (244).

Sobre metabolismo graso la histamina ejerce un neto efecto lipolítico (247) que se lleva a cabo a través de receptores H_2 (303).

En general, las distintas descripciones consultadas coinciden en señalar un incremento del nivel de cAMP cuando la histamina interactúa con receptor H_1 (44, 158, 401, 531, 614, 615, 672), efecto que, al menos en músculo liso intestinal, se compagina con un efecto activador sobre la cAMP-fosfodiesterasa que acelera la degradación del cAMP disminuyendo su nivel tisular (354).

En cambio, se ha demostrado que el receptor H_2 está ligado a la adenil:ciclase, puesto que la interacción de la histamina o cualquier agonista H_2 -histamínérgico con receptores H_2 conduce a un incremento de la actividad de la adenil:ciclase con la consiguiente elevación del nivel tisular de cAMP, tanto en cerebro (300, 334, 563) como en tejidos peri-

féricos (208, 209, 303, 382, 506, 507, 585).

6/ Otros receptores.

Además de los receptores específicos para los neurotransmisores a los que acabamos de referirnos, se ha descrito la existencia de receptores para hormonas peptídicas (139, 178), la mayoría de los cuales parecen estar relacionados con la adenil:ciclase puesto que inducen incrementos de cAMP en varios tejidos (139).

Un caso particular lo constituye la insulina, cuyo mecanismo de acción está por resolver. Esta hormona provoca en algunos tejidos el descenso del nivel celular de cAMP, lo que ha llevado a especular con la posibilidad de que dicho descenso sea responsable de la mayoría de las acciones de la insulina (180). Ahora bien, el descubrimiento de que la insulina eleva el nivel de cAMP en tejido adiposo (370) ha abierto una nueva vía que intenta implicar al cAMP como mediador de la acción insulínica. Sin embargo, ello no parece probable ya que STEIMBERG (701) ha consignado recientemente que tanto la cAMP-Proteín:kinasa como la cGMP-Proteín:kinasa activan a la triglicérido:lipasa en tejido adiposo favoreciendo la lipólisis, lo que evidentemente choca con el efecto antilipolítico desplegado por esta hormona.

Quizás uno de los mayores logros en el campo de los receptores ha sido el descubrimiento de los llamados "receptores opiáceos". Desde hace muchos siglos viene utilizándose el extracto de opio como material terapéutico y varios alcaloides procedentes de dicho extracto entre los que destaca la morfina, provocan una variada gama de respuestas farmacológicas: analgesia, euforia, adicción, etc... que se verifican primordialmente a nivel del sistema nervioso central.

Sin embargo, hasta 1.973 el mecanismo de acción de estos agentes opiáceos era desconocido. En dicho año, tres equipos de investigación, trabajando independientemente, descubrieron la existencia de "receptores opiáceos"

estereoespecíficos en cerebro de rata (569, 689, 733).

Ante este descubrimiento surgió una pregunta obvia: ¿Por qué existen receptores en el cerebro animal para unos agentes que sólo existen en el Reino vegetal?. De todas las posibles respuestas la más razonable era pensar que dichos receptores desempeñan un papel fisiológico, es decir, que constituyen "puntos objetivo" para la acción de sustancias endógenas "simil-opiáceas". Tales sustancias han sido ya detectadas, poseen estructura peptídica y han recibido el nombre genérico de "Endorfinas". Una publicación recientemente aparecida se ocupa ampliamente de estos agentes endógenos (734).

Desde el punto de vista bioquímico, se está investigando la posible intervención del sistema cAMP/adenil:ciclasa como mediador de los receptores opiáceos. En este sentido, los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios puesto que algunos autores describen un descenso en la actividad de la adenil:ciclasa tanto basal como estimulada por ciertos agentes (prostaglandinas, adenosina, etc...) con el subsiguiente descenso en la producción de cAMP (161, 512, 680) y otros consignan el efecto contrario (95, 596). En este mismo contexto parece ser que un tratamiento prolongado con morfina puede afectar a la fosforilación de proteínas de membrana que induce el cAMP (690).

Un grupo de agentes cuya importancia biológica está fuera de duda y al que hemos dedicado un apartado especial en la presente revisión son las prostaglandinas. Se ha establecido la existencia de zonas específicas de unión para las prostaglandinas E, F y A (359, 650, 651).

Los receptores de la serie E son heterogéneos, existiendo receptores de "alta" y "baja" afinidad para sus ligandos (651). Parece ser que estos receptores guardan relación con la adenil:ciclasa, siendo mayor la activación propiciada por los receptores de "baja" que por los de "alta" afinidad (651).

Por su parte, los receptores de la serie F ostentan también diferente afinidad (alta y baja) y dado que las prostaglandinas de la serie F elevan, en general, el nivel de cGMP en varios tejidos (651) existe la posibilidad de que los receptores de la serie F guarden relación con la guanil:ciclasa.

Las prostaglandinas E_1 y $F_{2\alpha}$ poseen algunas acciones opuestas, por lo que la relación $PGE_1/cAMP$ y $PGF_{2\alpha}/cGMP$ observada en varios tejidos (651) podría servir de apoyo a la hipótesis "Yin-Yang" (284, 287). Sin embargo, los efectos antagónicos que despliegan dos PGs de la serie E: PGE_1 y PGE_2 (651) ponen serias dificultades a dicha hipótesis.

Para finalizar creemos interesante destacar la existencia de receptores para la adenosina, nucleósido dotado de una amplia actividad biológica siendo destacable su papel como neurotransmisor en el hipotético "Sistema Purinérgico" de BURNSTOCK (117, 118).

LONDOS y WOLFF (483), utilizando dos tipos de agentes análogos a la adenosina con sendas modificaciones en el anillo de ribosa y en el de purina respectivamente, han conseguido identificar lo que pueden ser dos tipos de receptores o dos formas de un mismo receptor para la adenosina ligados a la adenilciclasa. Estas dos zonas de anclaje han sido designadas como: "zona R" y "zona P".

La zona R requiere que el anillo de ribosa que porta la adenosina esté intacto y al ser ocupada por la adenosina conduce, en general, a la activación de la adenil:ciclasa.

La zona P necesita de la integridad del anillo púrico y su ocupación da lugar a la inhibición de la adenil:ciclasa.

La zona R parece ubicarse en la superficie externa de la membrana celular (156, 806), mientras que aún no ha podido establecerse la situación celular de la zona P.

Numerosas publicaciones dan cuenta del efecto de la adenosina sobre

la actividad de la adenil:ciclasa y la acumulación de cAMP (91, 156, 301, 328, 367, 491, 593, 659). Dicho efecto, como hemos apuntado anteriormente, conduce a la activación de la adenil:ciclasa a través de la zona R salvo en tejido adiposo donde el efecto es netamente inhibitor, tanto para la actividad adenil:ciclasa como para la lipólisis (232, 247, 481).

Además del efecto antipolítico (232, 347, 481) y de su posible vinculación con el sistema purinérgico (117, 118) la adenosina,relaja la musculatura lisa (329, 403, 489) lo que concuerda con el hecho, comprobado en otros tejidos, de que estimula a la adenil:ciclasa (91, 328, 367, 491, 659). Sin embargo, en la musculatura lisa,la adenosina no modifica de un modo estadísticamente significativo el nivel de cAMP (489), por lo que la posible implicación del sistema cAMP/ adenil:ciclasa en la respuesta relajante de la adenosina resulta dudosa.

Otras acciones a destacar son su posible papel como regulador del flujo coronario (67) y como mediador en el sistema nervioso central (504), además del efecto inhibitor presináptico en algunos tejidos (275, 333, 504) y su acción antinicotínica bloqueante de la liberación de acetilcolina en nervios colinérgicos intestinales (311, 330, 502, 660).

B.- Actividad del músculo liso y nucleótidos cíclicos.

Como hemos podido apreciar en el transcurso de la exposición precedente, existe un gran número de publicaciones que a través de sus resultados permiten especular con la posibilidad de que las variaciones en el contenido muscular de nucleótidos cíclicos sean las responsables de las respuestas relajantes o contráctiles propiciadas por varios agentes; concretamente el cAMP sería responsable de la respuesta relajante (42, 71, 355, 542, 662) y el cGMP se encargaría de la contracción (40, 49, 157, 158, 284, 287, 401, 462, 673, 674).

Algunos autores han estudiado, así mismo, las modificaciones que la concentración de estas biomoléculas experimenta durante la actividad

Neurotransmisor	Tipo de receptor	Nucleótido cíclico mediador		Referencias	Efecto en músculo liso
		cAMP	cGMP		
CATECOLAMINAS	Alfa	no	si (?)	16,17,277,407,675	Contrae(salvo intest.)
	Beta	si	no	23,37,355,662	Relaja
ACETILCOLINA	Muscarínico	no	si (?)	270,302,397,482,301, 373,674	Contrae
	Nicotínico	no	si (?)	554	-----
	D-1	si	no	405,110,173,302,374,	-----
	D-2	no	?	404	Relaja
DOPAMINA	"Autorreceptores"	no	?	406,432	-----
	"Pre-sinápticos"	?	?	316	-----
	S.N.C."Post-sinápticos"	si	no	227,228,102,103,316	-----
	"M"	?	?	256	Contrae(a través coli DEF.)
	Tej. Perife."D"	no	si (?)	157,401,655	Contrae
HISTAMINA	H ₁	no	si (?)	44,158,401,931,614,615	Contrae
	H ₂	si	no	288,209,300,303,374,383, 508,507,583,585	Relaja
	Opiáceo	si (?)	?	95,161,512,596,680,	-----
ENDORFINAS	"R"	si	no	600	-----
	"p"	si (?)	?	91,156,301,328,367,	Relaja
ADENOSINA	Para P _G s E	si	no	491,539,659	-----
	Para P _G s F	no	si (?)	651	Relaja (en general)
PROSTAGLANDINAS				651	Contrae

Tabla resumen en la que se compendia la relación neurotransmisor-receptor-nucleótidos cíclicos

muscular espontánea (671) habiéndose descrito en algunas preparaciones musculares como por ejemplo el útero de rata, un incremento de las concentraciones de cGMP y cAMP al comienzo de la contracción y relajación respectivamente (381). Otros autores han probado el efecto de ambos nucleótidos sobre varias preparaciones musculares. El efecto constatado utilizando cAMP o derivados análogos más permeables para la membrana celular como el dibutiril-cAMP ha sido nulo o relajante (40) mientras que el aporte exógeno de cGMP resulta difícil de clasificar, no habiéndose obtenido respuestas claras y convincentes (40).

Todos estos trabajos constituyen una importante base en la que fundamentar la posible implicación del cAMP y cGMP en el funcionalismo de la musculatura lisa. Sin embargo, trabajos recientemente publicados aportan serios inconvenientes sobre la validez de la anterior hipótesis puesto que sustancias como el nitroprusiato sódico, la hidralazina y el verapamil son capaces de elevar el nivel de cGMP a pesar de que relajan la musculatura lisa (201).

Además el uso del derivado 8-bromo-cGMP sobre una preparación de conducto deferente de rata, es capaz de provocar relajación de la misma en ciertas condiciones (676).

Por otro lado, la Neurotensina, pequeño péptido que provoca la contracción del íleon de cobaya, no modifica los niveles de cAMP ni cGMP, lo que parece descartar la participación de dichos nucleótidos en la respuesta contráctil que este péptido desencadena (418). Otro tanto cabe señalar para la adenosina que, como indicamos en nuestro anterior epígrafe, relaja la musculatura lisa sin modificar el nivel de cAMP (489).

C.- Modelos teóricos de interacción entre el complejo hormona-receptor y la adenil:ciclasa.

Una de las principales incógnitas a despejar en el campo de la biología atañe a la naturaleza de los receptores de membrana y al mecanismo

por el que las interacciones de estos receptores con sus respectivos ligandos modifican el metabolismo celular. En este sentido, el modelo más estudiado es el sistema de receptores acoplados a la adenil:ciclase, de amplia distribución en las membranas celulares de las especies animales.

Este sistema presenta la ventaja de que emite una señal fácilmente mensurable: producción de cAMP a partir de ATP, lo que simplifica su estudio y permite utilizar membranas aisladas.

Los receptores asociados a la adenil:ciclase son de naturaleza protéica (74) y son entidades independientes de la adenil:ciclase (562, 629, 665), presumiblemente programadas por genes distintos (371). En favor de este concepto se halla el hecho de que al trasplantar un receptor de una célula a otra, la adenil:ciclase de la célula aceptora es capaz de responder al receptor trasplantado (451, 668).

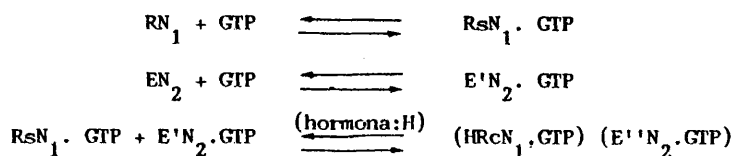
En principio y teniendo en cuenta lo que acabamos de exponer, podemos imaginar el receptor como una estructura integrada por una zona heterogénea proyectada hacia el exterior de la superficie de la membrana celular encargada de reconocer específicamente al ligando correspondiente y una zona homogénea que se extiende a través de la bicapa estructural de la membrana y que interactúa con la adenil:ciclase.

Además de estas dos unidades: receptor y enzima, el sistema de la adenil:ciclase posee componentes que ligan al guanosín trifosfato (GTP) (625, 629) y que parecen estar dotados de un papel central en la regulación de la adenil:ciclase y la respuesta del sistema a las hormonas (625).

MARTIN RODBELL (625) denomina a estos componentes: N_1 y N_2 . El componente N_1 está asociado a los receptores y el componente N_2 lo está a la adenil:ciclase. La unión del GTP al primero de ellos sensibiliza a los receptores para el proceso de acoplado con el ligando correspon-

diente, mientras que la ocupación del segundo activa automáticamente al enzima sin necesidad de acoplamiento previo entre hormona y receptor.

RODBELL (625) propone el siguiente modelo general de actuación del GTP y de las hormonas sobre el sistema de la adenil:ciclase:



Donde Rs= forma sensibilizada del receptor, Rc=forma acoplada a la hormona, E'= enzima activo y E''= enzima en estado hiperactivo.

La dependencia de la respuesta hormonal por el GTP ha sido cuestionada puesto que, también, se ha descrito un efecto inhibitor por parte de bajas concentraciones de este nucleótido sobre la adenil:ciclase en tejido adiposo (481), en médula renal, (75), en sarcolema cardíaco (543) y también en plaquetas, puesto que la inhibición alfa-adrenérgica de la adenil:ciclase plaquetaria depende de GTP (377). Sin embargo, el hecho de que posea efecto positivo y negativo sobre la adenil:ciclase puede conferir al GTP un importante papel regulador (481).

Algunos autores han sugerido, así mismo, que los fosfolípidos de la membrana celular pueden estar implicados en la regulación de la actividad adenil:ciclase (226) e incluso en el acoplamiento receptor-enzima (32).

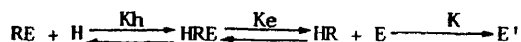
TOLKOVSKY y LEVITZKI (736) han descrito recientemente cinco posibles modelos de acoplamiento entre el receptor y la adenil:ciclase que transcribimos brevemente:

1^{er} Modelo: En el que el receptor y el enzima se hallan "pre-acoplados":



Este modelo postula: 1/ que en ausencia de la hormona no hay actividad basal por parte de la adenil:ciclasa, 2/ que la tasa de activación del enzima depende de la activación hormonal y se satura siguiendo una cinética Michaeliana, 3/ que la afinidad de la hormona por el receptor medida cinéticamente debe de ser igual o mayor que la afinidad medida directamente mediante experimentos de unión, 4/ que el descenso de la concentración de receptores o del enzima mediante el uso de inhibidores irreversibles no debe afectar la proporción en que aparece el complejo activo (HRE'), sin embargo, debe de ascender el nivel máximo asequible de HRE' tanto en presencia de GTP como de su derivado GppNHp.

2º Modelo: En el que la hormona se une al complejo, previamente acoplado, receptor-enzima y lo disocia:

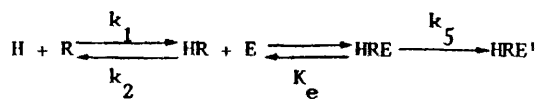


Como en el modelo anterior el receptor y el enzima se hallan pre-acoplados.

Este modelo preconiza 1/ que puede existir cierta actividad enzimática basal en ausencia de la hormona, siempre y cuando el pre-acoplado (R-E) no sea total, 2/ que la unión de la hormona posee "cooperatividad negativa", a pesar de que una constante intrínseca de acoplamiento gobierna dicho proceso. Ello se debe a que coexisten paralelamente el complejo HR y el complejo HRE, 3/ que la cinética que rige la acumulación de enzima activo E' no es de primer orden, 4/ que la reducción de la concentración de receptores totales R_t y enzima total E_t por inactivación irreversible dará como resultado el descenso de nivel máximo de enzima activo E' asequible, descendiendo su tasa de formación.

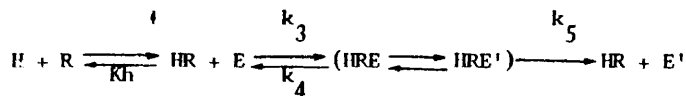
3º Modelo: En el que se da por supuesta la existencia de equilibrio entre el complejo hormona-receptor y el enzima. Este modelo suele denominarse como "del receptor flotante", puesto que supone que el receptor "flota" en la membrana celular (375). Esquemáticamente se representa

como sigue:



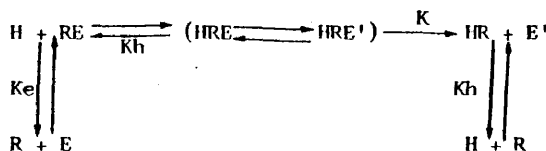
La unión hormonal presenta "cooperatividad negativa" y una cinética de segundo orden.

4º Modelo: 0 modelo de "acoplamiento por colisión". En el cual se describe la activación enzimática mediante la siguiente ecuación:



Es, en realidad, un caso especial del modelo anterior y postula: 1/ que la unión hormonal es "no-cooperativa", 2/ que la activación enzimática de GppNHp a saturación es de primer orden, 3/ que, en contraste con el modelo anterior, la constante de proporcionalidad K_5 que dirige la formación del enzima activado depende linealmente de la concentración total de receptores pero es independiente de la concentración de enzima, 4/ que dicha constante en presencia de GppNHp aumenta en función de la concentración hormonal hasta saturación de acuerdo con una curva de dependencia "no-cooperativa".

5º Modelo: Este modelo es, en realidad, el resultado de la combinación del 1º y 2º modelos:



Preconiza una unión hormonal "no-cooperativa" y una cinética de formación de enzima activo fuertemente desviada de la cinética de primer orden.

La simbología utilizada en las representaciones esquemáticas es la siguiente: R= receptor, E= enzima, E'= enzima activado, H= hormona, Kh= constante de disociación del complejo (HR), y Ke= constante de disociación del complejo (RE).

3.- Interacción de los nucleótidos cíclicos con componentes celulares.

A fin de comprender con claridad el papel exacto que los nucleótidos cíclicos juegan como moléculas reguladores de muchos procesos biológicos, resulta imprescindible conocer la identidad del componente o componentes celulares que constituyen el objetivo directo de su acción y de cuya interacción resultara un efecto modulador de las funciones celulares específicas.

Existe, aún hoy en día, muy poca información al respecto y a pesar de que experimentalmente se ha demostrado que gran parte de los nucleótidos cíclicos endógenos se encuentran formando complejos con proteínas solubles (282, 642, 746, 749) tan solo se ha logrado identificar y estudiar en profundidad un tipo de proteínas denominadas proteínas quinasas nucleótido cíclico-dependientes que son proteínas enzimáticas que catalizan la transferencia del grupo gamma-fosfato desde el ATP hasta los grupos hidroxilo (OH) de residuos aminoacídicos, tales como la serina y treonina, integrantes de varias proteínas (636). Los nucleótidos cíclicos actúan como efectores alostéricos y por ello se denominan nucleótido cíclico-dependientes.

A- Proteín quinasa cAMP-dependiente:

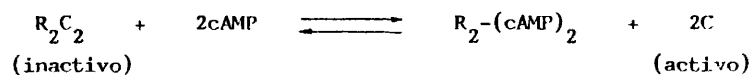
La proteín quinasa cAMP-dependiente (cAMP-PK), (ATP:proteína fosfo-transferasa, EC 2. 7. 1. 37) fué descubierta por WALSH, PERKINS y KREBS (776) en 1.968; con ello se daba un importante paso en el difícil camino hacia la comprensión del mecanismo por el que "los segundos mensajeros" transmiten "el mensaje hormonal" a fin de modular las operaciones celulares específicas.

Los primeros estudios subsiguientes al descubrimiento de WALSH y cols., indicaban la existencia de múltiples formas de cAMP-PK (454, 149); sin embargo, muchas de las formas obtenidas no son más que artefactos químicos, habiéndose establecido claramente que la mayoría de los tejidos procedentes de animales mamíferos poseen dos formas de cAMP-PK que pueden separarse por cromatografía en DEAE-celulosa y que en virtud de la posición durante la elución han recibido la denominación de formas I y II respectivamente (165, 351, 613).

Se distribuyen ampliamente en tejidos de animales mamíferos, habiéndose detectado ambas formas en cerebro (165, 243, 505), corazón (114, 165, 351, 635), mucosa gástrica (165, 610), tejido adiposo (165, 424), hígado (149, 165, 434), ovario (725), testículo (165), espermatozoides (267), y músculo esquelético (165).

Las proporciones de ambas formas varían de especie a especie y dentro de la misma especie de tejido a tejido. Así por ejemplo: el isoenzima tipo II predomina en corazón de vaca y cobaya (164, 243), mientras que el mismo tejido de ratón y rata contiene entre un 75 a un 80% de la forma I (165).

-Propiedades: Ambas proteínas kinasas son enzimas tetraméricas integrados por cuatro subunidades: dos reguladoras (R) y dos catalizadoras (C) (225, 351, 428, 454, 631). Al parecer, el cAMP activa al enzima uniéndose a las subunidades R, lo que provoca la disociación del tetrámero quedando libres las subunidades C (428, 454). Podemos representar esquemáticamente el proceso de la siguiente forma:



Sin embargo, recientemente, algunos autores han propuesto un modelo cinético diferente (27, 747), en el que se incluye la formación de un complejo ternario intermedio integrado por 2 moléculas de cAMP, dos

Pm, posee una mayor afinidad por el Mg^{2+} -ATP (sustrato) que la PK-II (351). Así mismo, en ausencia de Mg^{2+} -ATP tiene más afinidad por el cAMP que la PK-II. (351).

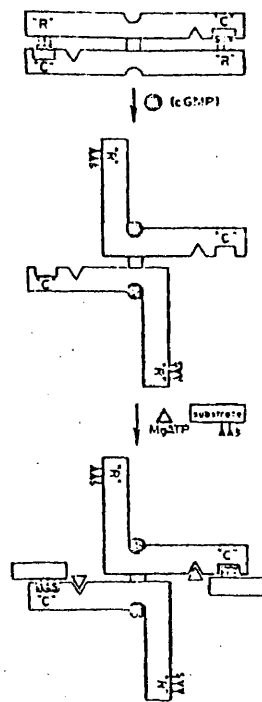
2/ posiblemente la diferencia más importante entre ambas estriba en la capacidad de autofosforilación de la PK-II (631) de la que carece la PK-I (351).

La autofosforilación es un proceso por el cual se transfiere una molécula de fosfato desde el ATP a un resto de serina de cada subunidad R_2 de la PK-II (351, 631, 508) dicha transferencia es catalizada por la subunidad C del propio enzima.

3/ cabe destacar, por último, las diferencias de comportamiento de las dos formas frente al proceso "asociación-disociación" de las subunidades correspondientes. La PK-I requiere la presencia de Mg^{2+} -ATP a 30° C para que sus subunidades R_1 y C se asocien (351, 106), mientras que las subunidades R_2 y C de la PK-II pueden asociarse en ausencia de Mg^{2+} -ATP (351). Por otro lado en presencia de histona o concentraciones elevadas de ClNa, las subunidades R_1 y C se disocian rápidamente reasociándose lentamente en buffer diluido (165, 243), en tanto que en la forma II la presencia de dichos reactivos provoca una lenta disociación que se convierte en rápida reasociación tan pronto como se elimine el cAMP del medio (165).

Además de estos dos tipos de cAMP-PK, posiblemente de origen citoplásmico, se ha detectado este tipo de actividad enzimática en las membranas celulares de varios tejidos (hígado, músculo esquelético, cerebro, corazón, tejido adiposo y mucosa gástrica) (142, 607, 624, 750). Esta cAMP-PK ligada a la membrana viene a representar el 5% de la actividad total desarrollada por las cAMP-PK celulares (750).

B.- Proteín kinasa-cGMP dependiente: cGMP-PK (ATP: Proteína fosfo-transferasa, EC. 2.8.1.37).



Figura, 3.4.: Mecanismo de acción de la cGMP-PK

R= Zona reguladora

C= Zona catalizadora

A= Residuo de arginina

S= Residuo de serina

permanente (en ausencia de cGMP) podría explicarse por la existencia en la zona R de una porción similar en composición y estructura a la de las proteínas que actúan como sustrato en el proceso fosforilativo. En presencia del cGMP, éste interactúa con el locus de unión en cada una de las cadenas propiciando un cambio conformacional que podemos describir como una "apertura" de las cadenas, que dejan libre el centro catalítico para que el sustrato proteico a fosforilar pueda "anclar" en dicha porción.

Este modelo puede, entre otros problemas, explicar la observación de que la tasa de autofosforilación es mayor en ausencia que en presencia de cGMP (196) puesto que en presencia de cGMP el dímero se "abre" y aleja en consecuencia la zona R de la zona G dificultando la fosforilación del residuo de serina (autofosforilación).

El Pm del holoenzima completo procedente de varios tejidos de animales mamíferos oscila entre 120.000 y 165.000 daltons (445, 446, 686, 687, 724). Su catión divalente predilecto es el Magnesio y en menor cuantía el calcio (445, 686, 687). El pH óptimo para su actividad oscila entre 6.5 y 8.5 (435, 446, 448, 474, 686, 724). El donador de fosfato es, como en el caso de la cAMP-PK, el ATP (636).

C.- Regulación y función de las proteínas kinasas-nucleótido cíclico-dependientes.

En 1971 WALSH y cols. (774) aislaron a partir de músculo esquelético un factor proteico termoestable que inhibe a la cAMP-PK a nivel de la subunidad catalítica (30, 31). El significado fisiológico de esta proteína inhibidora es desconocido. Hipotéticamente EARP y STEINER (216) sugieren, entre otras explicaciones, que, de localizarse el inhibidor en una (s) zona (s) determinada (s) de la célula, bien podría bloquear la acción del cAMP en dicha (s) zona (s) permitiendo la expresión del efecto del cAMP en el resto de la célula.

Posteriormente se aisló una proteína, también termoestable, capaz de estimular a la cGMP-PK (202) e inhibir a la cAMP-PK. Dada la doble acción de este factor se pensó que el inhibidor de la cAMP y el estimulador de la cGMP-PK son la misma proteína y se le llamó "Modulador de la proteína kinasa".

Estudios posteriores aportaron pruebas sobre la presencia de esta proteína estimuladora de la cGMP-PK en varios tejidos de animales mamíferos (435, 436, 444, 445, 686, 687) pero aún quedaba por establecer si este factor estimulador y el inhibidor de la cAMP-PK era la misma proteína. A juzgar por los estudios de KUO y cols. (443, 447) se trata de proteínas diferentes distribuidas en cantidades equiparables en la mayoría de los tejidos a excepción del músculo esquelético que posee casi exclusivamente el "modulador inhibidor" y del músculo liso que contiene prácticamente en exclusiva el "modulador estimulador".

Como en el caso del modulador inhibidor de la cAMP, se desconoce la función y el mecanismo de acción del modulador estimulador de la cGMP-PK, aunque KUO y cols. (448) señalan que este modulador interactúa con las histonas y otros sustratos protéicos haciéndolos mejores sustratos para la cGMP-PK.

Además de estos dos moduladores, también se ha descrito la existencia de un tercer factor protéico que inhibe tanto a la cAMP-PK como a la cGMP-PK (720).

Evidentemente, al margen de estas proteínas moduladoras de origen endógeno, la actividad de las proteínas kinasas nucleótido cíclico-dependientes es también regulada por aquellos agentes capaces de modificar la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos (véase aptdo. 2). La función de las cAMP- y cGMP-PKs consiste, como decíamos al comienzo, en transferir el grupo gamma-fosfato desde ATP

hasta diversas moléculas protéicas capaces de actuar como sustratos de dichos enzimas. Se ha demostrado que las histonas, caseína, fosvitina, protamina y la fosforilasa b kinasa son sustratos efectivos de la cAMP-PK (428, 514, 775, 776) "in vitro". Si, además, tenemos en cuenta que el enzima puede ser mediador de varias hormonas, es lógico pensar en su capacidad para fosforilar otras proteínas "in vivo" entre las que cabría incluir: la glucógeno:sintetasa, piruvato:kinasa, triglicérido:lipasa, fosforilasa:kinasa, colesterol:esterasa, etc...

Todo ello puede interpretarse en el sentido de que la cAMP-PK es un enzima poco específico (454), sin embargo, varios trabajos aparecidos en los últimos años han puesto de relieve la especificidad de la cAMP-PK; por ejemplo, COHEN y cols. (160) trabajando con fosforilasa:kinasa de músculo esquelético de conejo observan que de los 200 residuos de lisina que posee el enzima completo sólo dos resultan fosforilados, de los 150 residuos de treonina no se fosforilan ninguno y tampoco fosforila a residuos de serina que, en cambio, si son marcados por otras kinasas (160). Así mismo, la cAMP-PK es capaz de distinguir entre proteínas similares, por ejemplo: fosforila a la L-piruvato:kinasa (217, 346) y no a la M-piruvato:kinasa (160).

Además de la especificidad, se han estudiado también los elementos estructurales necesarios para que la cAMP-PK pueda reconocer a los sustratos a fosforilar. En este sentido, parece que la estructura primaria de las proteínas, sustratos en potencia de la cAMP-PK, es más importante que la terciaria puesto que la cAMP-PK puede fosforilar a proteínas desnaturalizadas (555). También parece claro, que la cAMP-PK no es capaz de reconocer una determinada secuencia de aminoácidos (555), sin embargo, al menos aparentemente, los aminoácidos básicos juegan un importante papel en el reconocimiento de los sustratos por parte de la cAMP-PK (555).

En lo que respecta a la cAMP-PK, se sabe que actúa preferentemente

sobre las histonas, fosforilando en lugares diferentes a los de la cAMP-PK (445, 556, 724). Además, se ha comprobado que la cGMP-PK procedente de pulmón bovino es capaz de fosforilar a la piruvato:kinasa, fructosa 1;6 difosfatasa, glucógeno:sintetasa y fosforilasa b kinasa (474), también la mielina procedente de varias fuentes es buen sustrato de la cGMP-PK (448).

D.- La fosforilación como mecanismo de las diversas acciones desplegadas por los nucleótidos cíclicos.

Tras el descubrimiento de la cAMP-PK (776) se propuso la hipótesis de que los diversos efectos del cAMP en los distintos tejidos son mediados por las proteín kinasas (440). A modo de inciso y antes de proseguir cabe señalar la reciente sugerencia de BORON y cols. (97) que adjudica al pH intracelular el papel de "tercer mensajero" ya que, al parecer, el cAMP juega un papel regulador de dicho parámetro y en consecuencia la influencia hormonal sobre el sistema cAMP/adenil:ciclasa daría lugar a una modificación del pHi que bien podría afectar a una variedad de procesos celulares.

Continuando con la idea inicial, cabe indicar que según dicha hipótesis el cAMP sólo necesita regular la actividad de un tipo de enzimas y la especificidad de acción del cAMP vendría dada por el tipo de proteína específica que resulta fosforilada por dichas proteín kinasas en varios tejidos.

Una función de especial interés en el contexto del presente trabajo lo constituye el fenómeno de la permeabilidad iónica de las membranas biológicas, que en el caso de tejidos excitables como el nervioso y muscular resulta el pilar fundamental de la función biológica que genéticamente les ha sido asignada, por ello la posible aplicación de la hipótesis desarrollada por el equipo de PAUL GREENGARD (440) para explicar la transmisión nerviosa y la actividad muscular, reviste el máximo inte-

rés en orden a explicar la posible intervención de los nucleótidos cíclicos en ambas funciones.

Recientemente GREENGARD (302) ha publicado una interesante revisión en la que expone algunos hallazgos experimentales que apoyan el papel de los nucleótidos cíclicos en el funcionalismo nervioso y muscular, de los que vamos a dar cuenta resumidamente en los siguientes párrafos: el cAMP y la fosforilación protéica juegan, al parecer, tres papeles en la sinapsis nerviosa:

- 1.- Regular la biosíntesis de los neurotransmisores de los terminales presinápticos.
- 2.- Alterar la función del sistema microtubular.
- 3.- Modificar la permeabilidad de la membrana de las neuronas post-sinápticas.

Existen evidencias que indican que la tercera función es resultado de la regulación del estado de fosforilación de proteínas específicas de la propia membrana. En este sentido, se ha descrito la presencia de dos sustratos protéicos de la cAMP-PK en la membrana sináptica (748) llamados proteína I y proteína II. Ambas proteínas resultan fosforiladas por la cAMP-PK. La proteína I se halla sólo en tejido nervioso, mientras que la proteína II existe, también, en las membranas y el citoplasma de células de otros tejidos.

La fosforilación de ambas proteínas se alcanza en un tiempo máximo de 5 seg. (tiempo mínimo de observación que las técnicas actuales permiten), evidentemente dada la rapidez con que se efectúa la transmisión del impulso nervioso es imprescindible que la acción del cAMP sobre la PK y la subsiguiente fosforilación de las proteínas I y II tenga lugar en un espacio de tiempo compatible con la velocidad de transmisión del impulso nervioso.

Dada la dificultad que conlleva el estudio de fenómenos electrofisiológicos tan rápidos como los desarrollados en tejido nervioso,



BIBLIOTECA

se han utilizado otros tipos de células que permiten dicho estudio. En este sentido, existen varios tejidos en los que, también, los nucleótidos cíclicos parecen implicados en la función de la membrana celular y que pueden servir como modelo de estudio. Así se han estudiado fragmentos de membrana de retículo sarcoplásmico procedente de células de miocardio, viéndose que el cAMP estimula el transporte activo de calcio y que existe correlación entre dicho transporte, estimulación de una ATPasa calcio y magnesio-dependiente y la fosforilación de una proteína de membrana de un Pm aproximado de 22.000 daltons (456, 721, 722). Utilizando células epiteliales de vejiga de sapo intactas se ha establecido una buena correlación entre el grado de fosforilación de una proteína de membrana llamada proteína D, transporte de sodio y niveles de cAMP en varias situaciones (197, 777).

Los agonistas beta-adrenérgicos provocan un incremento de flujo de sodio y potasio através de la membrana en hematies de ciertas aves. Puesto que el receptor beta interactúa con el sistema cAMP/adenil:ciclase (véase aptdo. 2A.1) elevando el nivel de cAMP parece factible que el cAMP sea el mediador de dicho incremento del flujo iónico. Además el cAMP imita a los agonistas beta-adrenérgicos en este aspecto. Existe en este caso, según el equipo de GREENGARD (638) una correlación entre el aumento del flujo catiónico a través de la membrana y la fosforilación de una proteína de membrana de unos 240.000 daltons de Pm.

WELLER y WELLER y LAING (787, 788) en sus resultados experimentales no consiguen las correlaciones a las que alude GREENGARD (308). Utilizando hematies humanos y de paloma describen como, en efecto, el cAMP aumenta la permeabilidad al calcio pero sin guardar relación con la fosforilación de proteínas de membrana ya que, incluso, dicha fosforilación compromete seriamente la mayor permeabilidad al calcio propiciada por el cAMP. Consideran, por tanto, fortuita la correlación transporte de calcio, nivel de cAMP y fosforilación de proteínas de membrana consig-

nada por GREENGARD (302) y postulan que el cAMP regula la permeabilidad de la membrana para el calcio de un modo bifásico, por un lado, interactuando directamente con algún componente de la membrana eleva la permeabilidad al calcio y por otro fosforila a proteínas de membrana a través de la cAMP-PK reduciendo la permeabilidad; así mismo, indican que el cAMP aumenta la permeabilidad al sodio en hematies de paloma merced a un efecto directo y no a través de la fosforilación de proteínas (788).

Estos resultados (787, 788) constituyen una seria objeción a la hipótesis propuesta por KUO y GREENGARD (440).

La aplicación de esta hipótesis al cGMP plantea múltiples problemas puesto que, a pesar de que la cGMP-PK ha sido hallada en varios tejidos (425, 435, 437, 439, 443, 477, 541, 724, 758), tan solo en el músculo liso se han detectado proteínas de membrana capaces de actuar como sustratos de la cGMP-PK (137). Estas proteínas han sido denominadas G-I y G-II.

Dado que un agente como la acetilcolina provoca un rápido aumento del nivel de cGMP en músculo liso (462, 675) y que el cGMP a bajas concentraciones estimula la fosforilación de las proteínas G-I y G-II (137) podría ser que el cGMP y dichas proteínas de membrana modularan algunos de los efectos de la acetilcolina en músculo liso.

Quizás este mecanismo justifique el incremento de cGMP y el efecto contráctil desarrollado por varios agentes sobre la musculatura lisa, fenómenos ambos que han sido ampliamente tratados en anteriores apartados.

BIBLIOGRAFIA

- 1- ADACHI, K., LEVINE, V., HALPRIN, K.M., LIZUKA, H., YOSHIKAWA, K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* 429:498-507.
- 2- AHLQUIST, R.P. (1948). *Am. J. Physiol.* 153:586-600.
- 3- AHLQUIST, R.P. (1962). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 139:38-41.
- 4- AHLQUIST, R.P. (1966). *J. Pharm. Sci.* 55:359-367.
- 5- AITKEN, M.M., SANDFORD, J. (1970). *Br. J. Pharmacol.* 38:443P
- 6- ALDRIDGE, R.R., BARRETT, S., BROWN, J.B., FUNDER, J.W., GODING, J.R., - KALTENBACH, C.C., MOLE, J.B. (1970) *J. Reprod. Fertil.* 21:369.
- 7- AMBACHE, N. (1957). *J. Physiol.* 135; 114-132
- 8- ————— (1959). *J. Physiol.* 146:255-249.
- 9- —————, BRUMMER, H.C., ROSE, J.G., WHITING, J. (1966). *J. Physiol.* 185:77.
- 10- —————, REYNOLDS, M. (1960). *J. Physiol.* 154:40 P.
- 11- ANGGARD, E. (1966). *Acta Physiol. Scand.* 66:599.
- 12- —————. (1965). *Biochem. Pharmacol.* 14:1507.
- 13- —————, JONSSON, C.E., (1971). *Acta Physiol. Scand.* 81:440-447
- 14- ALVAREZ, B., BRUNO, J.J. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:515-519.
- 15- AMER, M.S. (1971). *Fed. Proc.* 30:220 (Abstr.).
- 16- AMER, M.S. (1974). *Gastroenterology* 67:333-337.
- 17- AMER, M.S., BYRNE, J.E. (1975). *Nature* 256:421-424.
- 18- AMER, M.S., MAYOL, R.F. (1973). *Biochim. Biophys. Acta.* 309:148.
- 19- ANDERSSON, R. (1972). *Acta Physiol. Scand.* 85:312-322.
- 20- —————, LUNDHOLM, L., MOHME-LUNDHOLM, E. (1971). *En: Proceedings of the symposium on Physiology and pharmacology of vascular neuroeffector systems.* pp.202-215. INTERLAKEN.
- 21- —————, MOHME-LUNDHOLM, E. (1970). *Acta Physiol. Scand.* 79:244-261
- 22- —————, γ cols. (1975): *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 5:491-518.
- 23- —————. (1972). *Acta Physiol. Scand. (Suppl.)* 382:1-59
- 24- ANGUS, J.A., BOBIK, A. KORNER, P.I., STONEHAM, M.T. (1978). *Br. J. Pharmacol.* 62:7-17.
- 25- APPLEMAN, M.M., TERASAKI, W.L. (1975). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* — 5:153-162.

- 26- APPELMAN, M.M., THOMPSON, W.J., RUSSELL, T.R. (1973). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 3:65-98.
- 27- ARMSTRONG, R.N., KAISER, E.T. (1978). *Biochemistry.* 17:2840-2845.
- 28- ASAKAWA, T., RUIZ, J., HO, R.J. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 75:2684-2688.
- 29 - ASANO, T., HIDAOKA, M. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 397:124-133.
- 30- ASHBY, C.D., WALSH, D.A. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:6637-6642.
- 31- —————, —————. (1973). *J. Biol. Chem.* 248:1255-1261.
- 32- ASBURY, R.F., COOK, G.H., WOLFF, J. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:5286-92
- 33- ASH, A.S.F., SCHILD, H.O. (1966). *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 27:427-39
- 34- ASHMAN, D.F., LIPTON, R., NEVCON, M.H., PRICE, T.D. (1963). *Biochem. -- Biophys. Res. Commun.* 11:330-334.
- 35- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D., BLACKMORE, P.F., EXTON, J.H. (1977), -- *J. Biol. Chem.* 252:2662-2669.
- 36- AURBACH, G.D., HOUSTON, B.A. (1968). *J. Biol. Chem.* 243:5935.
- 37- AURBACH, G.D., SPTEGEL, A.M., GARDNER, J.D. (1975). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 5:117-132.
- 38- BALASCH, J., SANTOS, B. (1966). *Münchener Med. Wochenschrift.* N°10 año 108.
- 39- BANKS, R.O., FONDACARO, J.D., SCHWAIGER, M.M., JACOBSON, E.D. (1978). -- *Am. J. Physiol.* 235:F570-F575.
- 40- BÄR, H.P. (1974). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 4:195-237.
- 41- BARKER, K.A., HARPER, B., HUGHES, I.E., (1977). *J. Pharmacol.* 29:129-134
- 42- BARNETT, D.B., RUGG, E.L., NAHORSKI, S.R. (1978). *Nature* 273:166-168.
- 43- BARRETT, S., BLOCKEY, M.A., de B., BROWN, J.M., CUMMING, I.A., GODING, J.R., MOLE, B.L., OBST, J.M.J. (1971). *Reprod. Fertil.* 24:136-137.
- 44- BARTFAI, T., BREAKFIELD, X.O. (1978). En: "Molecular Biology and Pharmacology of Cyclic nucleotides" (Ed. Folco, G., PAOLETTI, R.) pp. 57-67. Elsevier/North-Holland Biomedical Press (Amsterdam, N.York).
- 45- BATTEZ, G., BOULET, L. (1913). *C.R. Séanc. Soc. Biol.* 74:8-9.
- 46- BAYLE de JESSE (1960). *Thérapie* 11:730.
- 47- BEAVO, J.A., BECHETEL, P.J., KREBS, R.G., (1975). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 5:241-251.
- 48- —————, HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W. (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 5649-5655.

- 49- BEAVO, J.A., HARDMAN, J.G., SHUTHERLAND, E.W. (1971). *J. Biol. Chem.* 246:3841-3846.
- 50- BERGSTROM, M.S. (1967). *Science* 157:382-391.
- 51- BEHRMAN, H., YOSCHINAGA, K., GREEP, R. (1971). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 180:426-435.
- 52- BENNETT, A., FLESLER, B. (1970) *Gastroenterology*. 59:790
- 53- ———, FRIEDMANN, C.A., VANE, J.R., (1967). *Nature* 216:873.
- 54- ———, ELEY, K.G., SCHOLLES G.B. (1968) *Br J. Pharmac.* 34:630-638.
- 55- ———, ———, ——— (1968). *Brit. J. Pharmac.* 34:639-647.
- 56- BENSINGER, R.E., FLETCHER, R.T., CHADER, G.J. (1974). *Science* 183: 86-87.
- 57- BERGSTRAND, H., LUNDQUIST, B. (1978). *Mol. Cell. Biochem.* 21:9-15.
- 58- BERGSTRAND, H., LUNQUIST, B. (1976). *Biochemistry* 15:1727-1735.
- 59- BEGSTROM, S., CARLSON, L.A. (1965). *Acta Physiol. Scand.* 65:383-384.
- 60- ———, ———, EKElund, L.G., ORO, L. (1965). *Acta Physiol. Scand.* 64:332-339.
- 61- ———, ———, ORO, L. (1964). *Acta Physiol. Scand.* 80: 170.
- 62- ———, ELIASSON, R., VON EULER, U.S., SJOVALL, J. (1959) *Acta Physiol. Scand.* 45:133-144.
- 63- ———, DUNER, H., VON EULER, U.S., PERNOW, B. SJOVALL, J. (1959) - *Acta. Physiol. Scand.* 45:145.
- 64- ———, SAMUELSSON, B. (1963). *Acta. Chem. Scand.* 17:5282.
- 65- ———, SJOVALL, J. (1960). *Acta. Chem. Scand.* 14:1693-1700.
- 66- ———, ———, (1960). *Acta Chem. Scand.* 14:1701-1705.
- 67- BERNE, R.M., RUBIO, R., DOBSON, J.D., CORNISH, R.R. (1971). *Circulation - Res.* 28(Suppl. 1):115-119.
- 68- BERNIER, J.J., RAMBAUD, J.C., CATTAR, D., (1969). *GUT* 10:980
- 69- BERTACCINI, G., MOLINA, E., VITALI, T., ZAPPIA, L. (1979). *Br. J. Pharmacol.* 66:13-17.
- 70- BERTHELSEN, S., PETTINGER, W.A., (1977). *Life Sci.* 21:595-606.
- 71- BERTI, F., PUGUSI, L. (1972). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 1:567.

- 72- BEITZ, E. (1972). "Vascular Smooth muscle". Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. N.Y.
- 73- BEVERS, M.M., SMITS, R.A.E., VAN RIJN, J., VAN LUIK, R. (1974). *Biochim. Biophys. Acta.* 341:120.
- 74- BIRNBAUMER, L. (1973). *Biochem. Biophys. Acta* 300:129-158.
- 75- ———, NAKAHARA, T., YANG, P. (1974). *The J. Biol. Chem.* 249: -- 7857-7866.
- 76- ———, PHOL, S.L., RODBELL, M. (1969). *J. Biol. Chem.* 244:3468-3476.
- 77- ———, ———, ———, (1971). *J. Biol. Chem.* 246:1857-1860.
- 78- BIRNBAUM, J.E., ABEL, P.W., AMIDON, G.L., BUCHNER, C.K.J. (1975). *J. Pharmac. exp. ther.* 194:396-409.
- 79- BLACK, J.W., DUNCAN, W.A.M., DURANT, C.J., GANELLIN, C.R., PARSON, E.M. - (1972). *Nature* 236:385-390.
- 80- BLASCHKO, M., MUSCHOLL, E. (1972). *Catecholamines Hand-Book of experimental Pharmacology.* Tomo 33. Springer-Verlag. Berlin.
- 81- ———, ———, FURCHGOTT, R.F. *Capitulo 9 de la obra anterior:* 283-335.
- 82- BLATCHLEY, F.R., DONOVAN, B.T. (1969). *Nature* 221:1065.
- 83- BLAUSTEIN, A. (1965). *El Bazo.* Ediciones Toray, S.A. Barcelona.
- 84- BRESSLER, R., VARGAS-CORDON, M., LEOVITZ, H.E. (1968). *Diabetes.* 17: - 617-624.
- 85- BLOCH, A. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58:652-659.
- 86- ———, DUTSCHMAN, G., MAVE, R. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:955-959.
- 87- ———, (1975). *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5:331-338.
- 88- BLOOM, F.E. (1975). *Rev. Physiol. B.* 74:1103.
- 89- ———, HOFFER, B.J., SIGGINS, G.R., BARKER, J.L., NICOLL, R.A. (1972) *Fed. Proc.* 31:97.
- 90- BLOSSER, J.C., APFEL, S.H. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:3088-3093.
- 91- BLUME, D.J., FOSTER, C.J. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:5003-5008.
- 92- BOCKAERT, J., ROY, C., JARD, S. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:7073-7081.
- 93- BOHME, E., JUNG, R., MECHLER, I. (1974). *Methods Enzymol.* 38C:199-202.
- 94- BOJJI REDY, N., OLIVER, K.L., FESTOFF, B.W., KING ENGEL, W. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 540:371-388.

- 95- BONNET, K.A., (1975). *Life Sci.* 16:1877-1882.
- 96- BORN, G.V.R. (1970). En: "Smooth muscle". (ed. BULBRING, E., BRADING, A. JONES, A., TOMITA, T.) pp.418-451. Edward Arnold Publishers Ltd. (London)
- 97- BORON, W.F., RUSELL, J.M., BRODWICK, M.S., KEIFER, D.W., ROOS, A. (1978) — *Nature* 276:511-513.
- 98- BOWMAN, W.C., HALL, M.T., (1970). *Br. J. Pharmacol.* 38:399.
- 99- BRADHAM, L.S., HOLT, D.A., SAMO, M. (1970). *Biochem. Biophys. Acta* 201: — 250-260.
- 100- BRAUN, T., DODS, D.F. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:1097-1101.
- 101- BRIMBLECOMBE, R.W., DUNCAN, W.A.M., DURANT, H.J., EMMETT, J.C., GANELLIN, C.R., PARSONS, M.E. (1975). *J. Int. Med. Res.* 3:86-91.
- 102- BRITAIN, R.T., JACK, D., RITCHIE, A.C., (1970): *Adv. Drug. Res.* 5:197-253.
- 103- BROCKLEHURST, W. (1958). En: 5-Hydroxy tryptamine. (ed. Lewis G.P.) — p.p. 172-176. London: Pergamon.
- 104- BROOKER, G., THOMAS, L.J. Jr., APPLEMAN, M.M. (1968). *Biochemistry* 7:4177-4181.
- 105- BROSTROM, M.A., BROSTROM, C.O., BRECKENRIDGE, B.M. WOLFF, D.J. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:4744-4750.
- 106- BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A., KREBS, E.G. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:2444-2447.
- 107- BROSTROM, C.O., HUANG, Y.C., BRECKENRIDGE, B. M., WOLFF, D.J. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:64-68.
- 108- BROSTROM, C.O., WOLFF, D.J. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 172:301-311.
- 109- BROWN, E.M., CARROLL, R.J., AURBACH, G.D. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4210-4213.
- 110- BROWN, J.H., MAKMAN, M.H. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:539-543.
- 111- BROWNLEE, G., JOHNSON, E.S., (1963) *Br. J. Pharmac. Chemother.* 21:306-322.
- 112- BRUNO, J.J., TAYLOR, L.A., DROLLER, M.J. (1974). *Nature* 251:721-723.
- 113- BUCHERL y REIN (1949). *Naturwissenschaften* 36:20.
- 114- BURCHELL, A., COHEN, P.T.W., COHEN, P. (1976). *Febs. Lett.* 67:17-22.
- 115- BURGEN, A.S.V., SPERD, L. (1969). *Br. J. Pharmacol.* 34:99-115.
- 116- BURKE, G. (1969). *J. Lab. Clin. Med.* 74:856. (Abstract)

- 117- BURNSTOCK,G. (1972). *Pharmacol. Rev.* 24:509-581.
- 118- BURNSTOCK,G. (1977). En: *Purine and Pyrimidine metabolism. Ciba Foundation Symposium 48 (New Series)*.pp. 295-307. Elsevier Excerpta Medica. North-Holland (Amsterdam).
- 119- BURTON,A.C. (1966). *Physiology and Biophysics of the circulation. Year Book Medical Publishers.*
- 120- BUTCHER,R.W., BAIRD,C.E. (1968). *J.Biol.Chem.* 243:1713-1717.
- 121- ————, HO,R.J., MENG,H.C., SUTHERLAND,E.W. (1965). *J. Biol. — Chem.* 240:4515.
- 122- ————, SUTHERLAND,E.W. (1962). *J. Biol. Chem.* 237:1244-1250.
- 123- BYGDAMAN,M. (1964). *Acta Physiol. Scand.* 63 (Supl.242):1
- 124- ————, (1967). Eds. S. Bergström and B. Samuelsson. Stockholm: Almqvist and Wiksell: 71-77.
- 125- ————, FREDRICSSON,B., SVANBORG,K., SAMUELSSON,B. (1970). *Fert. — Steril.* 21:622-629.
- 126- ————, HAMBERG,M., SAMUELSSON,B., WIQVIST,N. (1968). *Amer. J. — Obstet. Gynec.* 102:317-326.
- 127- ————, WIQVIST,N. (1971). *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 180:473-482.
- 128- CAILLA,H.G., GORIDIS,C., ROUX,D.R., REUTTER,W., DELAAGE,M.A. (1978). — *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 9:768.
- 129- CAILLA,M.L., RACINE-WEISBUCH,M.S., DELAAGE,M.A. (1973). *Anal. Biochem.* 56:394-407.
- 130- CAILLA,M.L., ROUX,D., DELAAGE,M., GORIDIS,C. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:1503-1509.
- 131- CAILLA,M.L., VANNIER,C.J., DELAAGE,M.A. (1976). *Anal.Biochem.* 70:195-202.
- 132- CALNE,D., CHASE,T.N., BARBEAU,A. (1975). *Adv. Neurol. Vol.* 9.
- 133- CAMBRIDGE,G.W., HOLGATE,J.A. (1955). *Br. J.Pharmacol.Chemother.* 10: — 326-335.
- 134- CAMPBELL,M.T., OLIVER,I.T., (1972). *Evr.J.Biochem.* 28:30-37.
- 135- CAMPBELL,A.K., SIDDLER,K. (1977). *Biochim.Biophys. Acta* 497:62-74.
- 136- CARLSON,L.A., HALLBERG,D. (1968). *J. Lab.Clin.Med.* 71:368.
- 137- CASNELLIE,J.E., GREENGARD,P.(1974). *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 71:1891-95
- 138- CATALAN,R.E., CASTILLON,M.P., MUNICIO,A.M. (1976). *Biochem. Biophys. — Res.Commun.* 69:914-919.

- 139- CATT, K.J., DUFAY, M.L. (1977). *Ann. Rev. Physiol.* 39:529-557.
- 140- CHAND, N. De Roth, L. EYRE, P. (1979): *Br. J. Pharmacol.* 66:331-336.
- 141- CHAND, N. EYRE, P. (1978). *Agents & Actions* 8:191-198.
- 142- CHANG, K.J., MARIUS, N.A., CUATRECASAS, P. (1975). *J. Biol. Chem.* - 249:6854-6865.
- 143- CHASIN, M., HARRIS, D.N. (1976). *Adv. Cyclic Nucleotide res.* 7:225-264.
- 144- CECH, S.Y., IGNARRO, L.J. (1977). *Science*, 198:1063-1065.
- 145- CECH, S.Y., IGNARRO, L.J. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 80: 119-125.
- 146- CEUTHBERT, M.F. (1969). *Brit. Med. J.* 4:723-726.
- 147- CHANG, GADDUM, (1929) *J. Physiol.* 68. Citado por Salvá.
- 148- CHENG, Y.CH., BLOCH, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:2522-2524.
- 149- CHEN, L.J., WALSH, D.A. (1971). *Biochemistry.* 10:3614-3621.
- 150- CHEUNG, W.Y. (1967). *Biochemistry* 6: 1079-1087.
- 151- CHEUNG, W.Y. (1969). *Anal. Biochemistry* 28:182-191.
- 152- CHEUNG, W.Y. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38:533-538.
- 153- ————— (1971). *J. Biol. Chem.* 246:2859-2869.
- 154- —————, BRADHAM, L.S., LYNCH, T.J., LIN, Y.M., TALLANT, E.A. — (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:1055-1062.
- 155- CHRISMAN, T.D., GARBERS, D.L., PARKS, M.A., HARDMAN, J.G. (1975). — *J. Biol. Chem.* 250:374-381.
- 156- CLARK, R.B., GROSS, R., SU, Y.F., PERKINS, J.P. (1974). *J. Biol. Chem.* 249:5296-5303.
- 157- CLYMAN, R.I., BLACKSIN, A.S., SANDLER, J.A., MANGANIELLO, V.C., — VAUGHAN, M. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:4718-4721.
- 158- CLYMAN, R.I., SANDLER, J.A., MANGANIELLO, V.C., VAUGHAN, M. (1975). *J. Clin. Invest.* 55:1020-1025.
- 159- COHEN, P., ANTONIOW, J.F., NIMMO, H.G., YEAMAN, S.J., (1976). En: *Metabolic interconversions of enzymes* (Ed. SHALTIEL, S.) p.p. 9-18. Springer Verlag. Heidelberg.
- 160- COHEN, P., WATSON, D.C., DIXON, G.H. (1975). *Eur. J. Biochem.* 51:79-92

- 161- COLLIER, H.O.J., ROY, D.C., (1974). *Nature* 248:24-27.
- 162- COOK, W.H., LIPKIN, D., MARKHAM, R. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* 79:3607.
- 163- CORBIN, J.D., BROMSTROM, C.O., ALEXANDER, R.L., KREBS, E.G. (1972). -
J. Biol. Chem. 247:3736-43.
- 164- CORBIN, J.D., KEELY, S.L. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:910-918.
- 165- CORBIN, J.D., KEELY, S.L., PARK, C.R. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:218-
225.
- 166- COBBIN, L.B., THORP, R.H. (1957). *Nature* Vol. 180. N^o 4579:242-243.
- 167- ———, ——— (1959). *J. Pharmacol.* 14:392.
- 168- COCEANI, F., PACE-ASCIAK, C., VOLLA, F., WOLFE, I.S. (1967). *J. Physiol.*
213:1056.
- 169- ———, WOLFE, L.S., (1965). *J. Physiol. Pharmacol.* 43:445.
- 170- COLLIER, H.O.J., SWEATMAN, W.J.F. (1968). *Nature (Lond)* 219:864-865.
- 171- COSTA, M., FURNESS, J.B. (1979). *Biochem. Pharmacol.* 28:565-571.
- 172- COSTA, M., FURNESS, J.B., (1979). *Br. J. Pharmacol.* 65:237-248.
- 173- COSTA, E., GESSA, G.L., (1977). *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* Vol 16.
- 174- CREESE, I., USDIN, T., SNYDER, S.H. (1979). *Nature* 278:577-578.
- 175- CRISS, W.E., MURAD, F., KIMURA, H., MORRIS, H.P. (1976). *Biochem. Biophys.*
Acta. 445:500-508.
- 176- CRISS, W.E., MURAD, F., KIMURA, H. (1976). *J. Cyclic Nucleotide Res.* —
2:11-19.
- 177- CROWSHAW, K., TAKMAN, B.H., ATTREP, K.A., GOUGOUTAS, J.Z. (1967). *Biochem*
J. 105:1251-1260.
- 178- CUATRECASAS, P. (1974). *Ann. Rev. Biochem.* 43:169-214.
- 179- CUATRECASAS, P., JACOBS, S., BENNETT, V. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
72:1739-1743.
- 180- CZECH, M.P. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46:359-384.
- 181- DABROWSKA, R., SHERRY, J.M.F., AROMATORIO, D.K., HARTSHORNE, D.J. (1978)
Biochemistry. 17:253-258.
- 182- DALE, H.H. (1914). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6:147-190.
- 183- DALE, H.H., FEDBERG, W., VOGT, M. (1936). *J. Physiol.* 86:353-380.

- 184- DAMESHEK, W. (1955). Bull N.Y. Acad. Med. 31:112.
- 185- DAVIES, B.N. HORTON, E.W., WITHRINGTON, P.G. (1967). J. Physiol. (Lond) 188:38.
- 186- DAVIS, C.W., KUO, J.F. (1977). J. Biol. Chem. 252:4078-4084.
- 187- DAVOREN, P.R., SUTHERLAND, E.W. (1963). J. Biol. Chem. 238:3016-3023.
- 188- DE CARLE, D.J., CHRISTENSEN, J. (1976). Gastroenterology 70:216-219
- 189- DEDMAN, J.R., JACKSON, R.L., SCHREIBER, W.E., MEANS, A.R. (1978). J. — Biol. Chem. 253:343-346.
- 190- DEDMAN, J.R., POTTER, J.D., JACKSON, R.L., JOHNSON, J.D., MEANS, A.R. — (1977). J. Biol. Chem. 252:8415-8422.
- 191- DEDMAN, J.R., POTTER, J.D., MEANS, A.R. (1977). J. Biol. Chem. 252:2437
- 192- DEDMAN, J.R., WELSH, M.J., MEANS, A.R., (1978). J. Biol. Chem. 253: — 7515-7521.
- 193- DELAAGE, M.A., ROUX, D., CAILLA, H.L. (1978). En: Molecular biology and Pharmacology of cyclic nucleotides . (Ed. Folco, G., PAOLETTI, R.) p.p. 155-171. Elsevier/N.-Holland Biomedical Press. (Amsterdam, N.York).
- 194- DE JONGE, H.R., (1975). Febs. Letters 53:237-242.
- 195- DE JONGE, H.R., (1975). Febs. Letters 55:143-152.
- 196- DE JONGE, H.R., ROSEN, O.M. (1977). J. Biol. Chem. 252:2780-2783.
- 197- DE LORENZO, R.J., WALTON, K.G., CURRAN, P.F., GREENGARD, P. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 70:880.
- 198- DE RUBERTIS, F.R., CRAVEN, P.A. (1976): J. Biol. Chem. 251:4651-4658.
- 199- DEVILLER, P., CILLE, Y., BETKEL, H. (1975). ENZYME. 19:300-313.
- 200- DIAMOND, J., HOLMES, T.G. (1975): Can. J. Physiol. Pharmacol. 53:1099-1107.
- 201- DIAMOND, J., JANIS, R.A. (1978). Nature 271:472-473.
- 202- JICZFALUSY, U., HAMMARSTROM, S. (1977). Febs. Letters. 82:107-110.
- 203- DONNELLY, T.G. Jr. (1976). Arch. Biochem. Biophys. 173:375-385
- 204- DONNELLY, T.E. Jr. (1977). Biochim. Biophys. Acta. 480:194-203.
- 205- DONNELLY, T.E., Jr. (1978). Biochim. Biophys. Acta 542:245-252.
- 206- DONNELLY, T.E. Jr. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun 82:964-970.
- 207- DONNELLY, T.E. Jr., KUO, J.F., REYES, P.L., LIU, Y.P., GREENGARD, P. (1973) J. Biol. Chem. 248:190-198.

- 208- DOUSA, T.P., HUI, Y.S.F., NORTHRUP, T.E., GOLDENBERG, M.M. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28:343-344.
- 209- DOZOIS, R.R., WOLLIN, A., RETTMANN, R.D., DOUSA, T.P. (1977). *Am. J. Physiol* 232:E35-E38.
- 210- DRUMMOND, G.J., DUNCAN, L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245:976-983.
- 211- DRUMMOND, G.I., DUNHAM, J. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 189:63-75.
- 212- DUCHARME, B.W., WEEKS, J.R., (1967). *Fed. Proc.* 26:681.
- 213- DUMLER, I.L., ETINGOF, R.N. (1976). *Biochim. Biophys. Acta.* 429:474-484.
- 214- DURANT, G.J., GANELLIN, C.R., PARSONS, E. (1975). *J. Med. Chem.* 18:905-909.
- 215- DURHAM, J.P. (1976). *Eur. J. Biochem.* 61:535-544.
- 216- EARP, H.S., STEINER, A.L. (1978). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 431-459.
- 217- EDLUND, B., ANDERSSON, J., TITANJI, V., DAHLQUIST, V., EKMAN, P., ZETTERQUIST, O., ENGSTROM, L. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67:116-1521
- 218- EDWARDS, N.G. (1969). *Amer. J. Cardiol.* 23:307.
- 219- EGRIE, J., SIEGEL, F.L. (1975). *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 67:662-670.
- 220- ELIASSON, R., POSSE, N. (1960). *Acta Obstet. Gynec. Scand* 39:112-126.
- 221- ————, RISLEY, P.L., (1966). *Acta Physiol. Scand.* 67:253.
- 222- ELINGTON, G., RAPHAEL, R.A., SMITH, G.N., HALL, N.J., PICKLES, V.R. (1963) *Nature (Lond.)* 200:960-993.
- 223- EMBREY, M.P., FILSHIE, G.M. (1970). *Lancet* 1:157-159.
- 224- ————, HILLIER, K., TRUSSEL, R.R., PATEL, R.C., TAMUSANGE, S. (1970) *J. Obstet. Gynec. Brit. Commonw.* 77:200-210.
- 225- ————, TRUSELL, R.R., HILLIER, K., PATEL, R.C. (1969). *J. Obstet. - Gynec. Brit. Commonw.* 76:769-782.
- 226- ENGELHARD, V.H., GLASER, M., STORM, D.R. (1978). *Biochemistry.* 17:3191-3200.
- 227- ENJALBERT, A., BURGOIN, S., HAMON, M. ADRIEN, J., BOCKAERT, K. (1978). *Mol. Pharmacol.* 14:2-10.
- 228- ENJALBERT, A., HAMON, M., BOURGOIN, S., BOCKAERT, J. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14:11-23.
- 229- ENTMAN, M.L., LEVEY, G.S., EPSTEIN, S.E. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35:728-733.

- 230- ERLICHMAN, J., RUBIN, C.S., ROSEN, O.M., (1973). *J. Biol. Chem.* 248:7607-7609.
- 231- ERNEUX, C., VAN SANDE, J., DUNONT, J.E., BOEYNAEMS, J.M. (1977). *Eur. J. Biochem.* 72:137-147.
- 232- FAIN, J.N., POINTER, R.H., WARD, W.F., (1972). *J. Biol. Chem.* 247:6866-6872.
- 233- FAZEKAS, M.I. (1957). *Ann. Endocrinol.* 18:706.
- 234- FEISSINGER, GOTHE (1963). *Comp. Ren. Soc. Biol.* 117.
- 235- FERGUSON, D.R., PRICE, R.H. (1973). *Febs. Letters* 34:204-206.
- 236- FERREIRA, S.H., VAN J.R. (1967) *Nature. (Lond.)*, 216:868.
- 237- FERTEL, R., WEISS, B. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12:678-687.
- 238- FILBURN, C.R., WYATT, G.R., (1976). *Biochem. Biophys. Acta.* 22:1635-1640
- 239- FLACK, J.D., JESSUP, R., RANWELL, P.W. (1969). *Science N.Y.* 163:691-92
- 240- FLAWIA, M.M., TORRES, H.N. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:6873-6879.
- 241- FLAWIA, M.M., TORRES, M.N. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:6880-6883.
- 242- FLESHLER, B., BENNETT, A., (1969). *J. Lab. Clin. Med.* 74:872-873.
- 243- FLEISCHER, N., ROSEN, O.M., REICHLIN, M. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:54-58.
- 244- FLYNN, S.B., GRISTWOOD, R.W., OWEN, D.A.A. (1979). *Br. J. Pharmacol.* 65:127-137.
- 245- FORTE, L.R. (1972). *Biochem. Biophys. Acta* 266:524-542.
- 246- FRANKS, D.J., MAC MANUS, J.P. (1971). *Biochem. Biophys. Res. commun.* --- 42:844-849.
- 247- FREDHOLM, B.B., MENG, H.C., ROSELL, S. (1968). *Life Sci.* 7:1209-1215.
- 248- FREY, W.H.H., BOMAN, B.M., NEWMAN, D. GOLDBERG, N.D. (1976). *Fed. Proc.* 35:1730.
- 249- FUJIMOTO, H., ICHIKAWA, A., TOMITA, K, (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* 161:54-63.
- 250- FUJIMOTO, M., MIHARA, S., OKABAYASUI, T., SUGASE, T., TARUI, S. (1975). -- *J. Biochem.* 78:131-137.
- 251- FUNDER, J.W., BLAIR-WEST, J.R., COGHLAN, J.P., DENTON, D.A., SCOGGINS, B.A. WRIGHT, R.D. (1969). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 47:PII

- 252- FURCHGOTT, R.F., (1972). En: Catecholamines (Ed.: BLASCHKO, H., MUSCHOLL, E.) p.p. 283-330. Springer-Verlag (Berlin)
- 253- GABBIANI, G., BADONNEL, M.C., MAJNO, G. (1970). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 135:447-452.
- 254- GADDUM, J.H., HAMEED, K.A. (1954). Br. J. Pharmac. Chemother. 9:240-248
- 255- GADDUM, J.H., HEBB, C.O., SILVER, A., SWANN, A.A.B. (1953). Q. J. Exp. Physiol. 40:49-74.
- 256- GADDUM, J.H., PICARELLI, Z.P. (1957). Br. J. Pharmac. Chemother 12:323-328
- 257- GAION, R.M., KRISHNA, G. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun. 86:105-111
- 258- GANDARIAS, J.M. (1959). Revista Clinica Española Año XX. Tomo LXXI N°6
- 259- —————. (1969). Fisiología Especial. Editorial Americana.
- 260- —————, (1974). Bioquímica y fisiología general. Editorial — Toray.
- 261- —————, (1971). Discurso de ingreso en la Real Academia de — Medicina de Bilbao.
- 262- GARBERS, D.L. (1976). J. Biol. Chem. 251:4071-4077.
- 263- GARBERS, D.L., CHRISMAN, T.D., HARDMAN, J.G. (1976). En: Eukaryote cell function and Growth: Regulation by intracellular cyclic nucleotides. - (Ed.: DUMONT, J.E., BROWN, B.L., MARSHALL, N.J.) pp. 155-193. Plenum Press. - (London).
- 264- GARBERS, D.L., CHRISMAN, T.D., HARDMAN, J.G. (1978). Molecular Biology - and Pharmacology of cyclic Nucleotides (Ed.: POLCO, G., PAOLETTI, R.) — EL SEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS (AMSTERDAM-N.Y.) 43-55.
- 265- GARBERS, D.L., CHRISMAN, T.D., SUDDATH, J.L., HARDMAN, J.G. (1975). Arch. Biochem. Biophys. 166:135-138.
- 266- GARBERS, D.L., DYER, E.L., HARDMAN, J.G. (1975). J. Biol. Chem. 250:382-387.
- 267- GARBERS, D.L., FIRST, N.L., LARDY, H.A. (1973). J. Biol. Chem: 248:875-79
- 268- —————, HARDMAN, J.G., RUDOLPH, F.B. (1974). Biochemistry. 13:4166-4171.
- 269- GARDNER, E.A., THOMPSON, W.J., STRADA, S.J., STANCEL, G.M. (1978) Biochemistry 17:2995-3000.
- 270- GEORGE, W.J., POLSON, J.B., O'TOOLE, A.G., GOLDBERG, N.D. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 66:398-403.

- 271- GERRARD, J.M., TOWNSEND, D.N., TODDARD, S., WITKOP, C.J. Jr., WHITE, J.G. (1977). *Am. J. Pathol.* 86:99-116.
- 272- GILL, G.N., GARREN, L.D. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:786-790
- 273- GILL, G.N., HOLDY, K.E., WALTON, G.M., KANSTEIN, C.B. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:3918-3922.
- 274- GILL, G.N., WALTON, G.M., SPERRY, P.J., (1977). *J. Biol. Chem.* 252:6443-6449.
- 275- GINSBORG, B.L., HIRST, G.D.S. (1972). *J. Physiol.* 224:629-645.
- 276- GLASS, D.B., FREY, W.H.M., CARR, D.W., GOLDBERG, N.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:1279-1285.
- 277- GLASS, D.B., WHITE, J.G., GOLDBERG, N.D., (1974). *Fed. Proc.* 33:611.
- 278- GNEGY, M.E., NATHANION, J.A., UZUNOV, P. (1977). *Biochim. Biophys. Acta.* 497:75-85.
- 279- GOLDBERG, L.I. (1972). *Pharmacol. Rev.* 24:1-29.
- 280- GOLDBERG, L.I., VOLKMAN, P.H., KOHLI, J.D. (1978). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18:57-79.
- 281- GOLDBERG, N.D., DIETZ, S.B., O'TOOLE, A.G. (1969). *J. Biol. Chem.* 244:4458-4466.
- 282- GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K. (1977). *Ann. Rev. Biochem.* 46:823-896.
- 283- _____, _____, DUNHAM, E., LOPEZ, C., HADDEN, J.W., (1974). (ed. B. CLARKSON, R. BASERGA) Cold Spring Harbor, ny: Cold Spring Harbor Lab. 609-626.
- 284- _____, _____, HARTLE, D.K., HADDEN, J.W. (1973). En: *Proceedings of the fifth international Congress of Pharmacology.* San Francisco, vol. 5 "Cellular Mechanisms" (Ed.: MAXWELL, R.A., ACHESON, C.H.) p.p. 146-169. S. Karger, Basel.
- 285- GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., NICOL, S.E., GLASS, D.B., SANFORD, C.H. KUEHL, F.A. Jr., ESTENSEN, R.D. (1974). *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5:307-330.
- 286- _____, LARNER, J., SASKO, H., O'TOOLE, A.G. (1969). *Anal. Biochem.* 28:523.
- 287- _____, O'DEA, R.F., HADDOX, M.K. (1973) *Adv. cyclic nucleotide Res.* 3:155-223.
- 288- GOLDBLATT, M.W., (1935). *J. Physiol. (Lond.)* 84:208.
- 289- GONZALEZ, J.A. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca (1970).

- 290- GOPINATH,R.W., VINCENZI,F,F, (1977) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 77:1203.
- 291- GOREN,E.N., ROSEN,D.M. (1971). *Arch.Biochem.Biophys.* 142:720-723.
- 292- ———, ——— (1972). *Arch.Biochem.Biophys.* 153:384-397.
- 293- GORIDIS,C., REUTTER,W. (1975). *Nature* 257:698-700.
- 294- ———, VIRMAUX,N. CAILLA,H.L., DELAAGE,M.A. (1974). *Febs.Letters*, 49:167-169.
- 295- GORIDIS,C., VIRMAUX,N., URBAN,P.F., MANDEL,P. (1973). *Febs. Letters* 30:163-166.
- 296- GRAF,M., PLETSCHER,A., (1979). *Br.J. Pharmacol.* 65:601-608.
- 297- GRAY,J.P., DRUMMOND,G.I., LUK,D.W., (1976). *Arch.Biochem.Biophys* 172:20-30.
- 298- GRAY,J.P., HARDMAN,J.G., BIBRING,T. SUTHERLAND,E.W. (1970). *Fed. Proc.* 29:608.
- 299- ———, DRUMMOND,G.I. (1976). *Arch. Biochem.Biophys.* 172:31-38.
- 300- GREEN,J.P., JOHNSON,C.L., WEINSTEIN,H. MAAYANI,S. (1977). *Proc.- Natl.Acad.Sci.USA.* 74:5697-5701.
- 301- GREEN,R.D., STANBERRY,L.R. (1977). *Biochem.Pharmacol.* 26:37-43.
- 302- GREENGARD,P. (1976). *Nature* 260:101-108.
- 303- GRUND,V.R., GOLDBERG,N.D., HUNNINGHAKE,D.B. (1975) *J.Pharmacol. - Exp.Ther.* 195:176-184.
- 304- GRYGLEWSKI,R.J., BUNTING,S., MONCADA,S., FLOWER,R.J., VANE,J.R. - (1976). *Prostaglandins* 12:685-713.
- 305- GUERRIN,F., MILLED,G., MERVEILLE,P., HEQUET,B. (1967). *C.R. Soc. Biol.*, 61:1318-1325.
- 306- GUIDOTTI,A., COSTA,E. (1973). *Science* 179:902-904.
- 307- GUIDOTTI,A., HANBAUER,I., COSTA,E. (1975). *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 5:619-639.
- 308- GULYASSY,P.F. (1968). *J. Clin.Invest.* 47:2458-2468.
- 309- GULZOW,M. *Klin wochschr.* 27:285 (1949).
- 310- GUTKNECHT,G.D., CORNETTE,J.C., PHARRISS,B.B. (1969). *Biol. Reprod.* 1:367-371.
- 311- GUSTAFSSON,L., HEDQUIST,P. FREDHOLM,B.B.,LUNDGREN,G. (1978). *Acta - Physiol.Scand.* 104:469-478.

- 312- HADDOX, M.K., STEPHENSON, J.M., GOLDBERG, N.D. (1974). *Fed. Proc.* 33(1): 522.
- 313- HAESSLER, H.A., CRAWFORD, J.D. (1965). *Science N.Y.* 154:909-910.
- 314- HAGA, T., HAGA, K., GILMAN, A.G. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:5776-5782.
- 315- HAIGLER, H.J., AGHAJANIAN, G.K. (1974): *J. Neural. trans.* 35:257-273.
- 316- HAIGLER, H.J., AGHAJANIAN, G.K., (1977): *Fed. Proc.* 36:2159-2164.
- 317- HAMBERG, M., FREDHOLM, B.B. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 431:189.
- 318- HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSSON, B. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:2994-2998.
- 319- HAMBERG, M., SVENSSON, J., WAKABAYASHI, T., SAMUELSSON, B. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:345-349.
- 320- HAMMARSTROM, S., FALARDEAU, P. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3691.
- 321- HARDMAN, I.G., DAVIS, J.W., SUTHERLAND, E.W. (1966). *J. Biol. Chem.* 241: 4812.
- 322- HARDMAN, J.G., DAVIS, J.W., SUTHERLAND, E.W. (1969). *The J. Biol. Chem.* - 244:6354-62.
- 323- HARDMAN, J.G., ROBINSON, G.A., SUTHERLAND, E.W. (1971). *Ann. Rev. Physiol.* 33:311-336.
- 324- ———, SUTHERLAND, E.W. (1969). *The J. Biol. Chem.* 244:6363-70.
- 325- HARMS, H.H., ZAAGSMA, J., DE VENTE, J. (1977). *Life Sci.* 21:123-128.
- 326- HARPER, J.F., BROOKER, G. (1975). *J. Cyclic Nucleotide Res.* 1:207-218.
- 327- HARWOOD, J.P., LOW, H., RODBELL, M. (1973). *J. Biol. Chem.* 248:6239-6245.
- 328- HASLAM, R.J., ROSSON, G.M. (1975). *Mol. Pharmacol.* 11:528-544.
- 329- HAYASHI, M., KUNIMOTO, M., MORI, M., SHINOZUKA, K., YAMADA, S., (1978). *Br. J. Pharmacol* 63:457-464.
- 330- HAYASHI, E., YAMADA, S., MORI, M. (1977). *Jap. J. Pharmacol* 27:659-665.
- 331- HAZELHOF, E., NUGTEREN, D.H., VAN DORP, D.A. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 450:450
- 332- HECHTER, O., BARR, H.P., MATSUBA, M., SOIFER, D. (1969). *Life Sci.* 8 part I 935-942.
- 333- HEDQUIST, P., FREDHOLM, B.B. (1976): *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 293:217-223.

- 334- HEGSTRAND, L.R., KANOFF, P.D., GREENGARD, P. (1976). *Nature* 260:163-165.
- 335- HEMLER, M., LANDS, W.E.M., SMITH, W.L. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:5575.
- 336- HEIZOG, J.P., JOHNSTON, H.H., LAULER, D.P. (1968). Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation for Exp. Biol. Eds. P.W. RAMWELL and J.E. SHAW. N.Y. Interscience: 147-161.
- 337- HEWLETT, E., WOLFF, J. (1976). *J. Bacteriol.* 127:890-898
- 338- HIDAKA, H., ASANO, T. (1976). *Biochem. Biophys. Acta* 429:485-497.
- 339- ———, YAMAKI, T., YAMABE, H. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 187: 315-321.
- 340- HIGGINS, W.J. (1974). *J. Exp. Zool.* 190:99-110.
- 341- HIGGINS, C.B., BRAUNWALD, E. (1972). *Amer. J. Med. Vol.* 53:92-112.
- 342- ———, VATNER, S.F., FRANKLIN, D., BRAUNWALD, E. (1970). *Pharmacologist* 12:267.
- 343- HIMORI, N., TAIRA, N. (1978). *Br. J. Pharmacol.* 64:553-558.
- 344- HINMAN, J.W. (1972). *Ann. Rev. Bioch.* 161-173.
- 345- HIRATA, M., HAYASHI, O. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21:361-65.
- 346- HJELMQUIST, G., ANDERSSON, J., EDLUND, B., ENGSTROM, L., (1974). *Biochem. - Biophys. Res. Commun.* 61:559-563.
- 347- HJENDAHL, P., SOLLEVI, A. (1978). *Acta Physiol. Scand.* 103:270-274.
- 348- HO, H.C., DESAI, R., WANG, J.H. (1975). *Febs. Letters.* 50:374-377.
- 349- ———, TEO, T.S., DESAI, R., WANG, J.H. (1976). *Biochim. Biophys. Acta-* 429:461-473.
- 350- ———, WIRCH, E., STEVENS, F.C., WANG, J.H. (1977). *J. Biol. Chem.* 252: 43-50.
- 351- HOFMANN, F., BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J., KREBS, E.G. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:7795-7801.
- 352- HOLMES, S.H., HORTON, E.W. (1950). Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation of Exp. Biol. Eds. P.W. RAMWELL and J.E. SHAW. N.Y. Interscience: 21.
- 353- ———, ———. (1967). *J. Physiol. (Lond)* 191:134.
- 354- HONEYMAN, T., GOODMAN, H.M. (1971). *Fed. Proc.* 30:435 (Abstr.)

- 355- HONEYMAN, T., MERRIAM, P., FAY, F.S. (1978). *Mol. Pharmacol.* 14:86-98.
- 356- HORTON, E.W. (1963). *Nature (Lond.)* 200:892-893.
- 357- ———, (1965). *Experientia* 21:113-118.
- 358- ———, (1969). *Physiol. Rev.* 49:122.
- 359- ———, (1972). *Prostaglandins*. Springer-Verlag Berlin.
- 360- ———, MAIN, I.H.M. (1963). *Brit. J. Pharmacol.* 21:182-189.
- 361- ———, ———, (1965). *Brit. J. Pharmacol.* 24:470-476.
- 362- ———, ———, (1965). *J. Physiol. (Lond.)* 179:18
- 363- ———, ———, (1966). *J. Physiol. (Lond.)* 185:36.
- 364- ———, ———, (1966). *Mem. Soc. Endcr.* 14:29.
- 365- ———, ———, (1967). *Brit. J. Pharmacol.* 30:568.
- 366- ———, ———, THOMPSON, C.J., WRIGHT, P.M. (1968). *Gut.* -
9:655-658.
- 367- HUANG, M., DRUMMOND, G. (1976). *Biochem. Pharmacol.* 25:2713-2719.
- 368- IGNARRO, L.J., GROSS, R. (1978). *Biochim Biophys. Acta.* 541:170-180.
- 369- ILIEN, B., STIERLE, A., LUGNIER, C., STOCLET, J.C., LANDRY, Y. (1978).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83:486-492.
- 370- ILLIANO, G., TELL, G.P.E., SIEGEL, M.I., CUATRECASAS, P. (1973). *Proc.*
Nat. Acad. Sci. USA. 70:2443-2447.
- 371- INSEL, P.A., MAGUIRE, M.E., GILMAN, A.G., COFFINO, P., BOURNE, M., NELMON,
K. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12:1062-1069.
- 372- IRIE, Y., IGAWA, T., HOSOKAWA, SAITOH, Y. (1979). *Eur. J. Pharmacol.* 53: -
351-358.
- 373- ISHIKAWA, E., ISHIKAWA, S., DAVIS, J.W., SUTHERLAND, E.W. (1969). *The J.*
Biol. Chem. 244:6371-76.
- 374- IVERSEN, L.L. (1975). *Science* 188:1084-1089.
- 375- JACOBS, S., CUATRECASAS, P. (1976). *Biochim. Biophys. Acta.* 433:482-95.
- 376- JACOBSON, E.D. (1970). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133:516-519.
- 377- JAKOBS, K.H. (1978). *Ent: Molecular Biology and pharmacology of cyclic*
nucleotides (Ed. FOLCO, G., PAOLETTI, R.) p.p. 265-277. Elsevier/North-
Holland Biomedical Press. (Amsterdam, N.YORK).
- 378- JARD, S., BERNARD, M. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:781.

- 379- JARD,S., GUILLOM,G., ROY,CH. (1978). En: Molecular Biology and Pharmacology of cyclic nucleotides (Ed.FULCOG, PAOLETTI,R.) ELSEVIER/ NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS (AMSTERDAM-N.Y.) 17-31.
- 380- JARRET,H.W., PENNISTON,S.T. (1977). Biochem. Biophys.Res.Comm. 77:1210.
- 381- JOHANSSON,S ANDERSSON R.G.G.(1975)Experientia, 31: 1314-1315
- 382- JOHNSON,C.L., MIZOGUCHI,H. (1977). J. Pharmacol Exp.Ther. 200:174-86
- 383- JOHNSON,R.A., MORTON, D.R., KINNER,J.H., GORMAN,R.R., Mc.GUIRE., J.C. SUN,F.F. (1976). Prostaglandins 12 (6):915.
- 384- JOHNSON,R.A., SUTHERLAND,E.W. (1973). J. Biol. Chem. 248:5114-5121.
- 385- JOHNSTON,J.O., HUNTER,K.K., (1970). Physiologist 13:235.
- 386- JOHNSTON, STRIKE,T.A., (1962). Acta Haemat. Basel, 28:3.
- 387- JONES,H.P., BRADFORD,M.M., Mc.RORIE,R.A., CORNIER,M.J. (1978). Biochem. Biophys.Res. Commun. 82:1264-1272.
- 388- JONES,H.P., MATTHEWS,J.C., CORMIER,M.J. (1979).Biochemistry 18:55-60
- 389- JURADO GRAU(1962). VIII Jornadas Angiológicas.Sevilla.
- 390- KAKIUCHI,S., YAMAZAKI,R., NAKAJIMA,H. (1970). Proc. Jap. Acad. 46: - 587-592.
- 391- _____, _____, TESHIMA,Y. (1971). Biochem.Biophys. Res. - Commun. 42:968-974.
- 392- _____, _____, UENISHI,K. (1973). Proc. Natl.- Acad. Sci. USA. 70:3526-3530.
- 393- _____, _____, _____, _____, MIYAMOTO,E. (1975) Adv. Cyclic.Nucleotide.Res. 5:163-178.
- 394- _____, _____, _____, _____, _____, (1975). Biochem.J. 146:109-120.
- 395- KALEY,G., WEINER,R. (1968).Prostaglandins Symposium of the Worcester Foundation for Exp.Biol.Eds. P.W. Ramwell and J. E. Shaw N.Y. Interscience:321-328.
- 396- KANEKO,T., ZOR,U., FIELD,J.B., (1969). Science 163:1062.
- 397- KAPOOR,C.L., KRISHNA,G. (1978) Biochim.Biophys.Acta 544:102-112.
- 398- KARIM,S.M.M. (1969). En: "Prostaglandines,Peptides and amines". (Man- tegazza,P., HORTON,E.W. eds.) Lond./N.Y. Acad. Press. Inc:65

- 399- KARIM, S.M.M., DEVLIN, J. (1967). *J. Obstet. Gynec. Brit. Commonw.* 74:200.
- 400- KATACKA, K., RAMWELL, P.W., JESSUP, S. (1967). *Science* 157:1187.
- 401- KATSUKI, S., MURAD, F. (1977). *Mol. Pharmacol.* 13:330-341.
- 402- KAYAALF, S.O., TURKER, R.K.. (1967). *Eur. J. Pharmacol.* 2:175-180.
- 403- T.KAZIC and D. MILOSAVJEVIC. (1976). *Arch. Int. Pharmacodyn* 223, 187-195.
- 404- KEBABIAN, J.W., CALNE, D.B. (1979). *Nature* 277:93-96.
- 405- KEBABIAN, J.W., PETZOLD, G.L., GREENGARD, P. (1972). *Proc. Natl. - Acad. Sci. USA.* 69:2145-2149.
- 406- KEBABIAN, J.W., SAAVEDRA, J.M. (1976). *Science* 193:683-685.
- 407- KEELY, S.L., CORBIN, J.D., LINCOLN, T. (1977). *Mol. Pharmacol* 13: 965-975.
- 408- KELLY, S.J., DARDINGER, D.E., BUTLER, L.G. (1975). *Biochemistry.* - 14:4983-4988.
- 409- KEELY, S.L., LINCOLN, T.M. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 543:251-57
- 410- KHAN DEL WAL, R.L., HAMILTON, J.A. (1971). *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 411- KIMURA, H., MURAND, F. (1974). *J. Biol. Chem.* 249:6910-6916.
- 412- KIMURA, H., MURAD, F. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:4810-4817.
- 413- ———, ———, (1975). *Metabolism* 24:439-445.
- 414- ———, ———, (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:1965-69.
- 415- ———, ———, (1976). *Life Sci.* 17:837-844.
- 416- KIRTON, K.T., PHARRISS, B.B., FORBES, A.D. (1970). *Proc. Soc. Exp. — Biol. Med.* 133:314.
- 417- KIRTON, K.T., PHARRISS, B.B., FORBES, A.D. (1970). *Biol. Reprod.* 3: 163-168.
- 418- KITABGI, P., FREYCHET, P. (1979). *Eur. J. Pharmacol.* 55:35-42.
- 419- KLAINER, L.M., CHI, Y.M., FRIEDBERG, S.L., RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W. (1962). *J. Biol. Chem.* 237:1239-1243.
- 420- KLEE, C.B. (1977). *Biochemistry* 16:1017-1024.

- 421- KLEE,C.B., KINKS,M.H. (1978). *Biochemistry* 17:120-126.
- 422- KLOEZE,J. (1967). Nobel Symposium 2, Prostaglandins. Eds. S. BERGSTROM and B. SAMUELSSON. Stockholm:Almqvist and Wiksell:241-252.
- 423- KLOTZ,U., STOCK,K. (1972). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* — 274:54-62.
- 424- KNIGHT,B.L., FORDHAM,R.A. (1975). *Biochem.Biophys.Acta* 384:102-111
- 425- KOBAYASHI,R., FANG,V.S. (1976). *Biochem. BiophysRes.Comm.* 69:1080-1087.
- 426- KOTTEGODA,S.R. (1969) *J. Physiol. (Lond.)* 200:687-712.
- 427- KRASKA,R.C., YU,D.H., GOLDBERG,N.D. (1974). *Pharmacologist* 16:310.
- 428- KREBS,E.G. (1972). *Curr.Top.Cell.Regul.* 5:99-133.
- 429- KRISHNA,G., HARWOOD,J.P., BARBER,A.J., JAMIESON,G.A. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:2253-2254.
- 430- KROEGER,E.A., MARSHALL,J.M. (1974). *Am.J. Physiol.* 226:1298-1303.
- 431- KRONTIL,M., KLABUSAY. (1961). *Acta Univ. Paekiana Olomucensis* 23-145
- 432- KRUEGER,B.K., FORN,J., WALTERS,J.R., ROTH,R.H., GREENGARD,P. (1976).- *Mol.Pharmacol.* 12:639-648.
- 433- KUEHL,F.A., HUMES,J.L., TARNOFF,J., CIRILLO,V.J., HAM,E.A. (1970) — *Science* 169:883.
- 434- KUMON,A., NISHIYAMA,K., YAMAMURA,M., NISHIZUKA,Y. (1972.) *J. Biol. - Chem.* 247:3726-3735.
- 435- KUO,J.F. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 71:4037-4041.
- 436- KUO,J.F. (1975). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 72:2256-2259.
- 437- ——— (1975). *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 65:1214-1220.
- 438- ———, BRACKETT,N.L., SHOJI,M., TSE,J. (1978).*J. Biol.Chem.* 253: 2518-2521.
- 439- ———, DAVIS,C.W., TSE,J. (1976). *Nature* 261:335-336.
- 440- ———, and GREENGARD,P. (1969). *Proc. Nat.Acad.Sci.USA.* 64:1349-55
- 441- GREENGARD,P., KOU,J.F. (1970). *The J. Biol.Chem.* 245:4067-73.
- 442- KUO,J.F., GREENGARD,P. (1970). *J.Biol.Chem.* 245:2493-2498.
- 443- KUO,W.N., KUO,J.F. (1976). *J.Biol.Chem.* 251:4283-4286.

- 444- KUO, J.F., KUO, W.N., SHOJI, M. (1976). *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 15:379-389.
- 445- KUO, J.F., KUO, W.N., SHOJI, M., DAVIS, C.W., SEERY, J.C., DONNELLY, T.E. Jr. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:1759-1766.
- 446- KUO, J.F., PATRIC, J.G., SEERY, V.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:996-1002.
- 447- KUO, W.N., SHOJI, M., KUO, J.F., (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 437: 142-139.
- 448- KUO, J.F., SHOJI, M., KUO, W.N., (1978). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18:341-355.
- 449- KURZROK, R., LIEB, C. (1930). *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* 28:268-272.
- 450- LABRIER, F., LEMAIRE, S., COURTE, C., (1971). *J. Biol. Chem.* 246: -- 7293-7302.
- 451- LABURTHE, M., ROSSELIN, G., ROUSSET, M., ZWEI BAUM, A., KORNER, M., SELINGER, Z., SCHRAMM, M. (1979). *Febs. Letters.* 98:41-43.
- 452- LANDS, A.M., ARNOLD, A., McAULIFE, J.P., LUDUENA, F.P., BROWN, T.G. Jr. (1967). *Nature* 214:597-598.
- 453- LANDT, M., BUTLER, L.G. (1978). *Biochemistry* 17:4130-4135.
- 454- LANGAN, T.A., (1973). *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 3:99-153.
- 455- LANGER, S.Z. (1977). *Br. J. Pharmac.* 60:481-487.
- 456- LA RAIA, P.J., MORKIN, E. (1974). *Circ. Res.* 35:298.
- 457- LARGE, B.J., LESWELL, P.F., MAXWELL, D.R. (1969). *Nature (Lond.)*. -- 224:78-80.
- 458- LEE, C.Y., (1970). In: "Smooth Muscle" (Ed. BULBRING, E., BRADING, A.F., JONES, A.W., TOMITA, T.). p,p, 549-557. Edward Arnold Pub. (London)
- 459- LEE, J.B., (1969). *Ann. Int. Med.* 70:1033-1038.
- 460- ———, COVINO, B.G., TAKMAN, B.H., SMITH, E.R. (1965). *Circ. Res.* -- 17:57.
- 461- ———, CROWSHAW, K., TAKMAN, B.H., ATTREP, K.A., GOUGOUTAS, J.Z. -- (1967). *Biochem. J.* 105:1251.
- 462- LEE, T.P., KUO, J.F., GREENGARD, P. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* -- 69:3287-91.
- 463- LEVEY, G.S. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38:86-92.

- 464- LEVEY, G.S. (1971). *J. Biol. Chem.* 246:7405-7407.
- 465- LEVEY, G.S., KLEIN, I. (1972). *J. Clin. Invest.* 51:1578-1582.
- 466- LIANG, C.T., SACKTOR, B. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 466:474-487.
- 467- LIANG, C.T., TAKENAWA, T., SACKTOR, B. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:1440-1445.
- 468- LIAO, S., LIN, A.H., TYMOCZKO, J.L. (1971). *Biochem. Biophys. Acta* 230:535-538.
- 469- LIBET, B., KOBAYASHI, H., TANAKA, T. (1975). *Nature* 258:155-157.
- 470- LIMBIRD, L.E., LEFKOWITZ, R.J. (1975). *Biochem. Biophys. Acta* 377:186-196.
- 471- LIMBIRD, L.E., LEFKOWITZ, R.J. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:799-802.
- 472- LIN, Y.M., LIU, Y.P., CHEUNG, W.Y. (1974). *J. Biol. Chem.* 249:4943-4954.
- 473- LIN, Y.M., LIU, Y.P., CHEUNG, W.Y. (1975). *FEBS Letters* 49:356-60.
- 474- LINCOLN, T.M., CORBIN, J.D. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3239-3243.
- 475- LINCOLN, T.M., DILLS, W.L., Jr., CORBIN, J.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:4269-4275.
- 476- ———, FLOCKHART, D.A., CORBIN, J.D. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:6002-6009.
- 477- ———, HALL, C.L., PARK, C.R., CORBIN, J.D. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2259-2563.
- 478- LINDL, T., CHAPMAN, G. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:1273-1282.
- 479- LIPKIN, D., COOK, W.H., MARKHAM, R. (1959). *J. Am. Chem. Soc.* 81:6198.
- 480- LIU, Y.P., CHEUNG, W.Y. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:4193-4198.
- 481- LONDOS, C., COOPER, D.M.F., SCHLEGEL, W., RODBELL, M. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5362-5366.
- 482- LONDOS, C., SALOMON, Y., LIN, M.C., HARWOOD, J.P., SCHRAMM, M., WOLFE, J., RODBELL, M. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3087-3090.
- 483- LONDOS, C., WOLFF, J. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5482-86.
- 484- LOPATIN, R.N., GARDNER, J.D. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 543:465-475.

- 485- LOTEN, E.G. (1978). *J. Biol.Chem.* 253:746-757.
- 486- LYMAN, C.L. (1949). *Texas Agr. Expt. Sta. Bull.* 70:5-30.
- 487- MACCHIA, V., VARRONE, S., WEISSBACH, H., MILLER, D.L., PASTAN, I. (1975) *J. Biol.Chem.* 250:6214-6217.
- 488- MAC.DONALD, I. (1975). *Biochem. Biophys.Acta.* 397:244-253.
- 489- S.G. MACKENZIE, R.FREW., H.P. BARR. (1977). *European J. of Pharmacology* 41:183-
- 490- MAC LEOD, R.M., LEHMEYER, J.E. (1970). *Clin. Res.* 18:366.
- 491- MAGUIRE, M.E., STURGILL, T.W., ANDERSON, H.S., MINNA, J.D., GILMAN, A.G. (1975) *Adv.Cyclic. Nucleotide Res.* 5:699-718.
- 492- MAIN, I.H.M. (1964). *Brit.J. Pharmacol.* 22:511-519.
- 493- MALTA, E., Mc.PHERSON, G.A., RAPER, C. (1979). *Br.J. Pharmacol.* 65: -- 249-256.
- 494- MANGANIELLO, V., VAUGHAN, M. (1972). *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* 69: -- 269-273.
- 495- MARCUS, R. (1975). *Endocrinology* 96:400-408.
- 496- MARKS, F., RAAB, I. (1974). *Biochim. Biophys.Acta* 249:7764.
- 497- MARSH, J.M., (1970). *Febs. Lett.* 7:283-286.
- 498- MARTORELL, F. (1958). *Arch.Int. Pharmacol.* 77:327.
- 499- MASCITELLI, CORIANDOLI y CITERIO. (1959). *The J. of Pharmacol.* 767.
- 500- MATHE, A.A., ASTROM, A., PERSSON, N.A. (1971). *J. Pharmac. Exp.Ther.* - 23:905-910.
- 501- MATSUZAWA, H., NIREMBERG, M., (1975). *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* 72:- 3472-3476.
- 502- McDOUGAL, M.R., BOROWITZ, J.L. (1972). *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* 195: 177-184.
- 503- McGIFF, J.C., CROWSHAW, K.J., TERRAGNO, N.A., LONIGRO, A.J., STRAND, J.C. WILLIAMSON, M.A., LEE, J.B., NG K.K.F. (1970). *Circ.Res.* 27:765.
- 504- McILWAIN, H. (1974). En: "Central Nervous System". (Ed:GENAZZANI, E., HOIKEN, H.) p.3. Springer-Verlag (Berlin).
- 505- McKELVEY, J.F. (1975). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 65:54-62.

- 506- McNEILL, J.H., MUSCHEK, L.D. (1972). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 4:611-624.
- 507- —————, VERMA, S.C. (1974). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188:180-188.
- 508- MEANO, H., REYES, P.L., VEDA, T., RUDOLPH, S.A., GREENGARD, P. (1974). *Arc. Biochem. Biophys.* 164:551-559.
- 509- MENON, K.M.J., SMITH, M. (1971). *Biochemistry* 10:1186-1190.
- 510- MICHAL, F. (1969). *Nature* 221:1253-1254.
- 511- MIKI, N., BARABAN, J.M., KEIRNS, J.J., BOYCE, J.J., BITENSKY, M.W. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:6320-27.
- 512- MINNEMAN, K.P. (1977). *Br. J. Pharmacol.* 59:480p-481p (Abstr.).
- 513- MISIEWICZ, J.J., WALLER, S.L., KILEY, N., HORTON, E.W. *Lancet* 1:648-651. (1969).
- 514- MIYAMOTO, E., KUO, J.F., GREENGARD, P. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: — 6395-6402.
- 515- MIYAMOTO, T., OGINO, N., YAMAMOTO, S. HAYAISHI, O. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:2629.
- 516- —————, YAMAMOTO, S., HAYAISHI, O. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3645.
- 517- MIYAZAKI, E., ISHIZAWA, M., SUNANO, B., SAKAGAMI, T. (1967). *Nobel Symposium 2, Prostaglandins*. Eds: S. BERGSTROM and B. SAMUELSSON. Stockholm: Almqvist and Wiksell: 277-281.
- 518- MOHINDRU, A., CHENET, A., RHOADS, A.R. (1978). *Biochemistry*, 17:3297-3304
- 519- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S., VANE, J.R. (1976). *Nature* 263:663
- 520- MONN, E., CHRISTIANSEN, R.O. (1971). *Science* 173:540-542.
- 521- MONNERON, A., D'ALAYER, J. (1978). *Febs. Letters* 90:157-161.
- 522- MORISHIMA, J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 370:227-241.
- 523- MORISHIMA, I. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 391:75-83.
- 524- MORISHIMA, I. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 403:106-112.
- 525- MOSS, J., MANGANELLO, V.C., VAUGHAN, M. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:5211-15
- 526- MOSS, J., MANGANELLO, V.C., VAUGHAN, M. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* — 541:279-287.
- 527- MUKHOPADHYAY, A.K., WEISBRODT, N. (1977). *Am. J. Physiol.* 232(1):E19-E24.
- 528- MURAD, F. (1976). *En: Cyclic Nucleotids and the regulations of cell growth* (Ed. ABOV-SABE, M. DOWDEN, HUTCHINSON and ROSS, Inc.) STROUNSBURG. 191-206

- 529- MURAD, F., AURBACH, G.D. (1977). En: "The year in metabolism" 1976-1977. (Ed. FREINKEL, N.) p.p. 1-32 PLENUM PU.CORP. (N.Y.)
- 530- MURAD, F., CHI, Y.M., RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W. (1962). J. Biol. Chem. 237:1233-1238.
- 531- ———, KIMURA, H. (1974). Biochim. Biophys. Acta 343:275-286.
- 532- ———, ———, MITTAL, C.K., ARNOLD, W.P. (1977). Proc. of the V Int. Congress of Endocrinology, Hamburg (1976) Excerpta Medica - (1977).
- 533- MURPHY, B.E., STONE, J.E. (1978). Pharmacologist 20:232.
- 534- NAIR, K.G. (1966). Biochemistry 5:150-157.
- 535- NAKAHARA, T., TERADA, S., PINCUS, J., FLOURET, G., HECHTER, O. (1978). - J. Biol. Chem. 253:3211-3218.
- 536- NAKANO, J. (1960). Prostaglandin Symposium of Worcester Foundation for Exp. Biol. Eds. P.W. RAMWELL and J.E. SHAW. N.Y. Interscience: 201
- 537- ———. (1968). Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 128:39.
- 538- ———, McCURDY, J.R. (1967). Clin. Res. 15:409.
- 539- ———, ———, (1967). J. Pharmacol. Exp. Ther. 156:538-547.
- 540- NAKAZAWA, K., SANO, M. (1974). J. Biol. Chem. 249:4207-4211.
- 541- ———, ———. (1975). J. Biol. Chem. 250:7415-7419.
- 542- NAMM, D.H., LEADER, J.P. (1976). Blood Vessels. 13:24-47.
- 543- NARAYANAN, N., SULAKHE, P.V. (1978). Arch. Biochem. Biophys. 185:72-81.
- 544- NATHANSON, J.A. (1977). Physiol. Rev. 57:157-256.
- 545- ———, GLASER, G.H. (1979). Nature 278:567-569.
- 546- NATHANSON, N.M., KLEIN, W.L., NIREMBERG, M. (1978). Proc. Natl. Acad. - Sci. USA 75:1788-1791.
- 547- NEEDLEMAN, P., MONDADA, S., BUNTING, S., VANE, J.R., HANBERG, M., SAMUELSSON, B. (1976). Nature 261:558.
- 548- NEER, E.J. (1973). J. Biol. Chem. 248:3742-3744.
- 549- ———, (1974). J. Biol. Chem. 249:6527-6531.
- 550- ———, (1976). J. Biol. Chem. 251:5831-5834.
- 551- ———, (1976). J. Supramol. Struct. 4:51-61.
- 552- ———, (1978). J. Biol. Chem. 253:5808-5812.
- 553- ———, SUKLENNIK, E.A., (1975). J. Biol. Chem. 250:7905-7909.

- 554- NESTLER, E.J., BEAM, K.G., GREENGARD, P. (1978). *Nature* 275:451-453.
- 555- NIMMO, H.G., COHEN, P. (1977). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 8:145-266.
- 556- NISHIYAMA, K., KATAKAMI, H., YAMAMURA, H., TAKEI, Y., SHIMOMURA, R., — NISHIZUKA, Y. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:1297-1300.
- 557- NUGTEREN, D.H., HAZELHOF, E. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 326:448.
- 558- NUGTEREN, D.H., VONKEMAN, H., VAN DORP, D.A. (1967). *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.* 86:1237-1245.
- 559- OGINO, N., MYAMOTO, T., YAHAMOTO, S., HAYAIISHI, O. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:890.
- 560- ONAYA, T., SOLOMON, D.H. (1970). *Endocrinology* 86:423-426.
- 561- ORLOFF, J., GRANTHAM, J. (1967). *Nobel Symposium 2, Prostaglandins.* — Eds: S. Bergström and B. Samuelsson. Stockholm: Almqvist and Wiksell. 143-146.
- 562- ORLY, J., SCHRAMM, M. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:4410-4414.
- 563- PALACIOS, J.M., GARBARG, M., BARBIN, G., SCHWARTZ, J.C. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14:971-982.
- 564- PAMO, J.M. (1969). *Facultad de Medicina de Salamanca.* (v.ref. 17 cap. 2)
- 565- PATON, W.D.M., ZAR, A.M. (1968). *J. Physiol.* 194: 13-34.
- 566- PATTERSON, W.D., HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W. (1975). *Biochim. — Biophys. acta* 384:159.
- 567- PATTERSON, W.D., HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W. (1976). *Mol. Cell. — Endocrinol.* 5:51-66,
- 568- PENDLETON, R.G., SETLER, P.E. (1977). *Gen. Pharmacol.* 8:1-5.
- 569- PERT, C.B., SNYDER, S.H. (1973). *Science* 179:1011-1014.
- 570- PERKINS, J.P. (1973). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 3:1-64.
- 571- PERRIER, C.V., LASTER, L. (1970). *J. Clin. Invest.* 49:73.
- 572- PETERKOFKY, A. (1976). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 7:1-48.
- 573- PHARISS, B.B., WYNGARDEN, L.J. (1968). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130:92
- 574- PHARISS, B.B. (1970) *Perspect. Biol. Med.* 13:434-444.
- 575- PICHARD, A.L., CHEUNG, W.Y., (1976). *J. Biol. Chem.* 251:5726-5737.
- 576- —————, KAPLAN, J.C. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 64:342.

- 577- PICHARD, A.L., KAPLAN, J.C. (1978). En: "Molecular Biology and Pharmacology of cyclic Nucleotides". (Ed. FOLCO, G., PAOLETTI, R.) p.p.-85-87: ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS (AMSTERDAM, N.Y.)
- 578- _____, HANOUNE, J., KAPLAN, J.C. (1973). *Biochim. Biophys. acta* 315:370-377.
- 579- PICKLES, V.R. (1967). *Nature (Lond.)* 180:1198.
- 580- _____ (1967). *Int. J. Fertil.* 12:335.
- 581- _____, HALL, W.J. (1963). *J. Reprod. Fertil.* 6:315.
- 582- PILASKI, M., VOIGT, K.D., WALTER, W. (1979). *Biochimica et Biophysica acta* 582:380-389.
- 583- PLEDGER, W.J., STANCEL, G.M., THOMPSON, W.J., STRADA, S.J. (1974). -- *Biochim. Biophys. Acta* 370:242-248.
- 584- PLEDGER, W.J., THOMPSON, W.J., STRADA, S.J. (1975). *Biochim. Biophys. - Acta* 391:334-340.
- 585- POCH, G., KUKOVEITZ, W.R., SCHOLZ, N. (1973). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 280:223-228.
- 586- PODESTA, E.J., DUFAU, M.L., CATT, K.J. (1978). *Biochemistry* 17:1566-73.
- 587- POHL, S.L. (1969). *Science* 164:566-567.
- 588- _____, KRANS, H.M.J., KOZYREFF, B., BIRNBAUHER, L., ROBBELL, M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246:4447-4454.
- 589- POSTERNAK, T. (1974). *Ann. Rev. of Pharmacology.* 14:23-33.
- 590- PLIEGO, S.A., RUBALLAVA, B. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:609-615.
- 591- POLET, H., LEVINE, L. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:351.
- 592- POLET, H., LEVINE, L. (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* 168:96.
- 593- PREMONT, R., PEREZ, M., BOCKAERT, J. (1977). *Mol. Pharmacol.* 13:662-670
- 594- PRICE, T.D., ASIMAN, D.F., MELLICOW, M.M. (1967). *Biochem. Biophys. Acta.* 138:452.
- 595- FUJOL, J.M. 28 Congreso Internacional de Quimica Industrial.
- 596- PURI, S.K., COCHIN, J., VOLICER, L., (1975). *Life Sci.* 16:759-768.
- 597- QUEENER, S.F., FLEMING, J.W., BELL, N.H. (1975). *J. Biol. Chem.* 250: - 7586-7592.
- 598- RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W., BERTHET, J. (1957). *J. Biol. Chem.* 224:463.
- 599- _____, _____, (1958). *J. Biol. Chem.* 232:1065-1091.
- 600- _____, _____, (1962). *J. Biol. Chem.* 237:1228-1232.

- 601- RAMWELL, R.W., SHAW, J.E. (1966). *Amer. J. Physiol.* 211:125.
- 602- _____, _____. (1967). Prostaglandins, Proceedings of the 2 Nobel Symposium. Stockholm Almqvist and Wiksell. Eds: S.Bergström and B. Samuelsson. Interscience: 283.
- 603- _____, _____, JESSUP, R. (1966). *Amer. J. Physiol.* 211:998.
- 604- _____, _____, KUCHARSKI, J. (1965). *Science* 148:1390.
- 605- RATHERY, F., COSMULESCO, I.C.E., GRIGNON. (1934). *La Presse Médicale* 47.
- 606- RATTAN, S., GOYAL, R.K. (1976). *Gastroenterology* 70:377-381.
- 607- RAY, T.R., FORTE, J.C. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:1199-1206.
- 608- RAZ, A., SCHWARTZMAN, M., KENIGWAKSHAL, R. (1976). *Eur. J. Biochem.* — 70:89.
- 609- RENDELL, M., SALOMON, Y., LIN, M.C., RODBELL, M., BERMAN, M. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:4253-4260.
- 610- REIMANN, E.M., RAPINO, N.G. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 350:201-214.
- 611- REIN, MARTENS, y BUCHRL. (1941). *Naturwissenschaften.* 36-233.
- 612- REIN, (1951). *Plüg. Arch. Ges. Physiol.* 253-435.
- 613- REINMAN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G. (1971). *J. Biol. Chem.* 246: — 1986-1995.
- 614- RICHELSON, E. (1978). *Nature*, 272:366-368.
- 615- RICHELSON, E. (1978). *Nature* 274:176-177.
- 616- RICKENBERG, H.V. (1974). *Ann. Rev. Microbiol.* 28:353-369.
- 617- ROBERT, A. (1968). Prostaglandin Symposium of Worcester Foundation - for Exp. Biol. Eds.: P.W. Ramwell and J.E. Shaw. N.Y. Interscience 47
- 618- _____, NEZAMIS, J.E., PHILLIPS, J.P. (1967). *Amer. J. dig. Dis.* 12: 1073-1076.
- 619- _____, _____, _____, (1968). *Gastroenterology* 55: 481-487.
- 620- ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W. (1968). *Ann. Rev. Biochem.* 37:149-174.

- 621- ROBINSON,G.A., BUTCHER,R.W., SUTHERLAND,E.W. (1971). "Cyclic AMP". Academic Press. (New York).
- 622- ROCHA e SILVA,M., VALLE,J.R., PICARELLI,Z.P. (1953): Br. J. Pharmac. Chemother 8:378-388.
- 623- RODAN,G.A., FEINSTEIN, M.B. (1976). Proc. Natl. Acad.Sci. USA 73: - 1829-1833.
- 624- RODNIGHT,R., WELLER,M. (1972). En: Effects of drugs on cellular control Mechanisms. (Ed. RABIN,B.R., FREEDMAN,R.B.) p.p.175-192 MAC MILLAN PRESS (LONDON).
- 625- RODBELL,M. (1978). En: Molecular Biology and Pharmacology of cyclic-Nucleotides. (Ed.:FOLCO,G., PAOLETTI,R.) p.p.1-12-ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS (AMSTERDAM,N.Y.)
- 626- RODBELL,M., BIRNBAUMER,L., POHL,S.L. KRANS,H.M.J. (1971). J. Biol. - Chem. 246:1877-1882.
- 627- RODBELL,M., KRANS,H.M.J., POHL,S.L., BIRNBAUMER,L. (1971). J. Biol.- Chem. 246:1861-1871.
- 628- _____, _____, _____, _____. (1971). J. Biol.- Chem. 246:1872-1876.
- 629- _____, LIN,M.C., SALOMON,Y., LONDOS,C., HARWOOD,J.P., MARTIN,B.R. RENDELL,M., BERMAN,M. (1975). Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5:3-30.
- 630- ROSEN,O.M. (1970). Arch. Biochem. Biophys. 137:435-441.
- 631- ROSEN,O.M., ERLICHMAN,J. (1975). J. Biol. Chem. 250:7786-7794.
- 632- _____, ROSEN,S.M. (1969). Arch. Biochem. Biophys. 131:449-456.
- 633- ROTH-BRANDEL,U., BYGDAMAN,M., WIQVIST,N., BERGSTROM,S. (1970) Lancet 1, 190-191.
- 634- ROWE,G.C. et al. Amer. Heart J. 65:656-663. (1963)
- 635- RUBIN,C.S., ERLICHMAN,J., ROSEN,O.M. (1972). J. Biol.Chem.247:36-44.
- 636- RUBIN,CH.S., ROSEN,O.M. (1975). Ann.Rev.Biochem.44:831-887.
- 637- RUDICK,J., CONDA,M., JANOWITZ,H.D. (1970). Fedn.Proc.Amer.Soc.Exp. - Biol.29:445 Abs.
- 638- RUDOLPH,S.A., GREENGARD,P. (1974). J. Biol.Chem. 249:5684.
- 639- RUSSEL,T.R., PASTAN,I. (1974). J.Biol. Chem. 249:7764.
- 640- RUSELL,T.R., TERASAKI,W.L., APPLEMAN,M.H. (1973) J. Biol. Chem. 248: 1334-1340.

- 641- RYAN, J., STORM, D.R. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60:304-311
- 642- SAEBO, J., UELAND, P.E. (1978). *Febs. Letters* 96:125-128.
- 643- SAID, S.L. (1968). Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation for Exp. Biol. Eds.: P.W. Ramwell and J.E. Shaw. N.Y. Interscience: 267.
- 644- SAITOH, Y., UI, M. (1976). *Biochem. Pharmacol.* 25:841-845.
- 645- SAKAI, T., MAKINO, H., TANAKA, R. (1978). *Biochim. Biophys. Acta.* 522: 477-490.
- 646- SALOMON, Y., LIN, M.C., LONDOS, C., RENDELL, M., ROBBELL, M. (1975). -- *J. Biol. Chem.* 250:4239-4245.
- 647- SALVA, J.A. (1948). *Farmacologia del extracto de bazo. Farmacologia actual* 43:16.
- 648- SAMUELSSON, B. (1964). *Biochem. Biophys. Acta* 84:218.
- 649- ————. (1963). *J. Biol. Chem.* 238:3229-3234.
- 650- ————, GRANSTRÖM, E., GREEN, K., HAMBERG, M., HAMMARSTRÖM, S. — (1975). *Ann. Rev. Biochem.* 44:669-695.
- 651- ————, GOLDBYNE, M., GRANSTRÖM, E., HAMBERG, M., HAMMARSTRÖM, S. — MALMSTEN, O. (1978). *Ann. rev. Biochem.* 47:997-1029.
- 652- SANDBERG, F., INGELMAN-SUNDBERG, A., JOELSSON, I., RYDEN, G., (1967). — Nobel Symposium 2, Prostaglandins Eds.: S. Bergström and B. Samuelsson. Stockholm: Almqvist and Wiksell: 91.
- 653- ————, ————, RYDEN, G. (1963). *Acta Obstet. — Gynec. Scand.* 42:269.
- 654- ————, ————, ————. (1965). *Acta Obstet. — Scand.* 44:585.
- 655- SANDLER, J.A., CLYMAN, R.I., MANGANIELLO, V.C., VAUGHAN, M. (1975). *J. Clin. Invest.* 55:431-435.
- 656- SANDLER, M., KARIM, S.M.M., WILLIAMS, E.D. (1968). *Lancet* 2:1053.
- 657- SANKARAN, K., HANBAUER, I., LOVENBERG, W. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:3188-3191.
- 658- SATO, S., YAMADA, T., FURIMATA, R., MAKIOCHI, M. (1974). *Biochim. Biophys. acta* 332:166-174.
- 659- SATTIN, A., RALL, T.W. (1970). *Mol. Pharmacol.* 6:13-23.
- 660- SAWYNOK, J., JHAMANDAS, K.H. (1976). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 379-390.

- 661- SAYERS,G., BEALL,R.J., SEELIG,S. (1972). *Science* 175:1131-1133.
- 662- SCHEID,C.R., HONEYMAN,T.W., FAY,F.S. (1979).*Nature* 277:32-36.
- 663- SCHNETZER,G.W. (1972). *Am. Heart.J.* 83:552-564.
- 664- SCHRAMM,N., NAIM,E. (1970). *J. Biol.Chem.* 245:3225-3231.
- 665- SCHRAMM,M., ORLY,J., EIMERL,S., KORNER,M. (1977). *Nature* 268: -
310-313.
- 666- SCHRODER,J., RICKENBERG,H.V. (1973). *Biochim. Biophys.Acta* 302:
50-63.
- 667- SCHULMAN,H., GREENGARD,P. (1978). *Nature* 271:478-479.
- 668- SCHULSTER,D., ORLY,J., SEIDEL,G., SCHRAMM,M. (1978). *J. Biol.Chem.*
253:1201-1206.
- 669- SCHULTZ,G., BOHME,E., MUNSKE,K. (1969). *Life Sci.* 8:1323-1332.
- 670- SCHULTZ,G., HARDMAN,J.G. (1975). En: *Regulation of function and -
growth of eukaryotic cells by intracellular cyclic nucleotides --
(ed.: DUMONT,J.E., BUTCHER,R.W., BROWN,B.) Plenum,N.York.*
- 671- SCHULTZ,G., HARDMAN,J.G. (1976). En: "Eukaryotic cell function and
growth. (Ed. DUMONT,J.E.) *Nato advanced study Institutes series A.*
New York: Plenum. Vol. 9 p.p. 667-683.
- 672- SCHULTZ,G., HARDMAN,J.G., BAIRD,C.E., SUTHERLAND,E.W. (1973). *Proc.*
Nat. Sci. USA 70:3889-3893.
- 673- SCHULTZ,G., HARDMAN,J.G., DAVIS,J.W., SCHULTZ,K., SUTHERLAND,E.W.
(1972). *Fed. Proc.* 31:440 (Abstr.).
- 674- SCHULTZ,G., HARDMAN,T.G., SCHULTZ,K., BAIRD,C.E., PARKS,M.A., DAVIS
J.W., SUTHERLAND,E.W. (1972). *Abstract 5th. International congress
on Pharmacology* p. 206.
- 675- SCHULTZ,G., HARDMAN,J.G., SCHULTZ,K., DAVIS,J.W., SUTHERLAND,E.W. -
(1973). *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 70:1721-1725.
- 676- SCHULTZ,K.D., SCHULTZ,K., SCHULTZ,G. (1977). *Nature* 265:750-751.
- 677- SCHWARTZ,J.C. (1975). *Life Sci.* 17:503-518.
- 678- SCHWARTZ,J.C. (1977). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17:325-339.
- 679- SEVILLA,N., STEER,M.L., LEVITZKI,A (1976). *Biochemistry* 15:3493-99
- 680- SHARMA,S.K., NIREMBERG,M., KLEE,W.A., (1975). *Proc.Natl.Acad. Sci.*
USA 72:590-594.

- 681- SHAW, J.E. (1966). *Fed. Proc.* 25:770.
- 682- ———, RAMWELL, P.W. (1967). *Nobel Symposium 2, Prostaglandins*
Eds.: S. Bergström and B. Samuelsson. Stockholm: Almqvist and —
Wilsell: 293.
- 683- ———, ———, (1968). *J. Physiol. (Lond.)* 195:34.
- 684- SHEARD, P. (1968). *J. Pharm. Pharmacol.* 20:332-333.
- 685- SIEGEL, M.I., PUCA, G.A., CUATRECASAS, P. (1976). *Biochem. Biophys -
Acta.* 438:310-323.
- 686- SHOJI, M., PATRICK, J.G., DAVIS, C.W., KUO, J.F. (1977). *Biochem. J.-
161:213-221.*
- 687- SHOJI, M., PATRICK, J.G., TSE, J., KUO, J.F. (1977). *J. Biol. Chem. -
252:4347-4353.*
- 688- SILVERMAN, P.M. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70:381-388.
- 689- SIMON, E.J., HILLER, J.M., EDELMAN, I. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci.
USA.* 70:1947-1949.
- 690- SIMON, E.J., HILLER, J.M., (1978). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18:
371-194.
- 691- SMITH, C.H., ERLANDSON, M.E., SCHULMAN, I., STERN, G. (1957). *Ann. J.
Med.* 22:390-.
- 692- SMITH, S.B., INGERMAN, C., KOCISIS, J.S., SILVER, M.J. (1974). *J. Clin.
Invest.* 53:1468.
- 693- SMITH, E.R., McMORROW, J.V. Jr., COVINO, B.G., LEE, J.B., (1968). —
*Prostaglandin Symposium of Worcester Foundation for Exp. Biol. —
Eds.: P.W. Ramwell and J.E. Shaw. N.Y. Interscience:259-266.*
- 694- SMITH, U., RYAN, J. (1970). *Bradykinin and related kinins: cardio--
vascular, biochemical and neural action:249-261.*
- 695- SMITH, J.B., SILVER, M.J., INGERMAN, C.M., KOCISIS, J.J. (1974). *En:-
platelets and thrombosis. (S. SHERRY y S. S. S. Ed.) p.p.81 —
(Baltimore:University Park Press).*
- 696- SMOAKE, J.A., SONG, S.Y., CHEUNG, W.Y. (1974). *Biochim. Biophys Acta*
341:402-411.
- 697- SNYDER, F.F., DRUMMOND, G.I. (1978). *Arch. Biochem. Biophys* 185:116-25.
- 698- SOIFER, D., HECHTER, O. (1971). *Biochem. Biophys. Acta.* 230:539-542.

- 699- SMITH, R.J., IGNARRO, L.J. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:108-112.
- 700- STAMPA, A., GARCIA, J. (1965). *Galenica Acta* 18:113-121.
- 701- STEINBERG, D. (1978). En: *Molecular Biology and Pharmacology of -- Cyclic Nucleotides*. (Ed.: FOLCO, G., PAOLETTI, R.) p.p. 95-108. Elsevier /North-Holland Biomedical Press (Amsterdam, N.Y.).
- 702- STEINBERG, D., VAUGHAN, M., (1967). Nobel Symposium 2, Prostaglandins Eds.: S. Bergström and B. Samuelsson. Stockholm: Alqvist and Wiksell 109:121.
- 703- _____, _____, NESTEL, P. (1963). *Biochem. Pharmacol.* 12: 764-766.
- 704- STEINER, A.L., PAGLIARA, A.S., CHASE, L.R., KIPNIS, D.M. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:1114-1120.
- 705- STEVENS, F.C., WALSH, M., HO, H.C., TEO, T.S., WANG, J.H. (1976). *J. -- Biol. Chem.* 251:4495.
- 706- STREWLER, G.J., MANGANIELLO, V.C., VAUGHAN, M. (1978). *J. Biol. Chem.* - 253:390-394.
- 707- STRIKE, T.A., ELLINGER, F. (1963). *Acta Haemat. Basel* 29:2.
- 708- SULAKHE, S.J., LEUNG, N.L.K., SULAKHE, P.V. (1976). *Biochem. J.* 157: - 713-719.
- 709- SULAKHE, P.V., SULAKHE, S.J., LEUNG, N.L.K., ST. LOUIS, P.J., HICKIE, R.A. (1976). *Biochem. J.* 157:705-712.
- 710- SUN, F.F. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74:1432.
- 711- SUN, I.C., SHAPIRO, L., ROSEN, O.M. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:193-203.
- 712- SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. (1957). *J. AM. Chem. Soc.* 79:3608.
- 713- SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. (1958). *J. Biol. Chem.* 232:1077-1091.
- 714- _____, _____, (1960). *Pharmacol. Rev.* 12:265-299.
- 715- _____, _____, MENON, T. (1962). *J. Biol. Chem.* 237: -- 1220-1227.
- 716- SVERSON, D.L., DRUMMOND, G.J., SULAKHE, P.V., (1972). *J. Biol. Chem.* - 247:2949-2958.
- 717- SWEATMAN, W.J., COLLIER, H.O. (1966). *Nature (Lond)* 217:69.
- 718- SWINGLE, W.W., PFIFFNER, J.J. (1931). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 28: -- 510-512.

- 719- SWISLOCKI,N.I., TIERNEY,J. (1973). *Biochemistry* 12:1862-1866.
- 720- SZMIGIEZKI,A., GUIDOTTI,A., COSTA,E. (1977). *J. Biol.Chem.* -- 252:3848-3853.
- 721- TADA,M., KIRCHENBERGER,M.A., KATZ,A.M. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:2640.
- 722- _____, _____, REPKE,D.I., KATZ,A.M. (1974). *J.- Biol. Chem.* 249:6174.
- 723- TAKAI,K., KURASHINA,Y., USUKY -NORI,C., OKAMOTO,H., HAYAISHI , O. (1974). *J. Biol. Chem.* 249:1965-1972.
- 724- TAKAI,Y., NISHIYAMA,K., YAMAMURA,H., NISHIZUKA,Y. (1975). *J.- Biol. Chem.* 250:4690-4695.
- 725- TALMADGE,K.W., BECHTEL,E., SALONKANGAS,A., HUBER,P., JUNGSMANN, R.A., EPPENBERGER,V. (1975). *Eur. J. Biochem.* 60:621-632.
- 726- TANIGUCHI,T., FUJIWARA,M., LEE,J.J., HEDAKA,H. (1978). *Biochim. Biophys. Acta.* 522:465-476.
- 727- TANINI,A., ROTELLA,C., TOCCAFON'JI,R. (1978). *En: Molecular -- Biology and Pharmacology of Cyclic Nucleotides* (Ed.: FOICO,G. PAOLETTI,R.) p.p.307-310. ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL - PRESS (AMSTERDAM,N.YORK).
- 728- TAO,M., LIPMANN,F. (1969). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 63:86-92.
- 729- TAO,M., SALAS,M.L., LIPMAN,F. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci.- USA.* 67:408-414.
- 730- TEO,T.S., WANG,J.H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248:5950-5955.
- 731- _____, _____, WANG,T.H., (1973). *J. Biol.Chem.* 248:588-595.
- 732- TERASAKI,W.L., APPLEMAN,M.M. (1975). *Metabolism* 24:311-319.
- 733- TERENCEUS,L (1973). *Acta Pharmacol.Toxicol.* 32:317-320.
- 734- TERENCEUS,L. (1978). *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 18:189-204.
- 735- TESHIMA,Y., KAKIUCHI,S. (1974). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* - 56:484-495.
- 736- TOLKOVSKY,A.M., LEVITZKI,A. (1978). *Biochemistry* 17:3795-3810.
- 737- THOMPSON,W.J., APPLEMAN,M.M. (1971). *Biochemistry.* 10:311-316.
- 738- _____, _____, (1971). *J. Biol. Chem.* 246:3145-3150.

- 739- THOMPSON, W.J., LITTLE, S.A., WILLIAMS, R.H. (1973). *Biochemistry* 12: 1889.
- 740- ———, ROSS, C.P., PLEDGER, W.J., STRADA, S.J. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:4922-4929.
- 741- ———, WILLIAMS, R.H., LITTLE, S.A. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 159:206-213.
- 742- TISDALE, M.J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* 397:134.
- 743- TROYER, E.W., FERRENDELLI, J.A. (1976). *Fed. Proc.* 35:456.
- 744- TSAI, S.CH., MANGANELLO, V.C., VAUGHAN, M. (1978). *Arch. Biochem. -- Biophys* 189:155-160.
- 745- TURTLE, J., KIPKIS, D.M. (1967). *Biochemistry* 6:3970.
- 746- TSUZUKI, J., KIGER, J.A. Jr. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 393:225-235.
- 747- TSUZUKI, J., KIGER, J.A. Jr. (1978). *Biochemistry* 17:2961-2970.
- 748- UEDA, T., MEANO, H., GREENGARD, P. (1973): *J. Biol. Chem.* 248:8295.
- 749- UELAND, P.M., DØSKELAND, S.O. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:677-686.
- 750- UNO, I., UEDA, T., GREENGARD, P. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:2192-2195
- 751- UZUNOV, P., LEHNE, R., REVUELTA, A.V., GNEGY, M.E., COSTA, E. (1976). -- *Bi. chim. Biophys. Acta.* 422:326-334.
- 752- UZUNOV, P., REVUELTA, A., COSTA, E. (1975). *Mol. Pharmacol.* 11:506-510
- 753- ———, WEISS, B. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 284:220-226
- 754- VANAMAN, T.C., WAITERSON, D.M. (1976). *Fed. Proc.* 35:1363.
- 755- VANDERMEERS, A., ROBBERECHT, P., VANDERMEERS-PIRET, M.C., RATHE, J., - CHRISTOPHE, J. (1978). *Biochem. Biophys, Res. Commun.* 84:1076-1081.
- 756- VAN DER OUDERAA, F.J., BUYTENHEK, M., NUGTEREN, D.H., VAN DORP, D.A. (1977). *Biochem. Biophys. Acta.* 487:315.
- 757- VAN INWEGEN, R.G., PLEDGER, W.J., STRADA, S.J., THOMPSON, W.J. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* (1976). 175:700-709 .
- 758- VAN LEEMPUT-COUTREZ, M., CANUS, J., CHRISTOPHE, J. (1973). *Biochem. - Biophys. Res. Commun.* 54:182-190.
- 759- VARIMO, K., LONDESBOROUGH, J., (1976). *Biochem. J.* 159:363-370.
- 760- VOGT, W. (1949). *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 206:1-11.

- 761- VOGT,W., SUZUKI,T., BABILLI,S. (1966)Mem. Soc. Endocr. 14:137-142.
- 762- VON EULER,U.S. (1934). Arch. Exp. Path. Pharmac. 175:78-84.
- 763- —————, (1963). Ann. N.Y. Acad. Sci. 104:449-463.
- 764- —————, (1935). Klin. Wschr. 14:1182-1183.
- 765- —————, (1935). J. Physiol. 84:21P.
- 766- —————, (1937). J. Physiol. (Lond.) 88:213.
- 767- VON HUNGEN,K., ROBERTS,S. (1973). Nature (New Biol.) 242:58-60.
- 768- —————, —————, HILL,D.F. (1975). Brain Res. 84:257-267
- 769- —————, —————, —————. (1974). J. Neurochem. 22:811-819.
- 770- WAISMAN,D.M., SINGH,T.J., WANG,J.H. (1978). J. Biol. Chem. 253: --3387-3390.
- 771- —————, STEVENS,F.C., WANG,J.H. (1975). Biochem. Biophys. --Res. Commun. 65:975-982.
- 772- WALLACE,R.W., LYNCH,T.J., TALLANT,E.A., CHEUNG,N.Y. (1978). Arch.-Biochem. Biophys. 187:328-334.
- 773- WALLACH,D., PASTAN,I. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 72: --859-865.
- 774- WALSH,D.A., ASHBY,C.D., GONZALEZ,C., CALKINS,D., FISLHER,E.H., ---KREBS,E.G. (1971). J. Biol. Chem. 246:1977-1985.
- 775- —————, KREBS,E.G. (1973). Enzymes 8:555-581.
- 776- —————, PERKINS,J.P., KREBS,E.G. (1968). J. Biol. Chem. 243: --3763-3765.
- 777- WALTON,K.G., DELORENZO,R.J., CURRAN,P.F., GREENGARD,P. (1975). J.-Gen. Physiol. 65:153.
- 778- WANG,J.H., DESAI,R. (1976). Biochem. Biophys.Res.Comm. 72:926-32
- 779- —————, —————. (1977). J. Biol.Chem. 252:4175-4184.
- 780- —————, TEO,T.S., HO,H.C., STEVENS,F.C. (1975). Adv.Cyclic. Nu-
cleotide.Res. 5:179-194.
- 781- WATTERSON,A.M., HARRELSON,W.G.Jr., KELLER,P.M., SHARIFF,F., VANA--
MAN,T.C. (1976). J. Biol.Chem. 251:4501-4513.
- 782- WAY,L., DURBIN,R.P. (1969). Nature (Lond.) 221:874.

- 783- WEEKS, J.R., (1972). *Ann. Rev. Phar.* 317-335.
- 784- ———, SEKHAR, C.N., DUCHARME, D.W. (1969). *J. Pharm. Pharmacol.* 21:103.
- 785- WEISS, B., FERTEL, R., FIGLIN, R., UZUNOV, P. (1974). *Mol. Pharmacol.* - 10:615-625.
- 786- ———, GREENBERG, L.H. (1978). En: *Molecular biology and pharmacology of cyclic nucleotides*, (Eds.: FOLCO and R. PAOLETTI) p.p.69-84 ELSEVIER/NORTH HOLLAND BIOMEDICAL PRESS (AMSTERDAM-N.YORK).
- 787- WELLER, M., (1978). *Mol. Cell. Biochem.* 20:95-102.
- 788- ———, LAING, W. (1978). *Mol. Cell. Biochem.* 20:119-124.
- 789- WELLS, J.N., BAIRD, C.E., WU, Y.J., HARDMAN, J.G. (1975). *Biochim. Biophys. Acta.* 384:430-442.
- 790- WELLS, J.N., HARDMAN, J.G. (1977). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 8:119-143.
- 791- ———, WU, Y.J., BAIRD, C.E., HARDMAN, J.G. (1975). *Mol. Pharmacol* 11:775-783.
- 792- WELSH, M.J., DEDMAN, J.R., BRINKLEY, B.R., MEANS, A.R. (1978). *Proc. -- Natl. Acad. Sci. USA* 75:1867.
- 793- WELTON, A.F., LAD, P.M., NEWBY, A.C., YAMURA, H., NICOSIA, S., RODBELL, M. (1978). *Biochim. Biophys. Acta.* 522:625-639.
- 794- WEINSTOCK, M., WEISS, C. (1979). *Br. J. Pharmacol.* 65:593-599.
- 795- WHITE, A. (1975). *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 5:535-573.
- 796- WHITE, G., AURBACH, G.D. (1969). *Biochem. Biophys. Acta* 191:686-697.
- 797- WICKSON, R.D., BOUDREAU, R.J., DRUMMOND, G.I. (1975). *Biochemistry* 14: 669-675.
- 798- WILLIAMS, E.D., DARIM, S.M.M., SANDLER, M. (1968). *Lancet* 1:22.
- 799- WILLIAMS, L.T., MULLIKIN, D., LEFKOWITZ, R.J. (1978). *J. Biol. Chem.* - 253:2984-2989.
- 800- WILLIS, A.L. (1974). *Prostaglandins* 5:1-25.
- 801- WILLOUGHBY, D.A. (1968). *J. Path. Bact.* 96:381-387.
- 802- WLODAWE, P., HAMMARSTROM, S., (1979). *Febs. Letters* 97:32-36.
- 803- WLODAWER, P., KINDAHL, H., HAMBERG, M. (1976). *Biochim. Biophys. Acta.* 431:603.

- 804- WOLFF, J.J., BROSTROM, C.O. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 163:349.
- 805- WOLFF, J., COOK, G.H., (1973). *J. Biol. Chem.* 248:350-355.
- 806- ———, ———. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:687-693.
- 807- ———, LONDOS, C., COOK, G.H. *Arch. Biochem. Biophys.* 191:161-168-(1978)
- 808- WOLFF, A.J., SIEGEL, F.L. (1972). *J. Biol. Chem.* 247:4180-4185.
- 809- WOMBACHER, H. (1978). *Febs. Letters* 85:77-80.
- 810- WOO, Y.T., MANERY, J.F. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 154:510-519.
- 811- WOOD, C.L., ARNETT, C.D., CLARKE, W.R., TSAI, B.S., LEFKOWITZ, E.J. -
(1979). *Biochem. Pharmacol.* 28:1277-1282.
- 812- YAGI, K., YAZAWA, M. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:1338-1340.
- 813- YAMAMURA, H., NISHIYAMA, K., SHIMOMURA, R., NISHIZUKA, Y. (1973). --
Biochemistry 12:856-862.
- 814- ZLTKIS, ZAK, BOYLE. (1953). *J. Lab. Clin. Med.* 41-486.
- 815- ZOR, U., BLOOM, G., LOWE, I.P., FIELD, J.B. (1969). *Endocrinology* 84:
1082-1088.
- 816- ———, KANEKO, T., SCHNEIDER, H.P.G., McCANN, S., LOWE, I.P., BLOOM, G
BORLAND, B., FIELD, J.B. (1969). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63:918.

4. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Las investigaciones han sido realizadas en el Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Bilbao.

MATERIAL

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

En el presente trabajo se han utilizado un total de 86 cobayas de ambos sexos repartidas del modo siguiente:

- 66 cobayas, de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 350 y 550 gramos para las pruebas fisio-farmacológicas en baño de órganos.
- 8 cobayas, de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 350 y 450 gramos para las determinaciones de histamina.
- 12 cobayas hembras con pesos comprendidos entre 400 y 500 gramos para las determinaciones de nucleótidos cíclicos.

Los animales permanecieron en el estabulario a una temperatura de 18-25°C hasta el comienzo de la experiencia, con acceso libre a comida y bebida hasta 48 horas antes del experimento, momento en el que eran privados de comida.

II. PRODUCTOS QUIMICOS.

A.- Relación de productos químicos utilizados para la preparación de la solución salina nutritiva:

- Cloruro de sodio "Merck".
- Bicarbonato de sodio "Merck".
- Cloruro de potasio "Merck".
- Cloruro de calcio "Merck".
- Sulfato de magnesio con $7H_2O$ "Merck".
- Fosfato de sodio primario con $2H_2O$ "Merck".
- Glucosa anhidra "Merck".

B.- Productos utilizados en la preparación del extracto esplénico:

- Hidróxido de sodio "Merck".
- Sulfato de Zinc "Merck".
- Acido sulfúrico "Merck".
- Arena de mar purificada "Merck".

C.- Productos utilizados durante las pruebas fisio-farmacológicas con fleon aislado de cobaya:

- Clorhidrato de histamina "Sigma".
- Maleato de d-clorofeniramina, bajo el nombre comercial de Polaramine, inyectable, de laboratorios SCHERING, USA., en forma de ampollas de 1 cc., conteniendo 5 mg del producto.
- Clorhidrato de difenhidramina, bajo el nombre comercial de Benadryl, inyectable, de laboratorios PARKE DAVIS, S.A.E., en forma de ampollas de 1 cc., conteniendo 50 mg del producto.
- 5-hidroxi-triptamina (serotonina) formando complejo con sulfato de creatinina "Sigma".
- Dimaleato de metisergida en polvo seco, producto conseguido gracias a la gentileza de laboratorios SANDOZ, S.A.E.
- Sulfato de atropina, bajo el nombre comercial de Atropina "Miró", inyectable, de laboratorios MIRO, en forma de ampollas de 1 cc., conteniendo 1 mg de producto.

D.- Productos utilizados para las determinaciones de histamina:

- Hidróxido de sodio "Merck".
- Acido sulfúrico "Merck".
- Clorhidrato de histamina "Sigma".
- O-ftalaldehido "Sigma".
- n-butanol "Merck".
- n-heptano "Merck".
- Metanol para espectroscopía de fluorescencia, Uvasol "Merck".

E.- Productos utilizados para la determinación de nucleótidos cíclicos:

- Dioxano para centelleo líquido "Merck".
- Metanol para centelleo líquido "Merck".
- Etilenglicol "Merck".

- Naftaleno para centelleo líquido "Merck" y "BDH".
- Dimetil-POPOP, p.bis(2(4 metil-5-feniloxazolil) benceno) para centelleo líquido "Merck".
- PPO (2,5 difeniloxazol) para centelleo líquido "Hopkin & Williams", SEARLE, Co.

- Kits de radioinmunoanálisis de nucleótidos cíclicos, procedentes de "The Radiochemical Centre", conteniendo:

- Kits de cAMP:

- Buffer Tris/EDTA.
- Antisuero específico para cAMP.
- 8-H³-Adenosín 3': 5' monofosfato cíclico.
- Adenosín 3': 5' monofosfato cíclico.
- Adsorbente ("Charcoal").

- Kits de cGMP:

- Buffer Tris/EDTA.
- Antisuero específico para cGMP.
- 8-H³-guanosín 3': 5' monofosfato cíclico.
- Guanosín 3': 5' monofosfato cíclico.
- Reactivo blanco.
- Sulfato de amonio.

F.- Productos utilizados para la determinación de proteínas:

- Folin-Cicoalteu, reactivo de fenoles "Merck".
- Carbonato de sodio anhidro "Merck".
- Tartrato de sodio y potasio "Merck".
- Hidróxido de sodio "Merck".
- Sulfato de cobre con 5H₂O "Merck".
- Acido sulfúrico "Merck".
- Seroalbúmina bovina al 20% "Behring".
- Suero control "Ortho".

III. INSIRUMENTACION.

A. Relación de aparatos más significativos utilizados en la preparación del extracto esplénico:

- Los macerados de bazo fueron centrifugados mediante una centrífuga preparativa modelo J-21 de BECKMAN.

- El ajuste a pH ácido de los extractos se realizó con auxilio de un pH-METER ZEROMATIC de BECKMAN.

B.- Aparatos más importantes utilizados durante el registro de la actividad de la preparación intestinal:

- Baños termostatados: Se utilizó un baño HERMI para órganos aislados y un baño BRAUN con rango de temperatura hasta 100°C para usos diversos, especialmente para atemperar las soluciones a ensayar antes de añadirlas a la copa del baño de órganos.

- Registadores: El registro gráfico de las diferentes pruebas realizadas se llevó a cabo mediante un registrador HEWLETT-PACKARD tipo 7754A de cuatro canales. Además del registro gráfico, se empleó para la visualización de los fenómenos obtenidos un osciloscopio PHILIPS PM 3231 de 0-15 MHz.

- La eliminación del plexo mesentérico y la limpieza de la pieza se efectuó con ayuda de una lupa binocular BAUSCH & LOMB modelo SVB-73 (lentes 10X, estereozoom de 0.7X a 3X).

C.- Aparatos de mayor relevancia utilizados para las determinaciones de histamina:

- Centrífuga: Se utilizó una centrífuga MSE modelo MISTRAL 4L capaz de aceptar los tubos con tapón esmerilado imprescindibles en esta experiencia.

- Agitadores: Se utilizaron dos agitadores vibradores CENCO y uno WILTEN & Co.B.V., así como, un agitador de bandeja P-SELECTA modelo UNITRONIC-320.

-Espectrofluorímetro: Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro BAIRD-ATOMIC modelo FLUORIPPOINT dotado de monocromadores de excitación y emisión. El rango de longitud de onda oscila entre 220 y 770 nm en excitación y entre 250 y 800 nm en emisión.

- Para las determinaciones efectuadas en la solución salina nutritiva se utilizó el utillaje descrito en el apartado A.

D.- Instrumental más importante utilizado para la determinación de nucleótidos cíclicos:

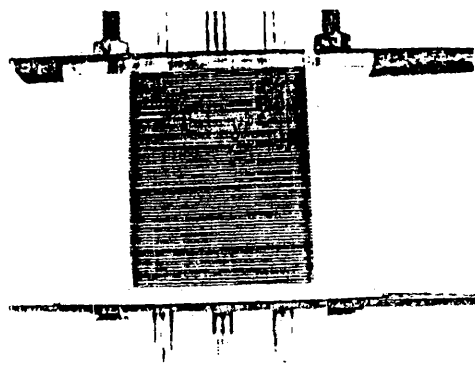
- Pipetas de precisión: Para el manejo de pequeños volúmenes, se utilizaron micropipetas EPPENDORF con puntas de plástico desechables y con capacidades de: 50, 100, 150 y 200 microlitros. La manipulación de volúmenes mayores, aunque menores de 1 mililitro, se llevó a cabo mediante pipetas automáticas CLAY ADAMS graduadas entre 0 y 1000 microlitros con intervalos de 100 microlitros, dotadas de puntas plásticas SELECTAPETTE desechables.

- Centrífuga: Las separaciones entre nucleótido cíclico libre y ligado a antisuero se realizaron por centrifugación en una centrífuga preparativa modelo J-21 de BECKMAN.

- Baño refrigerador: Los tubos procesados en el transcurso de esta experiencia permanecieron en todo momento a una temperatura de entre 2-4°C, para lo cual se utilizó un ULTRATERMOSTAT NB 35423 y un compresor-refrigerador para bajas temperaturas de COLORA.

- Las piezas intestinales fueron privadas de la capa mucosa con ayuda de una lupa binocular BAUSCH & LOMB (vease apartado A) y cortadas en fragmentos de aproximadamente 0.5 mm x 0.5 mm mediante un aparato diseñado y construido en nuestro laboratorio (ver figura: 4.1) consistente en una empalizada de finas hojas de acero separadas entre sí por piezas rectangulares de plástico duro de 0.5 mm de espesor.

- Baño termostático: Los fragmentos de íleon suspendidos en solución de Tyrode se mantuvieron a 37°C mediante un baño BRAUN.



Figura, 4.1

- Homogeneizador: Los fragmentos tisulares fueron homogeneizados con un homogeneizador de ultrasonidos modelo ULTRASONIC de MSE.

- Espectrofotómetro de centelleo líquido: Una vez procesadas las muestras, su contenido radiactivo era registrado merced a un espectrofotómetro de centelleo líquido modelo ABAC SL-40 de la casa INTERTECHNIQUE, acoplado a un teletipo.

E.- Aparatos más importantes relacionados con la determinación de proteínas:

- Analizador centrífugo GEMSAEC III
- Pipeteador automático de cuatro bombas GEMSAEC
- Ordenador PDP-11 acoplado al autoanalizador.

F.- Aparatos de cálculo:

- Ordenador PDP-11
- Calculadora 9862A de HEWLETT-PACKARD, dotada de graficador.

MÉTODOS

I. PREPARACION DEL EXTRACTO ESPLÉNICO.

Durante el presente trabajo se utilizaron extractos de bazo de vaca por reunir las mejores condiciones de obtención y resultados.

1.- Homogeneizado.

Los bazos de vaca utilizados para este propósito procedían de ganado sacrificado entre 1 y 2 horas antes de la preparación del extracto habiéndose conservado durante este intervalo en cámara frigorífica.

El peso de los citados bazos oscilaba entre 400 y 600 gramos, siendo troceados antes de cualquier intervención y cada fragmento cuidadosamente pesado. Una vez efectuada la pesada se mezclaban con arena de mar purificada "Merck" en la proporción de 1 parte de bazo por 3 de arena en peso y de esta forma macerados en un mortero. A continuación se añadían las soluciones desproteinizantes en la siguiente proporción: por cada parte de bazo se añaden, peso a volumen, 5 de NaOH 0.3 N y posteriormente otras 5 de SO_4Zn al 5%. Una vez efectuada la desproteí-
nización, se introducía el macerado en frascos de centrifuga adecuados en los que, tras haber efectuado las pesadas correspondientes para el cálculo del extracto obtenido de toda la operación, se dejaba decantar durante 5 minutos.

2.- Desproteí- nización.

El método de desproteí-
nización utilizado, que se cita en el párrafo anterior, es el recomendado por SOMOGYI y NELSON para la desproteí-
nización del plasma en su método de determinación de la glucosa plasmática (5, 9, 19).

Las soluciones necesarias para este procedimiento son:

- $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 5% en agua bidestilada
- $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.3 N (NaOH 0.3 N).

Las soluciones deben de estar ajustadas de tal forma que 5 ml de SO_4Zn requieren 4,7 a 4,8 ml de hidróxido de bario para producir color

rosa con la fenolftaleína (5). Las soluciones deben conservarse en botellas protegidas del CO_2 de la atmósfera (5).

En este trabajo se sustituyó el hidróxido de bario por hidróxido de sodio a igual concentración, con objeto de evitar el efecto de los iones bario sobre la musculatura lisa intestinal. El ión sodio se mostró en cambio completamente inoperante en este sentido y sin embargo esta sustitución no parece menoscabar la eficacia del método de desproteínización utilizado (5, 9).

3.- Centrifugado.

Antes de la centrifugación propiamente dicha se refrigeraba la centrífuga hasta una temperatura de 5° - 8°C , conseguida la cual se introducían en la centrífuga los frascos debidamente compensados. La centrifugación duraba 5 minutos a 6.000 r.p.m. y una vez transcurrido este tiempo se sacaban los frascos y se disponían para su filtrado.

4.- Filtrado.

El sobrenadante obtenido de la centrifugación era filtrado seguidamente a través de papel de filtro para análisis gravimétrico lavado a los ácidos, obteniéndose un líquido transparente e incoloro con pH aproximadamente neutro.

5.- Fijación del pH.

El volumen obtenido tras el filtrado se dividía en varias fracciones que eran guardadas en cámara frigorífica. Inmediatamente antes de la utilización de estas fracciones para una experiencia, eran llevados a pH ácido mediante la adición de pequeñas cantidades de ácido sulfúrico diluido, utilizando de esta forma los mismos iones que durante la desproteínización. El ajuste a $\text{pH} = 5$ se llevó a cabo mediante un pHmetro Beckman (7, 9, 17).

II. BAÑO DE ORGANOS AISLADOS.

Las preparaciones de íleon son colocadas para su experimentación en un baño para órganos aislados (2). En sus partes más esenciales, un

baño de órganos aislados consta de lo siguiente (ver figura: 4.2):

El baño propiamente dicho (A) o baño externo cuya misión es mantener, a través del agua que contiene, una temperatura constante gracias a la intervención de un termostato (A) incluido en el propio baño.

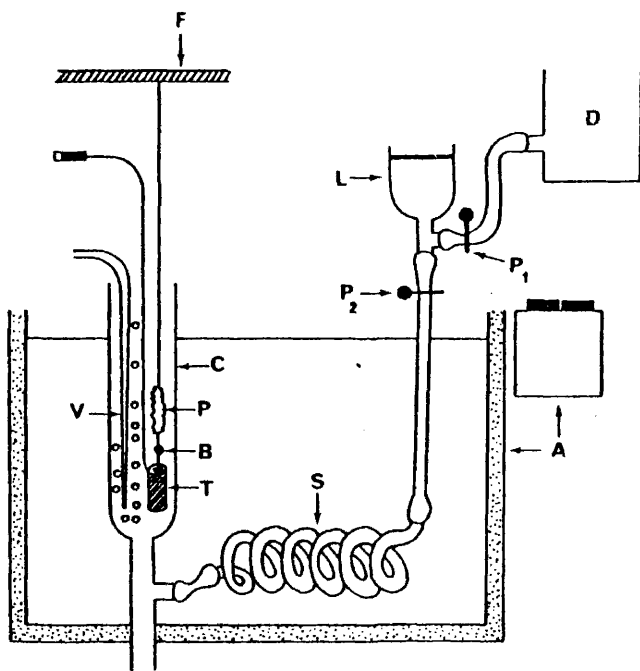
La copa o baño interno (C) que contiene la solución nutritiva, y sumergida en ella la preparación (P) de tejido aislado. Dicha preparación se encuentra sujeta por su extremo superior a una varilla fijadora (F) y por su parte inferior cuelga un pequeño contrapeso de 0.5 gramos unido a una barrita de hierro dulce de 1 centímetro de longitud (B) que actúa como núcleo de desplazamiento a lo largo de las espiras de un transductor isotónico diferencial (T).

La solución salina nutritiva se encuentra almacenada en un depósito (D) y antes de entrar en la copa debe ajustar su temperatura para lo cual atraviesa un serpentín (S) sumergido en el propio baño de órganos.

El aireado se efectúa por burbujeo desde el extremo inferior de la copa mediante un delgado tubo de vidrio uno de cuyos extremos se convierte en capilar exponiéndolo a la llama de un mechero Bunsen y el otro se conecta con una bomba de aire tipo pecera (V).

La solución salina de la copa se cambia con regularidad cada vez que finaliza una prueba y se desea preparar la siguiente. En el presente trabajo el lavado de la preparación se hizo siempre por el sistema de rebosamiento, dejando correr una cantidad de solución salina constante en cada caso y vaciando posteriormente la copa hasta un volumen prefijado (25 ml), tras abrir la pinza de desagüe.

El volumen constante de arrastre se logra mediante la interposición entre el depósito (D) y el serpentín (S), de un frasco graduado que se llena a partir del depósito hasta un nivel deseado abriendo la pinza P_1 . Posteriormente, al abrir la pinza P_2 , el volumen contenido en dicho frasco de lavado (L) baja arrastrando el líquido del serpentín hacia el interior de la copa eliminando por rebosamiento el contenido previo de la misma, que cae en el baño externo.



Figura, 4.2

Los volúmenes de arrastre y final de la copa eran de 50 y 25 ml respectivamente.

2.- Solución salina:

Las soluciones salinas para órganos aislados deben ser preparadas cuidadosamente, con materiales de grado de pureza analítico y agua bidestilada.

Es aconsejable la utilización de soluciones concentradas de depósito de cada uno de los componentes de la solución evitándose de esta forma la necesidad de tener que pesar cada producto durante su preparación. Las pesadas para estas soluciones madre deberán hacerse en balanzas con errores inferiores al 1% de la masa del producto a pesar. Además estas soluciones así preparadas se conservan en el frigorífico durante una semana, mientras que las soluciones ya diluidas solo tienen validez para un día.

Para nuestro trabajo utilizamos la solución de Tyrode, cuya preparación se hizo con arreglo a las instrucciones que figuran en el cuadro 4.1.

Se utilizó sulfato de magnesio con $7H_2O$ en lugar de cloruro de magnesio, que por su carácter higroscópico resulta de difícil pesada. En este sentido no parece presentar problema alguno el cambio de ión cloruro por sulfato. La reducción consecuente en la concentración de los cloruros es pequeña, ya que la mayoría procede del cloruro de sodio. Por otra parte la incorporación de iones sulfato resulta completamente inocua (10).

Por motivos completamente superponibles a los anteriores el cloruro de calcio se empleó en su forma bihidratada, de muy fácil manejo (10).

La mezcla de las soluciones concentradas se hizo en el orden citado en el cuadro con la excepción del cloruro de calcio que se añadía al final de cada preparación, una vez diluidas casi a totalidad con agua, a la vez que se agitaba con objeto de evitar la precipitación de las

TYRODE	Concentración Gramos/litro	Para 1 litro se	
		ponenml.	de solución madre al.....%
ClNa	8.00	32.0	25
CO ₃ Na	1.00	20.00	5
ClK	0.20	2.00	10
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.26	2.60	10
NO ₃ H.Na.2H ₂ O	0.05	1.30	5
Cl ₂ Ca . 2H ₂ O	0.20	1.80	(total) 14.7
GLUCOSA	1.00	se pesa y se añade al momento	

Cuadro, 4.1

de las sales de calcio.

La solución así preparada se conserva aproximadamente 24 horas a la temperatura ambiente y algo más en el frigorífico. En cualquier caso, para el presente trabajo se deshecharon las soluciones que no habían sido preparadas en el día.

El gaseado de la solución se realizó mediante una bomba de aire.

Puesto que el extracto a ensayar es un fluido biológico, se adicionó, a la solución de Tyrode, sulfato de atropina ($5,1 \times 10^{-6}$ moles/ml de sol. salina), a fin de evitar las posibles interferencias debidas a una eventual presencia de acetilcolina en el extracto (10).

3.- Preparación de los fármacos utilizados.

Como norma general las soluciones se han preparado a partir de un stock concentrado del que por diluciones sucesivas se obtenían las concentraciones deseadas. Tanto las soluciones madre como las diluciones consiguientes se han preparado poco antes del comienzo de cada experiencia. Como medio de dilución se ha empleado solución salina fisiológica en lugar de agua destilada (10). Todos los agentes incluido el extracto esplénico han sido añadidos a la copa del baño de órganos debidamente atemperados en un baño auxiliar a 37°C, y en una cantidad, en volumen, de 1 mililitro.

Las soluciones madre de los distintos agentes así como sus diluciones han sido preparadas siguiendo un criterio común basado en un sencillo cálculo:

$$\begin{array}{l} P_m \text{ del agente a preparar, en mg/ml} \text{ ----- sol. 1 M} \\ \text{mg disponibles del agente/ml} \text{ ----- sol. X M} \end{array}$$

Las soluciones X M sirven como soluciones madre a partir de las cuales y por sucesivas diluciones 1/10 se obtienen las concentraciones a utilizar.

Teniendo en cuenta que la adición de los distintos reactivos a la copa representa una dilución adicional (25 ml en la copa + 1 ml de reac-

tivo añadido = 26 ml, vol. final en copa) se ha realizado la oportuna corrección:

26 ml ----- X M
1 ml ----- Y M

De forma que la concentración de las soluciones utilizadas se expresan en moles por mililitro de solución de Tyrode (volumen final en la copa).

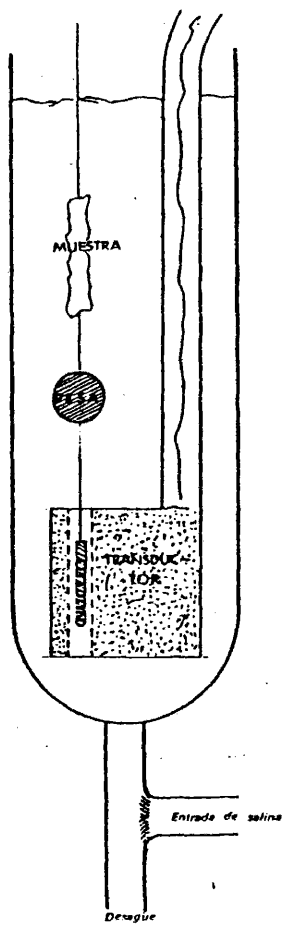
De todas las concentraciones examinadas, las más utilizadas por sus buenos resultados han sido:

- Para la histamina: Sol. 5.2×10^{-6} M, conc. en copa: 2×10^{-7} moles/ml.
- Para el maleato de d-clorofeniramina: Sol. 9.8×10^{-6} M, conc. en copa: 3.8×10^{-7} moles/ml.
- Para el clorhidrato de difenhidramina: Sol. 9.8×10^{-5} M, conc. en copa: 3.8×10^{-6} moles/ml.
- Para la serotonina: Sol. 2.6×10^{-4} M, conc. en copa: 1×10^{-5} moles/ml.
- Para la metisergida: Sol. 6.5×10^{-5} M, conc. en copa: 2.5×10^{-6} moles/ml.

4.- Preparación del íleon aislado.

La preparación del íleon aislado de cobaya es como sigue (10):

Se mata una cobaya mediante un golpe en la cabeza y posteriormente se le corta el cuello para desangrarla. Se abre el abdomen, y cuando se tiene localizada la unión ileo-cecal se corta a este nivel extrayendo unos 6 centímetros de intestino delgado terminal, adyacente a dicha unión, que se colocan en una placa conteniendo solución de Tyrode templada. Se limpia la pieza de mesenterio y se corta un trozo de unos 3 centímetros, preferentemente de la porción terminal. En algunos casos es necesario lavar el interior del íleon de restos alimenticios, lo que se consigue pasando a su través líquido de Tyrode con ayuda de una jeringuilla, pero cuidando de no ejercer una presión excesiva que pueda dañar la pieza.



Figura, 4.3

Posteriormente se ata un hilo a cada extremo del fragmento de intestino y se coloca en un baño para órganos aislados sujeto por el extremo superior a una varilla fija y por el inferior a un contrapeso del que pende una pequeña barrita de hierro dulce que actúa como núcleo de un transductor isotónico diferencial (ver figura: 4.3). La temperatura del baño es de 37°C y la pieza es gaseada mediante burbujeo directo de aire en la copa.

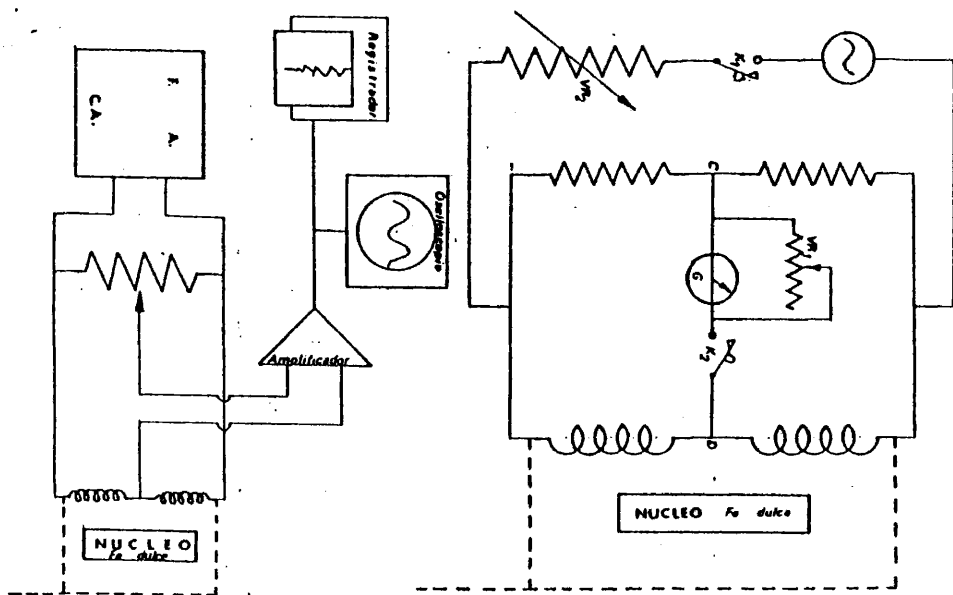
Una vez efectuadas estas operaciones, se da a la pieza un período de estabilización de 30 minutos, al cabo de los cuales se comprueba de nuevo la longitud del trozo de intestino y se ajusta, si fuera necesario, a la longitud deseada de unos 3 centímetros.

La elección de la preparación de íleon de cobaya se basó en que sus respuestas a la histamina y serotonina son de sobra conocidas (6, 10) y en su baja motilidad basal que la hace especialmente indicada para el estudio de niveles tisulares de nucleótidos cíclicos, ya que, al parecer dichos niveles fluctúan durante la actividad espontánea (12).

5.- Método de registro gráfico.

La actividad de la preparación se registró mediante un transductor isotónico acoplado a los aparatos consignados en el apartado de material.

El transductor isotónico diferencial, cuyo diseño, construcción y puesta a punto fué llevada a cabo por personal de nuestro laboratorio (1), consiste en un puente de WHEATSTONE modificado, en el que un ramal posee dos bobinas y el otro dos resistencias conocidas (vease figura: 4.4). Durante el ensayo el núcleo de hierro dulce se introduce en la zona de las bobinas de modo que al modificarse la longitud de la pieza intestinal (bien por contracción o bien por relajación) el núcleo se desplaza a lo largo de las mismas lo que origina que una de ellas tenga mayor inductancia que la otra con la consiguiente variación del voltaje. Dicha variación es proporcional al movimiento experimentado por el núcleo de hierro dulce y enviada como señal eléctrica al apar-



Figura, 4.4

to de registro que la amplifica y la traduce en señal visual graficándola sobre papel y/o en la pantalla de un osciloscopio. El recorrido de la palanca de inscripción es proporcional al camino recorrido por el núcleo de hierro dulce o lo que es lo mismo al grado en que la pieza se haya contraído o relajado.

III. DETERMINACION DE HISTAMINA.

Dentro de este epígrafe cabe distinguir dos bloques experimentales:

- 1/ Analisis de histamina en el extracto esplénico.
- 2/ Analisis de histamina en la solución de Tyrode.

El primer bloque comprende el estudio comparativo de la posible presencia de histamina en el extracto frente a un placebo obtenido siguiendo rigurosamente el procedimiento de extracción detallado en el apartado I salvo que se omita la adición de los fragmentos de bazo de vaca.

Así pues, durante la realización de este primer bloque se procedió al analisis de muestras de extracto esplénico y placebo, para su posterior comparación.

En el segundo bloque se pretendía estudiar la posibilidad de que el extracto esplénico ácido, al ser añadido a la copa del baño de órganos, propiciara la liberación de cierta cantidad de histamina por parte de la pieza intestinal.

La toma de muestras en este segundo bloque se realizó del siguiente modo:

Una vez colocada la pieza intestinal en el baño de órganos, tal y como se ha descrito en el apartado II.4, y tras el correspondiente período de estabilización, se procedía a lavar la preparación. Una vez lavada y tras un período de reposo de entre 10 y 15 minutos, se vaciaba el contenido de la copa en un Erlenmeyer de 50 mililitros de capacidad. Inmediatamente se llenaba de nuevo la copa repitiendo el tiempo de reposo (10-15 minutos) transcurrido el cual se añadía un mililitro de extracto esplénico ácido y rápidamente se colectaba el contenido de la copa en otro Erlenmeyer de la misma capacidad. Ambas muestras

(antes y después de la adición del extracto) eran analizadas y comparadas.

El análisis de las muestras procedentes de ambos bloques se realizó siguiendo el método fluorimétrico de SHORE y cols. (18); cuyo fundamento consiste en que la histamina se condensa con el 0-ftalaldehído dando un producto que emite fluorescencia en la zona de los 450 nm cuando es excitado por una fuente luminosa cuya longitud de onda se halla próxima a los 360 nm.

La histamina se extrae del extracto desproteinizado, primero con butanol y tras añadir heptano, al extracto butanólico, se extrae al fin con ácido sulfúrico diluído. Este extracto ácido se alcaliniza y la histamina se condensa con el 0-ftalaldehído. El producto fluorescente de dicha condensación se estabiliza acidificando el medio. La fluorescencia de esta solución es proporcional a la cantidad de histamina presente en la misma.

2.- Preparación de reactivos.

- 0-ftalaldehído: Se prepara al 1% en metanol; para ello se disolvieron 60 mg del producto en 6 ml de metanol. La solución así preparada es estable, al menos, durante dos semanas siempre que se conserve en cámara frigorífica y a oscuras. En nuestro trabajo se preparé poco antes de cada ensayo.

- Estandards de histamina: Se preparan a partir de una solución madre al 10%. Para ello se disolvieron 16,6 mg de diclorhidrato de histamina en 100 ml de ácido sulfúrico 0,05N. Una vez elaborada la solución madre era conservada en cámara frigorífica por espacio de una semana transcurrida la cual se desechaba. Las diluciones estándar se obtenían a partir de dicha solución del modo siguiente:

1/ Se diluía 1 mililitro de solución madre hasta 100 mililitros con agua destilada para obtener una concentración de 1 microgramo/ml.

2/ A continuación 1 mililitro de dicha solución se sometía a las siguientes diluciones en ácido sulfúrico 0,1 N:

1/100 -----	0.01 microgramos/ml.		
1/50 -----	0.02	"	"
1/25 -----	0.04	"	"
1/12,5 -----	0.08	"	"
1/6,25 -----	0.16	"	"

Estas diluciones estandard se preparaban poco antes de cada ensayo y eran utilizadas como patrones para la construcción de la recta estandard sobre la que se extrapolaban los valores de fluorescencia de las muestras problema.

3.- Procedimiento experimental.

El desarrollo experimental fué el siguiente:

1/- Se ponen 4 mililitros de las muestras problema a analizar en tubos de centrifuga con tapón de vidrio esmerilado conteniendo:

- 0.5 ml de NaOH 5N

- 1.5 gr de ClNa

- Agitar (agitador vibrador)

2/- Añadir 10 mililitros de n-butanol. Agitar 5 minutos (agitador de bandeja).

3/- Centrifugar (3000 r.p.m., entre 5 y 10 minutos), descartar la fase inferior (acuosa).

4/- Añadir 3 mililitros de NaOH 0.1N saturada con ClNa a la fase orgánica. Agitar 1 minuto (agitador de bandeja). Centrifugar (3000 r.p.m. entre 5 y 10 minutos).

5/- Pasar 4 mililitros del extracto butanólico a un tubo de centrifuga con tapón de vidrio.

6/- Añadir 7.5 mililitros de n-heptano. Agitar (agitador vibrador).

7/- Añadir 2.5 mililitros de ácido sulfúrico 0.1N. Agitar 5 minutos (agitador de bandeja).

8/- Centrifugar (3000 r.p.m. entre 5 y 10 minutos). Eliminar la fase orgánica.

9/- Colocar 2 mililitros del extracto ácido obtenido tras el paso 8 en un tubo de ensayo y añadirle 0.4 mililitros de NaOH 1N. Agitar (agitador vibrador).

10/- Añadir 0,1 mililitros de 0-ftalaldehido al 1% en metanol. Agitar (agitador vibrador).

11/- Exactamente 4 minutos despues añadir 0.2 mililitros de ácido sulfúrico 2N. Agitar (agitador vibrador).

Con este último paso tenemos ya preparadas las muestras para su posterior lectura en el espectrofluorímetro.

Las soluciones problema-referencia se obtienen siguiendo fielmente todo el procedimiento que acabamos de detallar pero invirtiendo el orden de los pasos 10 y 11.

Las soluciones estandard se preparan sometiendo 2 mililitros de cada dilución estandard a los pasos 9, 10 y 11 exclusivamente.

Las soluciones estandard-referencia se obtienen tratando 2 mililitros de cada dilución estandard a través de los pasos 9 , 11 y 10 exclusivamente y por ese orden.

La eficacia del método se determinó cebando muestras de placebo y solución de Tyrode con concentraciones conocidas de histamina y sometendolas a todas las manipulaciones del proceso experimental (pasos 1 a 11).

IV. DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS.

En la experimentación con nucleótidos cíclicos cabe distinguir dos fases:

- 1/- Detección de nucleótidos cíclicos en el extracto.
- 2/- Detección de nucleótidos cíclicos en el tejido intestinal.

En el transcurso de la primera fase, se realizó un analisis comparativo del contenido de cAMP y cGMP en extracto esplénico y placebo pre-

parados según la normativa descrita en el apartado I; para ello, se utilizó la técnica del radioinmunoanálisis (RIA).

En la segunda fase se pretendía determinar los niveles de cAMP y cGMP en la pieza intestinal, tras la adición de extracto esplénico ácido. Para ello, se utilizó un método basado en el que describen LEE, KUO, GREENGARD (14) y GARTHWAITE, BALAZS (8), que detallamos a continuación:

Se sacrifica una cobaya de entre 400 y 500 gr de peso, mantenida en ayunas desde 48 horas antes (vease apartado II.4), se le abre el abdomen y a partir de la válvula ileocecal se cortan 6 centímetros de intestino delgado sumergiendolos en solución de Tyrode templada. Se limpia meticulosamente de mesenterio y en su caso de restos alimenticios (vease apartado II.4). Posteriormente, se introduce cuidadosamente por la luz intestinal una barrita de vidrio en la que en uno de sus extremos se ha practicado una pequeña hendidura de bordes suavizados a la llama. Un extremo, el más alejado de la unión ileocecal, se aproxima hasta la hendidura y mediante un hilo se ata la pieza a la barrita utilizando dicha ranura como punto de sujeción. Entonces suavemente y empujando por el extremo opuesto a la ligadura se evierte el intestino de modo que la mucosa quede a la vista. Inmediatamente despues se realizan dos lavados sucesivos con 100 mililitros de solución de Tyrode a 37°C, cada vez, y con ayuda de una espátula y una lupa binocular se elimina la capa mucosa cuidando de no lesionar la capa muscular. A continuación, se corta longitudinalmente el fragmento intestinal de modo que obtenemos una lámina rectangular de células musculares. Dicha lámina se coloca en un porta transparente de plástico y se extiende quedando adherida por capilaridad ya que se halla empapada en solución de Tyrode. Una vez que tenemos así dispuesta la lámina muscular, el porta se coloca sobre una empalizada de finisimas cuchillas de acero (vease apartado III.D en la sección de material) separadas 0,5 milímetros entre sí y mediante una espátula presionamos el porta hasta observar

que las cuchillas traspasan la pieza. Esta operación se realiza dos veces, una en sentido longitudinal y otra en sentido transversal, consiguiendo fragmentar la preparación intestinal en numerosos trocitos de aproximadamente 0.5 x 0.5 mm, que son suspendidos en 50 mililitros de solución de Tyrode a 37°C. Esta suspensión se centrifuga a 1000 g durante 30-60 segundos eliminando a continuación el líquido nutritivo y resuspendiendo los fragmentos en nueva solución de Tyrode a 37°C. El lavado se repite una o dos veces más y finalmente la suspensión se coloca en un baño a 37°C. Con ayuda de un agitador magnético se remueve la suspensión y se divide en partes alicuotas de 2.5 mililitros que contienen alrededor de 11.1 mg de proteína/ml., traspasándolas a pequeñas cápsulas de porcelana. Las alicuotas así preparadas se mantienen en incubación a 37°C. Una vez efectuado esto, se procede a añadir a distintos tiempos de incubación el extracto esplénico ácido.

La cantidad de extracto esplénico ácido añadida a cada alicuota de 2,5 ml fué de 0,1 ml a fin de conservar la proporción respecto a la cantidad utilizada en otros momentos del presente trabajo (1ml/25ml). A los tiempos de incubación que se especifican en el apartado de resultados, las reacciones fueron detenidas mediante ebullición de los incubados (8) y , tras pasarlas a tubos de homogeneización de 12 ml de capacidad, fueron homogeneizados (convenientemente refrigerados) en un homogeneizador de ultrasonidos a una frecuencia de 6 Kciclos durante dos minutos. Estos homogenados se centrifugaron (6000 r.p.m., durante 5 minutos) utilizando los precipitados para la determinación de proteínas (14) y los sobrenadantes se procesaron por RIA mediante kits comerciales del "Radiochemical Centre" (8).

A.- RIA DE cAMP.

El método se basa en la competición que se establece entre el cAMP frío (no-marcado) y una cantidad determinada de cAMP marcado con tritio, para unirse a una proteína que posee gran afinidad y especificidad por el cAMP.

La cantidad de complejo proteína-cAMP marcado , formado durante el proceso, es inversamente proporcional a la cantidad de cAMP-frío presente en la muestra analizada.

La medición de la radiactividad ligada a la proteína nos permite calcular la cantidad de cAMP no-marcado en la muestra.

La separación entre el cAMP unido a la proteína y el cAMP no unido se lleva a cabo mediante adsorción del nucleótido libre en una matriz de "carcoal" y posterior centrifugación.

La radiactividad contenida en partes alicuotas del sobrenadante procedente de la centrifugación se determina mediante la técnica del centelleo líquido.

1.- Preparación de reactivos.

Todos los reactivos utilizados en el RIA de cAMP son componentes de un kit (vease apartado II.E de material) y se suministran en forma de polvo liofilizado.

Las soluciones de estos reactivos se prepararon siguiendo las instrucciones de la firma expendedora "The Radichemical Centre":

Reactivo 1.- Buffer Tris/EDTA: Se disuelve el contenido del frasco en 25 ml de agua destilada para obtener una solución aproximadamente 0.05M con un pH de 7.5 y un contenido de 4 mM de EDTA.

Reactivo 2.- Proteína-ligadora: Se prepara disolviendo el contenido del frasco en 15 ml de agua destilada y agitando suavemente a fin de evitar la formación de espuma.

Reactivo 3.- (8- H^3)-Adenosín 3': 5' monofosfato cíclico (cAMP-marcado): Se disuelve el contenido del vial en 10 ml de agua destilada.

Reactivo 4.- Adenosín 3': 5' monofosfato cíclico (cAMP-frío): Se añaden 5 ml de agua destilada al frasco y se agita obteniéndose una solución con 320 pmoles/ml.

Reactivo 5.- Charcoal: Este material adsorbente se prepara añadiendo 20 ml de agua destilada helada en el recipiente que lo contiene. La suspensión resultante se mantiene en un baño helado y bajo agitación

constante mediante un agitador magnético.

2.- Preparación de los standards.

Se preparan a partir de la solución de cAMP-frío (reactivo 4) del siguiente modo:

Se colocan 0.5 ml de buffer (reactivo 1) en cuatro tubos de ensayo A, B, C, D. En el tubo A se añaden 0.5 ml de solución de cAMP-frío (reactivo 4). En el tubo B se añaden 0.5 ml de solución A, etc.... De modo que obtenemos las siguientes concentraciones standard por 50 microlitros:

Solución de cAMP-frío (react.4)	-----	16	pmol/50 μ l
"	"	A	----- 8 " "
"	"	B	----- 4 " "
"	"	C	----- 2 " "
"	"	D	----- 1 " "

3.- Estabilidad de los reactivos.

Los reactivos 1 a 5 una vez disueltos tienen una duración máxima de una semana si se mantienen en cámara frigorífica a temperaturas de entre 2-4°C y de dos meses si se congelan inmediatamente después de su utilización. En este caso no se aprecian variaciones significativas incluso después de varios ciclos de congelación-descongelación.

El kit completo como tal tiene una duración de 4 meses a partir de la fecha de expedición.

Las soluciones standard de cAMP se preparan poco antes de comenzar la experiencia.

4.- Procedimiento experimental.

El proceso experimental se desarrolló de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el proveedor "The Radiochemical Centre", que describimos a continuación:

1/- Se coloca un número suficiente de pequeños tubos de centrifu-

ga con tapón, en gradillas adecuadas dentro de un baño refrigerado a 2-4°C. Los 14 primeros tubos se utilizan para determinar: dosis "blanco", dosis "cero" y dosis standards, y los siguientes se utilizan para las muestras problema.

2/- Se pipetea 150 microlitros de buffer Tris/EDTA (reactivo 1) en los tubos 1 y 2. Estos tubos sirven para determinar las cuentas de fondo debidas a los reactivos del ensayo.

3/- En los tubos 3 y 4 se pipetea 50 microlitros de buffer Tris/EDTA (reactivo 1). Estos tubos se destinan al analisis de la dosis "cero", es decir, radiactividad total unida a la proteína en ausencia de cAMP-frío.

4/- En los tubos 5-14 se añaden, por duplicado, 50 microlitros de cada dilución de cAMP-frío (reactivo 4) comenzando por la de menor concentración (tubo D).

5/- En los tubos siguientes al tubo número 14 se añaden 50 microlitros de la muestra problema que se quiere analizar.

6/- Se añaden 50 microlitros de cAMP-marcado (reactivo 3) a todos y cada uno de los tubos a procesar.

7/- Tanto en los tubos 3 a 14 como en los tubos problema se añaden 100 microlitros de proteína-ligadora (reactivo 2).

8/- Se agitan (agitador vibrador) todos los tubos durante unos 5 segundos.

9/- Se colocan de nuevo en el baño refrigerado a una temperatura de entre 2-4°C y se les deja incubar por un periodo que puede variar entre 30 minutos y 18 horas. Aunque en 30 minutos la reacción de unión del cAMP con la proteína específica alcanza ya el equilibrio, conviene dejar un tiempo de reacción de unas dos horas con el fin de minimizar la variación dentro del ensayo.

10/- Unos 15 minutos antes de que finalice la incubación se prepara la suspensión adsorbente tal y como se ha descrito anteriormente.

11/- Al finalizar la incubación se añade a todos y cada uno de los tubos 100 microlitros de la suspensión adsorbente (reactivo 5) y se agitan brevemente. No debe añadirse este reactivo más que a aquellos tubos que puedan ser centrifugados de una sola vez.

12/- Una vez que se ha efectuado la adición del adsorbente se procede a centrifugar (12000 r.p.m. durante 10 minutos) tras un periodo de reposo que no debe de exceder los 6 minutos contados desde la adición del adsorbente al último tubo, ni tampoco debe de ser inferior a 1 minuto.

13/- Una vez realizada la centrifugación, con cuidado de no tocar el precipitado, se toman 200 microlitros de cada tubo y se colocan en viales de centelleo con el líquido de centelleo apropiado (vease más adelante). Estos viales así preparados, están ya dispuestos para la lectura en el espectrofotómetro de centelleo líquido.

5.- Especificidad del ensayo.

El ensayo resulta altamente específico para el cAMP. Baste decir que los nucleótidos, potencialmente existentes en extractos como el que nos ocupa, capaces de producir interferencias en el ensayo: ATP y cGMP, deben de exceder en 1 millón y 200 veces respectivamente a la cantidad de cAMP presente en el tubo de ensayo para dar lugar a reacciones cruzadas. Ello descarta la posibilidad de tales interferencias por parte del ATP y también del cGMP a la vista de las concentraciones de este nucleótido halladas en diversos tejidos (20).

Por otro lado, todos los reactivos del kit poseen cierta cantidad de EDTA, sustancia que inhibe marcadamente la actividad de la fosfodiesterasa (4) evitando con ello posibles pérdidas de cAMP.

B.- RIA DE cGMP.

El fundamento de este ensayo estriba en la competencia que se establece entre el cGMP-frío y una cantidad fija de cGMP-marcado con tritio por unirse a un antisuero altamente específico para el cGMP.

La cantidad de cGMP marcado que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de cGMP presente en la muestra a analizar. Midiendo la radiactividad unida al anticuerpo podemos calcular la cantidad de cGMP-frío de la muestra.

La separación entre el cGMP unido al anticuerpo y el cGMP libre se lleva a cabo por precipitación con sulfato amónico y posterior centrifugación. El precipitado que contiene el complejo cGMP-anticuerpo se redisuelve en agua, después de haber eliminado el sobrenadante, y se añade a frascos de centelleo para su posterior contaje.

1.- Preparación de los reactivos.

Todos los reactivos utilizados en el RIA de cGMP vienen, al igual que los del RIA de cAMP, en forma de polvo seco (vease apartado II.E de material).

Las soluciones se han preparado siguiendo las instrucciones especificadas por "The Radiochemical Centre":

Reactivo 1.- Buffer Tris/EDTA: Disolver el contenido del vial en 25 mililitros de agua destilada. Se obtiene así una solución 0.05M, a pH = 7.5, que contiene 4mM de EDTA.

Reactivo 2.- Anticuerpo: Añadir 7.5 mililitros de agua destilada al frasco y agitarlo suavemente para evitar la formación de espuma.

Reactivo 3.- (8- H^3)-Guanosín 3': 5' monofosfato cíclico, (cGMP-marcado): Añadir 10 mililitros de agua destilada y agitar.

Reactivo 4.- Guanosín 3': 5' monofosfato cíclico, (cGMP-frío): Destapar con cuidado el vial para evitar pérdidas de material y añadir 5 mililitros de agua destilada. Agitar.

Reactivo 5.- Reactivo "blanco": Añadir 2 mililitros de agua destilada y agitar.

Reactivo 6.- Sulfato amónico: Poner el contenido del frasco en un Erlenmeyer de 200 mililitros de capacidad y añadir 150 mililitros de agua destilada fría (Esta solución no debe hacerse en matraz aforado

enrasando a 150 mililitros puesto que de este modo se obtiene una solución incorrecta). Agitar hasta la completa disolución del reactivo y mantenerlo en cámara frigorífica a temperaturas entre 2-4°C hasta el momento de su utilización.

La cantidad de sulfato amónico es de 58.8 gramos y al disolverlos en 150 mililitros de agua destilada da como resultado una solución saturada al 60%.

2.- Preparación de los standards.

Después de reconstituir el reactivo 4 se obtiene una solución con 8 pmoles de cGMP/100 microlitros. Los demás standards de 4, 2, 1 y 0.5 pmoles/100 microlitros, se preparan del modo siguiente: En 4 tubos A, B, C, D, se añaden 0.5 ml de buffer Tris/EDTA (reactivo 1). Al tubo A se le añaden 0.5 ml de reactivo 4 obteniendo una dilución 1/2 (4pmol). Al tubo B se le añaden 0.5 ml del tubo A para conseguir una dilución 1/4 (2 pmol) y así sucesivamente. Al final obtendremos 5 concentraciones estandar:

Solución de cGMP original (react. 4)	-----	8 pmol/100	1
" A	-----	4 "	"
" B	-----	2 "	"
" C	-----	1 "	"
" D	-----	.5 "	"

En varias ocasiones se utilizó un sexto estandar con 0.25 pmol/100 microlitros.

3.- Estabilidad de los reactivos.

En estado de polvo seco puede permanecer almacenado durante 3 meses a 2-4°C sin cambios apreciables.

En solución son estables durante dos semanas a 2-4°C y durante dos meses si se congelan inmediatamente después de su uso y se mantienen

a temperaturas bajo cero. En este caso pueden realizarse hasta 6 ciclos de congelación-descongelación sin variaciones apreciables de calidad.

Las diluciones estandar se prepararon poco antes del comienzo de cada experiencia.

4.- Procedimiento experimental.

Se siguió el recomendado por "The Radiochemical Centre", que describimos a continuación:

1/- Se coloca un número de tubos con tapón, suficientes para el análisis de estandards, dosis "cero", dosis "blanco" y problemas a determinar, en un baño refrigerado entre 2-4°C.

2/- Se pipetea 50 microlitros de cGMP-marcado (reactivo 3) en cada uno de los tubos a ensayar.

3/- Se pipetea 100 microlitros de buffer (reactivo 1) en los tubos 1 y 2. Estos tubos se emplearan para determinar la dosis "cero", es decir, la unión de cGMP-marcado al antisuero en ausencia de cGMP-frío.

4/- En los tubos 3-12 se añaden 100 microlitros de cada dilución estandar comenzando por la más diluída. Cada dilución se analiza por duplicado.

5/- En los tubos dispuestos para los problemas se añaden 100 microlitros del problema a analizar.

6/- En los tubos 13 y 14 se añaden 100 microlitros de reactivo blanco (reactivo 5). Este reactivo desplaza completamente al cGMP-marcado de los lugares de unión al antisuero y por ello estos tubos se utilizan para determinar el número de cuentas achacables a los reactivos del ensayo.

7/- Una vez que se ha procedido del modo expuesto, se añaden 50 microlitros de antisuero (reactivo 2) a todos y cada uno de los tubos. Se tapan y se agitan durante unos segundos (agitador vibrador).

8/- Tras la agitación los tubos se dejan reposar a 2-4°C por espacio de una hora y media; tiempo suficiente para que se alcance el

equilibrio de la reacción de unión : cGMP-antisuero.

La incubación puede prolongarse hasta 18 horas sin problemas, siempre y cuando todos los tubos esten sujetos a la misma condición.

9/- Acabada la incubación se destapan los tubos y se añade 1 ml de sulfato amónico helado a tantos tubos como puedan ser centrifugados de una sola vez. Se agitan (agitador vibrador) unos segundos y se colocan de nuevo en el baño frío durante 5 minutos contados desde la adición de sulfato amónico al último tubo.

10/- Transcurridos los cinco minutos se procede a centrifugarlos (8000 r.p.m. durante 10 minutos).

11/- Efectuado lo cual se decanta el sobrenadante y se deshecha, limpiando la embocadura de los tubos con un trocito de tejido para eliminar pequeñas gotas de sobrenadante que hayan podido quedar adheridas. Este sistema se sustituyó, tras el correspondiente estudio comparativo, por un sistema menos engorroso consistente en aspirar el sobrenadante mediante el vacío realizado por una trompa de agua.

12/- Al finalizar el procesado de todos los tubos se agrega en cada uno 1,1 ml de agua destilada. Se tapan y se agitan hasta la completa redisolución de todo el precipitado. Una vez concluída esta operación se toma 1 ml de cada muestra y se coloca en su correspondiente vial de centelleo a fin de proceder a su posterior lectura.

5.- Especificidad del ensayo.

Resulta altamente específico para el cGMP puesto que para la aparición de interferencias es necesaria la presencia en la muestra a analizar de aproximadamente 100.000 veces más cAMP que cGMP, lo que es muy poco probable dadas las cifras normales de cAMP en este tipo de fluídos biológicos (20).

Otros nucleótidos como el ATP, ADP, AMP y GTP, GDP, GMP, deben de exceder en 500.000 y 50.000 veces, respectivamente a la cantidad de cGMP para producir interferencias.

La presencia de EDTA en cada uno de los reactivos asegura la máxima provisión de cGMP puesto que evita su metabolización a cargo de la -- fosfodiesterasa (4).

C.- TECNICA DE CENTELLEO LIQUIDO.

Es una técnica ampliamente utilizada para medir isótopos emisores de partículas beta, tales como el carbono-14 y el tritio. Se basa en la capacidad que ciertas sustancias llamadas "centelleantes" ("scintillators") poseen para captar la energía radiante liberada durante la emisión de una partícula beta y reexpedirla en forma de luz (13).

Existen dos tipos de sustancias "centelleantes": primarias y secundarias. Las primarias son sustancias con gran capacidad de producción de luz en presencia de energía radiante; mientras que las secundarias se utilizan en función de las características ópticas del aparato de lectura e contador y sobre todo para disminuir la posibilidad de pérdida de cuentas ("quenching") y elevar con ello la eficacia del método. Su actividad primordial consiste en absorber la luz emitida por la sustancia centelleante primaria y reemitirla a una longitud de onda mayor, de modo que se halle en la zona de máxima sensibilidad del espectrofotómetro de centelleo.

Además de las sustancias "centelleantes", la preparación de la solución de centelleo requiere de solventes apropiados. La elección de los mismos se efectúa en función de su solubilidad para la muestra a analizar y de su transparencia a la energía radiante. Si la muestra es soluble en disolventes orgánicos suele utilizarse el tolueno y si, por el contrario, es acuosa se utiliza el 1,4 dioxano dada su miscibilidad con el agua.

1.- Solución de centelleo.

En el caso que nos ocupa las muestras a analizar eran acuosas por lo que la solución de centelleo debía ser miscible con el agua.

Existen varias fórmulas para preparar esta solución y de todas ellas elegimos la fórmula de BRAY (3), por tres razones fundamentales: su elevada miscibilidad con el agua, su buena eficacia, y por ser una de las soluciones de centelleo que "The Radiochemical Centre" recomienda para estos kits.

La solución de BRAY es como sigue:

- Dioxano ----- c.s.p. 1 litro
- Metanol ----- 100 ml.
- Etilenglicol ----- 20 ml.
- Naftaleno ----- 60 gr.
- PPO ----- 4 gr.
- Dimetil-POPOP ----- 200 mgr.

El dioxano durante su almacenamiento suele formar peróxidos que propician la aparición de "quenching", para evitarlo le adicionabamos 1 mgr de dietil-ditiocarbamato sódico/100 ml (13).

Esta solución así preparada acepta por encima del 20% de agua.

2.- Preparación de los viales para la lectura.

Una vez preparada la solución de centelleo se reparte en viales de vidrio con tapón roscado a razón de 10ml en cada vial. Posteriormente, se agrega a cada uno el correspondiente volumen de las muestras procedentes del RIA y tras suave agitación se les permite reposar en la bandeja del contador por un periodo de entre 2 y 3 horas, transcurridas las cuales se procede a su lectura.

3.- Lectura.

El espectrofotómetro de centelleo (contador) es un aparato que, simplificando al máximo, funciona del modo siguiente (vease figura:4.5):

Los frascos colocados en la bandeja son transportados mediante un cinturón de arrastre hasta el nicho de lectura. Una vez allí, mediante una pequeña plataforma dotada de movimiento ascendente y descendente

el frasco accede al interior del nicho ubicándose a la altura del tubo fotomultiplicador.

La energía radiante liberada durante la emisión de partículas beta por el isótopo radiactivo atraviesa los solventes de un modo proporcional a su transparencia a la radiación y alcanza a las sustancias "centelleantes" que absorben dicha energía y la reemiten en forma de luz (fotones) cuya intensidad será proporcional a la energía recibida. Esta luz (fotones) llega a un fotocátodo en el tubo fotomultiplicador y convierte dichos fotones en fotoelectrones primarios.

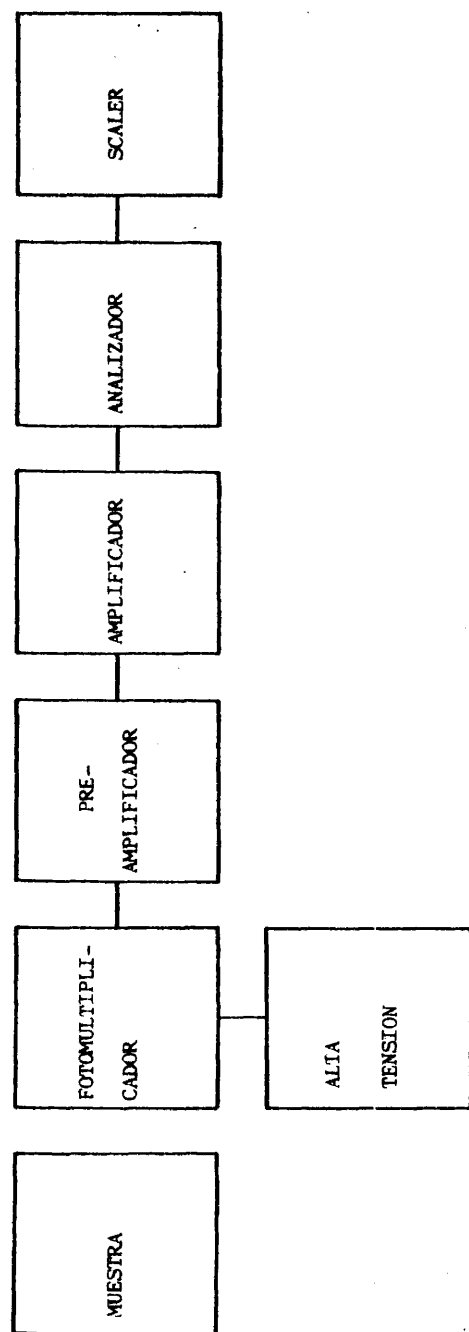
Los fotoelectrones primarios son multiplicados en el tubo fotomultiplicador produciéndose pulsos eléctricos mensurables (cada partícula beta emitida daría lugar a un pulso eléctrico) que son amplificados, a continuación, por una unidad amplificadora. Los pulsos amplificados atraviesan un analizador que actúa a modo de filtro y posteriormente un detector ("scaler") capta los pulsos y los anota en un display digital como simples cuentas.

Las lecturas se registran en papel como cuentas por minuto (c.p.m.), mediante un teletipo.

En nuestro caso, las condiciones de lectura fueron las siguientes:

- Isótopo : tritio
- Tiempo de lectura: 4 minutos (tal y como recomienda "The Radiochemical Centre").
- Número de lecturas de cada vial: 2
- Cada lectura fué automáticamente contrastada por el propio aparato, merced a una fuente de Cesio que actuaba como estandard externo.

La eficacia del RIA para ambos nucleótidos se determinó en la primera fase (extracto-placebo) cebando alicuotas de placebo con una cantidad conocida de cAMP y cGMP respectivamente. Y en la segunda fase (extracto de tejido intestinal) se determinó añadiendo a alicuotas de



Figura, 4.5.: (Modificada de la ref.: 13)

de solución de Tyrode, cantidades conocidas de ambos nucleótidos y sometiéndolas a todas las operaciones de extracción especificadas al comienzo del presente apartado.

V. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Los precipitados protéicos procedentes de los homogenados destinados a la medición de nucleótidos cíclicos eran recogidos y tras diluirlos con 3 ml de agua destilada eran congelados y conservados a -20°C hasta el momento de su determinación. El método utilizado, para ello, fué una variante automatizada del clásico método de LOWRY (11, 15).

Este método se basa en que al añadir sucesivamente una sal de cobre en medio alcalino y el reactivo de fenoles de Folin-Cicoaltea a una solución protéica diluída, ésta desarrolla una coloración azul que guarda proporción con la cantidad de proteínas. Dicha coloración es el resultado de la reacción del cobre sobre los enlaces peptídicos (biuret) y de la reducción del ácido fosfo-túngstico-molíbídico por la tirosina, el triptófano y la cisteína.

La nueva versión automatizada de éste método, puesta a punto en nuestro laboratorio, aparece esquemáticamente descrita en el protocolo adjunto.

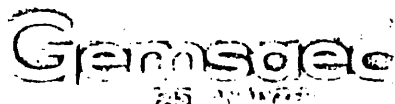
VI. CALCULOS.

A.- En la determinación de histamina.

El contenido de histamina en las muestras problema se obtiene extrapolando sus correspondientes valores de fluorescencia, sobre una recta standard construída a partir de las lecturas de fluorescencia de cinco soluciones de histamina de concentración conocida.

Cada una de las soluciones standard de histamina se analiza por triplicado. Por tanto, el valor de fluorescencia utilizado es la media de tres valores:

$$\text{Fstd.} = \frac{\text{Fstd}' + \text{Fstd}'' + \text{Fstd}'''}{3}$$



ELECTRO-NUCLEONICS INC.
EUROPE
Tramsingel 39 - Breda - Holland
Tel. 01600-45565

Procedure sheet for **PROTEINAS · TOTALES (LOWRY)**

Reaction

Rotoloader instructions

Sample volume 10 µl. (50%)¹⁾ Into Well
Flush volume 50 µl. (25%)¹⁾
Reagent I volume 400 µl. (40%)¹⁾ Into Well
Reagent II volume 40 µl. (80%)¹⁾ Into Well

¹⁾ for pumps of 20, 200, 1000, 50

Sample switch position C
Blank switch position Reagent
Standard into position 2

Sample

Solución proteica (ileon de cobaya)
diluída 1/30

Gemsac instructions

Reaction temp. 37°C
Wavelength 600nm
Filter position 560-785
Reaction mode end-point
Running mode auto

Reagent preparation

A-Solución alcalina:

- Carbonato de sodio anhidro: 20grs.
- Tartrato de sodio y potasio: 0.2grs
- Hidróxido de sodio 0.1N : 1 litro

Initial Reading	Reading Interval	Number of Readings
180 sec.	30 sec.	1

B-Solución cúprica:

- Sulfato de cobre. 5H₂O : 0.5grs.
- Acido sulfúrico (conc.): 1 gota
- Agua destilada : 100ml.

Computer instruction

IR = 180 TC = 1 HI =
RI = 30 AD = 4 LO =
NR = 1 CD = 2 RM =
TF = 1.00 SA = 2 XX =
SC = 0,58
KT = 1.00

C-Folin-Cicoaltea (Merck)

REACTIVO I : 50 ml de A + 1 ml de B
(estabilidad 24 horas).

REACTIVO II: 1 ml de C en 2 ml de agua
destilada (estabilidad 24 horas a 4°C).

Specific procedure notes

Patrón Ortho, 5,8 grs/100 ml, diluido
1/100. Debidamente contrastado con
un patrón de seroalbumina bovina
aplicando el método manual.

Una vez preparado el disco, incubarlo
5 minutos a 37°C

References

Lo mismo ocurre con las soluciones "estándar-referencia" y en consecuencia:

$$F_{std-ref.} = \frac{F_{std-ref.'} + F_{std-ref.``} + F_{std-ref.``'}}{3}$$

La fluorescencia final de cada concentración estándar viene dada por:

$$F_{std} - F_{std-ref.} = F_s$$

Así pues, si en un sistema de coordenadas cartesianas representamos los valores de F_s en ordenadas frente a las respectivas concentraciones en abscisas definiremos cinco puntos con los que construir la correspondiente recta estándar.

La fluorescencia F_p final de las muestras problema se calcula de un modo idéntico, pero teniendo en cuenta, que en este caso el análisis se verifica por duplicado.

Los valores de F_p vienen, además, corregidos en virtud del porcentaje de recuperación del método, estimado en un 60% (18), que en nuestro caso fué del 50,1% durante el primer bloque experimental y del 45,75% en el segundo bloque.

La corrección se lleva a cabo multiplicando la F_p por 100 y dividiendo por el porcentaje de recuperación, es decir:

$$\frac{F_p \times 100}{50,1}$$

y

$$\frac{F_p \times 100}{45,75}$$

0. lo que es lo mismo: $F_p \times 2$ y $F_p \times 2,2$ respectivamente.

Al extrapolar los valores de F_p sobre la recta estándar obtenemos las concentraciones correspondientes expresadas en microgramos/ml.

La construcción de la recta de regresión así como la extrapolación de las fluorescencias problema se efectuaron con el auxilio de un

ordenador acoplado a un graficador, debidamente programados.

B.- En la determinación de nucleótidos cíclicos.

Las lecturas realizadas por el espectrofotómetro de centelleo vienen expresadas en cuentas por minuto (c.p.m.). Normalmente, las variaciones del número de cuentas entre las muestras no son grandes, lo que permite el uso directo de las c.p.m. sin necesidad de recurrir a transformarlas en desintegraciones por minuto.

Conviene indicar que todas las muestras se procesaban por duplicado y que en cada ensayo se determinaban dos series de concentraciones estandard conocidas (4 tubos de cada concentración) en cada una de las cuales se insertaban pares de tubos destinados a medir la dosis "cero" (radiactividad unida a la proteína específica en ausencia de nucleótido cíclico no-marcado) y la dosis "blanco" (radiactividad de "fondo" debida a los reactivos y al propio contador). Así pues, los valores finales constituían la media de dos valores para las muestras problema y de cuatro valores para las demás muestras.

Una vez obtenidos estos promedios en c.p.m., se les restaba el valor medio de la dosis "blanco" a fin de eliminar las cuentas de "fondo" y posteriormente se construía una curva estandard mediante los patrones de concentración conocida. Para ello, entre varios métodos de representación gráfica, se eligió el método Logit/log, ya que posee una gran linealidad que mejora sensiblemente la exactitud y reproductibilidad de los resultados (16).

Este método consiste en representar en un sistema de coordenadas métricas, Logit Y en función del logaritmo de la concentración (Log C). La ecuación de la recta subsiguiente viene dada por:

$$\text{Logit } Y = \pm P \log C \pm Q$$

En donde,

$$Y = \frac{B}{T} \times 100$$

Es decir, porcentaje de nucleótido cíclico marcado combinado con la proteína, siendo B = número de c.p.m., obtenidas con cada concentración estandar y T = número de c.p.m. totales correspondientes a la dosis "cero".

Y,

$$\text{Logit } Y = \ln \left[\frac{Y}{100-Y} \right]$$

Una vez definida la pendiente P y el termino independiente Q de la ecuación de la recta, mediante las cinco concentraciones estandar, podemos calcular la concentración de los problemas con solo despejar log de C en dicha ecuación.

En nuestro caso, una vez conocidas las distintas funciones matemáticas necesarias, se realizó un programa que grabado en tarjeta magnética permitía procesar todos los datos en una calculadora dotada de graficador, de modo que, introduciendo los valores en c.p.m. y las concentraciones estandar, se obtenían directamente la curva patrón y las concentraciones de las muestras problema en pmoles/tubo.

En éste caso no fué necesario efectuar ninguna corrección puesto que la eficacia del método rondaba el 100%.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AINZ, L.F., (1974): "Efectos de algunos extractos hidrosolubles sobre músculo liso vascular y no vascular". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Bilbao.
- 2.- ARMSTRONG, G., (1970): Manual de prácticas de fisiología. 2ª edición. Editorial Interamericana, S.A.
- 3.- BRAY, G.A., (1960): "A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter". Anal. Biochem. 1:279-285.
- 4.- CHASIN, M., HARRIS, D.N., (1976): "Inhibitors and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase". Adv. Cyclic Nucleotide Res. 7:225-264
- 5.- COLOWICK, S.P., (1957): Methods in enzymology vol.III, pp: 85-86. Academic Press Inc. Publishers, N.Y.
- 6.- GADDUM, J.H., PICARELLI, Z.P., (1957): "Two kinds of tryptamine receptor". Br.J.Pharmac.Chemother. 12:323-328.
- 7.- GANDARIAS, J.M., (1971): "Regulación de la presión arterial:nuevas -- aportaciones". Real Academia de Medicina de Bilbao. Discurso para la recepción pública de Académico electo.
- 8.- GARTHWAITE, J., BALAZS, R., (1978): "Supersensitivity to the cyclic -- GMP response to glutamate during cerebellar maturation". Nature 275:- 328-329.
- 9.- GONZALEZ, J.A. (1970): "Influencias de distintos extractos orgánicos sobre la motilidad de la musculatura lisa. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.
- 10.- EDINBURGH UNIVERSITY (The staff of the Department of Pharmacology), (1970): "Pharmacological experiments on isolated preparations". E.S. Livingstone, Edinburgh and London.
- 11.- HARTMANN, L., (1971): "Techniques modernes de laboratoire et explorations fonctionnelles". Tomo I, L'expansion scientifique française, -- (Paris).
- 12.- JOHANSSON, S., ANDERSSON, R.G.G., (1975): "Variations of cyclic nucleotide levels during spontaneous uterine contractions". Experientia, -- 31:1314-1315.

- 13.- KOBAYASHI, Y., MAUDSLEY, D.V., (1969): "Practical aspects of liquid scintillation counting". En: "Methods of Biochemical Analysis". - Vol. 17, pp: 55-133, (Ed.: GLICK, D.). INTERSCIENCE publishers (N. York, London).
- 14.- LEE, T.P., KUO, J.F., GREENGARD, P., (1972): "Role of muscarinic cholinergic receptors in regulation of guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate content in mammalian brain, heart muscle, and intestinal smooth muscle". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:3287-3291.
- 15.- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, L., RANDALL, R., (1951): "protein measurement with the Folin Phenol reagent". J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 16.- NUÑEZ, J., RUIZ DE ALMODOVAR, M., ESCOBAR JIMENEZ, F., ABELLAN, M., -- MARTOS, J., DE LA HIGUERA, J., (1977): "Valoración de cinco métodos matemáticos para el ajuste del RIA de insulina". Diag. Biol. XXVI: 479-487.
- 17.- PAMO, J.M., (1969): "Influencia de los extractos orgánicos ácidos sobre la actividad motórica de piezas intestinales". Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.
- 18.- SHORE, P.A., BURKHALTER, COHN, V.H., Jr., (1959). J. Pharmac. Exp. -- Ther. 127:182.
- 19.- SOMOGYI, (1945). J. Biol. Chem. 160:62.
- 20.- STEINER, A.L., PAGLIARA, A.S., CHASE, L.R., KIPNIS, D.M., (1972): "Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II.-Adenosine 3',5'- monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids". J. Biol. Chem. 247:1114-1120.

5. RESULTADOS

I. DISTRIBUCION ESQUEMATICA.

A/.- PRUEBAS FISIO-FARMACOLOGICAS.

En las que se incluyen los distintos resultados obtenidos durante la experimentación en íleon aislado; es decir:

- 1.- Pruebas con extracto esplénico ácido.
- 2.- Pruebas con histamina.
- 3.- Pruebas de antagonismo con antihistamínicos.
- 4.- Pruebas con serotonina.
- 5.- Pruebas de antagonismo con antiserotonínicos.

B/.- DETERMINACIONES BIOQUIMICAS.

- 1.- Determinación de histamina:
 - a/.- En extracto esplénico y placebo.
 - b/.- En la solución nutritiva que baña a la pieza intestinal.
- 2.- Determinación de nucleótidos cíclicos:
 - a/.- En extracto esplénico y placebo.
 - b/.- En la pieza intestinal.
 - c/.- Apéndice: Determinación de proteínas.

C/.- RESUMEN.

II. RESULTADOS OBTENIDOS.

A.- Pruebas fisio-farmacológicas.

Estas pruebas se efectuaron bajo condiciones experimentales comunes que se detallan a continuación:

-Baño de órganos:

- Temperatura 37° C
- Solución nutritiva de Tyrode conteniendo $5,1 \times 10^{-6}$ moles de sulfato de atropina por milímetro.
- Gaseado con aire (directo).
- Lavado por rebosamiento 50 ml. Volumen final 25 ml.

-Transductor: El transductor utilizado fué del tipo isotónico diferencial. El contrapeso unido a la pieza intestinal pesaba 500 mg.

-Registrador: Las características del registrador fueron:

- velocidad: 25 mm/min.
- sensibilidad: 100 mV/cm.

A.1- Pruebas con extracto esplénico ácido (E.E.A.).

Al añadir E.E.A., en dosis de 1 ml. equivalente a 100 mgrs. de tejido fresco, se observó un rápido y considerable aumento de la línea basal de tono, tal y como puede apreciarse en las figuras 5.1 a 5.4.

Tras el lavado las preparaciones recuperaron su ritmo inicial.

Paralelamente, se presentan registros de motilidad en pruebas testigo, figuras 5.5 y 5.6, a las que se añadió placebo con idéntico pH al del extracto esplénico, a fin de contrastar sus efectos. Dichas adiciones no modificaron los niveles medios establecidos en reposo.

EXTRACTO ESPLENICO ACIDO.

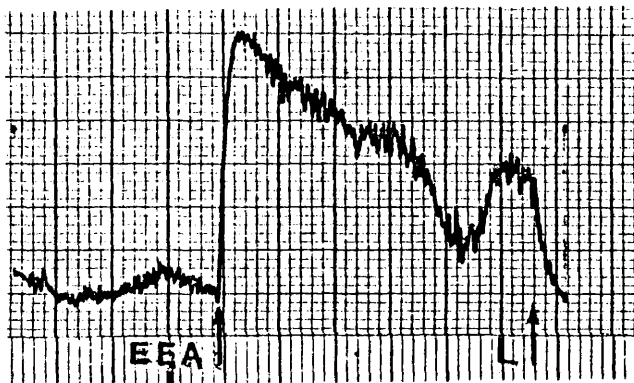


figura 5.1

ileon de cobaya hembra, peso 390 gr.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO.

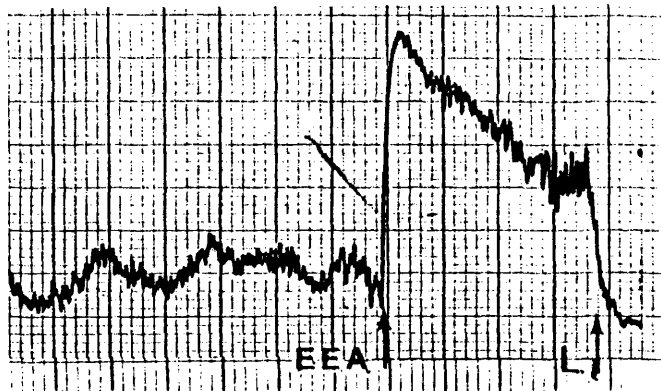


figura 5.2

íleon de cobaya hembra, peso: 327 gr.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO.

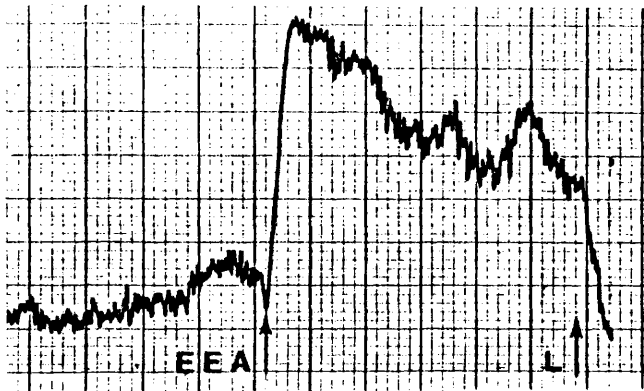


figura 5.3

íleon de cobaya hembra, peso: 366 gr

EXTRACTO ESPLENICO ACIDO.

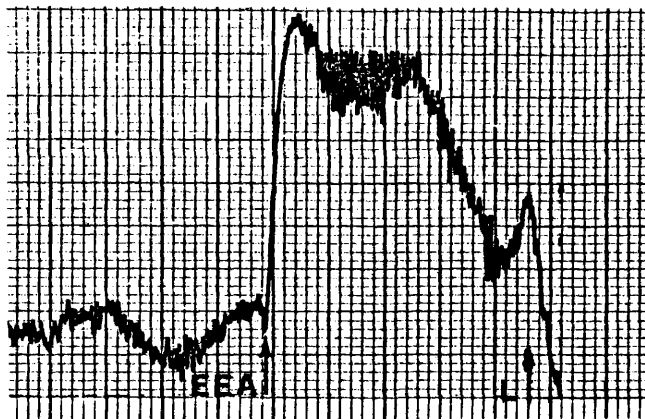


figura 5.4

hleon de cobaya macho, peso: 312 gr.

PLACEBO ACIDO.

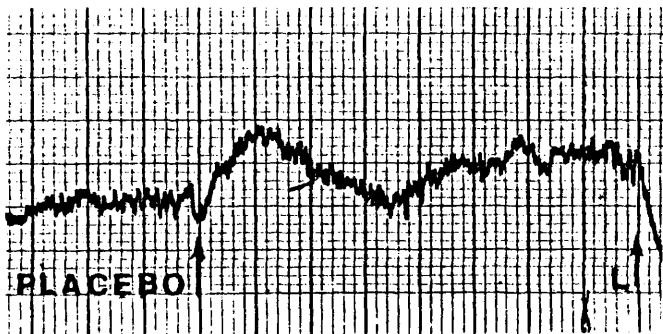


figura 5.6

leon de cobaya hembra, peso: 306,5 gr.

PLACEBO ACIDO

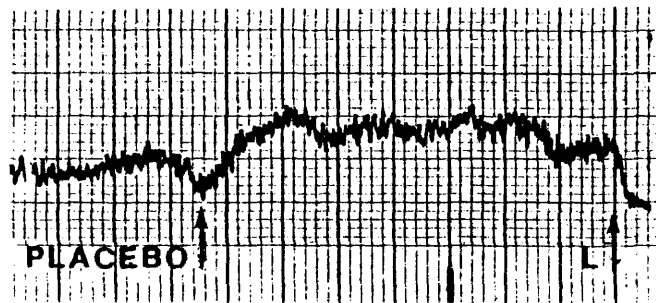


figura 5.5

íleon de cobaya hembra, peso: 319 gr.

A.2- Pruebas con histamina:

En las figuras 5.7 y 5.8 se advierten los registros de la motilidad intestinal obtenidos tras la adición de 1 ml de clorhidrato de histamina. La concentración final en la copa del baño de órganos era de 2×10^{-7} moles/ml de solución nutritiva. Como puede apreciarse, las respuestas propiciadas por la histamina son similares a aquellas registradas al ensayar el extracto esplénico ácido.

CLORHIDRATO DE HISTAMINA.

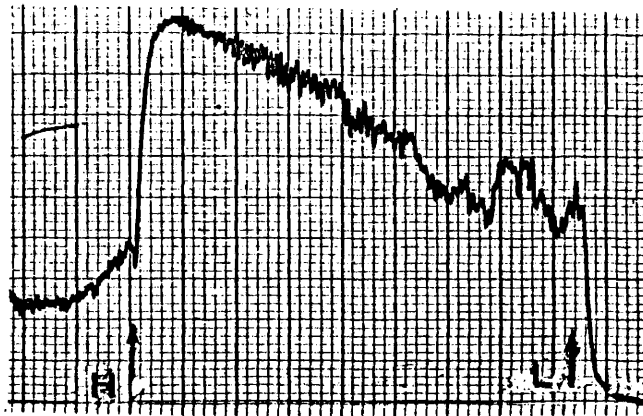


figura 5.7

íleon de cobaya hembra, peso: 350 gr.

CLORHIDRATO DE HISTAMINA.

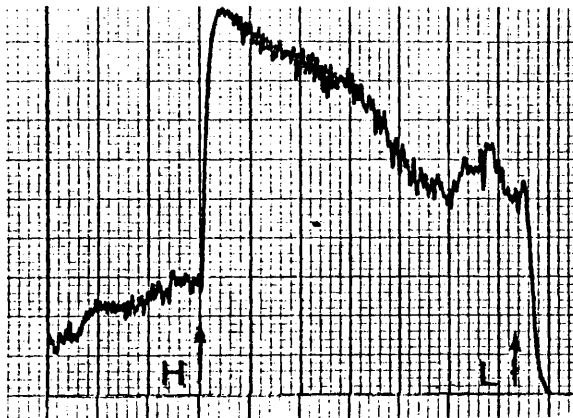


figura 5.8

ileon de cobaya macho, peso: 452 gr.

A.3- Pruebas de antagonismo con antihistamínicos.

En la sección que sigue a continuación se investigó el efecto que antagonistas selectivos de receptores H_1 de histamina despliegan sobre la acción del extracto esplénico ácido. Para ello se utilizaron dos antihistamínicos, el maleato de d-clorofeniramina (Polaramine) y el clorhidrato de difenhidramina (Benadryl).

La capacidad antagonista de ambos antihistamínicos queda patente en las figuras 5.10, 5.11, 5.12 y 5.13 en las que se anota la supresión de la respuesta a la histamina (2×10^{-7} moles/ml de Tyrode) cuando se ha procedido a la adición previa de 1 ml (5 minutos antes) de Polaramine y Benadryl en concentraciones (finales en copa) de 3.8×10^{-7} y 3.8×10^{-6} moles/ml de solución de Tyrode, respectivamente.

En las figuras 5.14, 5.15, 5.16, y 5.17 se presentan registros en los que ambos antihistamínicos, en idénticas condiciones a las que acabamos de exponer, anulan prácticamente la acción del extracto esplénico ácido.

HISTAMINA + MALEATO DE D-CLOROFENIRAMINA (P).

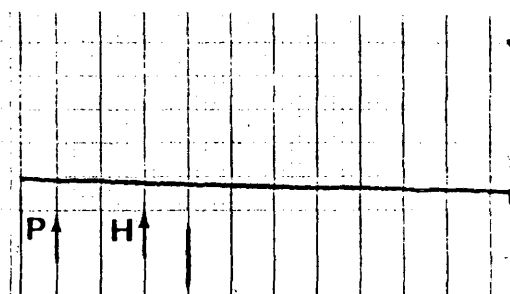
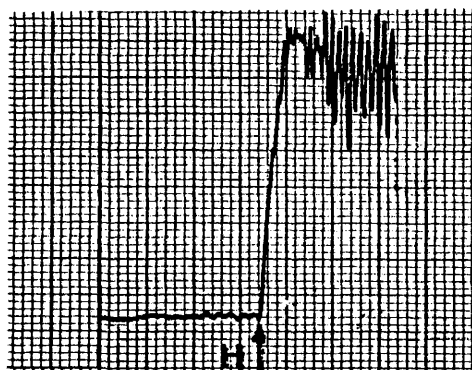


figura 5.10

fleon de cobaya hembra, peso: 349 grs.

HISTAMINA + MALEATO DE D-CLOROFENIRAMINA (P).

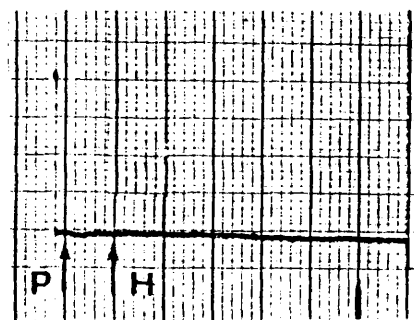
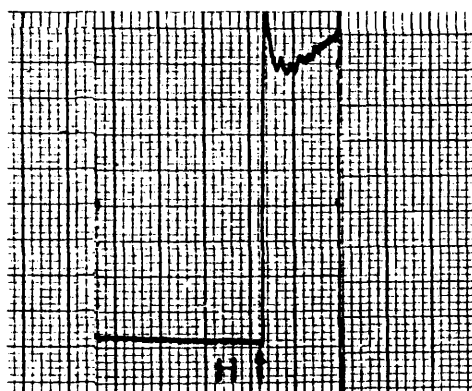


figura 5.11

ileon de cobaya macho, peso: 350 grs.

HISTAMINA + CLORHIDRATO DE DIFENHIDRAMINA(B).

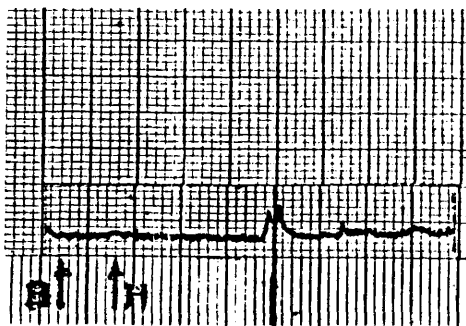
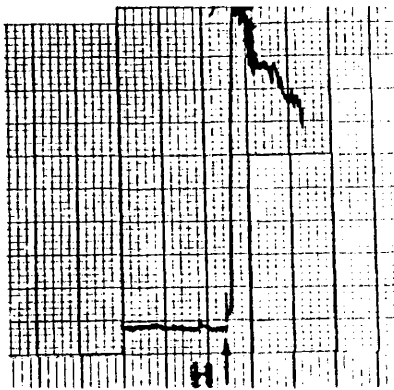


figura 5.12

íleon de cobaya hembra, peso: 483 grs.

HISTAMINA + CLORHIDRATO DE DIFENHIDRAMINA(B).

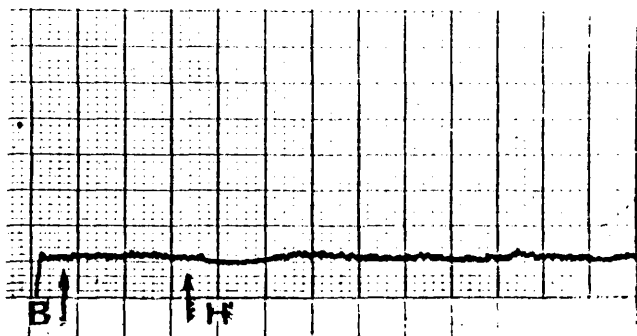
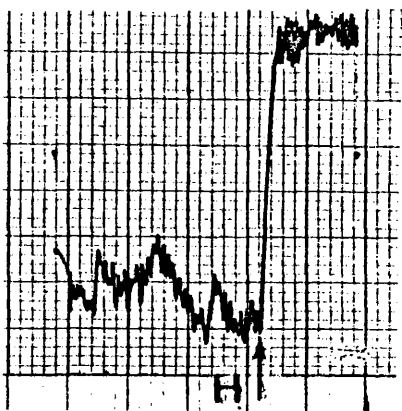


figura 5.13

íleon de cobaya hembra, peso: 385 grs.

EXTRACTO ESPLENICO ACIDO + MALEATO DE D-CLOROFENIRAMINA(P).

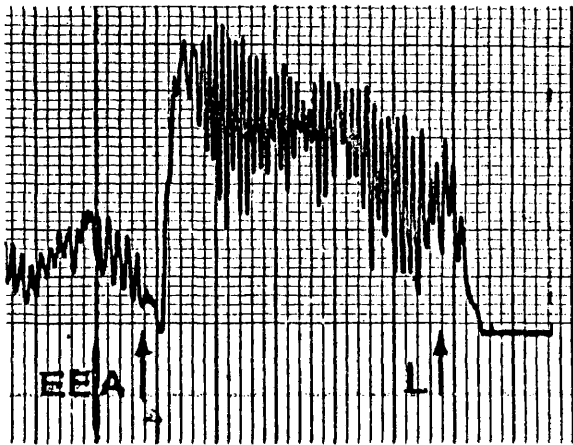


figura 5.14

íleon de cobaya hembra, peso: 349 grs.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO + MALEATO DE D-CLOROFENIRAMINA(P).

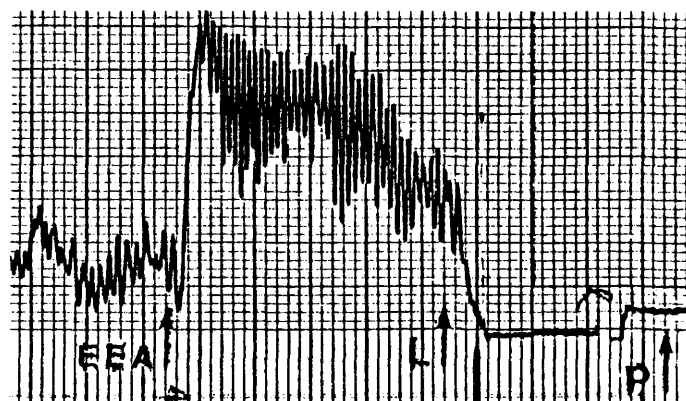


figura 5.15

íleon de cobaya hembra, peso: 390 grs.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO + CLORHIDRATO DE DIFENHIDRAMINA (B).

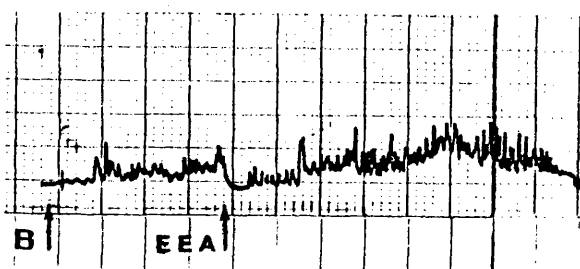
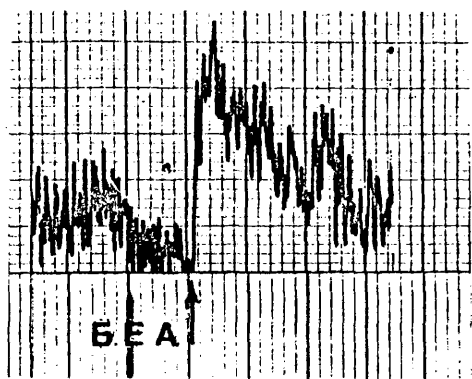


figura 5.16

íleon de cobaya hembra, peso: 483 grs.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO + CLORHIDRATO DE DIFENHIDRAMINA (B).

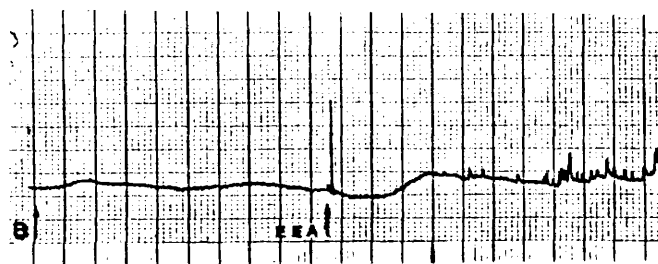
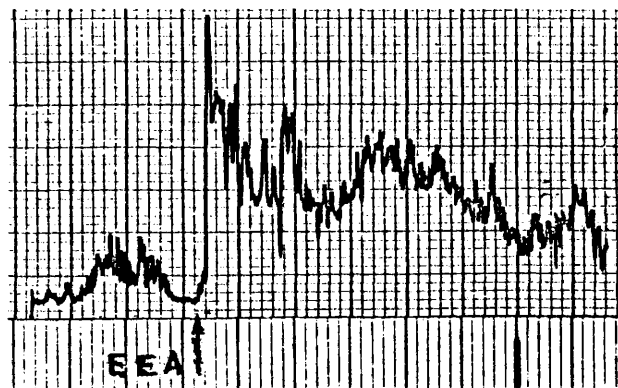


figura 5.17
fleon de cobaya hembra, peso: 385 grs.

A.4- Pruebas con serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT).

En las figuras 5.18 y 5.19 se advierten los registros de la motilidad intestinal obtenidos tras la adición de 1 ml de 5-hidroxi-triptamina. La concentración final en la copa del baño de órganos era de 1×10^{-5} moles/ml de solución nutritiva. En todos los casos obtuvimos respuestas mucho menores a aquellas registradas al ensayar la histamina y el extracto esplénico ácido.

5-HIDROXI-TRIPTAMINA (5-HT).

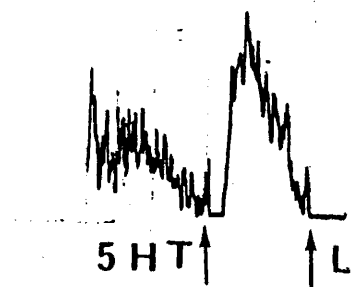


figura 5.18

íleon de cobaya hembra, peso: 522 grs.

5-HIDROXI-TRIPTAMINA (5-HT).

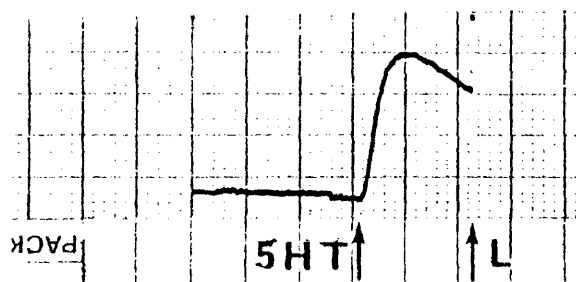


figura 5.19

ileon de cobaya hembra, peso: 502 grs.

A.5- Pruebas de antagonismo con antiserotonínicos.

En la sección que sigue a continuación se investigó el efecto que antagonistas selectivos de receptores "D" de serotonina despliegan sobre la acción del extracto esplénico ácido. Para ello se utilizó el antiserotonínico dimaleato de metisergida (MSD).

La capacidad antagonista del dimaleato de metisergida queda patente en las figuras 5.20 y 5.21, en las que se anota la supresión de la respuesta a la serotonina (concentración final: 1×10^{-5} moles/ml de Tyrode) cuando se ha procedido a la adición previa (5 minutos antes) de 1 mililitro de dimaleato de metisergida en una concentración final en copa de 2.5×10^{-6} moles/ml de solución de Tyrode.

Con el fin de descartar la eventual actividad antihistamínica del dimaleato de metisergida se llevaron a cabo una serie de ensayos en los que se enfrentó dimaleato de metisergida en las condiciones que acabamos de detallar e histamina a la concentración usual ya descrita (2×10^{-7} moles/ml de Tyrode). Los resultados obtenidos quedan plasmados en las figuras 5.22 y 5.23. En ellas puede apreciarse que la metisergida no inhibe la acción de la histamina.

En las figuras 5.24 y 5.25 se presentan registros en los que se denota que el dimaleato de metisergida no antagoniza la acción del extracto esplénico ácido.

5-HIDROXI-TRIPTAMINA (5-HT) + DIMALEATO DE METISERGIDA (MSD).

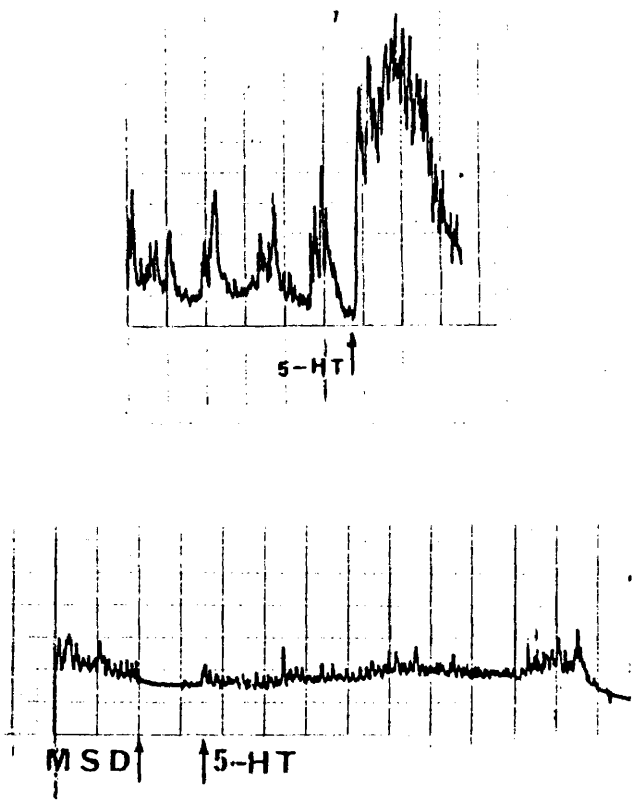


figura 5.20

íleon de cobaya hembra, peso: 580 grs.

5-HIDROXI-TRIPTAMINA (5-HT) + DIMALEATO DE METISERGIDA (MSD).

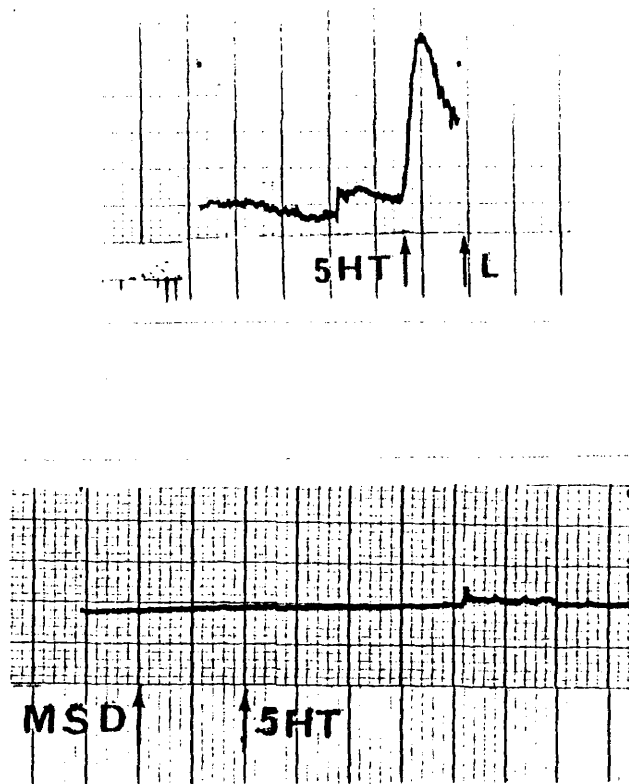


figura 5.21

ileon de cobaya hembra, peso: 502 grs.

CLORHIDRATO DE HISTAMINA (H) + DIMALEATO DE METISERGIDA (MSD).

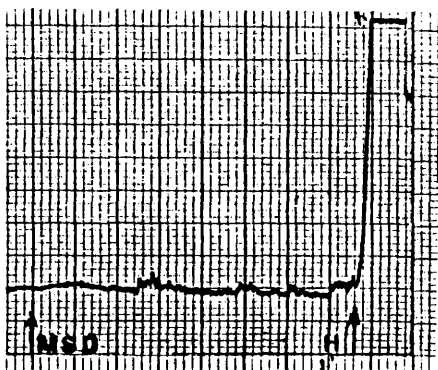
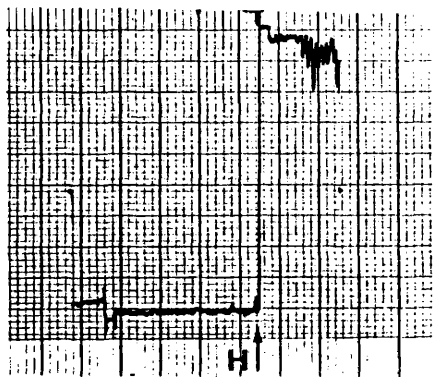


figura 5.22

íleon de cobaya hembra, peso: 487 grs.

CLORHIDRATO DE HISTAMINA (H) + DIMALEATO DE METISERGIDA (MSD).

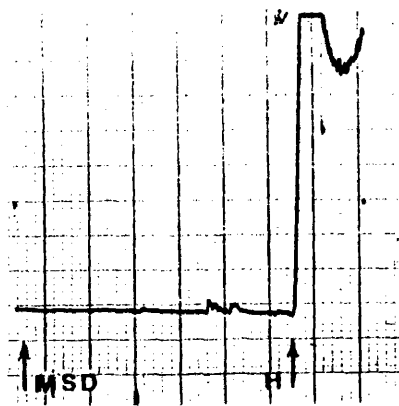
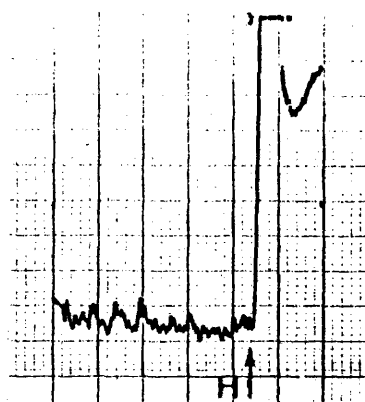


figura 5.23

íleon de cobaya hembra, peso: 487 grs.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO (EEA) + DIMALEATO DE METISERGIDA (MSD).

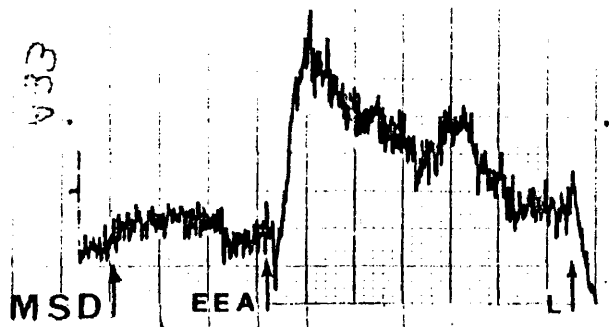
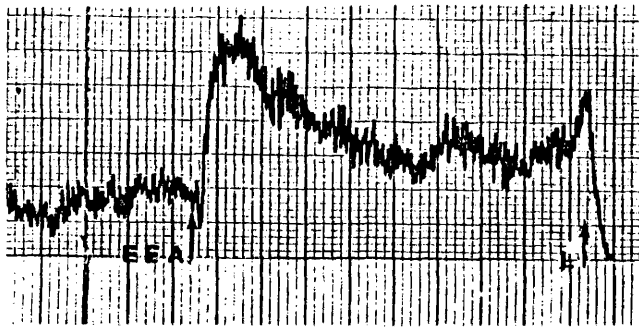


figura 5.24

ileon de cobaya hembra, peso: 510 grs.

EXTRACTO ESPLÉNICO ACIDO (EEA) + DIMALEATO DE METISERGIDA (MSD).

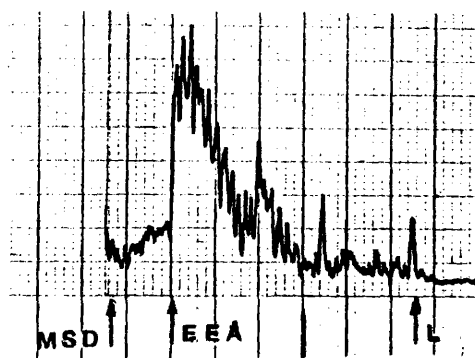
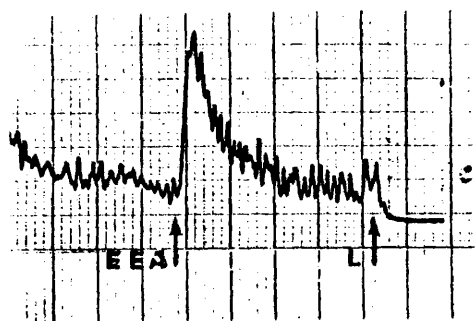


figura 5.25

ileon de cobaya hembra, peso: 419 grs.

B.- Determinaciones bioquímicas.

Antes de proceder a la exposición detallada de los distintos resultados obtenidos indicaremos que, todas las tablas de resultados que se presentan en el transcurso de este apartado expresan los diferentes valores obtenidos para las distintas series experimentales junto con un diagrama que representa la distribución con respecto a la media.

Por otro lado, los coeficientes de variación interensayo se obtienen mediante la oportuna comparación de las pendientes de las rectas estándar cuyas gráficas se ofrecen al comienzo de cada serie experimental en las que se especifica, además del valor de la pendiente (a), el coeficiente de correlación (r) entre los puntos que definen cada una de las rectas estándar.

Al final de cada serie experimental se realiza el correspondiente estudio estadístico comparativo a fin de establecer el nivel de significación de los resultados obtenidos, que se expresan en todos los casos como la media (\bar{X}) \pm el error estándar (E.S.). Para ello, se utiliza el parámetro t de Student:

$$t = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{\text{Esd}}$$

Donde \bar{X}_1 y \bar{X}_2 , son las respectivas medidas de los colectivos comparados.

Y Esd, es el error estándar de la diferencia de las medias, y se expresa:

$$\text{Esd} = \sqrt{\text{Es}_1^2 + \text{Es}_2^2}$$

Los límites del parámetro t para los coeficientes de seguridad 95% ($p=0.05$), 99% ($p=0.01$) y 99,9% ($p=0.001$), dependen del número de grados de libertad (v) = $\left[(n_1 + n_2) - 2 \right]$ y vienen tabulados (véase tabla: 5.1).

Cuando el valor experimental de t supera el límite establecido para

un determinado número de grados de libertad se dice que la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa, es decir, existe una probabilidad extremadamente débil para que la diferencia comprobada sea imputable únicamente a fluctuaciones fortuitas y viceversa.

Tabla 5.1: Límites del parámetro t correspondientes a los coeficientes de seguridad 95%, 99%, y 99,9% para diferentes valores de (v).

GRAD. DE LIB.	T(.05)	T(.01)	T(.001)
1	12.71	63.66	636.62
2	4.30	9.92	31.60
3	3.18	5.84	12.94
4	2.78	4.60	8.61
5	2.57	4.03	6.86
6	2.45	3.70	5.96
7	2.36	3.50	5.40
8	2.31	3.35	5.04
9	2.26	3.25	4.78
10	2.23	3.17	4.59
12	2.19	3.05	4.32
14	2.14	2.98	4.14
16	2.12	2.92	4.01
18	2.10	2.88	3.92
20	2.09	2.84	3.85
25	2.06	2.79	3.72
30	2.05	2.75	3.64
...
INFINITOS	1.96	2.58	3.29

B.1- Determinación de histamina.

a/- En extracto esplénico y placebo.

- Coeficiente de variación interensayo:

Al comparar las pendientes de las rectas estandar que aparecen en las figuras 5.26 a 5.29, se obtienen los siguientes resultados:

Valor de las pendientes (a)

1.- 1.8121

2.- 1.3854

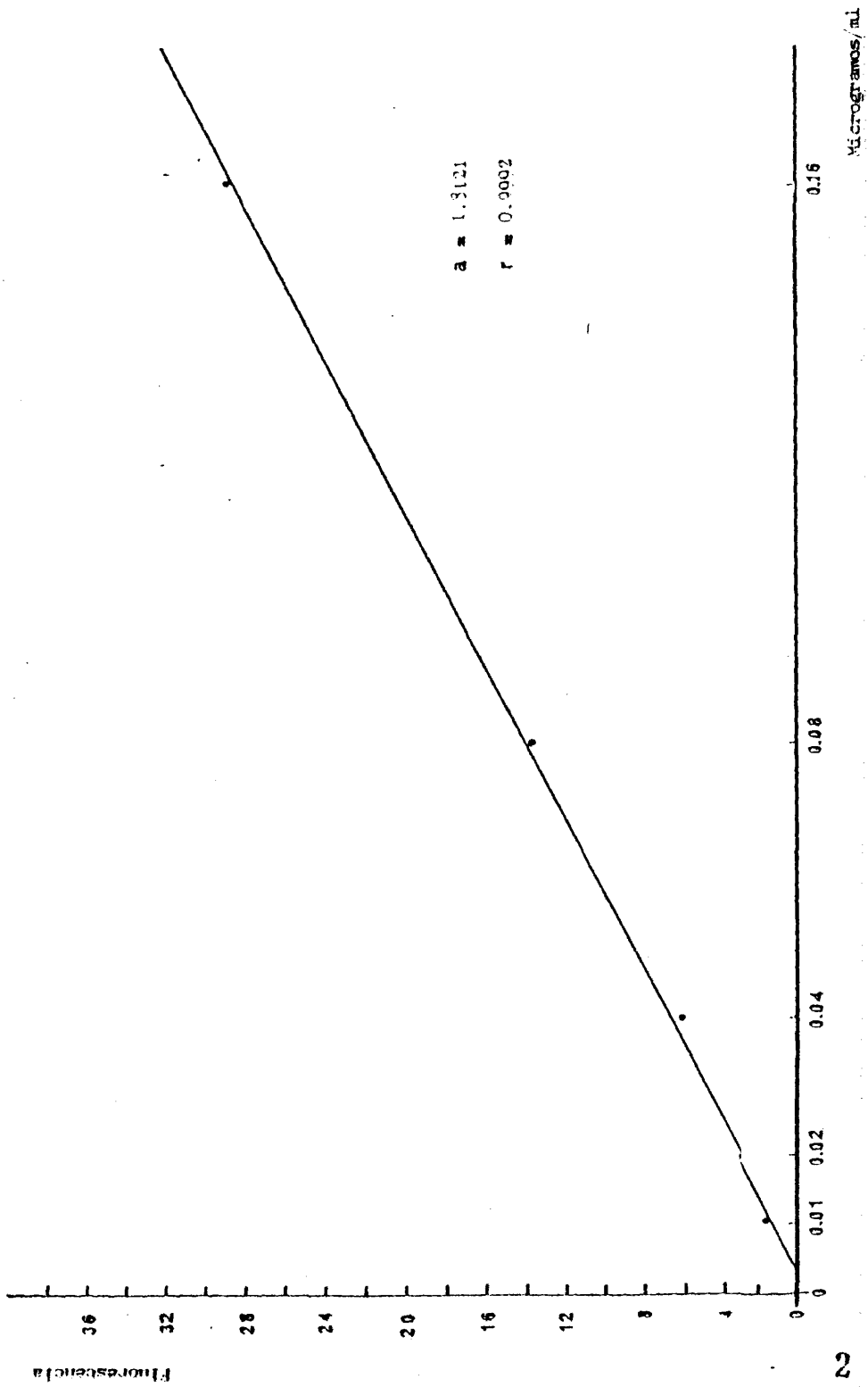
3.- 1.7106

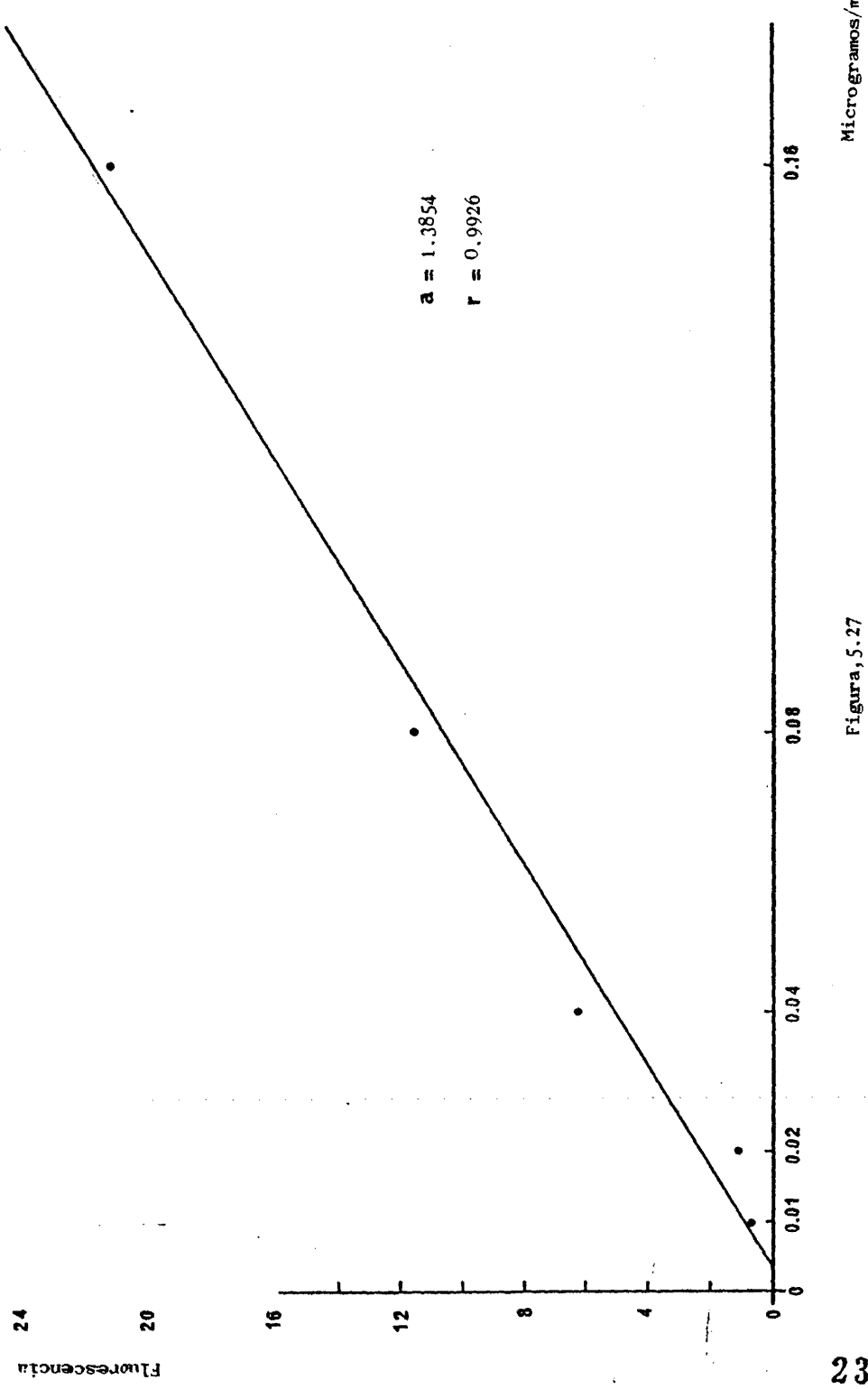
4.- 1.5493

$\bar{x} = 1.6144$

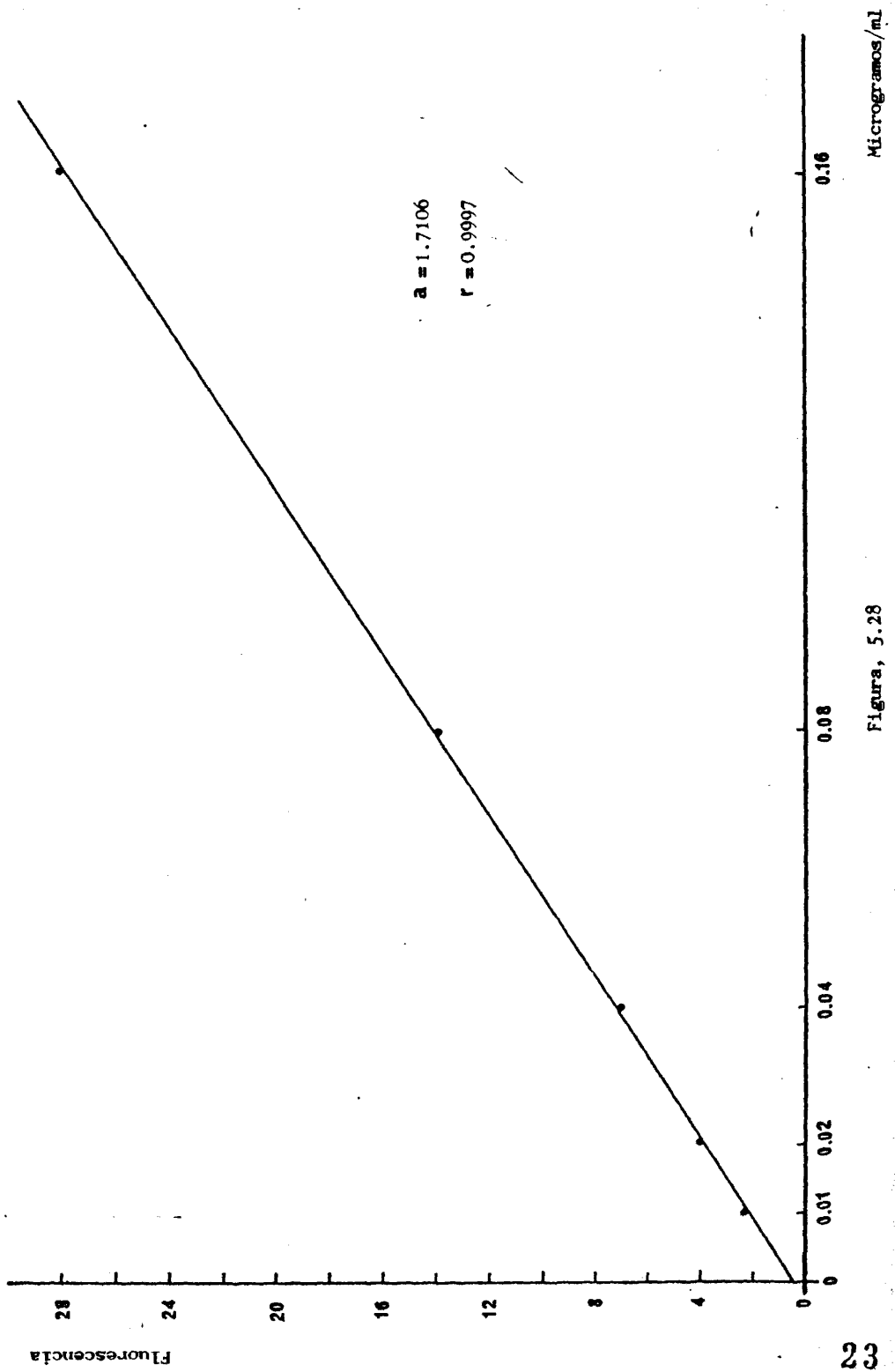
E.S = 0.1080

CV% = 11.5%



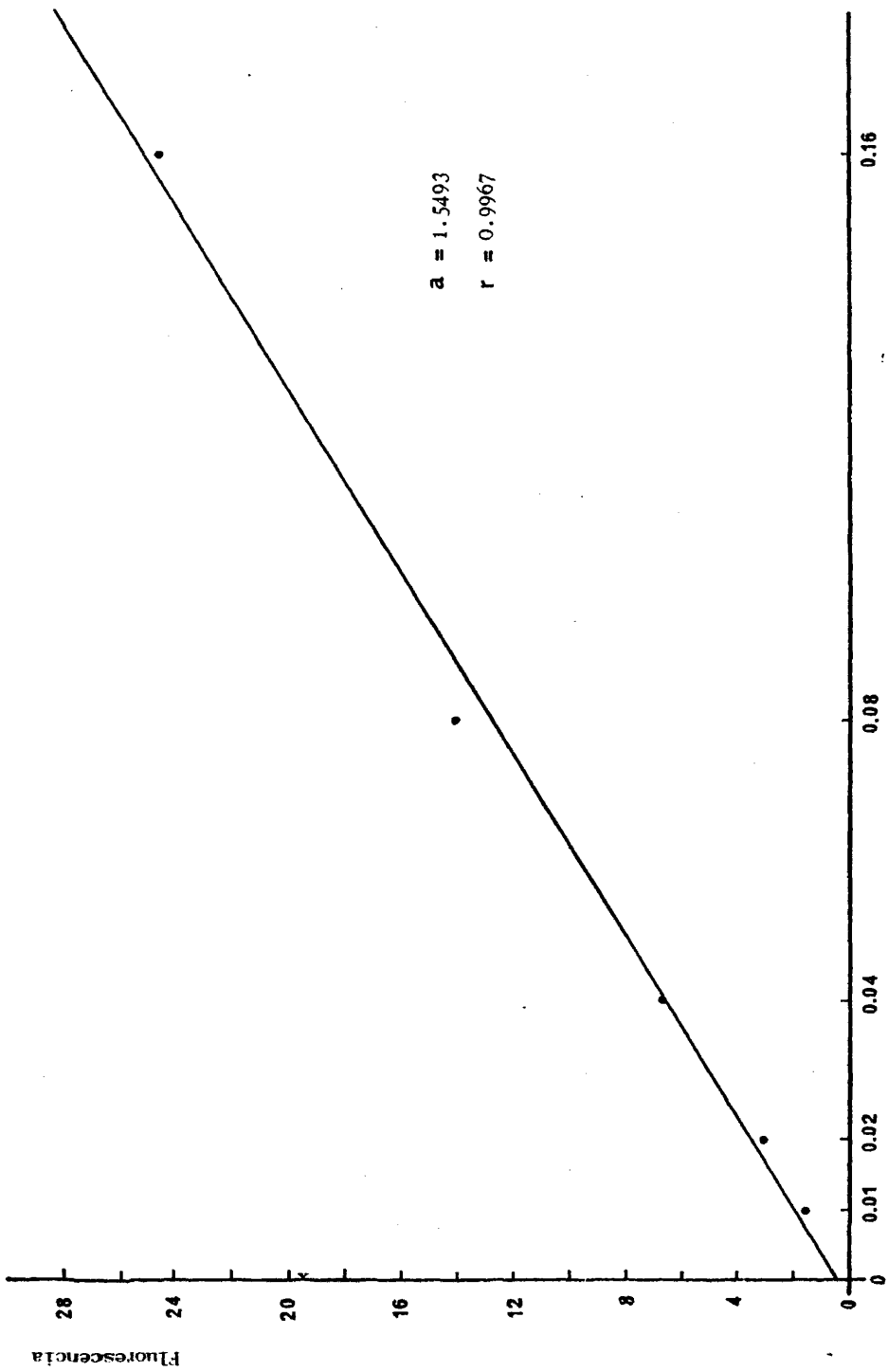


Figura, 5.27



Figura, 5.28

Microgramos/ml



Microgramos/ml.

Figura, 5.29

- Eficacia del Método:

Valor teórico: 0.32 microgramos/ml.

Valores prácticos obtenidos:

1.-	0.1568	μ grs/ml.
2.-	0.1595	" "
3.-	0.1650	" "
4.-	0.1540	" "
5.-	0.1677	" "
6.-	0.1650	" "
7.-	0.1568	" "
8.-	0.1568	" "
9.-	0.1595	" "
10.-	0.1650	" "

$$\bar{x} = 0.1606$$

$$E.S. = 0.0016$$

$$\% \text{ recuperación} = 50,1\%$$

-Concentraciones en $\mu\text{grs/ml}$ de histamina en el placebo:

$$\bar{X} = 0.01461, \text{ E.S} = 0.001376$$

Tabla 5.2

SEG	DATA	<2.....1.....N.....1.....2>
1	0.0260	*
2	0.0260	*
3	0.0203	*
4	0.0230	*
5	0.0146	*
6	0.0146	*
7	0.0146	*
8	0.0146	*
9	0.0146	*
10	0.0146	*
11	0.0187	*
12	0.0187	*
13	0.0145	*
14	0.0082	*
15	0.0082	*
16	0.0082	*
17	0.0082	*
18	0.0082	*
19	0.0082	*
20	0.0082	*

-Concentraciones en $\mu\text{grs/ml}$ de histamina en el extracto esplénico:

$\bar{X} = 0.01175$, E.S. = 0.000761

Tabla, 5.3

SEQ	DATA	<2.....1.....M.....1.....2>
1	0.0077	*
2	0.0077	*
3	0.0077	*
4	0.0077	*
5	0.0077	*
6	0.0077	*
7	0.0136	*
8	0.0187	*
9	0.0187	*
10	0.0187	*
11	0.0187	*
12	0.0159	*
13	0.0159	*
14	0.0159	*
15	0.0159	*
16	0.0084	*
17	0.0084	*
18	0.0084	*
19	0.0084	*
20	0.0084	*
21	0.0084	*
22	0.0107	*
23	0.0107	*
24	0.0182	*
25	0.0182	*
26	0.0182	*
27	0.0182	*
28	0.0197	*
29	0.0197	*
30	0.0088	*
31	0.0088	*
32	0.0034	*
33	0.0034	*
34	0.0074	*
35	0.0094	*
36	0.0074	*
37	0.0094	*
38	0.0074	*
39	0.0074	*
40	0.0074	*
41	0.0074	*

- Estudio estadístico:

Valor medio de histamina en el placebo ($\bar{X} \pm$ E.S.):

$$0.01461 \pm 0.001376$$

Valor medio de histamina en el extracto esplénico ($\bar{X} \pm$ E.S.):

$$0.01175 \pm 0.000761$$

Número de grados de libertad (v) = 59

t de Student experimental = 1.9713

Límite del parámetro t para un coeficiente de seguridad del 95%

($p = 0.05$) = 2.

Por lo tanto, los valores de histamina hallados en el extracto esplénico no difieren significativamente de los correspondientes al placebo.

b/- En la solución nutritiva que baña a la pieza intestinal.

- Coeficiente de variación interensayo:

Al comparar las pendientes de las rectas estandard que aparecen en las figuras 5.30 a 5.33, se obtienen los siguientes resultados:

Valor de las pendientes (a)

1.- 0.9068

2.- 0.7760

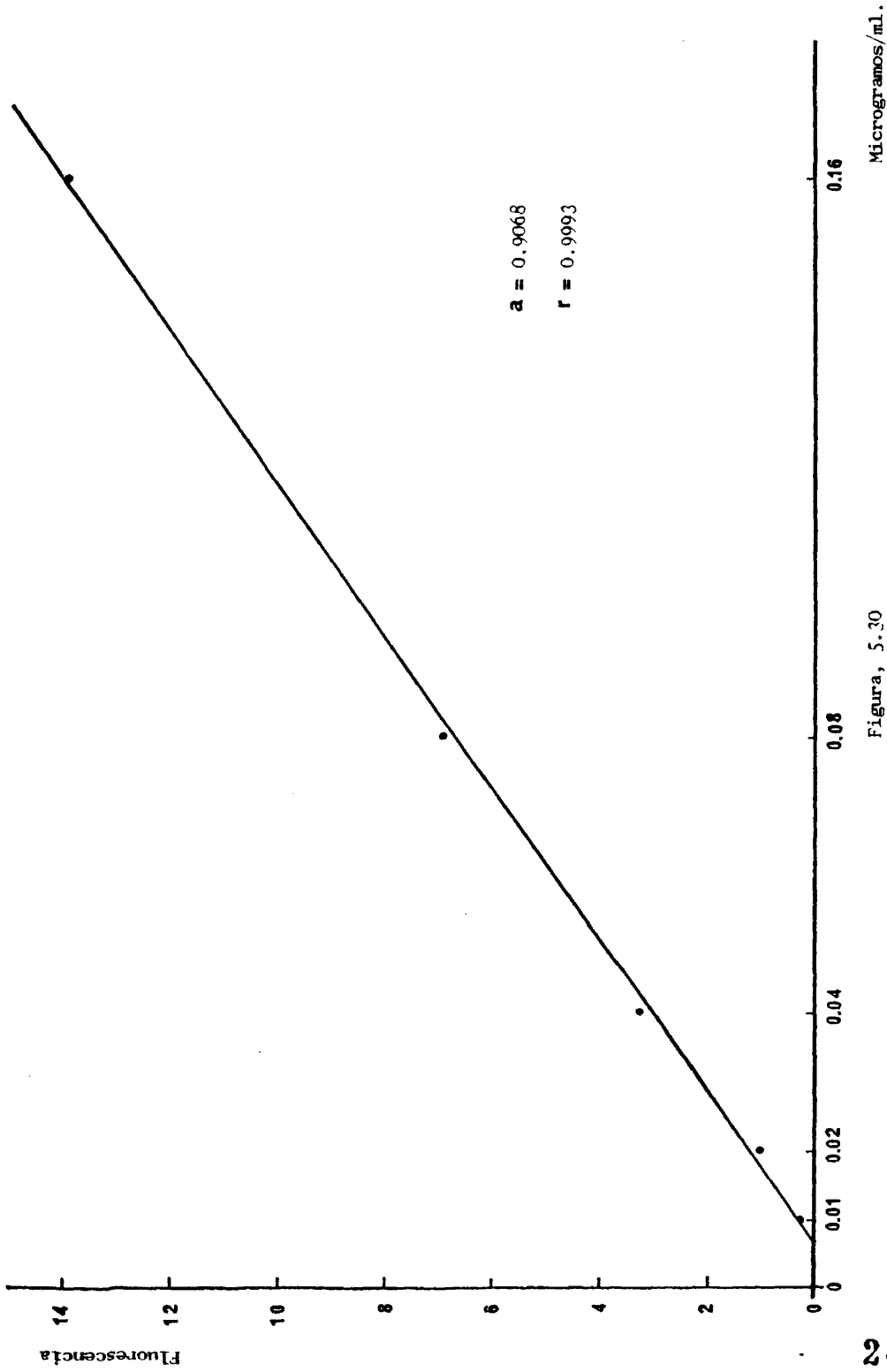
3.- 0.6893

4.- 1.0403

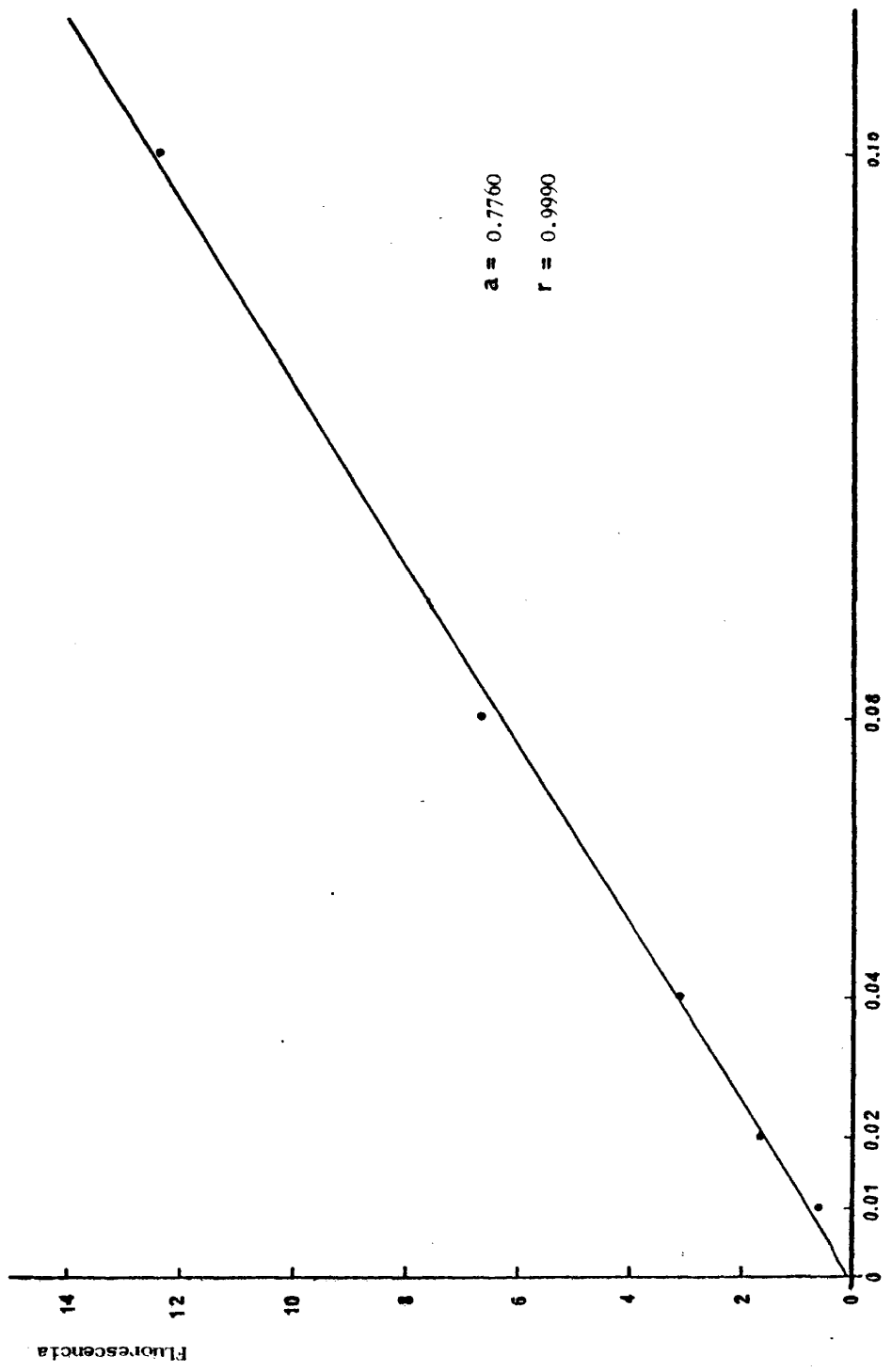
$\bar{x} = 0.8531$

E.S. = 0.0886

CV% = 17,9%



Figura, 5.30



Figura, 5.31

Fluorescencia

14

12

10

8

6

4

2

0

0.01

0.02

0.04

0.08

0.16

$a = 0.6893$

$r = 0.9980$

275

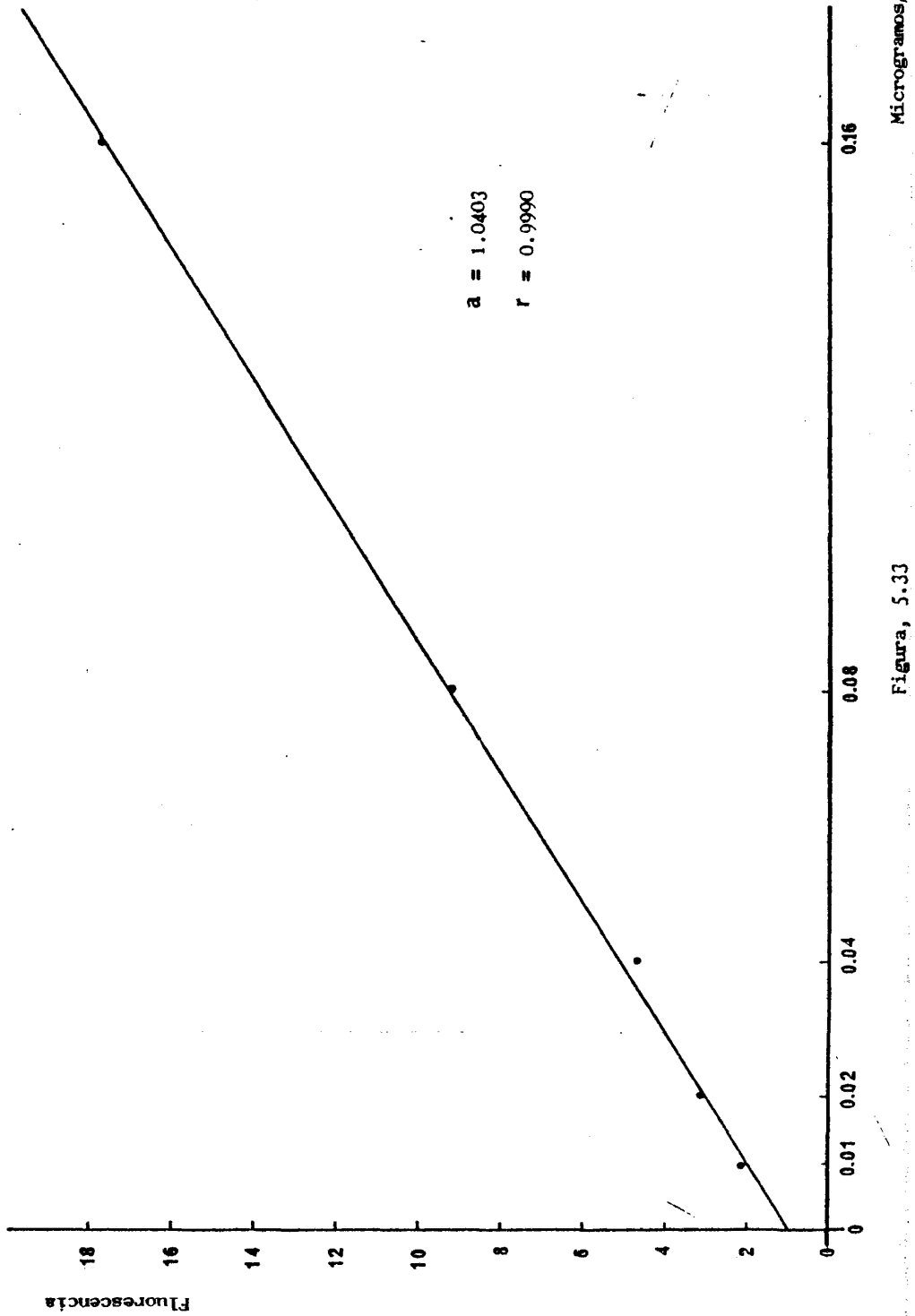
Figura, 5.32

Microgramos/ml.

•

•

•



Figura, 5-33

- Eficacia del método:

Valor teórico: 0.32 microgramos/ml.

Valores prácticos obtenidos:

1.-	0.1475	μ	grs/ml.
2.-	0.1475	"	"
3.-	0.1571	"	"
4.-	0.1379	"	"
5.-	0.1379	"	"
6.-	0.1475	"	"
7.-	0.1475	"	"
8.-	0.1475	"	"
9.-	0.1475	"	"
10.-	0.1475	"	"

$$\bar{x} = 0.1464$$

$$E.S. = 0.0018$$

$$\% \text{ recuperación} = 45,75\%$$

-Concentraciones en $\mu\text{grs/ml.}$ de histamina en la solución nutritiva que
 baña la pieza intestinal antes de la adición del extracto esplénico
 ácido:

$$\bar{X} = 0.006596 \quad , \quad \text{E.S.} = 0.000666$$

Tabla, 5.4

SEQ	DATA	<2.....1.....M.....1.....2
1	0.0054	*
2	0.0054	*
3	0.0012	*
4	0.0012	*
5	0.0054	*
6	0.0054	*
7	0.0054	*
8	0.0012	*
9	0.0079	*
10	0.0079	*
11	0.0079	*
12	0.0011	*
13	0.0083	*
14	0.0075	*
15	0.0035	*
16	0.0030	*
17	0.0030	*
18	0.0124	*
19	0.0124	*
20	0.0124	*
21	0.0124	*
22	0.0108	*
23	0.0108	*
24	0.0053	*
25	0.0053	*
26	0.0082	*
27	0.0082	*
28	0.0052	*
29	0.0052	*

-Concentración en $\mu\text{grs/ml}$. de histamina en la solución nutritiva que
 baña la pieza intestinal después de la adición del extracto esplénico
 ácido:

$$\bar{x} = 0.006385 \quad , \quad \text{E.S.} = 0.000602$$

Tabla, 5.5

SEQ	DATA	<2.....1.....N.....1.....2>
1	0.0047	*
2	0.0047	*
3	0.0047	*
4	0.0047	*
5	0.0047	*
6	0.0047	*
7	0.0047	*
8	0.0047	*
9	0.0047	*
10	0.0047	*
11	0.0082	*
12	0.0082	*
13	0.0111	*
14	0.0111	*
15	0.0062	*
16	0.0062	*
17	0.0062	*
18	0.0062	*
19	0.0062	*
20	0.0062	*
21	0.0044	*
22	0.0044	*
23	0.0044	*
24	0.0044	*
25	0.0044	*
26	0.0044	*
27	0.0148	
28	0.0148	

-Estudio estadístico:

Valor medio de histamina en la solución nutritiva antes de la adición del extracto esplénico ácido ($\bar{x} \pm E.S.$):

$$0.006596 \pm 0.000666$$

Valor medio de histamina en la solución nutritiva después de la adición del extracto esplénico ácido ($\bar{x} \pm E.S.$):

$$0.006385 \pm 0.000620$$

Número de grados de libertad (v) = 55

t de Student experimental = 0.2440

Límite del parámetro t para un coeficiente de seguridad del 95% (p = 0.05) = 2.

Por lo tanto, los valores de histamina hallados en la solución de Tyrode antes de la adición del extracto esplénico no difieren significativamente de los correspondientes valores obtenidos después de la adición del mismo.

B.2- Determinación de nucleótidos cíclicos.

a/- En extracto esplénico y placebo.

1/- Adenosín 3':5'-monofosfato cíclico (cAMP).

-Coeficiente de variación interensayo:

Al comparar las pendientes de las rectas estandard que aparecen en las figuras 5.34 a 5.39, se obtienen los siguientes resultados:

Valor de las pendientes (a)

1.- 2.6158

2.- 2.4215

3.- 2.4445

4.- 2.3463

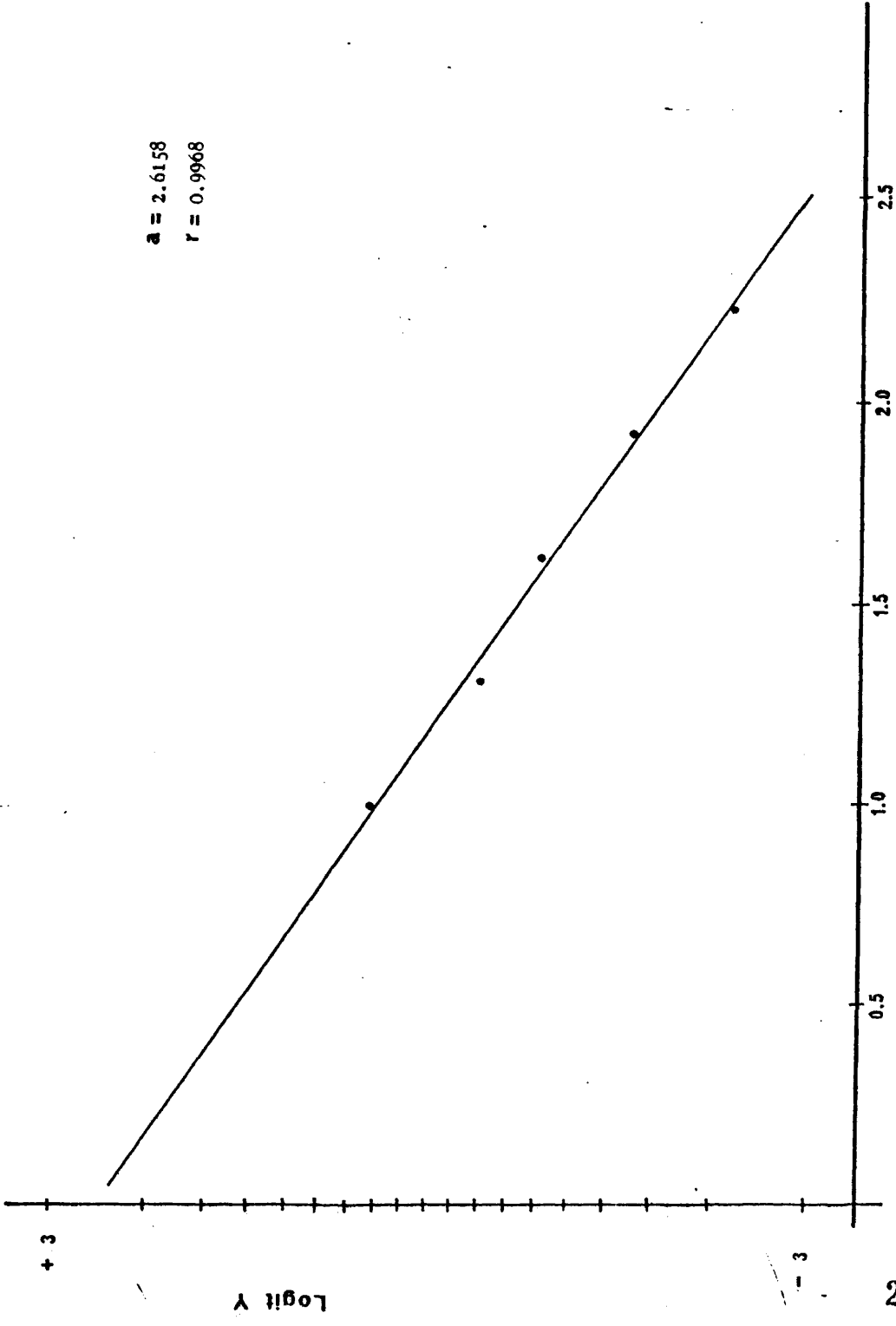
5.- 2.4409

6.- 2.4378

$\bar{X} = 2.4511$

E.S. = 0.0397

CV% = 3.61%



$a = 2.6158$
 $r = 0.9968$

3

Logit Y

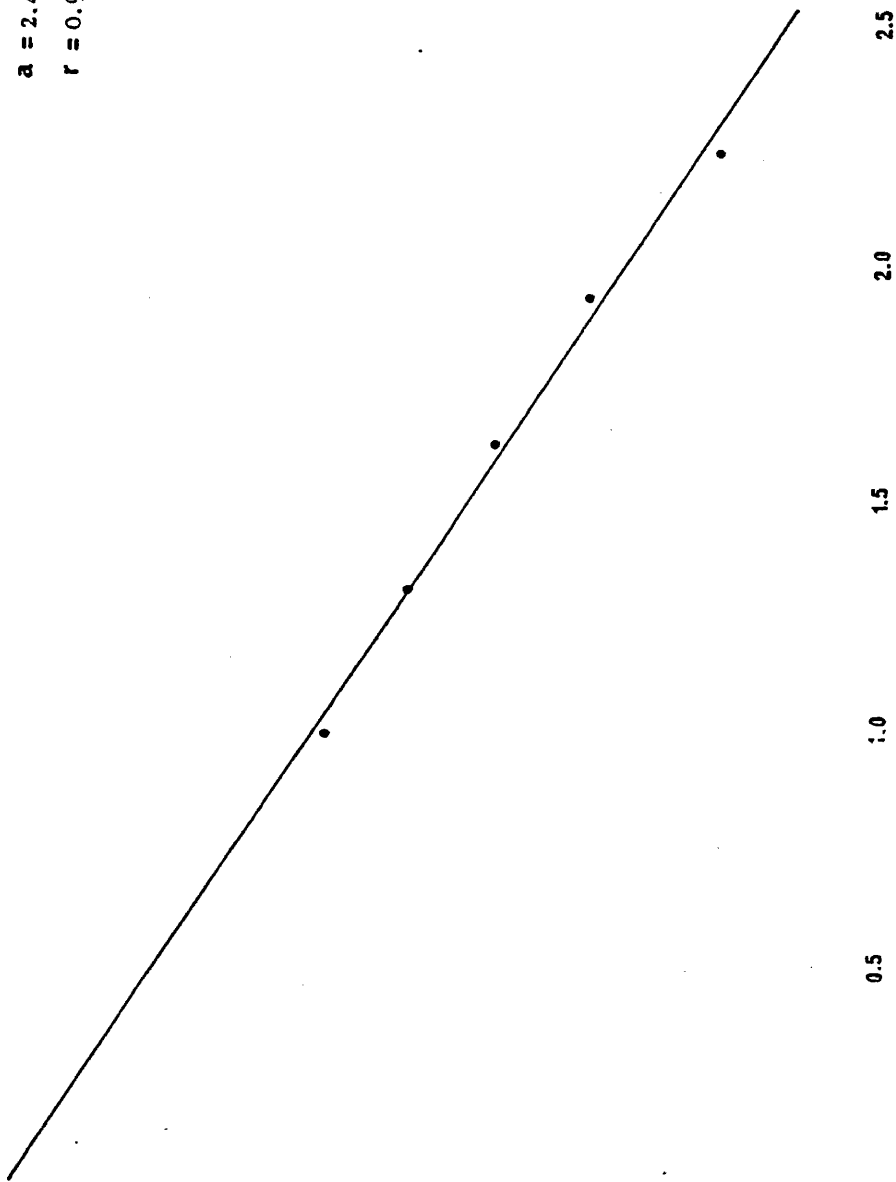
3

2

+3

$a = 2.4215$
 $r = 0.9948$

Logit Y

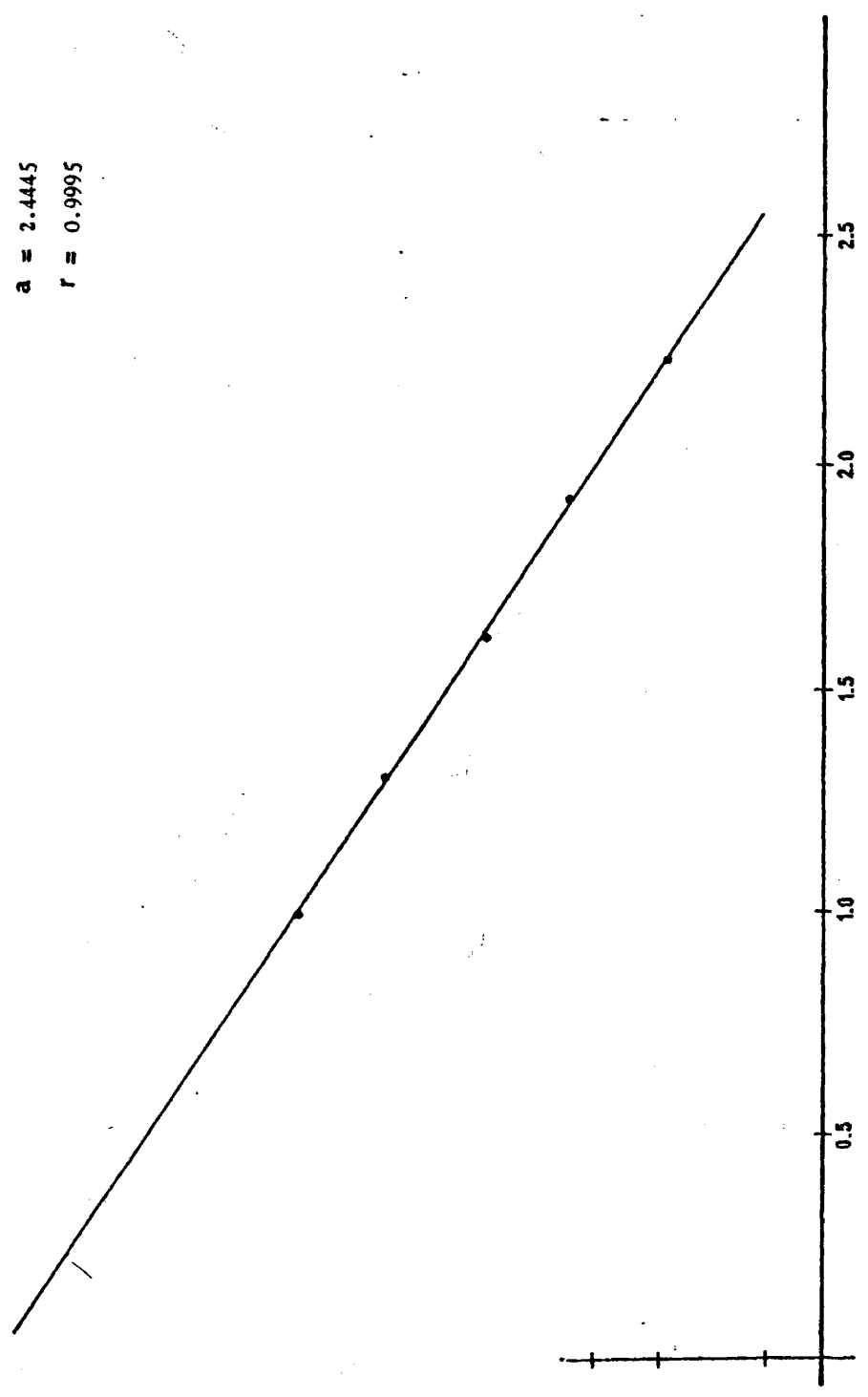


Log C

Figura, 5.35

-3

a = 2.4445
r = 0.9995



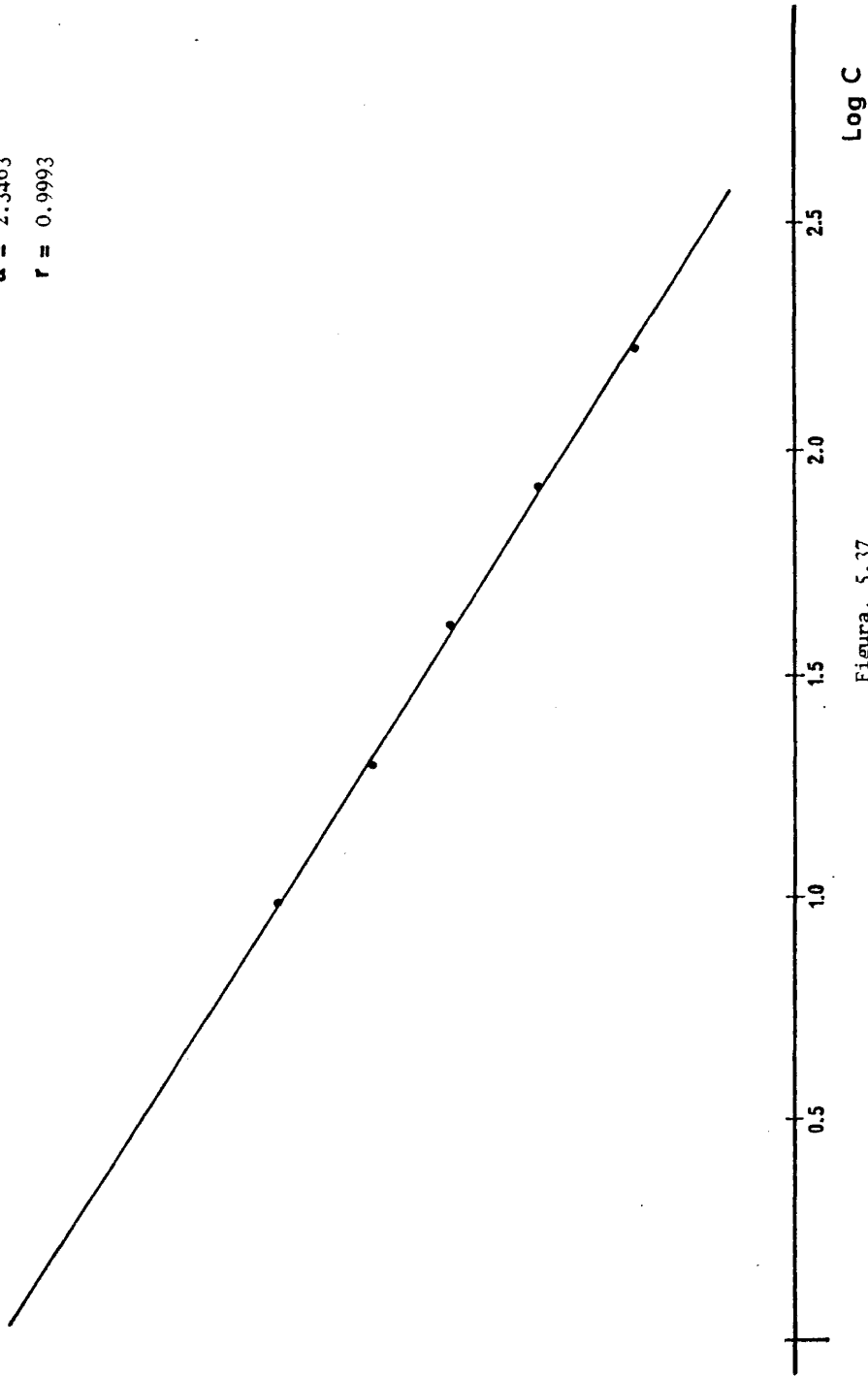
Logit Y

Figure, 5.36

Log C

Logit Y

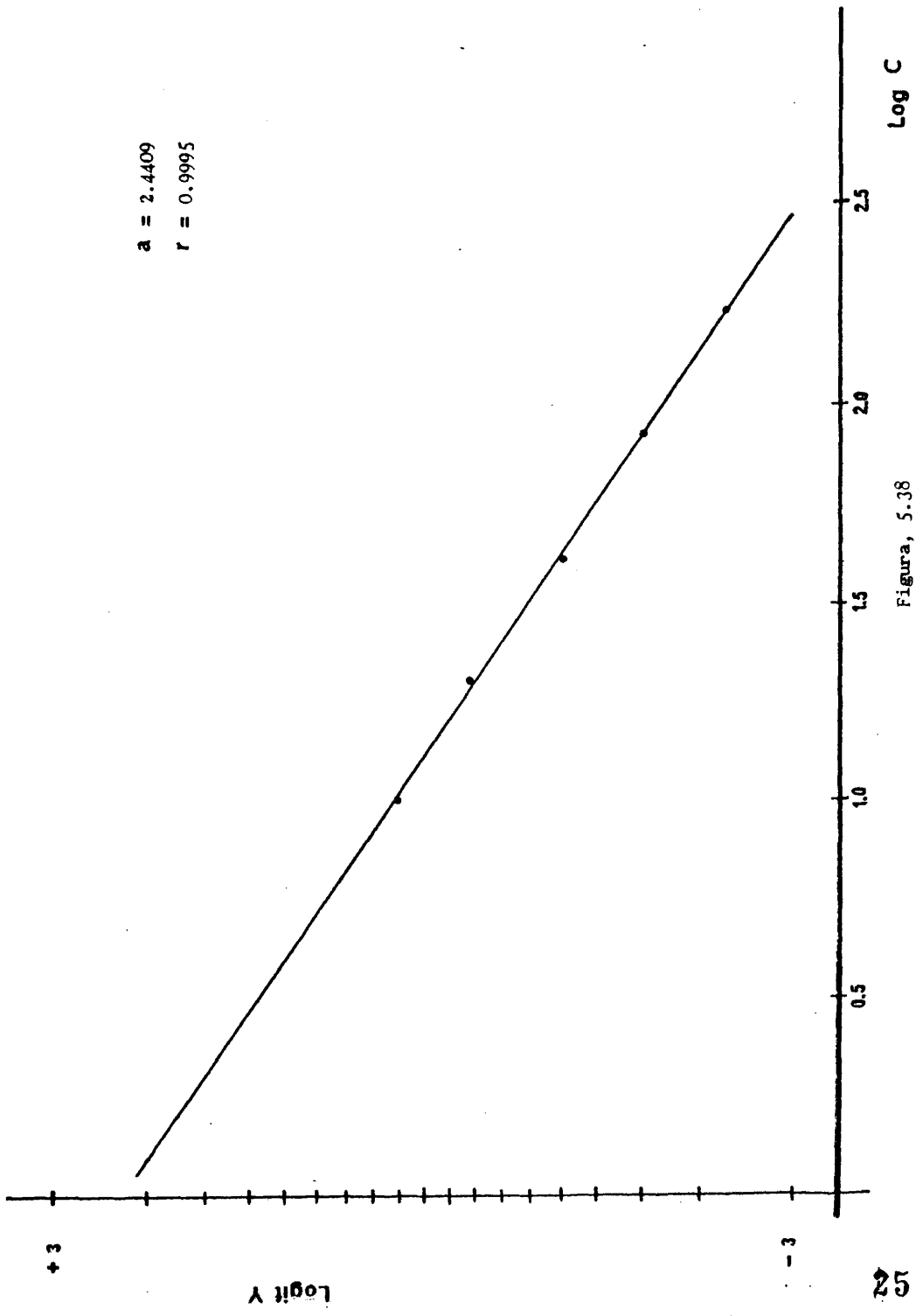
a = 2.3463
r = 0.9993



Log C

Figura, 5.37

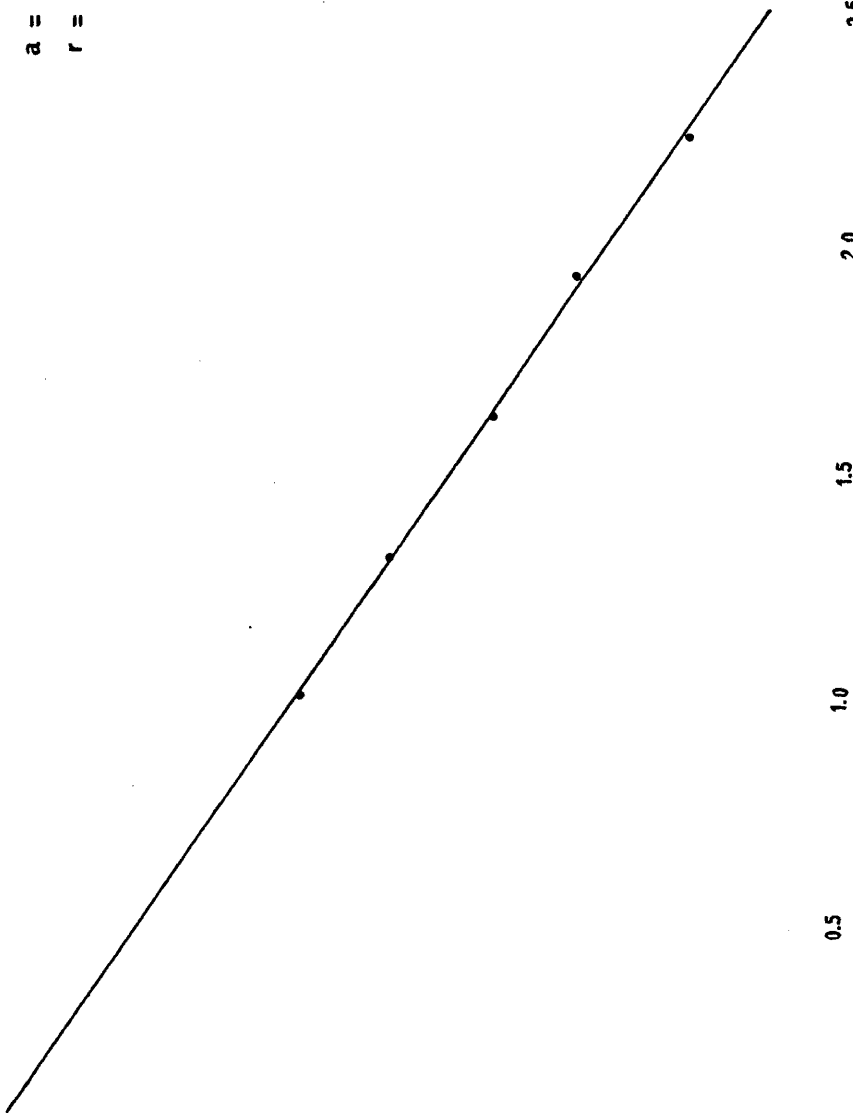
$a = 2.4409$
 $r = 0.9995$



Figura, 5.38

a = 2.4378
r = 0.9990

Logit Y



Log C

Figura, 5.39

- Eficacia del método: -

Valor teórico : 16 pmol/50 μ l

Valores prácticos obtenidos:

1.-	15.37	pmol/50 μ l
2.-	15.62	" "
3.-	16.19	" "
4.-	16.30	" "
5.-	15.69	" "
6.-	15.62	" "
7.-	16.25	" "
8.-	16.22	" "
9.-	15.33	" "
10.-	15.84	" "

$$\bar{x} = 15.843$$

$$E.S. = 0.1241$$

$$\% \text{ recuperación} = 99,01\%$$

-Concentraciones en pmoles/50 μ l de cAMP en el placebo: (tabla, 5.6)

$$\bar{X} = 0.01731 \quad , \quad \text{E.S.} = 0.00713$$

o bien en pmoles/ml:

$$\bar{X} = 0.3462 \quad , \quad \text{E.S.} = 0.1426$$

Tabla, 5.6

SEJ	DATA	<2.....1.....M.....1.....2>
1	0.0504	*
2	0.0000	*
3	0.0000	*
4	0.0782	*
5	0.0611	*
6	0.0000	*
7	0.0000	*
8	0.0000	*
9	0.0000	*
10	0.0000	*
11	0.0430	*
12	0.0000	*
13	0.0000	*
14	0.0000	*
15	0.0000	*
16	0.0743	*
17	0.0000	*
18	0.0000	*
19	0.0000	*

-Concentraciones en pmoles/50 μ l de cAMP en el extracto esplénico:
(tabla, 5.7)

$$\bar{X} = 3.9523 \quad , \quad E.S. = 0.08168$$

o bien en pmoles/ml:

$$\bar{X} = 79.046 \quad , \quad E.E. = 1.6336$$

Tabla, 5.7

Nº	Concentración (pmoles/50 μ l)
1	4.1074
2	4.1074
3	4.4725
4	4.1074
5	4.0254
6	4.0644
7	4.7130
8	5.1508
9	4.0702
10	4.1203
11	5.2108
12	4.0880
13	3.9171
14	4.0834
15	4.5810
16	4.5480
17	4.2827
18	4.4819
19	4.0174
20	3.8774
21	3.2574
22	3.8269
23	3.7538
24	5.2110
25	4.4714
26	4.0746
27	4.0166
28	4.4101
29	4.4170
30	4.0764
31	4.4360
32	4.0445
33	4.1421
34	4.1261
35	3.6720
36	3.8400
37	4.9278
38	4.1152
39	3.0786
40	4.1634
41	3.5072
42	3.1112
43	4.1084
44	3.0647
45	3.8380
46	3.0743
47	3.5509
48	3.5020
49	3.1200
50	3.2847
51	3.1705
52	3.3723
53	3.3046
54	3.0111
55	3.0926
56	3.0427
57	3.0076
58	3.1120
59	3.1672
60	3.0802
61	3.0537

-Estudio estadístico:

Valor medio de cAMP en el placebo ($\bar{X} \pm$ E.S.):

$$0.01731 \pm 0.00713$$

Valor medio de cAMP en el extracto esplénico ($\bar{X} \pm$ E.S.)

$$3.9523 \pm 0.08168$$

Número de grados de libertad (v) = 77

t de Student experimental = 26.9778

Límite del parámetro t para un coeficiente de seguridad del 99,9%

($p=0.001$) = 3,3.

Por lo tanto, los valores de cAMP hallados en el extracto esplénico difieren muy significativamente de los correspondientes al placebo.

2/- Guanosín 3':5'-monofosfato cíclico (cGMP).

- Coeficiente de variación interensayo:

Al comparar las pendientes de las rectas estándar que aparecen en las figuras 5.40 a 5.45, se obtienen los siguientes resultados:

Valor de las pendientes (a)

1.- 1.8616

2.- 2.1232

3.- 2.0131

4.- 1.9950

5.- 1.8282

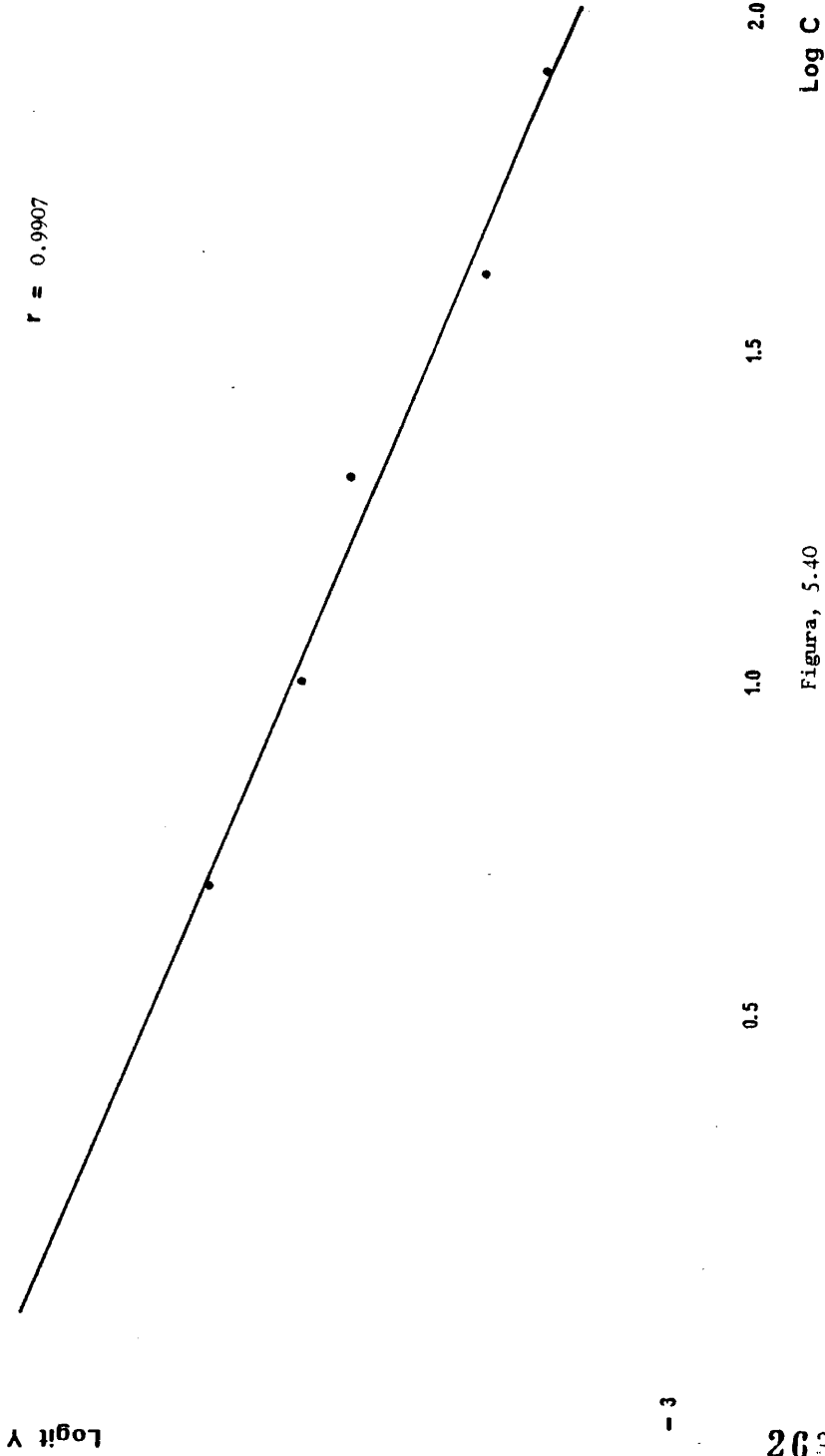
6.- 2.0934

\bar{x} = 1.9858

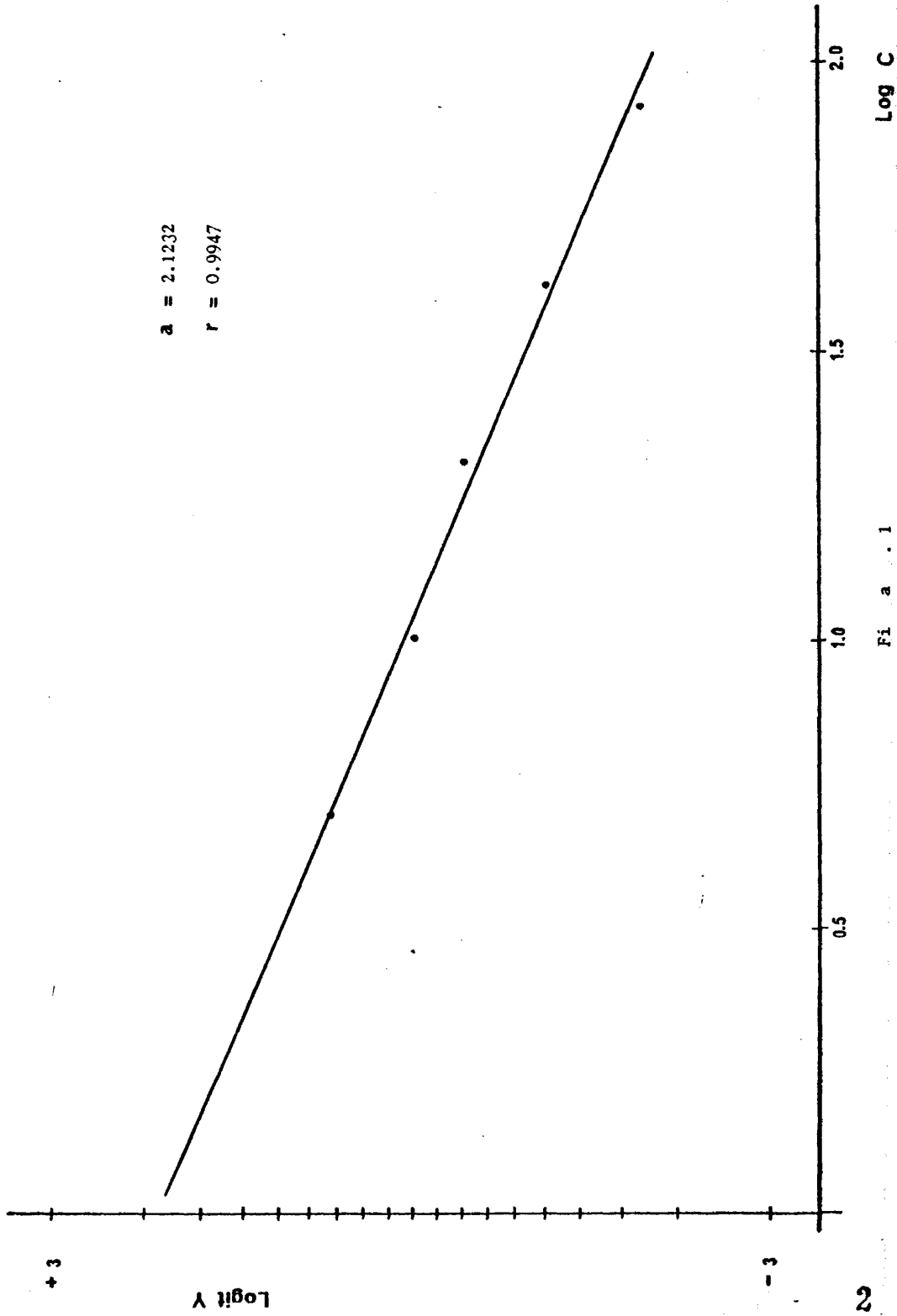
E.S. = 0.0535

CV% = 6.02%

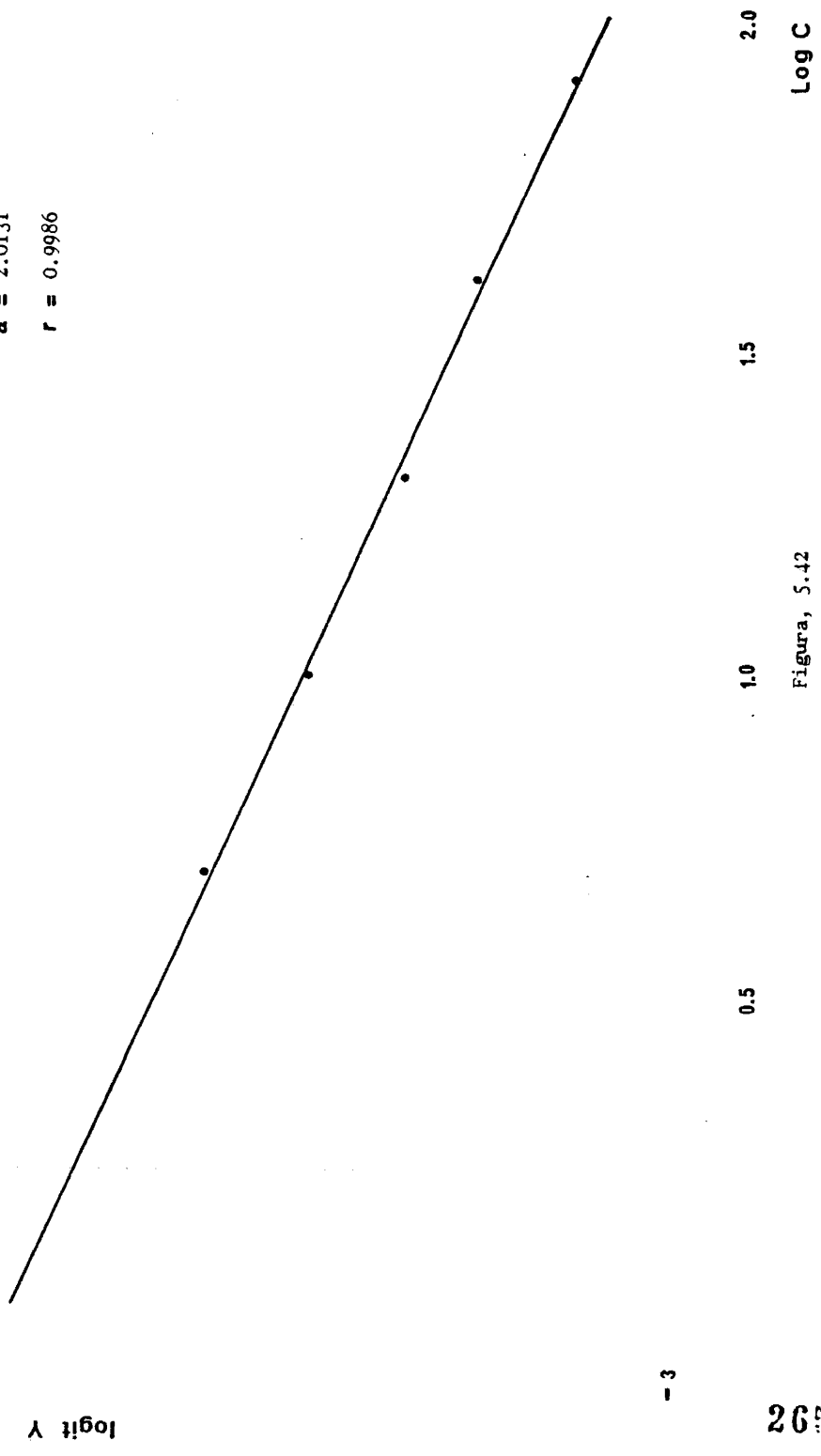
$a = 1.8616$
 $r = 0.9907$



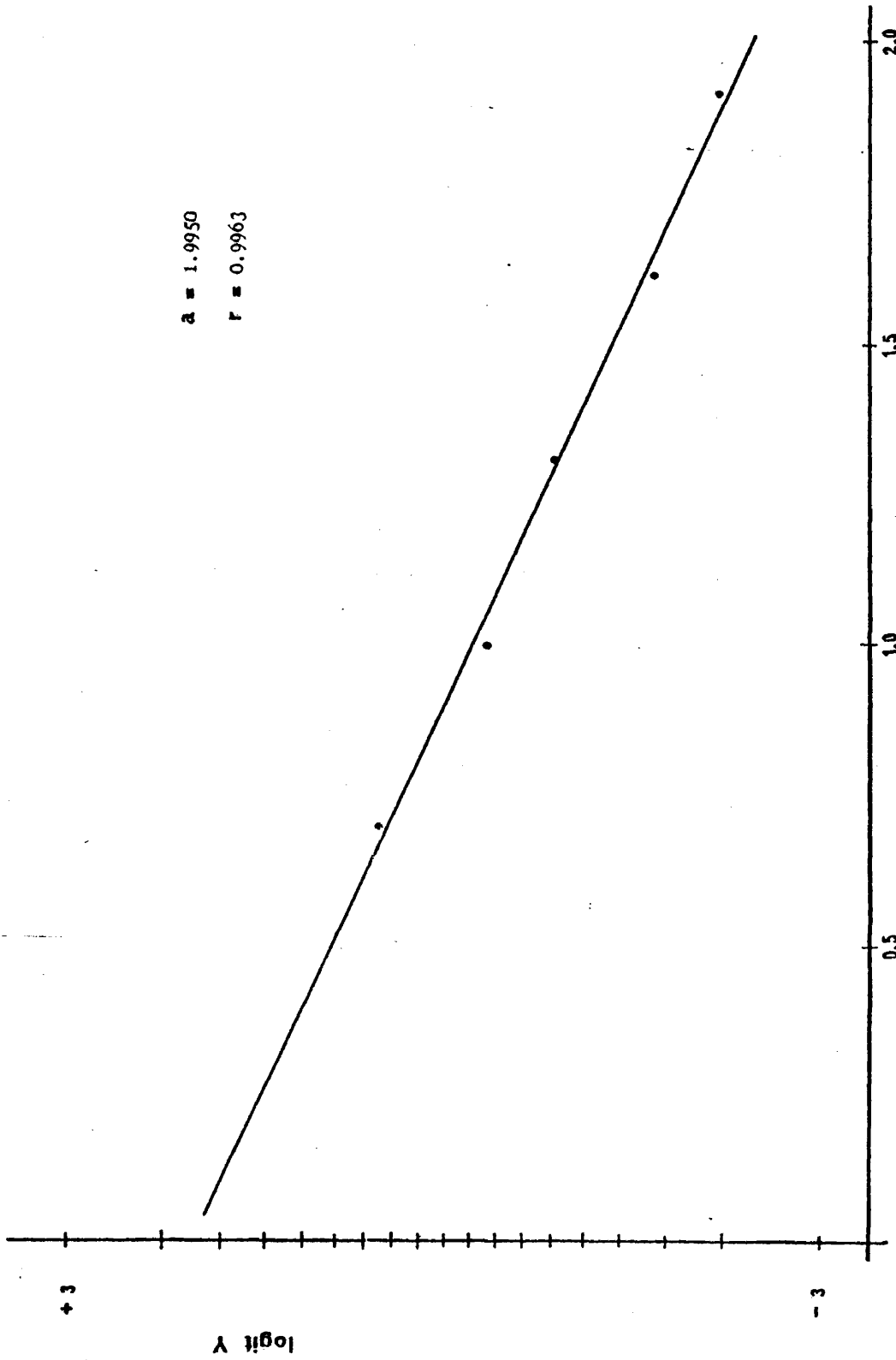
Figura, 5.40



a = 2.0131
r = 0.9986



Figura, 5.42

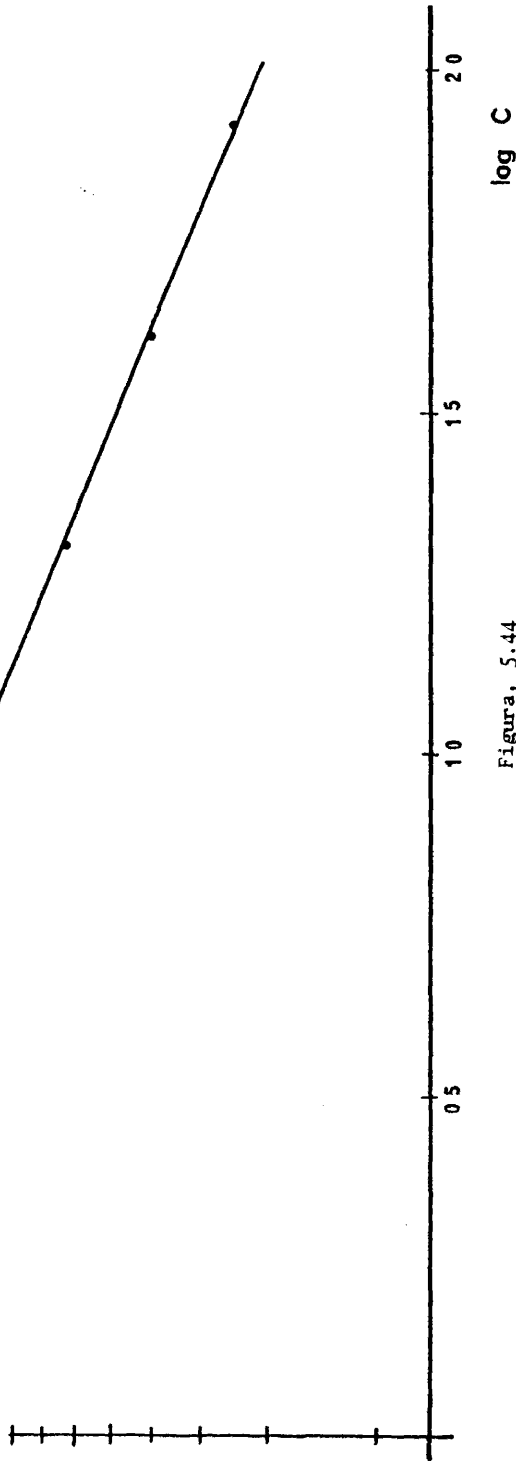


Figura, 5.43

a = 1.8282

r = 0.9996

logit Y

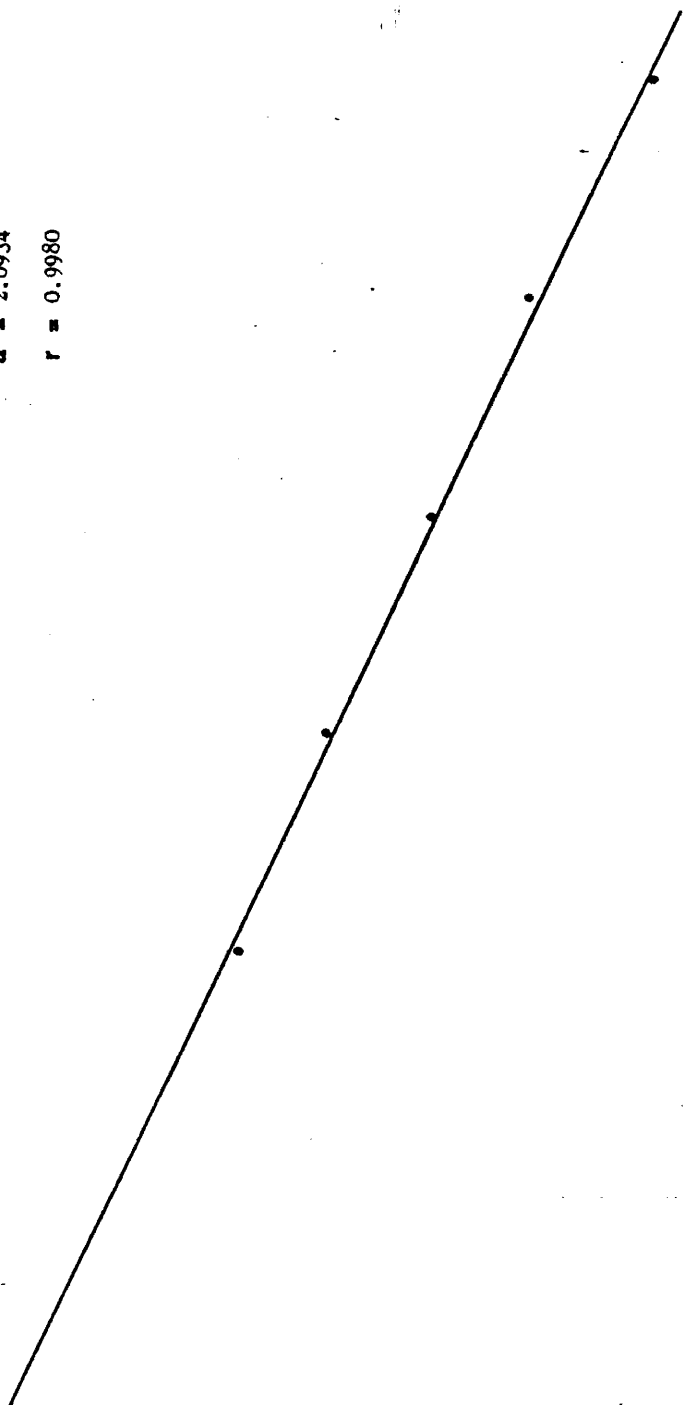


Figura, 5.44

log I₁ Y

a = 2.0934

r = 0.9980



2.0

log C

1.5

1.0

F: a

0.5

- Eficacia del método

Valor teórico : 4 pmoles/100 μ l

Valores prácticos obtenidos:

1.-	3.89	pmol/100 μ l	
2.-	4.57	" "	
3.-	3.38	" "	
4.-	4.47	" "	
5.-	3.52	" "	
6.-	3.60	" "	
7.-	3.83	" "	
8.-	3.72	" "	
9.-	4.39	" "	
10.-	5.31	" "	

$$\bar{x} = 4.068$$

$$E.S. = 0.200$$

$$\% \text{ recuperación} = 101,7\%$$

- Concentraciones en pmoles/100 μ l de cGMP en el placebo: (tabla, 5.8)

$$\bar{X} = 0.08147 \quad , \quad E.S. = 0.008364$$

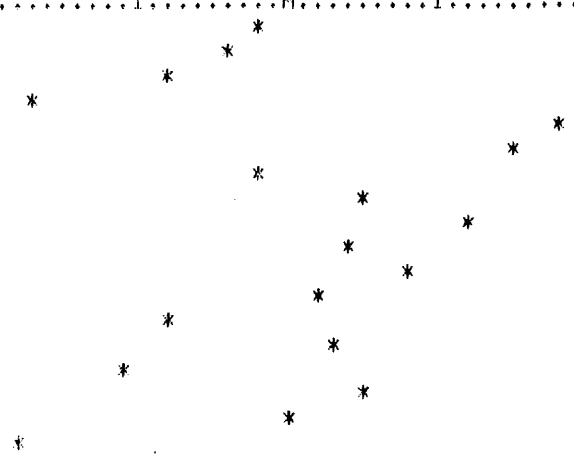
o bien en pmoles/ml:

$$\bar{X} = 0.8147 \quad , \quad E.S. = 0.08364$$

Tabla, 5.8

SEQ	DATA
1	0.0752
2	0.0664
3	0.0552
4	0.0224
5	0.1430
6	0.1320
7	0.0744
8	0.0990
9	0.1220
10	0.0840
11	0.1080
12	0.0968
13	0.0542
14	0.0704
15	0.0441
16	0.0784
17	0.0929
18	0.0180

<2.....1.....M.....1.....2>



- Concentraciones en pmoles/100 μ l de cAMP en el extracto esplénico:
(tabla, 5.9)

$$\bar{X} = 0.07676 \quad , \quad E.S. = 0.00601$$

o bien en pmoles/ml:

$$\bar{X} = 0.7676 \quad , \quad E.S. = 0.0601$$

Tabla, 5.9

SER	CONCENTRACION
1	0.0354
2	0.0142
3	0.0138
4	0.0115
5	0.0710
6	0.1470
7	0.0122
8	0.0245
9	0.0136
10	0.0321
11	0.1310
12	0.0378
13	0.0397
14	0.0552
15	0.0322
16	0.0127
17	0.0157
18	0.0745
19	0.0288
20	0.0443
21	0.0172
22	0.0360
23	0.0337
24	0.0830
25	0.0291
26	0.0402
27	0.0377
28	0.0456
29	0.0282
30	0.0525
31	0.0434
32	0.0510
33	0.0100
34	0.0286
35	0.0422
36	0.0317
37	0.0534
38	0.1240
39	0.0174
40	0.1386
41	0.0375
42	0.1170
43	0.0207
44	0.0608
45	0.1127
46	0.1350
47	0.1610
48	0.1650
49	0.1430
50	0.1110
51	0.1020
52	0.1140
53	0.1750
54	0.0812
55	0.1850
56	0.0317
57	0.1170
58	0.1170
59	0.1700
60	0.0525
61	0.0189
62	0.0402
63	0.1110
64	0.0451
65	0.0310
66	0.0147
67	0.1180
68	0.0147
69	0.0147

- Estudio estadístico:

Valor medio de cGMP en el placebo ($\bar{X} \pm E.S.$):

$$0.08147 \pm 0.008364$$

Valor medio de cGMP en el extracto esplénico ($\bar{X} \pm E.S.$):

$$0.07676 \pm 0.00601$$

Número de grados de libertad (v) = 85

t de Student experimental = 0.3756

Límite del parámetro t para un coeficiente de seguridad del 95%

($p = 0.05$) = 2.

Por lo tanto, los valores de cGMP hallados en el extracto esplénico no difieren significativamente de los correspondientes al placebo.

b/ En la pieza intestinal.

Antes de proceder a la descripción de los resultados obtenidos en el transcurso de esta fase experimental, es necesario indicar que los valores especificados en las tablas y gráficas correspondientes se expresan en pmoles/mg de proteína, por lo que remitimos al lector al apéndice que aparece al final del presente apartado(B. 2. c.), donde hallará cumplida información sobre la determinación proteica.

1/- Adenosín 3':5' -monofosfato cíclico(cAMP).

- Coeficiente de variación interensayo:

Al comparar las pendientes de las rectas estandard que aparecen en las figuras 5.46 a 5.51, se obtienen los siguientes resultados:

Valor de las pendientes (a)

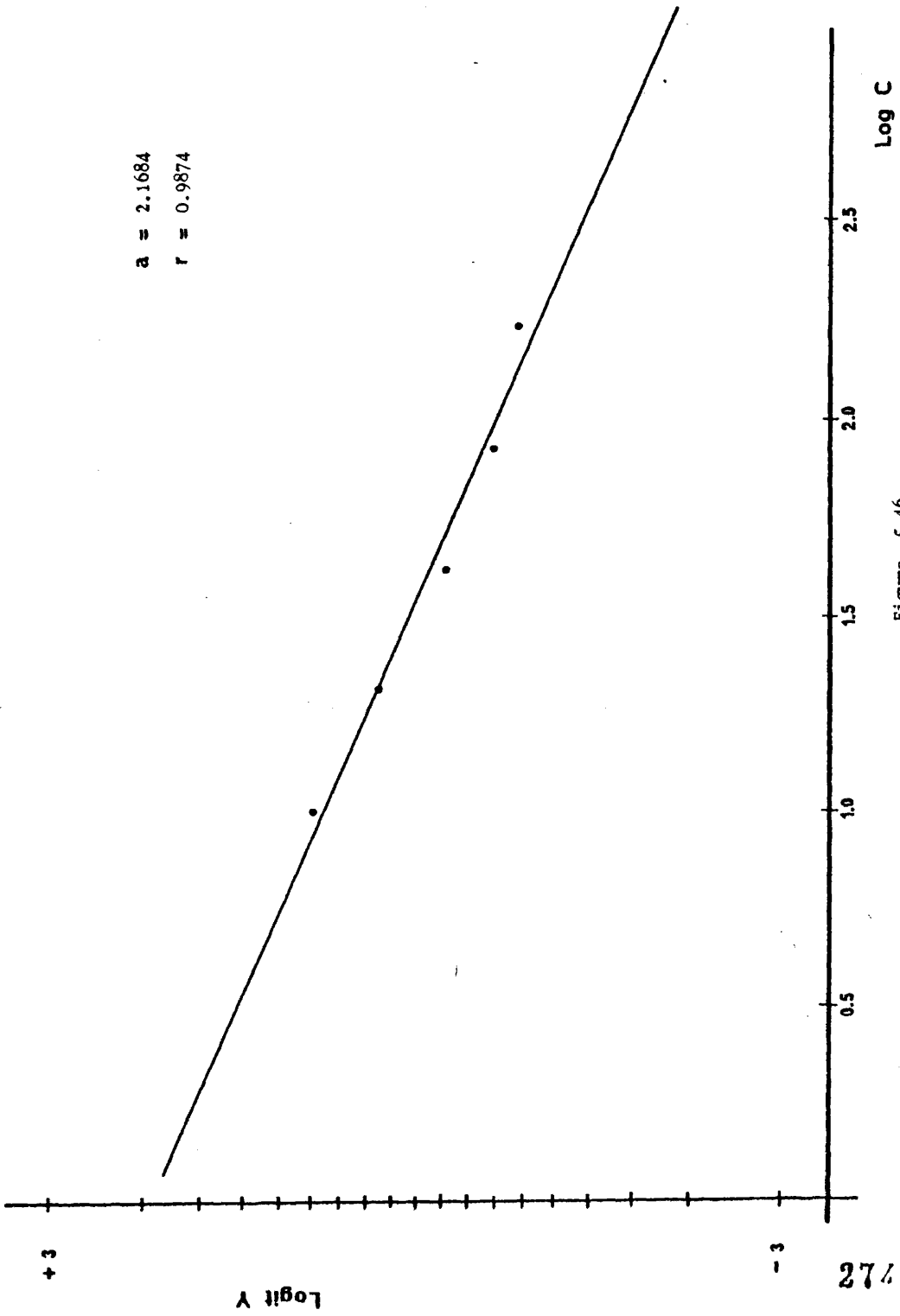
- 1.- 2.1684
- 2.- 2.1870
- 3.- 2.1430
- 4.- 1.9083
- 5.- 1.9032
- 6.- 2.1645

$$\bar{x} = 2.0791$$

$$E.S. = 0.0604$$

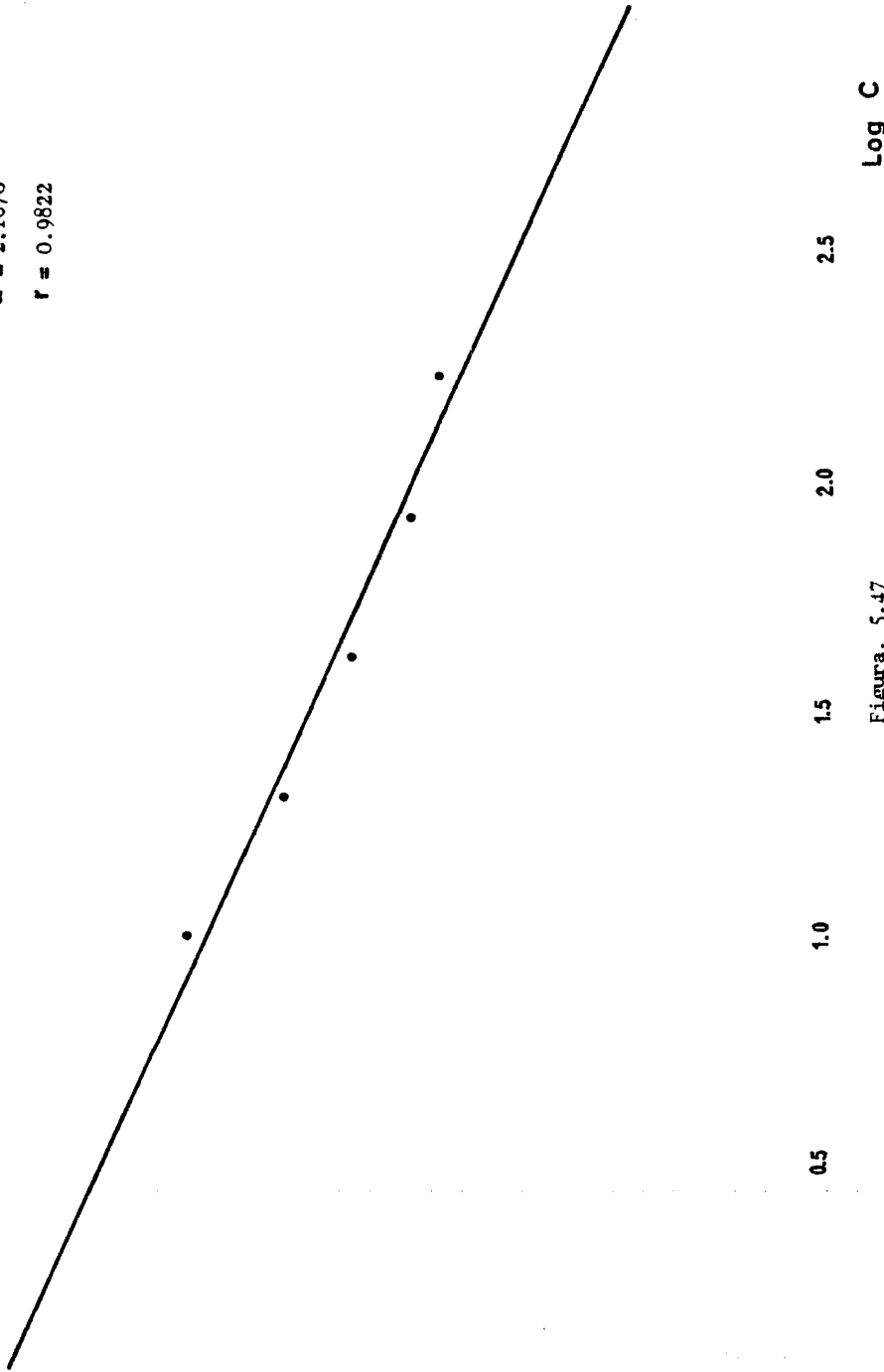
$$CV\% = 6,49\%$$

$a = 2.1684$
 $r = 0.9874$



Figura, 5.46

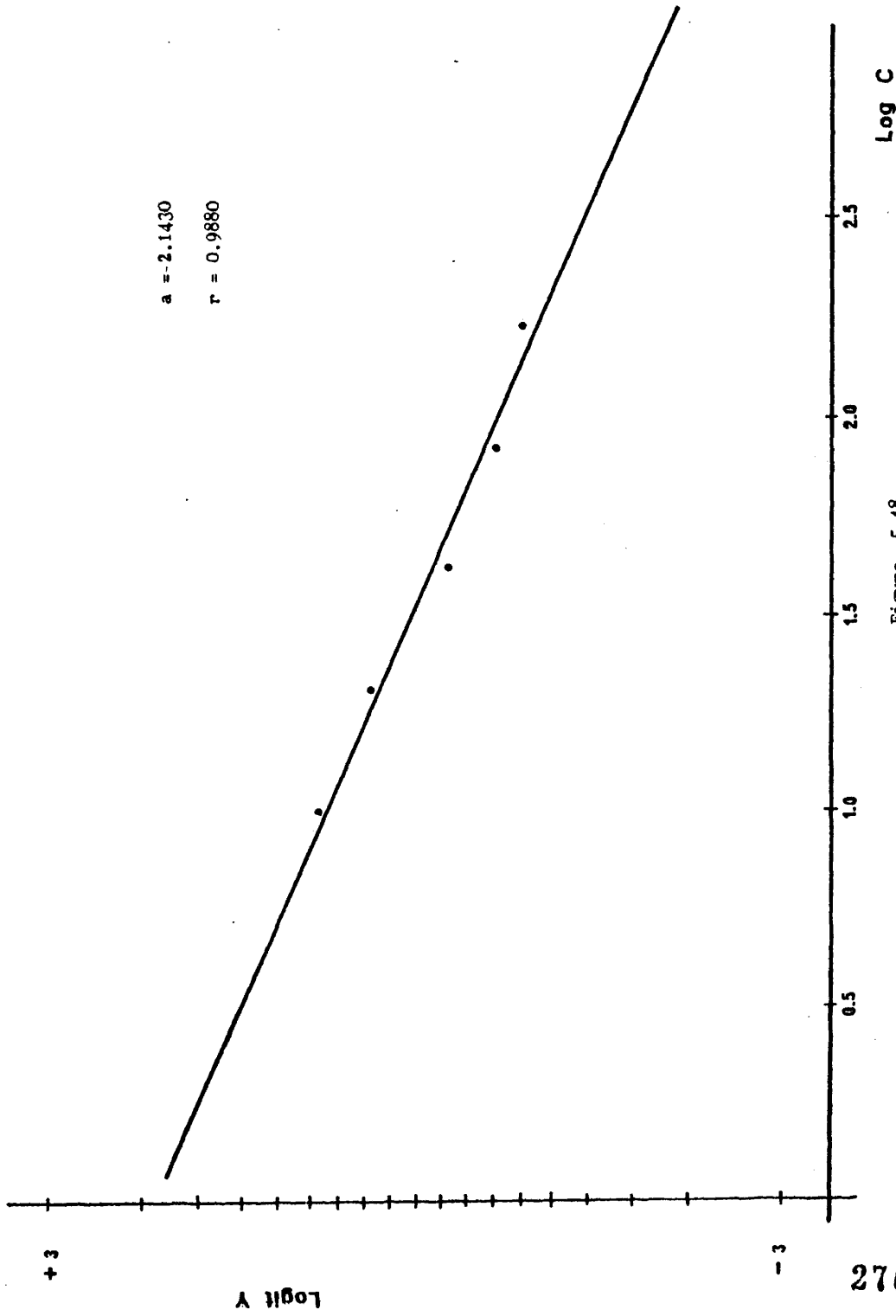
$a = 2.1870$
 $r = 0.9822$



Logit Y

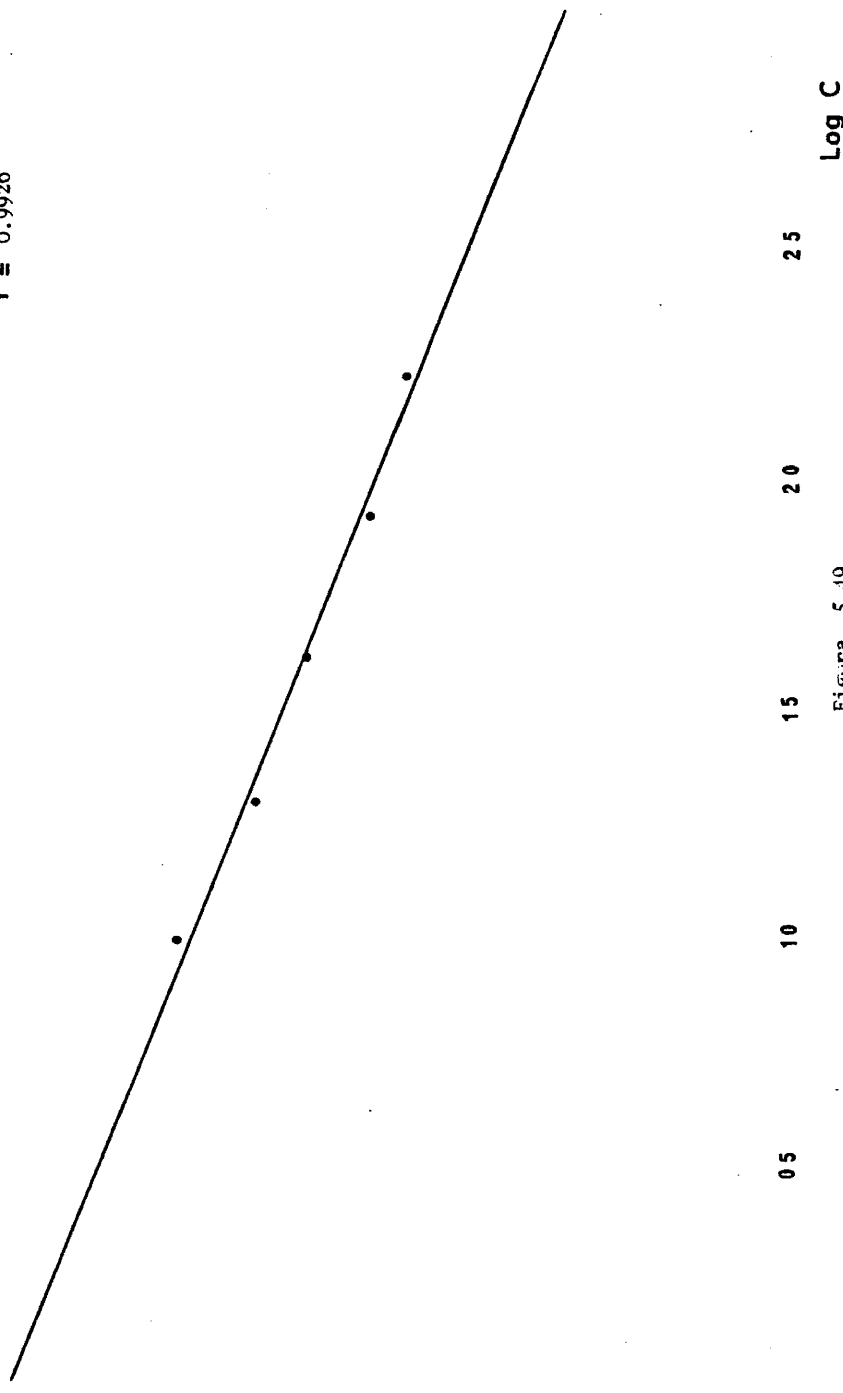
Log C

Figura, 5.47



Figura, 5.48

$a = 1.9083$
 $r = 0.9926$



Figura, 5.49

Log C

25

20

15

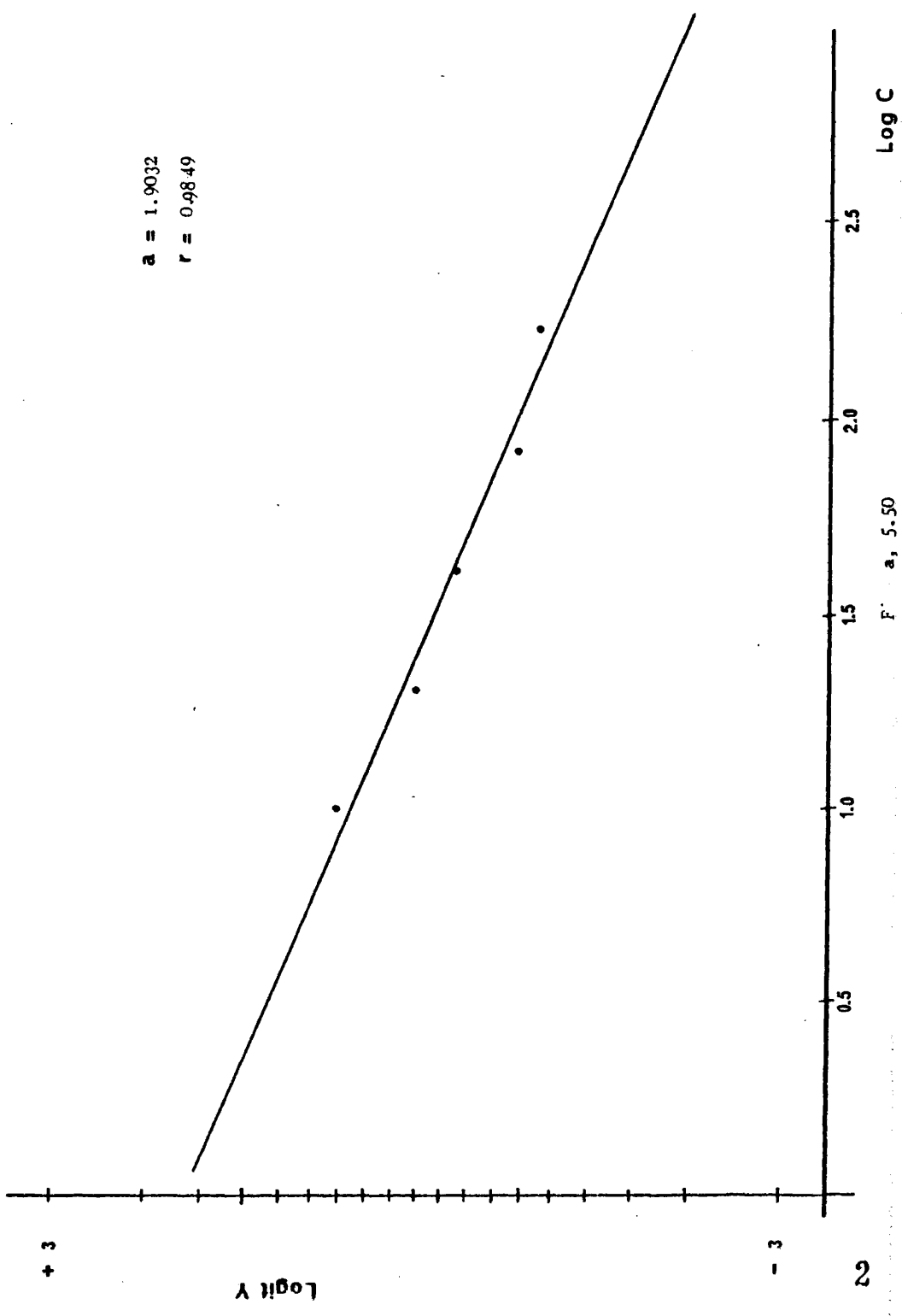
10

05

Logit Y

+ 3

- 3



F: a, 5.50

a = 2.1645
r = 0.9955

Logit Y

0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 Log C

Figura, 5.51

279

- Eficacia del método:

Valor teórico : 16 pmol/50 μ l.

Valores prácticos obtenidos:

1.-	15.86	pmol/50 μ l.
2.-	15.27	" "
3.-	14.64	" "
4.-	14.81	" "
5.-	15.65	" "
6.-	16.01	" "
7.-	15.43	" "
8.-	16.45	" "
9.-	16.85	" "
10.-	16.80	" "

$$\bar{X} = 15.777$$

$$E.S. = 0.2566$$

$$\% \text{ recuperación} = 98,6\%$$

- Valores de cAMP en tejido intestinal:

En las tablas 5.11 a 5.16, se ofrecen los datos obtenidos a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 40, 60 y 120 segundos) después de la adición del extracto esplénico ácido (E.E.A.) a la suspensión intestinal.

La tabla 5.10 recoge los valores control obtenidos en ausencia de E.E.A.

La figura 5.52 constituye un cuadro resumen de los valores obtenidos, tanto para control como para los distintos tiempos de incubación, expresados como la media (\bar{x}) \pm el error estándar (E.S.).

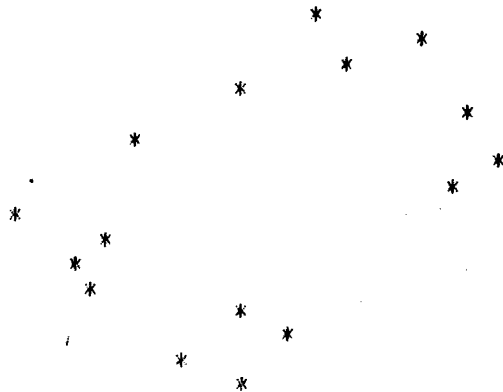
Las figuras 5.53 y 5.54, constituyen expresiones gráficas de los resultados destinadas a ofrecer una visión de conjunto de la influencia que el extracto esplénico ácido despliega sobre el nivel tisular de cAMP. Las barras verticales que parten, en ambos sentidos, de los puntos correspondientes a las respectivas medias representan errores estándar.

Tabla, 5.10: Valores control. Concentraciones en pmol/mg proteína de cAMP en fileon (sin adición de E.E.A.):

$$\bar{X} = 1.3802, \text{ E.S.} = 0.096$$

SEQ	DATA
1	1.5220
2	1.7930
3	1.6150
4	1.3330
5	1.8970
6	1.0570
7	1.9760
8	1.8480
9	0.7780
10	1.0100
11	0.9180
12	0.9710
13	1.3600
14	1.4410
15	1.2050
16	1.5280

<2.....1.....M.....1.....>



Tabla, 5.11: Concentraciones en pmol/mg de proteína de cAMP en fíleon a los 0 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 1.3842 \quad , \quad E.S. = 0.076$$

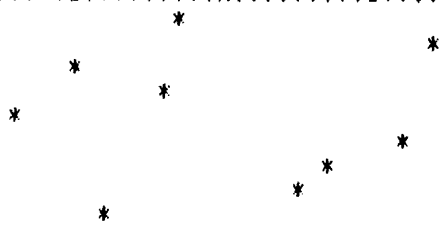
SEQ	DATA	(2.....1.....M.....1.....2)
1	1.2600	*
2	0.8970	*
3	1.2740	*
4	1.4240	*
5	1.6080	*
6	1.4150	*
7	1.1670	*
8	1.2000	*
9	1.4050	*
10	1.2990	*
11	1.4050	*
12	1.4810	*
13	1.9420	*

Tabla, 5.12: Concentraciones en pmol/mg de proteína de cAMP en íleon a los 10 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 1.1400 \quad , \quad E.S. = 0.145$$

SEQ	DATA
1	1.0190
2	1.7240
3	0.7460
4	0.9710
5	0.5550
6	1.6300
7	1.4200
8	1.3620
9	0.8250

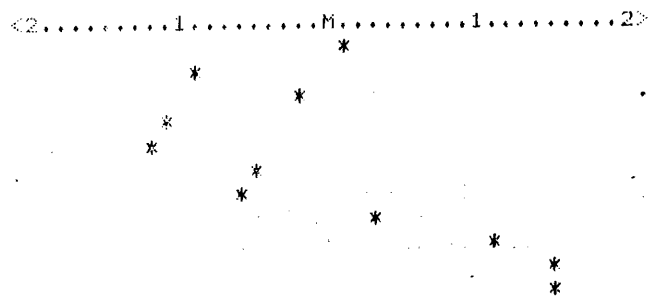
<2.....1.....M.....1.....2>



Tabla, 5.13: Concentraciones en pmol/mg de proteína de cAMP en íleon a los 20 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 1.0816, \text{ E.S.} = 0.157$$

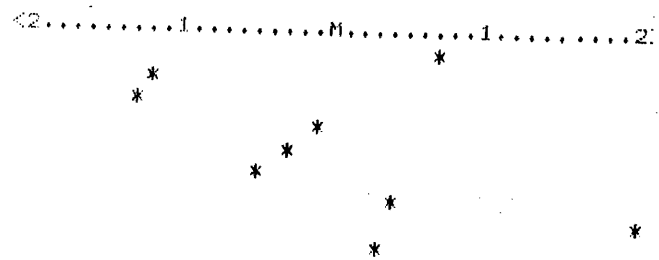
SEQ	DATA
1	1.1520
2	0.6130
3	0.9810
4	0.5180
5	0.5000
6	0.8350
7	0.7950
8	1.2080
9	1.6300
10	1.8210
11	1.8380



Tabla, 5.14: Concentraciones en pmol/mg de proteína de cAMP en ileon a los 40 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 1.0456 \quad , \quad E.S. = 0.118$$

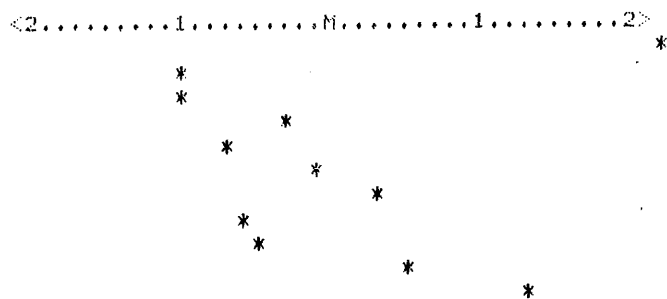
SEQ	DATA
1	1.2770
2	0.6420
3	0.6110
4	1.0000
5	0.7820
6	0.9740
7	1.1750
8	1.6950
9	1.1010



Tabla, 5.15: Concentraciones en pmol/mg de proteína de cAMP en íleon a los 60 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.8082 \quad , \quad E.S. = 0.142$$

SEG	DATA
1	1.7870
2	0.3460
3	0.3690
4	0.6520
5	0.4820
6	0.7670
7	0.9570
8	0.5220
9	0.5950
10	1.0300
11	1.3790

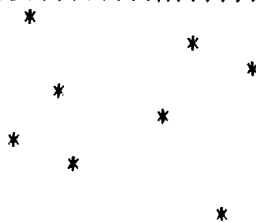


Tabla, 5.16: Concentraciones en pmol/mg de proteína de cAMP en íleon a los 120 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.7620 \quad , \quad E.S. = 0.100$$

SEQ	DATA
1	0.4970
2	0.8200
3	0.9330
4	0.5540
5	0.7570
6	0.4680
7	0.5850
8	1.3720
9	0.8720

<2.....1.....M.....1.....2>



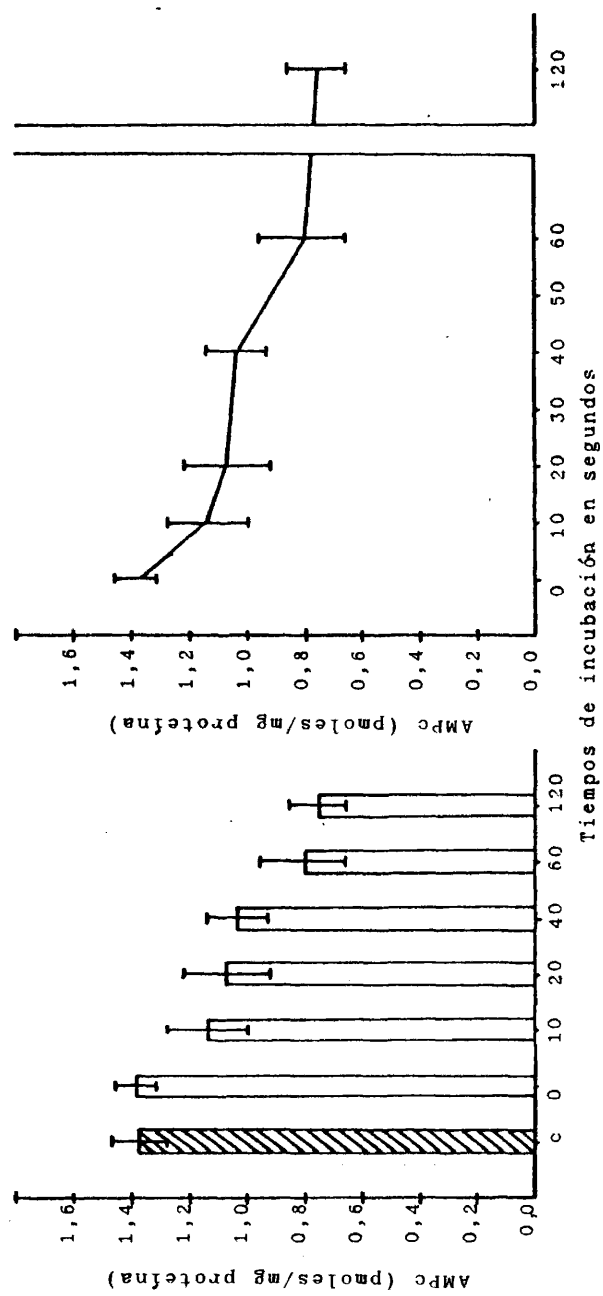
-Estudio estadístico:

Medias comparadas	(v)	t de Student	significación
Control -- 0"	27	0.0314	n.s.
" -- 10"	23	1.4330	n.s.
" -- 20"	25	1.7142	n.s.
" -- 40"	23	2.1412	p = 0.05
" -- 60"	25	3.4580	p = 0.01
" -- 120"	23	4.1343	p = 0.001
0" -- 10"	20	1.6194	n.s.
" -- 20"	22	1.8119	n.s.
" -- 40"	20	2.5193	p = 0.05
" -- 60"	22	3.7189	p = 0.01
" -- 120"	20	4.9984	p = 0.001
10" -- 20"	18	0.2639	n.s.
" -- 40"	16	0.4998	n.s.
" -- 60"	18	1.6144	n.s.
" -- 120"	18	2.2146	p = 0.05
20" -- 40"	18	0.1766	n.s.
" -- 60"	20	1.2922	n.s.
" -- 120"	18	1.6519	n.s.
40" -- 60"	18	1.2472	n.s.
" -- 120"	16	1.8289	n.s.
60" -- 120"	18	0.2537	n.s.

Por tanto, puede apreciarse que el E.E.A., provoca un descenso del nivel tisular de cAMP en el transcurso del tiempo que adquiere significación estadística, respecto al control y al tiempo cero, a partir del período de incubación 40 segundos; significación que persiste, inclusive, al comparar el nivel de cAMP a los 10 segundos y a los 120 segundos. Sin embargo a partir de los 60 segundos parece alcanzarse el máximo descenso y el nivel permanece prácticamente estable.

Adición	Tiempo de incubación (seg.)	AMPe
Control	—	1.380 [±] 0.09
EEA	0	1.384 [±] 0.07
EEA	10	1.140 [±] 0.14
EEA	20	1.081 [±] 0.15
EEA	40	1.045 [±] 0.11
EEA	60	0.808 [±] 0.14
EEA	120	0.762 [±] 0.10

Figura, 5-52



Figuras, 5.53 y 5.54

2/- Guanosín 3':5' -monofosfato cíclico (cGMP).

- Coeficiente de variación interensayo:

Al comparar la pendiente de las rectas estandard que aparecen en las figuras 5.55 a 5.60, se obtienen los siguientes resultados:

Valor de las pendientes (a)

1.- 1.4341

2.- 1.3639

3.- 1.5507

4.- 1.5192

5.- 1.4042

6.- 1.5788

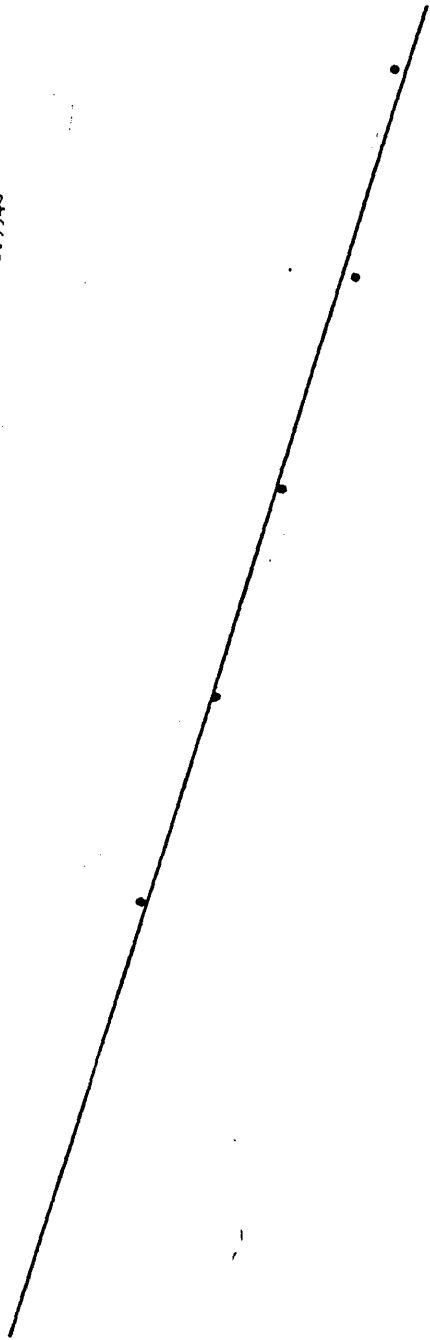
$\bar{X} = 1.4752$

E.S. = 0.0387

CV% = 5,87%

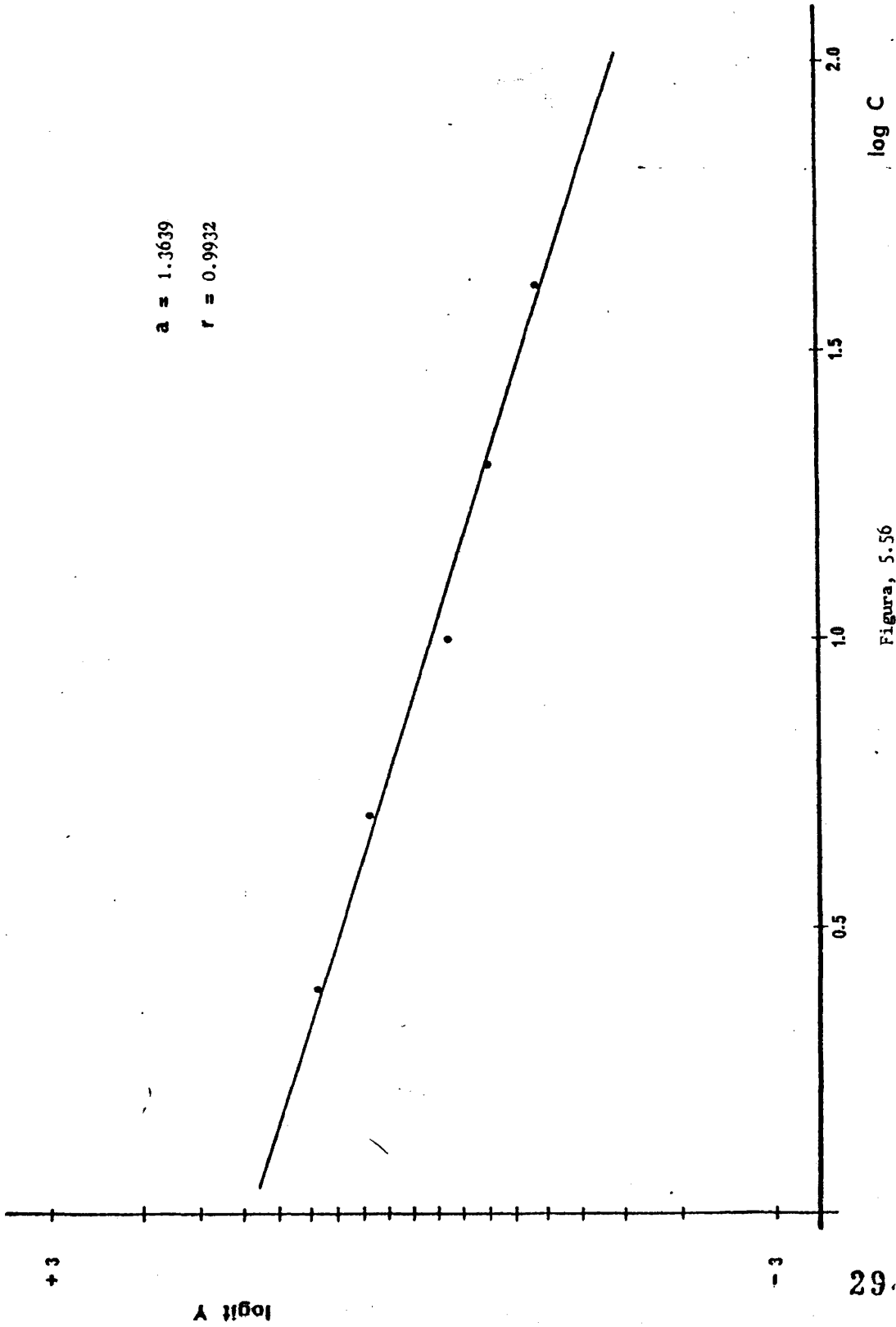
a = 1.4341
r = 0.9948

logit Y



1.0 1.5 2.0
log C

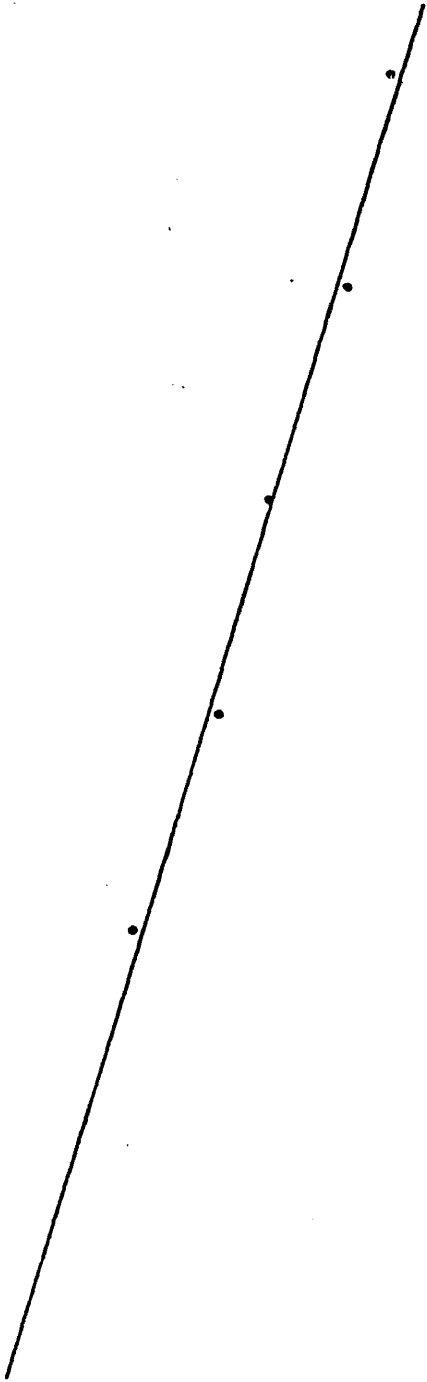
Figura, 5.55



Figura, 5.56

a = 1.5507

r = 0.9934



2.0

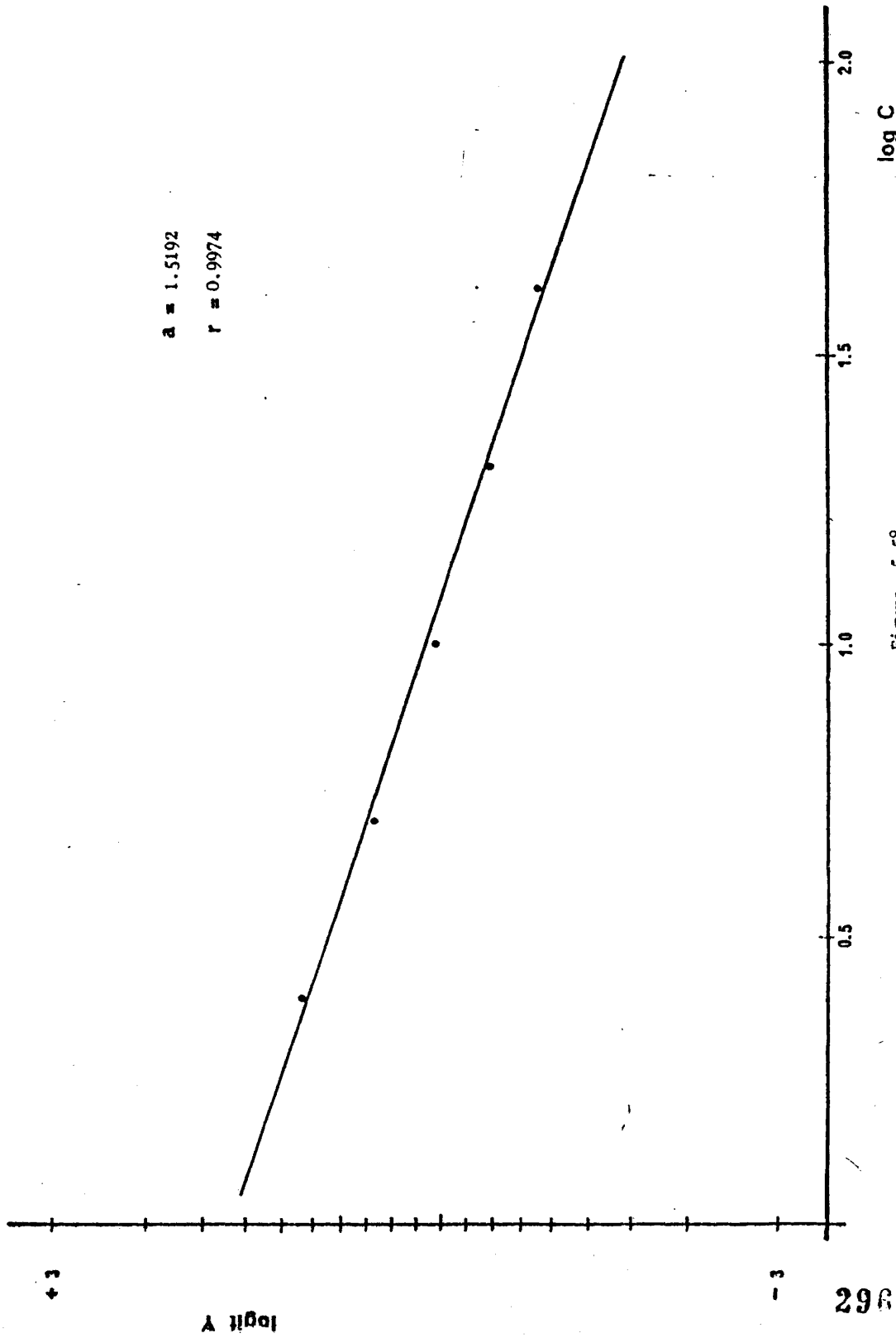
1.5

1.0

0.5

log C

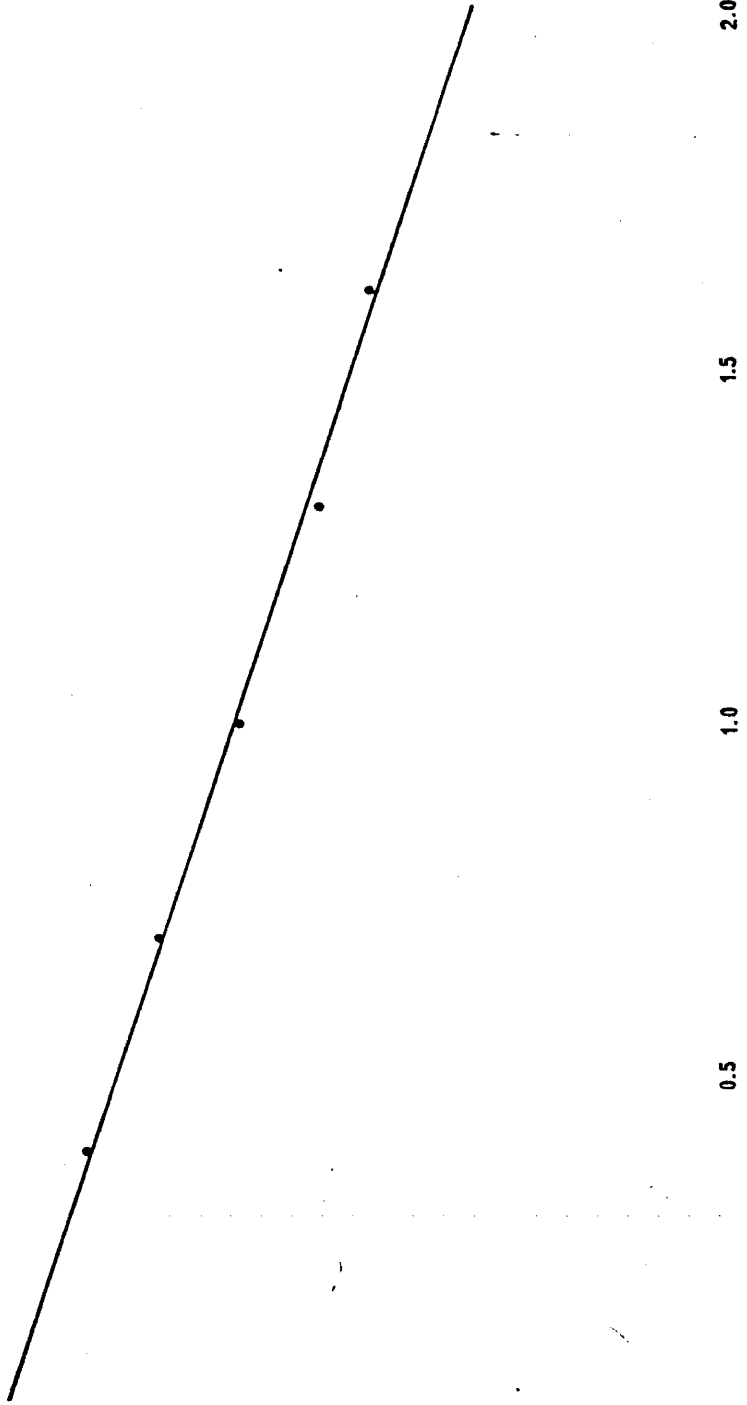
Figura, 5.57



Figura, 5.58

logit Y

a = 1.4042
r = 0.9974



2.0

log C

1.5

1.0

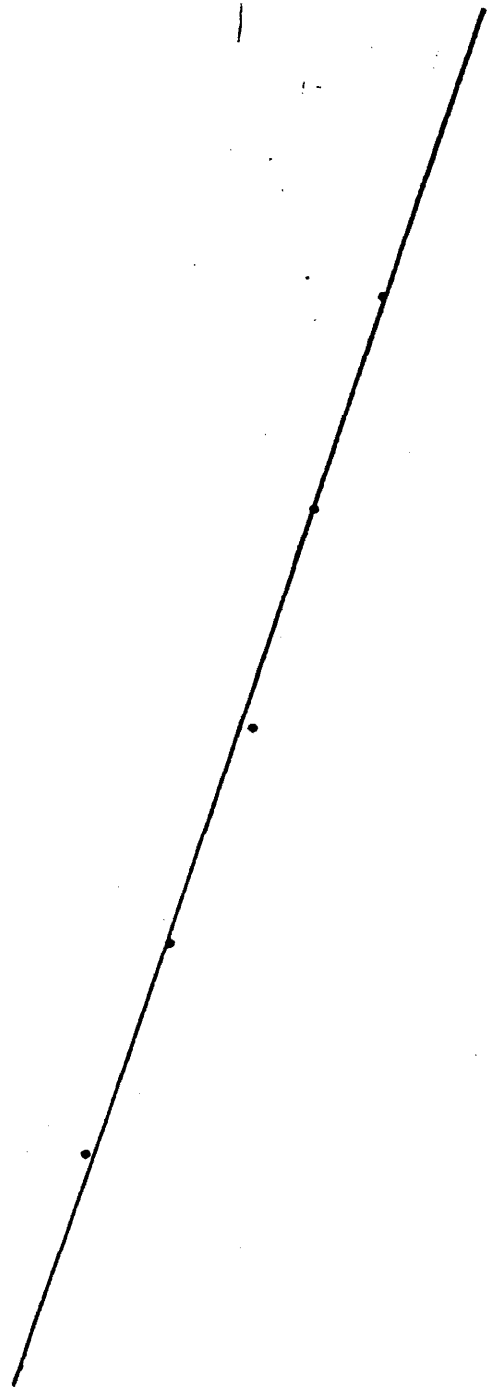
0.5

Figura, 5.59

logit Y

+3

$a = 1.5788$
 $r = 0.9977$



log C

0.5 1.0 1.5 2.0

Figura, 5.60

- Eficacia del método:

Valor teórico: 4 pmol/100 μ l

Valores prácticos obtenidos:

1.-	3.75	pmol/100	μ l
2.-	4.20	"	"
3.-	3.58	"	"
4.-	3.91	"	"
5.-	4.15	"	"
6.-	3.95	"	"
7.-	3.81	"	"
8.-	3.87	"	"
9.-	4.30	"	"
10.-	4.40	"	"

$$\bar{x} = 3.992$$

$$E.S. = 0,0871$$

$$\% \text{ recuperación} = 99,8\%$$

- Valores de cGMP en tejido intestinal:

En las tablas 5.18 a 5.23, se ofrecen los datos obtenidos a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 40, 60, y 120 segundos) después de la adición del extracto esplénico ácido (E.E.A.) a la suspensión intestinal.

La tabla 5.17 recoge los valores control obtenidos en ausencia de E.E.A..

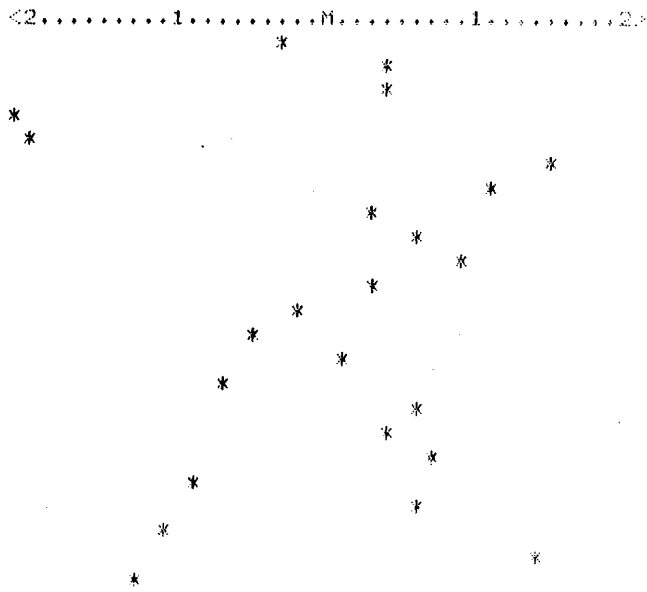
La figura 5.61 constituye un cuadro resumen de los valores obtenidos, tanto para el control como para los distintos tiempos de incubación, expresados como la media (\bar{x}) \pm el error estándar (E.S.).

Las figuras 5.62 y 5.63, constituyen expresiones gráficas de los resultados destinadas a ofrecer una visión de conjunto de la influencia que el extracto esplénico ácido despliega sobre el nivel tisular de cGMP. Las barras verticales que parten, en ambos sentidos, de los puntos correspondientes a las respectivas medias representan errores estándar.

Tabla, 5.17: Valores control. Concentraciones en pmol/mg de proteína de cGMP en íleon (sin adición de E.E.A.):

$$\bar{X} = 0.1254, \quad E.S. = 0.0091$$

SEQ	DATA
1	0.1130
2	0.1440
3	0.1430
4	0.0319
5	0.0382
6	0.1900
7	0.1730
8	0.1370
9	0.1510
10	0.1650
11	0.1380
12	0.1150
13	0.1040
14	0.1280
15	0.0951
16	0.1530
17	0.1420
18	0.1540
19	0.0878
20	0.1500
21	0.0792
22	0.1840
23	0.0687

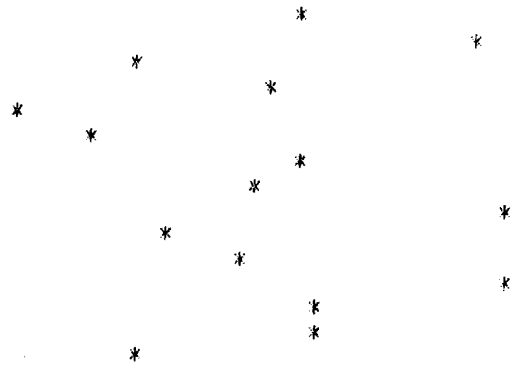


Tabla, 5.18: Concentraciones, en pmol/mg de proteína, de cGMP en íleon a los 0 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.0962 \quad , \quad E.S. = 0.0107$$

SEQ	DATA
1	0.1040
2	0.1510
3	0.0616
4	0.0973
5	0.0270
6	0.0494
7	0.1060
8	0.0704
9	0.1600
10	0.0671
11	0.0890
12	0.1620
13	0.1090
14	0.1090
15	0.0593

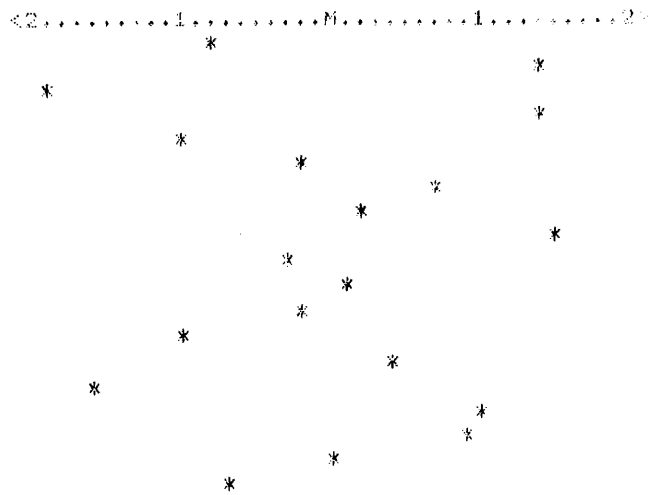
<2.....1.....M.....1.....2>



Tabla, 5.19: Concentraciones, en pmol/mg de proteína, de cGMP en íleon a los 10 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.0944 \quad , \quad E.S. = 0.0078$$

SEQ	DATA
1	0.0694
2	0.1410
3	0.0315
4	0.1420
5	0.0613
6	0.0880
7	0.1180
8	0.0997
9	0.1450
10	0.0844
11	0.0991
12	0.0881
13	0.0622
14	0.1060
15	0.0425
16	0.1260
17	0.1250
18	0.0931
19	0.0704

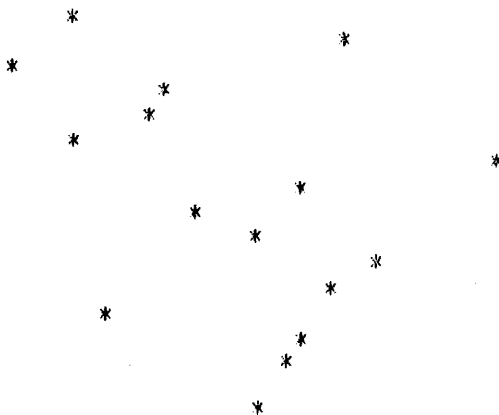


Tabla, 5.20: Concentraciones, en pmol/mg de proteína, de cGMP en íleon a los 20 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.1021 \quad , \quad E.S. = 0.0096$$

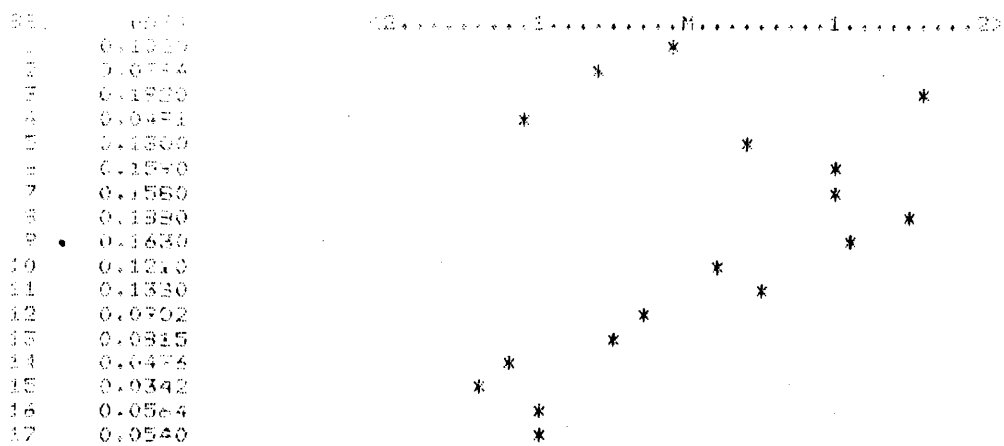
SEQ	DATA
1	0.0565
2	0.1260
3	0.0422
4	0.0792
5	0.0755
6	0.0575
7	0.1640
8	0.1120
9	0.0887
10	0.1020
11	0.1340
12	0.1200
13	0.0655
14	0.1150
15	0.1090
16	0.1870
17	0.1030

<2.....1.....M.....1.....2>



Tabla, 5.21: Concentraciones, en pmol/mg de proteína, de cGMP en fleon a los 40 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.1081 \quad , \quad E.S. = 0.0120$$

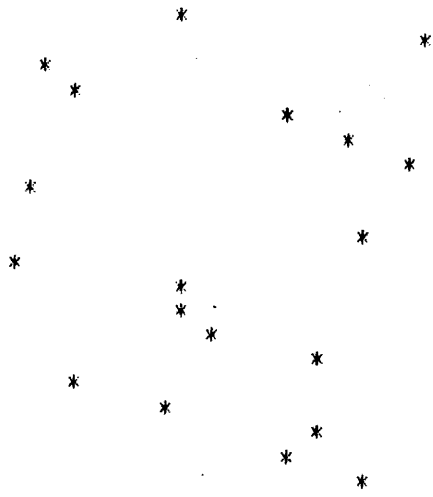


Tabla, 5.22 : Concentraciones, en pmol/mg de proteína, de cGMP en íleon a los 60 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{x} = 0,0878 \quad , \quad E.S. = 0.0073$$

SER	DATA
1	0.0760
2	0.1260
3	0.0463
4	0.0519
5	0.0980
6	0.1070
7	0.1230
8	0.0440
9	0.1570
10	0.1140
11	0.0388
12	0.0737
13	0.0751
14	0.0814
15	0.1030
16	0.0531
17	0.0713
18	0.1030
19	0.0963
20	0.1130

<2.....1.....M.....1.....2>

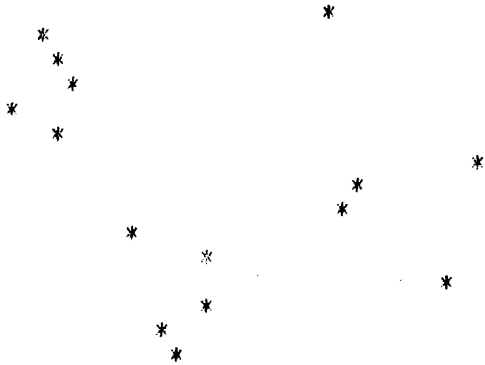


Tabla, 5.23: Concentraciones, en pmol/mg de proteína de cGMP en ileon a los 120 segundos después de la adición de E.E.A.:

$$\bar{X} = 0.0804 \quad , \quad E.S. = 0.0099$$

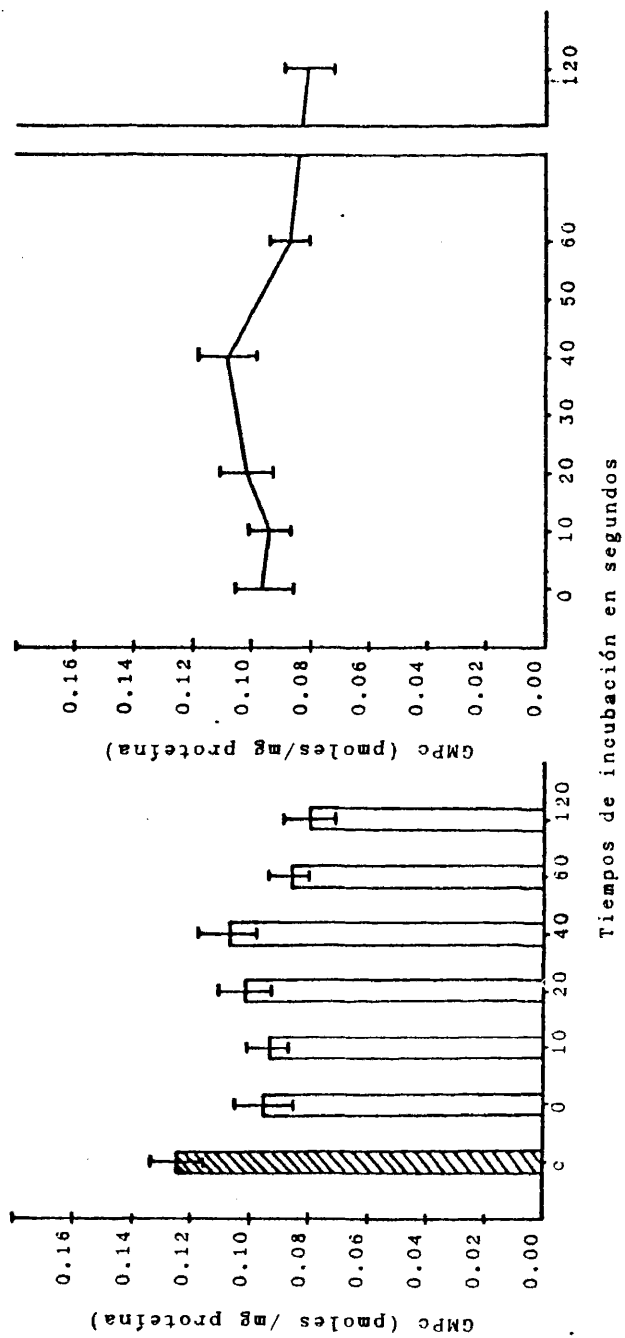
SEQ	DATA
1	0.1100
2	0.0412
3	0.0425
4	0.0475
5	0.0339
6	0.0452
7	0.1460
8	0.1170
9	0.1140
10	0.0634
11	0.0515
12	0.1400
13	0.0805
14	0.0695
15	0.0742

<2.....1.....M.....1.....2>



Adición	Tiempo de incubación (seg.)	GMPc
Control	—	0.125 [±] 0.009
EEA	0	0.096 [±] 0.01
EEA	10	0.094 [±] 0.007
EEA	20	0.102 [±] 0.009
EEA	40	0.108 [±] 0.01
EEA	80	0.087 [±] 0.007
EEA	120	0.080 [±] 0.009

Figura, 5.61



Figuras, 5.62 y 5.63

- Estudio estadístico:

Medias comparadas			(v)	t de Student	Significación
Control	--	0"	36	2.0578	p = 0.05
"	--	10"	40	2.5222	p = 0.05
"	--	20"	38	1.7253	n.s.
"	--	40"	38	1.1234	n.s.
"	--	60"	41	3.1512	p = 0.01
"	--	120"	36	3.2516	p = 0.01
<hr/>					
0"	--	10"	32	0.1384	n.s.
"	--	20"	30	0.4215	n.s.
"	--	40"	30	0.7038	n.s.
"	--	60"	33	0.6667	n.s.
"	--	120"	28	0.1468	n.s.
<hr/>					
10"	--	20"	34	0.6371	n.s.
"	--	40"	34	0.9349	n.s.
"	--	60"	37	0.6124	n.s.
"	--	120"	32	1.1229	n.s.
<hr/>					
20"	--	40"	32	0.3697	n.s.
"	--	60"	35	1.2095	n.s.
"	--	120"	30	1.5767	n.s.
<hr/>					
40"	--	60"	35	1.4214	n.s.
"	--	120"	30	1.6693	n.s.
<hr/>					
60"	--	120"	33	0.6163	n.s.

Como puede apreciarse en la tabla precedente, el extracto esplénico ácido provoca un descenso inicial (Tiempos 0 y 10 segundos) del nivel tisular de cAMP estadísticamente significativo. Posteriormente se inicia una lenta recuperación de tal forma que en los tiempos 20 y 40 segundos se alcanzan cotas que no difieren, desde el punto de vista estadístico, del valor control.

Por último, el nivel de cGMP cae de nuevo hasta que, a los 60 segundos, vuelve a diferir significativamente del valor control. En ese momento comienza a estabilizarse suavizando el descenso.

De todos modos, se puede considerar que a partir del tiempo 0 el nivel de cGMP permanece prácticamente invariable puesto que no hay diferencias estadísticamente significativas.

c/ Apéndice: Determinación de proteínas.

El contenido proteico, en mg/ml, de las porciones alicuotas destinadas al análisis de nucleótidos cíclicos en la preparación intestinal se detalla en la tabla, 5.24

$$\bar{X} = 11.11 \quad , \quad E.S. = 0.1672$$

Tabla, 5.24

SEQ	DATA	<2.....1.....M.....1.....2>
1	12.0000	*
2	14.1000	*
3	9.3000	*
4	9.3000	*
5	11.7000	*
6	11.7000	*
7	12.0000	*
8	9.6000	*
9	12.6000	*
10	12.0000	*
11	9.6000	*
12	10.8000	*
13	9.6000	*
14	11.1000	*
15	14.4000	*
16	12.0000	*
17	11.7000	*
18	12.3000	*
19	10.2000	*
20	10.5000	*
21	10.2000	*
22	11.4000	*
23	9.9000	*
24	12.3000	*
25	9.6000	*
26	11.1000	*
27	12.3000	*
28	10.2000	*
29	10.2000	*
30	10.2000	*
31	8.7000	*
32	9.6000	*
33	9.9000	*
34	10.8000	*
35	8.7000	*
36	11.1000	*
37	11.7000	*
38	11.7000	*
39	11.7000	*
40	12.6000	*
41	11.1000	*
42	9.6000	*
43	10.5000	*
44	10.5000	*
45	9.9000	*
46	11.7000	*
47	11.1000	*
48	11.1000	*
49	12.3000	*
50	13.2000	*
51	12.3000	*
52	12.0000	*
53	12.0000	*
54	12.0000	*
55	11.4000	*
56	10.5000	*
57	11.1000	*

C.- RESUMEN.

Se ha irvestigado sistemáticamente el mecanismo por el que ciertos extractos hidrosolubles procedentes de varios tejidos y representados en la presente tesis por el extracto de bazo de vaca son capaces de modificar el tono de preparaciones aisladas de músculo liso intestinal (íleon de cobaya, en este trabajo doctoral).

Dos son los niveles investigados:

1/ Nivel extracelular.

2/ Nivel intracelular.

1/ A nivel extracelular. Los ensayos fisio-farmacológicos efectuados a fin de dilucidar esta cuestión, indican que el extracto esplénico acidificado (pH=5) estimula marcadamente la motilidad del íleon aislado de cobaya; efecto que es anulado por antihistamínicos bloqueantes de receptores H_1 pero no por antiserotonínicos bloqueantes de receptores "D".

El posterior análisis de histamina en el extracto esplénico resultó negativo, no detectándose cantidades significativas de la misma. Tampoco se detectó liberación de cantidades estadísticamente apreciables de histamina, por parte de la pieza intestinal, después de la adición del extracto esplénico ácido a la copa del baño de órganos.

Por otra parte, la aplicación de radioinmunoanálisis de nucleótidos cíclicos al extracto esplénico reveló la presencia de niveles significativos de cAMP pero no de cGMP.

2/ A nivel intracelular. El extracto esplénico provoca un paulatino descenso del nivel intracelular de cAMP que comienza a ser significativo a partir de los 40 segundos de incubación.

Así mismo, dispara un brusco descenso del nivel de cGMP que rápidamente se estabiliza, iniciándose a partir de los 10 segundos de incubación una recuperación que alcanza cotas, a los 20 y 40 segundos, en los

que las diferencias respecto al nivel control carecen de significación . Por último, hay un nuevo descenso hacia valores significativamente diferentes respecto al valor control (tiempo de incubación 60 segundos) y por fin se estabiliza definitivamente. No obstante, las variaciones del nivel de cAMP a partir del período de incubación "0" segundos no tienen significación estadística, por lo que, salvo el rápido descenso inicial, el extracto esplénico no modifica ostensiblemente el nivel de cAMP en el transcurso de los subsiguientes tiempos de incubación.

6. DISCUSSION

DISCUSION

Continuando con la metódica del trabajo original del Profesor GANDARIAS, hemos utilizado extractos hidrosolubles, en contraste con la escuela escandinava que emplea sistemáticamente extractos de carácter liposoluble.

Los métodos de extracción empleados tienden a simplificar la obtención de los extractos por un lado, y a eliminar las clásicas sustancias activas contaminantes, como histamina, serotonina, etc., por otro. Con este método de extracción conseguimos un extracto prácticamente neutro procedente de bazo de vaca.

Teniendo en cuenta todo el conjunto de resultados obtenidos por el Prof. GANDARIAS y los seguidores de su línea de investigación, que han quedado reseñados en el capítulo de introducción; es preciso convenir que los extractos tisulares hidrosolubles afectan a la motilidad del músculo liso a través de mecanismos distintos a los alfa y beta-adrenérgicos. Por otro lado, tanto en los estudios precedentes realizados por GANDARIAS y colaboradores (Refs. 3 y 12, capítulo 2) como en nuestro propio trabajo, la posible participación colinérgica en el efecto desplegado por este tipo de extracto queda descartada ante la evidente incapacidad de la atropina para bloquear su acción. Al quedar experimentalmente demostrada la no participación de los mecanismos aludidos en la acción del extracto sobre músculo liso, se inició la búsqueda de otras vías capaces de provocar o mediar dicha acción. Ello constituyó la idea motriz que impulsó la elaboración del presente escrito.

En un principio varias evidencias experimentales aportadas por el Prof. GANDARIAS y su equipo de investigación (Ref. 3, capítulo 2), acerca del presunto principio activo responsable de la acción de estos extractos, tales como: su cierta termorresistencia, su bajo peso molecular, (a juzgar por la posición de eluición de la fracción más

activa obtenida al filtrar el extracto a través de columnas de Sephadex), etc..., apuntaban la posibilidad de que se tratase de un nucleótido y más concretamente de un nucleótido cíclico.

Existen varias publicaciones (véase página : 96 , capítulo 3) que tratan el tema del aporte exógeno de nucleótidos cíclicos. En ella se refiere un efecto hipo e hipertonizante sobre la musculatura lisa por parte del cAMP y cGMP respectivamente. Era factible, por tanto, que la presencia de ambos nucleótidos cíclicos en cantidades suficientes estuviese relacionada con la actividad motórica desplegada por estos extractos.

En este sentido, resultaba curioso el hecho de que estos extractos desarrollaran, sobre algunas preparaciones, efectos opuestos hipo e hipertonizantes (según el pH), (Ref. 12 y 17, capítulo 2) que sugiere cierto paralelismo con el antagónico efecto entre cAMP-cGMP al que acabamos de referirnos. Sin embargo, era evidente, aún confirmándose la existencia de cantidades apreciables de ambos nucleótidos en el extracto, la enorme dificultad de adjudicar a los mismos la actividad motórica de este tipo de extractos; máxime si se tiene en cuenta la poca permeabilidad de la membrana celular al cAMP y cGMP. Precisamente esta dificultad ha obligado a utilizar derivados análogos (ej.: dibutiril-cAMP y dibutiril-cGMP) más permeables, cuando se trata de objetivar el efecto subsiguiente a la aplicación externa de cualquiera de ambos nucleótidos.

De todos modos, resultaba ciertamente interesante determinar la presencia o no de cAMP y cGMP en el extracto y se procedió a su análisis.

Se encontró que el extracto de bazo de vaca, utilizado sistemáticamente en nuestro trabajo contenía una cantidad de cAMP próxima a los 400 pmoles/gr de tejido fresco; cifra que se halla dentro del rango normal de valores obtenidos para otros tejidos en otras especies animales (Ref. 704, capítulo 3), mientras que el contenido de cGMP era

estadísticamente nulo. Era pues posible ya descartar los nucleótidos cíclicos como presuntos responsables de la acción del extracto. Para mayor seguridad se procedió a ensayar el efecto del nucleótido presente en el extracto, a la concentración detectada, sobre fleon de cobaya, anotándose en algunos casos una débil respuesta relajante, (observación no incluida en el presente trabajo).

Una vez comprobado este punto, nuestra atención se centró en otros mecanismos, concretamente en mecanismos histaminérgicos y triptaminérgicos. Para el estudio sistemático de su posible incidencia como mediadores del efecto del extracto, se utilizaron preparaciones aisladas de fleon de cobaya. Una documentada bibliografía avala la presencia de receptores "D" de serotina y H_1 de histamina en esta preparación (véase páginas:86-91 capítulo 3).

Se experimentó primero sobre receptores histaminérgicos observando que los fármacos antagonistas de receptores H_1 inhibían efectivamente la acción del extracto. Posteriormente se ensayo con receptores triptaminérgicos anotándose que los fármacos antiserotonínicos específicos para receptores "D" son incapaces de bloquear la respuesta muscular que propicia el extracto. Ante ello, parece claro que el efecto contráctil del extracto esplénico ácido sobre esta preparación intestinal resulta mediado por receptores H_1 de histamina.

Existían, en principio, tres posibles interpretaciones que justificaran estos hechos experimentales:

1/ Que el extracto contuviese una cantidad suficiente de histamina capaz de dar lugar al incremento de la actividad motórica observada.

2/ Que al añadir el extracto a la copa del baño de órganos tuviera lugar una liberación de histamina, por parte de la pieza intestinal, de modo que esa cantidad liberada fuese responsable del aumento del tono muscular.

3/ Que en el extracto hubiese un sustancia distinta de la histamina pero con una configuración molecular similar y en consecuencia potencialmente capaz de interactuar con receptores H_1 de histamina provocando la respuesta contráctil.

Las dos primeras posibilidades quedaron descartadas, puesto que, como puede apreciarse en nuestros resultados, las pequeñas concentraciones de histamina halladas en el extracto y en la solución nutritiva después de la adición del extracto, no difieren significativamente de las halladas en placebo (carece de efecto contráctil) ni en la solución nutritiva antes de la adición de extracto respectivamente. Además, como indicábamos anteriormente, el método de extracción utilizado es muy poco propicio para la aparición de sustancias como la histamina. Por lo tanto, abogamos por la tercera posibilidad, según la cual el extracto contiene, presumiblemente, una sustancia simil-histamina que al interactuar con receptores H_1 -histaminérgicos disparan el incremento del tono muscular.

Una vez atendida la mecánica extracelular del extracto, interesaba dilucidar la posible intervención de segundos mensajeros intracelulares como mediadores de la actividad desplegada por el extracto en esta preparación del músculo liso.

En el capítulo de revisión se describe un gran número de publicaciones que, a través de sus resultados, sugieren la posibilidad de que las variaciones en el contenido muscular de nucleótidos cíclicos sean las responsables de las respuestas relajantes o contráctiles propiciadas por varios agentes. Concretamente el cAMP mediaría la respuesta relajante y el cGMP se encargaría de la contracción (véase página: 94 capítulo 3).

Por otra parte, varios autores coinciden en señalar un incremento del nivel de cGMP en respuesta a la interacción histamina-receptor H_1 (Refs. 44, 158, 401, 531, 614, 615, 672, capítulo 3); efecto que en músculo liso intestinal se compagina con un efecto activador sobre la

cAMP fosfodiesterasa que acelera la destrucción del cAMP descendiendo su nivel tisular (Ref. 354, capítulo 3).

El extracto objeto de estudio parece actuar a través de receptores H_1 ; por tanto, resultaba lógico pensar que influyera sobre ambos nucleótidos cíclicos de un modo similar al descrito para la histamina. De nuestros resultados se desprende que el comportamiento del extracto respecto al cAMP posee cierta similitud con el referido por HONEYMAN y GOODMAN (Ref. 354, capítulo 3), al que hemos aludido unas líneas antes, y por ANDERSSON (Ref. 23, capítulo 3), quien utilizando colon de conejo, anotó un descenso de nivel de cAMP durante la respuesta contráctil provocada con histamina. Ambas observaciones concuerdan con nuestros resultados. Por el contrario, la conducta del extracto con respecto al cGMP contrasta claramente con el consignado para la histamina, puesto que se obtuvo un brusco descenso inicial dentro de los 10 primeros segundos de incubación, manteniéndose posteriormente, el nivel, prácticamente invariable.

Este resultado no es, sin embargo, del todo sorprendente, si tenemos en cuenta varios trabajos recientes en los que se describe una absoluta falta de correlación entre actividad muscular y fluctuación tisular de nucleótidos cíclicos que aportan serios inconvenientes a la hipótesis que implica al cAMP y cGMP como mediadores de la respuesta relajante y contráctil, respectivamente.

Así por ejemplo, se ha descrito que sustancias relajantes del músculo liso como el nitroprusiato sódico, la hidralazina y el verapamil elevan el nivel de cGMP (Ref. 201, capítulo 3). Además, el uso del derivado 8-Bromo-cGMP sobre una preparación de conducto deferente de rata, es capaz de provocar relajación de la misma en ciertas condiciones (Ref. 676, capítulo 3). Por otro lado, la neurotensina, pequeño péptido que provoca la contracción del fleón de cobaya, no modifica los niveles de cAMP ni de cGMP (Ref. 418, capítulo 3). Otro tanto cabe señalar para la adenosina, que relaja la musculatura lisa sin modificar el nivel

de cAMP (Ref. 489, capítulo 3).

A la vista de estas consideraciones no parece que la respuesta contráctil del íleon en presencia del extracto sea mediada por alguno de ambos nucleótidos. Además, teniendo en cuenta que la contracción es prácticamente instantánea, sólo el descenso de cGMP parece lo suficientemente rápido como para tomarlo en cuenta, ya que el descenso de cAMP es lento y sólo se hace significativo a partir de los 40 segundos de incubación, lo que lo descalifica como mediador de la acción contráctil del extracto. Es posible, por consiguiente, que se trate de un evento metabólico de tipo secundario.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1/.- El extracto esplénico contiene cantidades apreciables de cAMP que pueden considerarse incluidos dentro de la escala normal de valores, que otros autores consignan, para este tipo de fluidos biológicos.

2/.- Por su parte, parece que el extracto esplénico no contiene niveles apreciables de cAMP, puesto que al comparar los valores hallados en el extracto frente a aquellos detectados en el placebo no se aprecian diferencias significativas.

3/.- La adición del extracto esplénico acidificado (pH,5) sobre preparaciones de íleon aislado de cobaya conduce a una rápida y marcada contracción hasta cierto punto similar a la obtenida con histamina.

4/.- Esta respuesta contráctil resiste la presencia de un fármaco antiserotonínico como el dimaleato de metisergida. En consecuencia, es posible descartar la vía triptaminérgica como mediadora de la acción del extracto.

5/.- Los fármacos antihistamínicos, como el maleato de d-clorofeniramina (Polaramine) y el clorhidrato de difenhidramina (Benadryl), bloqueantes específicos de receptores H_1 -histaminérgicos anulan la acción contráctil del extracto esplénico ácido, prácticamente en su totalidad; lo que sugiere que ejerce su acción a través de receptores H_1 de histamina.

6/.- El extracto no contiene cantidades significativas de histamina que puedan explicar nuestra anterior conclusión.

7/.- Tampoco induce la liberación de cantidades significativas de histamina, por parte de la pieza intestinal, capaces de explicar el efecto contráctil experimentado y el bloqueo anotado con el uso de fármacos antihistamínicos.

8/.- Parece posible la existencia, en el extracto esplénico, de una sustancia simil-histamina capaz de interactuar con receptores H_1 de

histamina y disparar la respuesta contráctil.

9/.- El extracto esplénico ácido desciende el nivel de cAMP en fleón aislado de cobaya durante la contracción. Sin embargo, este descenso no parece mediar la acción del extracto dado que la respuesta contráctil se inicia instantáneamente mientras que el descenso de cAMP sólo alcanza significación estadística a partir de los 40 segundos de incubación. Resulta más lógico concluir que se trata de un fenómeno metabólico de tipo secundario.

10/.- El extracto esplénico ácido desciende también el nivel tisular de cGMP, pero, a diferencia con el cAMP, el descenso es mucho más rápido alcanzando valores significativos antes del tiempo de incubación 10 segundos. En este caso, hay un mejor grado de correlación entre la rapidez de la respuesta contráctil y la velocidad de descenso del nivel de cGMP. Sin embargo, teniendo en cuenta los conceptos recopilados en el capítulo de revisión, parece muy aventurado concluir que dicho descenso esté directamente implicado en la producción de la contracción. Nos inclinamos, más bien, por interpretarlo como una acción metabólica secundaria del extracto esplénico ácido.

