

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Farmacología**



TESIS DOCTORAL

**Efectos de la somatostatina sobre las propiedades  
electromecánicas y los flujos de  $^{45}\text{Ca}$  en el miocardio aislado  
de cobayo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Juan José Díez Gómez**

Madrid, 2015

Juan José Díez Gómez

TP  
1986  
058



x-53-007008-0

EFFECTOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS PROPIEDADES ELECTROMECANICAS

Y LOS FLUJOS DE  $^{45}\text{Ca}$  EN EL MIOCARDIO AISLADO DE COBAYO

Departamento de Farmacología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1986



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 28/86

© Juan José Díez Gómez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 28015 Madrid  
Madrid, 1986  
Xerox 9400 X 721  
Depósito Legal: M-25891-1986

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS PROPIEDADES  
ELECTROMECANICAS Y LOS FLUJOS DE  $^{45}\text{Ca}$  EN EL  
MIOCARDIO AISLADO DE COBAYO

Autor: Juan José DIEZ GOMEZ

Director: Prof. Dr. D. Juan TAMARGO MENENDEZ,  
Catedrático Numerario de Farmacología

MADRID, 1985





DPTO. DE FARMACOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID-3  
TELEF. 449 94 35

D. JUAN TAMARGO MENENDEZ, CATEDRATICO NUMERARIO  
DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: "EFECTOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS PROPIEDADES ELECTROMECHANICAS Y LOS FLUJOS DE  $^{45}\text{Ca}$  EN EL MIOCARDIO AISLADO DE COBAYO" ha sido realizada por el Ldo. D. Juan José Díez Gómez en este Departamento de Farmacología, bajo mi dirección y tutela, y que cumple todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmo el presente Certificado en Madrid, a veinte de marzo de mil novecientos ochenta y cinco.

Fdo.: Prof. J. Tamargo.



AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. Juan Tamargo, director y tutor de esta Tesis, sin cuya constante ayuda este trabajo no habria sido posible, por su apoyo continuo durante la realización de este trabajo y su inmejorable dirección.

A los Profs. Drs. D. Perfecto García de Jalón y D. Pedro Lorenzo Fernández, directores del Departamento de Farmacología durante el tiempo de realización de este Tesis, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su Departamento.

Al Prof. Dr. D. Santos Barrigón, y a mis amigos y compañeros J. Manzanares, M.T. Tejerina, C. Delgado y C. Valenzuela, por su colaboración y ayuda durante los últimos años.

A D<sup>a</sup> Isabel Gómez, D<sup>a</sup> Cristina Rivas y D. Manuel Lorenzo, y a todos los miembros del Departamento de Farmacología, por haberme ayudado durante todo el tiempo que duró este trabajo.



JUSTIFICACION DE ESTA TESIS DOCTORAL

La somatostatina es un tetradecapéptido cíclico aislado del hipotálamo, páncreas y tracto gastrointestinal de diversas especies animales (BRAZEAU y cols., 1973; SCHALLY y cols., 1976; NOE y cols., 1979; SPIESS y cols., 1979; BENOIT y cols., 1980; BOHLEN y cols., 1981), cuya función fisiológica parece estar relacionada con su capacidad para inhibir la secreción de otras muchas hormonas. Sus acciones han sido ampliamente estudiadas en los tres lugares donde parece desempeñar un papel fisiológico. Son éstos la hipófisis, donde inhibe la liberación de hormona del crecimiento y de tirotropina (BRAZEAU y cols., 1973; VALE y cols., 1975), el páncreas endocrino, donde ejerce una función reguladora sobre la secreción de insulina y glucagón (ARIMURA y FISHBACK, 1981; GERICH, 1981) y el tracto gastrointestinal, donde actúa inhibiendo la secreción de un gran número de secreciones y hormonas (POLACK y cols., 1975; ARNOLD y LANKISCH, 1980). Sus acciones en otros sistemas orgánicos han sido estudiados con menor intensidad. En lo que respecta a las acciones de la somatostatina sobre el aparato cardiovascular han sido escasos los estudios realizados y es poco lo que se sabe hasta la fecha. Algunos autores han descrito una disminución de la presión

arterial por acción de la somatostatina (MOULOPOULOS y cols., 1978). Otros autores, sin embargo, no encuentran estos efectos en humanos (TYDEN y cols., 1979; ROSENTHAL y cols., 1978a, 1978b). Recientemente, GRECO y cols. (1984) han encontrado que la somatostatina podría disminuir la conducción auriculo-ventricular.

Sin embargo, hasta el momento actual, únicamente QUIRION y cols. (1979) han llevado a cabo estudios in vitro sobre las acciones que la somatostatina ejerce sobre el miocardio de distintas especies animales. Estos autores han puesto de manifiesto por primera vez que la somatostatina ejerce un efecto inotrópico negativo en las aurículas aisladas de cobayo, posiblemente mediado a través de la interacción con receptores específicos. No obstante, los estudios de QUIRION y cols. (1979) adolecen de tres defectos importantes:

- 1) Estos autores no llegaron a observar ningún efecto de la somatostatina sobre la función sinusal, debido al escaso número de experimentos realizados y a que no determinaban en sus preparaciones algunos parámetros de función sinusal como el tiempo de recuperación del nodo del seno.

- 2) En sus experimentos no realizaron registros de los potenciales de acción cardíacos, por lo que carecemos de información sobre los efectos de la somatostatina sobre las propiedades electrofisiológicas de las fibras miocárdicas.

3) Aunque de una manera indirecta propusieron que la somatostatina podría interferir con el flujo de entrada de calcio a las fibras miocárdicas, no llevaron a cabo estudios de flujos iónicos que confirmasen esta hipótesis.

Por estas razones, nos ha parecido interesante estudiar en esta Tesis Doctoral los efectos de la somatostatina sobre las propiedades electromecánicas en fibras musculares auriculares y en músculos papilares aislados de cobayo, así como sobre los flujos de  $^{45}\text{Ca}$  en las aurículas de este especie animal.



ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS

- Ach : acetilcolina.  
ACTH : corticotropina.  
AMPc : monofosfato cíclico de adenosina.  
ATP-asa: adenosina-trifosfatasa.  
AV : aurículo-ventricular.  
Bom : bombesina.  
Bq : becquerelio (desintegración/segundo).  
°C : grados centígrados.  
Ca<sup>2+</sup> : ión calcio.  
 $|Ca^{2+}|_i$  : concentración intracelular de ión calcio.  
 $|Ca^{2+}|_o$  : concentración extracelular de ión calcio.  
<sup>45</sup>Ca : calcio 45.  
CCK : colecistoquinina.  
cpm : cuentas por minuto.  
DA : dopamina.  
DE<sub>50</sub> : dosis eficaz 50  
df/dt máx : máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil.  
DPA<sub>50</sub> : duración del potencial de acción al 50% de repolarización.  
DPA<sub>90</sub> : duración del potencial de acción al 90% de repolarización.  
dpm : desintegraciones por minuto.  
E.S.M. : error estándar de la media.

-VIII-

FSH	: hormona folículo-estimulante.
g	: gramo.
GABA	: ácido gamma-aminobutírico.
GH	: hormona del crecimiento.
GHRH	: hormona liberadora de hormona del crecimiento.
GH-RIF	: factor inhibidor de la liberación de hormona del crecimiento (somatostatina).
GIP	: péptido inhibidor gástrico.
gK	: conductancia al potasio.
GMPC	: monofosfato cíclico de guanosina.
gNa	: conductancia al sodio.
GRF	: factor liberador de hormona del crecimiento.
5HT	: 5-hidroxitriptamina (serotonina).
Hz	: hertzio ( $s^{-1}$ ).
INa	: corriente rápida de entrada de sodio.
ISi	: corriente lenta de entrada de calcio.
IX <sub>1</sub>	: corriente de salida de potasio.
K <sup>+</sup>	: ión potasio.
K <sup>+</sup>   <sub>o</sub>	: concentración extracelular de ión potasio.
kBq	: kilobecquerelio ( $10^3$ Bq).
k <sub>cm</sub>	: coeficiente de velocidad de salida de <sup>45</sup> Ca.
kg	: kilogramo.
l	: litro.
LH	: hormona luteinizante.
LH-RH	: hormona liberadora de gonadotropinas.
M	: molar (moles/litro).
MBq	: megabecquerelio ( $10^6$ Bq).

mCi	: milicurio ( $10^{-3}$ Ci).
mg	: miligramo.
min	: minuto.
ml	: mililitro.
mm	: milímetro.
mM	: milimolar ( $10^{-3}$ M).
mmol	: milimol ( $10^{-3}$ mol).
ms	: milisegundo.
mV	: milivoltio.
n	: número de experimentos.
Na <sup>+</sup>	: ión sodio.
[Na <sup>+</sup> ] <sub>o</sub>	: concentración extracelular de ión sodio.
NA	: noradrenalina.
ng	: nanogramo ( $10^{-9}$ g).
nM	: nanomolar ( $10^{-9}$ M).
nmol	: nanomol ( $10^{-9}$ mol).
NT	: neurotensina.
P	: grado de significación.
pg	: picogramo ( $10^{-12}$ g).
pmol	: picomol ( $10^{-12}$ mol).
PPO	: 2,5-difeniloxazol.
PRE	: periodo refractario efectivo.
PRL	: prolactina.
r	: coeficiente de correlación.
RNA	: ácido ribonucleico.
rT <sub>3</sub>	: T <sub>3</sub> inversa.
s	: segundo.

-X-

SNC : sistema nervioso central.  
SP : sustancia P.  
SRIF : factor inhibidor de la liberación de hormona del  
crecimiento (somatostatina).  
SS : somatostatina.  
T<sub>3</sub> : triyodotironina.  
T<sub>4</sub> : tiroxina.  
TR : tiempo de recuperación.  
TRH : hormona liberadora de tirotropina.  
TRNS : tiempo de recuperación del nodo del seno.  
TSH : tirotropina.  
V : voltio.  
V máx : velocidad máxima de despolarización durante la  
fase 0.  
VIP : péptido intestinal vasoactivo.  
 $\bar{x}$  : media aritmética.  
 $\mu\text{Ci}$  : microcurio ( $10^{-6}$  Ci).  
 $\mu\text{g}$  : microgramo ( $10^{-6}$  g).  
 $\mu\text{l}$  : microlitro ( $10^{-6}$  l).  
 $\mu\text{mol}$  : micromol ( $10^{-6}$  mol).

I N D I C E

I. INTRODUCCION . . . . .	1
1. Resumen histórico . . . . .	2
2. Química . . . . .	4
2.1. Estructura . . . . .	4
2.2. Variaciones filogenéticas . . . . .	4
2.3. Formas moleculares . . . . .	6
3. Relación estructura-actividad . . . . .	9
4. Biosíntesis y transporte . . . . .	11
5. Localización . . . . .	14
5.1. Sistema nervioso central . . . . .	14
5.2. Sistema nervioso periférico . . . . .	16
5.3. Páncreas . . . . .	17
5.4. Tracto gastrointestinal . . . . .	17
5.5. Otras localizaciones . . . . .	20
6. Regulación de la secreción . . . . .	21
6.1. Flujos iónicos . . . . .	21
6.2. Neurotransmisores y neuropéptidos . . . . .	23
6.3. Otros factores . . . . .	26
7. Niveles plasmáticos . . . . .	30
8. Acciones . . . . .	36
8.1. Modalidades de acción hormonal . . . . .	36
8.2. Acciones hipofisarias . . . . .	40
8.2.1. Secreción de hormona del crecimiento . . . . .	40
8.2.2. Secreción de tirotropina . . . . .	43

8.2.3. Secreción de prolactina . . . . .	44
8.2.4. Secreción de corticotropina . . . . .	45
8.2.5. Secreción de gonadotropinas . . . . .	46
8.3. Acciones en el sistema nervioso . . . . .	46
8.3.1. Sistema nervioso central . . . . .	46
8.3.2. Efectos sobre la conducta . . . . .	49
8.3.3. Líquido cefalorraquídeo . . . . .	50
8.3.4. Sistema nervioso vegetativo . . . . .	51
8.4. Acciones en el páncreas endocrino . . . . .	52
8.5. Acciones en el tracto gastrointestinal . . . . .	56
8.6. Otras acciones . . . . .	61
8.7. Acciones de la somatostatina-28 . . . . .	64
9. Mecanismo de acción . . . . .	66
9.1. Receptores . . . . .	66
9.2. Nucleótidos cíclicos . . . . .	70
9.3. Fenómenos distales a los nucleótidos cíclicos . . . . .	72
9.4. Flujos iónicos . . . . .	73
10. Aplicaciones terapéuticas . . . . .	80
10.1. Diabetes mellitus . . . . .	80
10.2. Acromegalia . . . . .	83
10.3. Tumores endocrinos . . . . .	83
10.4. Enfermedades gastrointestinales . . . . .	84
10.5. Otras aplicaciones . . . . .	86
10.6. Análogos de somatostatina . . . . .	86
11. Efectos indeseables e inconvenientes . . . . .	88
12. Trastornos clínicos de la secreción de somatostatina . . . . .	90

12.1. Trastornos neurológicos . . . . .	90
12.2. Trastornos gastrointestinales . . . . .	91
12.3. Somatostatinoma . . . . .	93
II. MATERIAL Y METODOS . . . . .	101
1. Estudios de contracción y frecuencia . . . . .	102
1.1. Procedimiento experimental . . . . .	102
1.1.1. Montaje de las preparaciones . . . . .	102
1.1.2. Mantenimiento de las preparaciones . . . . .	103
1.1.3. Sistema de estimulación . . . . .	106
1.1.4. Sistema de registro . . . . .	106
1.2. Determinación de parámetros en aurículas derechas espontáneas . . . . .	107
1.3. Determinación de parámetros en aurículas izquierdas . . . . .	108
1.4. Medición de parámetros y obtención de valores . . . . .	111
1.5. Estudio del efecto de la somatostatina sobre las respuestas a isoproterenol y cloruro de calcio . . . . .	112
1.6. Estudio del efecto de la somatostatina en presencia de Tyrode 70% Na . . . . .	113
2. Estudios de potenciales de acción . . . . .	114
2.1. Montaje, mantenimiento y estimulación de las preparaciones . . . . .	114
2.2. Técnicas de registro y diseño experimental . . . . .	115
2.3. Periodo refractario efectivo . . . . .	116
2.4. Tiempo de recuperación . . . . .	117

2.5. Potenciales de acción lentos (calcio- dependientes) . . . . .	117
2.6. Músculos papilares de cobayo . . . . .	118
3. Estudios de flujos de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	120
3.1. Captación de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	120
3.1.1. Procedimiento experimental . . . . .	120
3.1.1.1. Grupo 1: Experimentos en condiciones basales . . . . .	121
3.1.1.2. Grupo 2: Experimentos con frecuencia variable . . . . .	123
3.1.1.3. Grupo 3: Experimentos con concentración extracelular de $\text{Ca}^{2+}$ variable . . . . .	123
3.1.1.4. Grupo 4: Experimentos con frecuencia y concentración extracelular de $\text{Ca}^{2+}$ variables . . . . .	124
3.1.2. Preparación de las hemiaurículas para el conteo radiactivo . . . . .	124
3.1.3. Líquido de centelleo . . . . .	126
3.1.4. Técnica de medida de la radiactividad	126
3.1.5. Corrección de la extinción y cálculo de la eficacia de conteo . . . . .	127
3.1.6. Cálculo de la captación de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	129
3.2. Salida de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	130
3.2.1. Procedimiento experimental . . . . .	130
3.2.2. Preparación de las muestras y conteo radiactivo . . . . .	132

3.2.3. Cálculo del porcentaje de $^{45}\text{Ca}$ restante en la aurícula . . . . .	133
3.2.4. Cálculo del coeficiente de velocidad de salida de $^{45}\text{Ca}$ ( $k_{\text{cm}}$ ) . . . . .	136
4. Fármacos y productos químicos utilizados . . . . .	138
4.1. Líquidos nutricios . . . . .	138
4.2. Fármacos utilizados . . . . .	138
4.3. Productos utilizados en la determinación de los flujos de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	139
4.3.1. Productos radiactivos . . . . .	139
4.3.2. Productos necesarios para la preparación del líquido de centelleo	140
4.3.3. Productos necesarios para la preparación de las muestras radiactivas . . . . .	140
5. Análisis estadístico de los resultados . . . . .	141
5.1. Descripción de los datos . . . . .	141
5.2. Comparación de medias . . . . .	142
5.3. Análisis de la varianza . . . . .	145
5.4. Correlación y regresión . . . . .	146
III. RESULTADOS . . . . .	148
1. Estudios de contracción y frecuencia . . . . .	149
1.1. Efecto de la somatostatina en aurículas derechas espontáneas . . . . .	149
1.2. Efectos comparativos de la somatostatina más manitol con manitol sólo . . . . .	151
1.3. Efecto de la somatostatina en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente . . . . .	155

1.4. Efectos de la somatostatina sobre el tiempo de recuperación del nodo del seno y la máxima frecuencia de estimulación auricular . . . . .	157
1.5. Efecto de la somatostatina sobre las curvas intervalo de reposo-amplitud contráctil . .	160
1.6. Efecto de la somatostatina sobre la potenciación post-extrasistólica . . . . .	164
1.7. Efecto de la somatostatina sobre la relación fuerza-frecuencia en aurículas izquierdas . . . . .	165
1.8. Efecto de las variaciones de la concentración extracelular de calcio sobre la acción inotrópica negativa de la somatostatina . . . . .	170
1.9. Efecto de la variación de la concentración extracelular de sodio sobre la acción inotrópica negativa de la somatostatina . . . . .	173
1.10. Efecto de la somatostatina sobre las respuestas inotrópicas y cronotrópicas al isoproterenol . . . . .	175
1.11. Efecto de la somatostatina sobre las contracciones lentas . . . . .	179
2. Estudios de potenciales de acción . . . . .	183
2.1. Efecto de la somatostatina sobre los potenciales de acción auriculares . . . . .	183

2.2. Efectos de la somatostatina sobre el periodo refractario efectivo y el tiempo de recuperación auriculares . . . . .	185
2.3. Efecto de la somatostatina sobre los potenciales de acción lentos . . . . .	190
2.4. Efecto de la somatostatina sobre los potenciales de acción ventriculares . . . . .	191
2.5. Efectos de la somatostatina sobre el periodo refractario efectivo y el tiempo de recuperación ventriculares . . . . .	195
3. Estudios de flujos de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	200
3.1. Captación de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	200
3.2. Efecto de la somatostatina sobre la captación de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	204
3.3. Efecto de las variaciones de la frecuencia sobre la acción de la somatostatina . . . . .	208
3.4. Efecto de las variaciones de la concentración extracelular de calcio sobre la acción de la somatostatina . . . . .	213
3.5. Efecto de la somatostatina sobre el flujo de salida de $^{45}\text{Ca}$ . . . . .	219
3.5.1. Aurículas izquierdas en reposo . . . . .	219
3.5.2. Aurículas derechas espontáneas . . . . .	223
IV. DISCUSION . . . . .	226
1. Respuestas inotrópicas y cronotrópicas . . . . .	228
2. Potenciales de acción rápidos y lentos cardíacos . . . . .	238

2.1. Potenciales rápidos . . . . .	238
2.2. Potenciales lentos . . . . .	242
3. Flujos de <sup>45</sup> Ca . . . . .	246
4. Repercusiones clínicas . . . . .	250
V. CONCLUSIONES . . . . .	254
VI. BIBLIOGRAFIA . . . . .	260

## I. INTRODUCCION

### 1. RESUMEN HISTORICO

Durante el curso de las investigaciones encaminadas a determinar la distribución del factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF) en el hipotálamo de rata, KRULICH y cols. (1968) descubrieron una sustancia que sorprendentemente inhibía la liberación de la hormona del crecimiento (GH). Este hallazgo, publicado en 1968, llevó a estos autores a lanzar la hipótesis de que la secreción de GH por la hipófisis estaba regulada por dos factores neurohumorales diferentes, uno de ellos estimulador y otro de ellos inhibidor. Un año más tarde, HELLMAN y LERNMARK (1969) encontraron, en extractos de islotes pancreáticos de paloma incubados in vitro, un factor que inhibía la liberación de insulina. Estas dos observaciones, aparentemente no relacionadas, convergerían posteriormente con la identificación química de la somatostatina, péptido inhibidor que actúa tanto en el sistema hipotálamo-hipofisario como en el páncreas.

Tendrían que transcurrir aún unos años más para que BRAZEAU y cols. (1973), intentando de nuevo aislar el GRF, observaran nuevamente la existencia de un factor inhibidor de la secreción de GH. En esta ocasión, con la experiencia en la metodología conseguida desde los primeros estudios con las hormonas liberadoras de

tirotropina (TRH) y de gonadotropinas (LH-RH), fue posible aislar e identificar en un tiempo relativamente corto, un potente péptido a partir de extractos hipotalámicos que inhibía la liberación de GH. Dado que esta fue la primera acción descrita, el péptido recibió los nombres de factor inhibidor de la liberación de GH (GH-RIF), factor inhibidor de la liberación de somatotropina (SRIF), o bien somatostatina. El nombre de somatostatina, ampliamente utilizado, no se considera actualmente muy apropiado debido a que este compuesto se distribuye extensamente en tejidos distintos del hipotálamo y sus funciones no se limitan a la regulación de la secreción de GH.

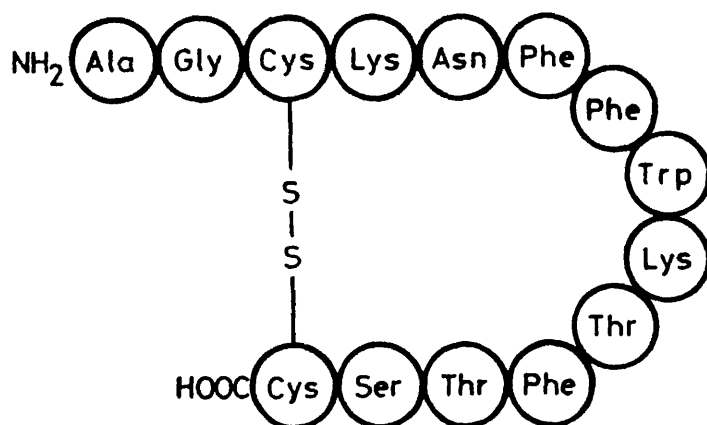
## 2. QUIMICA

### 2.1. ESTRUCTURA

La somatostatina de los mamíferos es un tetradecapéptido cíclico (figura 1) aislado por primera vez del hipotálamo de oveja por BRAZEAU y cols. (1973) y posteriormente aislado y caracterizado en otros órganos, tales como el hipotálamo de cerdo (SCHALLY y cols., 1976), páncreas de pez sapo (NOE y cols., 1979), páncreas de paloma (SPIESS y cols., 1979) y páncreas (BENOIT y cols., 1980) e hipotálamo de rata (BOHLEN y cols., 1981). El peso molecular de este péptido, también llamado somatostatina-14, es de 1638, y en su estructura no aparecen los grupos amida y ácido piroglutámico terminales característicos de la TRH y la LH-RH, aunque sí contiene un puente disulfuro similar al que presentan la oxitocina y la vasopresina, lo que da al compuesto una estructura anular. Su fórmula empírica es  $C_{76}H_{104}N_{18}O_{19}S_2$ .

### 2.2. VARIACIONES FILOGENETICAS

No todas las somatostatinas de las distintas



### SOMATOSTATINA

Figura 1.- Secuencia de aminoácidos de la somatostatina hipotalámica de mamífero.

especies son iguales; incluso dentro de una misma especie pueden existir varios genes que codifiquen la formación de diferentes somatostatinas. En el pez sapo ("anglerfish"), por ejemplo, se han aislado dos tipos de somatostatina (HOBART y cols., 1980). Una de ellas, llamada somatostatina I, recuerda a la somatostatina de los mamíferos; la otra, somatostatina II, presenta cierto número de diferencias con la anterior (tabla 1). La somatostatina del siluro ("catfish"), un péptido de 22 aminoácidos, comparte únicamente 8 residuos con la somatostatina-14 (OYAMA y cols., 1980).

Se ha logrado la producción de somatostatina sintética (BRAZEAU y cols., 1973; COY y cols., 1973; YAMASHIRO y LI, 1973; IMMER y cols., 1974; OYAMA y cols., 1980), cuya actividad biológica es idéntica a la de la hormona natural.

### 2.3. FORMAS MOLECULARES

Existen varias formas moleculares mayores de somatostatina que se han aislado del sistema nervioso central y tejidos periféricos (ARIMURA y cols., 1975; SCHALLY y cols., 1976; SPIESS y VALE, 1978; LAUBER y cols., 1979; NOE y cols., 1979; RORSTAD y cols., 1979; ZINGG y PATEL, 1979; ZYZNAR y cols., 1979; SPIESS y

TABLA 1.- ESTRUCTURA DE LA SOMATOSTATINA Y PEPTIDOS RELACIONADOS\*

Tipo de somatostatina o péptido	Secuencia de aminoácidos
Hipotálamo de mamífero	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
Islotes de siluro	Asp-Asn-Thr-Val-Arg-Ser-Lys-Pro-Leu-Ala-Cys-Met-Asn-Tyr-Phe-Trp-Lys-Ser-Ser-Thr-Ala-Cys
Islotes de pez sapo I	Ala-Ala-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Leu-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-SS-14
Islotes de pez sapo II	Ser-Val-Asp-Ser-Thr-Asn-Asn-Leu-Pro-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Tyr-Trp-Lys-Gly-Phe-Thr-Ser-Cys
Porcina 28	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-SS-14
Carcinoma medular de tiroides de rata	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-SS-14

SS-14 denota la secuencia de aminoácidos de la somatostatina hipotalámica de mamífero; los aminoácidos subrayados en las diferentes somatostatinas son análogos a los de la somatostatina-14. \*Modificado de REICHLIN, 1983.

VALE, 1980). Una de las formas de peso molecular mayor está constituida por 28 aminoácidos (ESCH y cols., 1980; PRADAYROL y cols., 1980; SCHALLY y cols., 1980) y puede considerarse como una somatostatina extendida por su porción amino-terminal. Este compuesto ha sido aislado del intestino (PRADAYROL y cols., 1978) y del hipotálamo de cerdo (SCHALLY y cols., 1980) y del hipotálamo de otras especies.

### 3. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Con el fin de establecer una correlación entre la estructura química de la somatostatina y su actividad hormonal se llevaron a cabo estudios con moléculas análogas al tetradecapéptido.

BRAZEAU y cols. (1973) observaron que la forma reducida de la somatostatina, (H<sub>2</sub>)-somatostatina, poseía la misma actividad biológica que la somatostatina cíclica. Esta observación planteó la duda acerca de la importancia del puente disulfuro que existe entre las dos cisteínas de las posiciones 3 y 14 de la somatostatina. Posteriormente se sintetizaron y analizaron otros compuestos, la (CH<sub>3</sub>, S-Cys<sup>3,14</sup>)-somatostatina y la (Ala<sup>3,14</sup>)-somatostatina, en los que quedó eliminado el ciclo formado por las dos cisteínas. Estos dos análogos mostraron poseer poca pero significativa actividad biológica in vitro (RIVIER y cols., 1975), de donde puede inferirse que el puente disulfuro de la somatostatina es importante para el desarrollo de la actividad biológica.

Para explicar la elevada actividad de la (H<sub>2</sub>)-somatostatina, RIVIER y cols. (1975) supusieron que este compuesto se oxidaba probablemente con rapidez a la forma cíclica en las condiciones de los análisis biológicos.

En un intento de dilucidar el papel que desempeña la cadena lateral Ala<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup> de la somatostatina, se sintetizaron análogos hormonales en los que se eliminaron los dos aminoácidos citados, o bien se sustituyeron por un grupo acilo (RIVIER y cols., 1975). La gran actividad biológica, tanto in vitro como in vivo, de los análogos así obtenidos indicaron que el dipéptido N-terminal, Ala<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>, es probablemente poco importante. El dodecapéptido C-terminal con el puente disulfuro entre las cisteínas contiene probablemente la información necesaria para el reconocimiento de los receptores hipofisarios.

En opinión de otros autores (BOWERS y cols., 1979), solamente los cuatro aminoácidos del anillo de somatostatina que abarcan desde la fenilalanina en posición 7 hasta la treonina en posición 10 son necesarios para la actividad biológica del compuesto, mientras que los otros diez tendrían como función asegurar una conformación adecuada para los cuatro aminoácidos activos.

#### 4. BIOSINTESIS Y TRANSPORTE

La somatostatina no es directamente sintetizada como tal en el organismo, sino que, como ocurre con otras muchas hormonas, deriva de un polipéptido precursor. El RNA mensajero que codifica la somatostatina humana ha podido ser aislado de un paciente con somatostatinoma pancreático. Esto ha permitido a SHEN y cols. (1982) predecir la estructura del precursor proteico de la somatostatina humana. Este precursor tiene un peso molecular de 12729 y está compuesto por 116 aminoácidos que incluyen tanto los correspondientes a la somatostatina-28 como los correspondientes a la somatostatina-14 en su posición C-terminal.

El polipéptido precursor de la somatostatina está conformado por una secuencia inicial de 24 aminoácidos, denominada pre-región, seguida por una secuencia de conexión de 64 residuos o pro-región que se continúa con la secuencia correspondiente a la somatostatina-28, en la cual, a su vez, está incorporada la somatostatina-14. Se desconocen los mecanismos de ruptura de esta cadena peptídica para la liberación de las somatostatinas 28 y 14.

Como sucede con otros péptidos precursores, el compuesto descrito es sintetizado en el retículo

endoplásmico de las neuronas y células epiteliales y es transportado al aparato de Golgi, donde se escinde la pre-región, dejando la prohormona libre (SHIELDS y cols., 1981). La prosomatostatina es ulteriormente almacenada en gránulos de secreción en donde se forman la somatostatina-14 y la somatostatina-28; cierta cantidad de prosomatostatina coexiste como tal en los gránulos maduros y se segrega junto con las dos somatostatinas (REICHLIN, 1981b; ZINGG y PATEL, 1982). Las diferencias en las proporciones relativas de las diversas formas de somatostatina reflejan muy posiblemente diferencias celulares en la transformación de la prohormona y tienen gran importancia debido a que las distintas somatostatinas poseen propiedades diferentes (RORSTAD y cols., 1979). Así, por ejemplo, la somatostatina-28 es más potente que la somatostatina-14 en su efecto supresor de la secreción de insulina (MEYERS y cols., 1980).

Tras el almacenamiento de la hormona en gránulos de secreción, éstos son transportados desde el pericarion hasta los terminales neuronales a través del flujo axoplásmico. En el nervio ciático, por ejemplo, la somatostatina es transportada a una velocidad de 400 mm/24 horas, lo que corresponde al sistema de transporte rápido característico de los gránulos de secreción en las fibras neurosecretoras de la neurohipófisis y de los nervios simpáticos (RASOOL y cols., 1981). En los terminales neurales hipotalámicos,

los gránulos de somatostatina entran en contacto con los vasos del sistema portal hipotálamo-hipofisario, y a través de esta vía alcanzan la hipófisis (RASOOL y cols., 1981).

## 5. LOCALIZACION

La presencia de somatostatina ha sido detectada en distintos sistemas orgánicos, en especial en el sistema nervioso y en el tracto gastrointestinal, por lo que se considera que se trata del péptido hipotalámico más ampliamente distribuido en el organismo.

### 5.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las células y fibras que contienen somatostatina se encuentran distribuidas en varias regiones del hipotálamo; muchas de ellas terminan en la eminencia media, que es el sitio de origen del sistema porta hipotálamo-hipofisario (REICHLIN, 1983). La principal fuente de fibras nerviosas que se proyectan a la eminencia media es una capa de varias células de espesor localizada en la región periventricular anterior del hipotálamo, en una posición inmediatamente por debajo del revestimiento ependimario (ALPERT y cols., 1976; BENNETT-CLARKE y cols., 1980; PELLETIER, 1980). Células similares se encuentran también en la división medial del núcleo paraventricular.

Algunas fibras somatostatinérgicas originadas en la región periventricular se proyectan a ciertos núcleos hipotalámicos considerados parte del sistema límbico (KRISCH, 1978; BENNETT-CLARKE y cols., 1980; PELLETIER, 1980), mientras que otras alcanzan el tronco encefálico y la médula espinal (KRISCH, 1981). Se han encontrado también terminaciones nerviosas conteniendo somatostatina en los núcleos supraquiasmáticos, regiones implicadas en la regulación de los ritmos circadianos, de la temperatura corporal y de las funciones endocrinas.

Todas las zonas de la corteza cerebral contienen somas neuronales de neuronas somatostatinérgicas (KRISCH, 1978; BENNETT-CLARKE y cols., 1980; KRISCH, 1980), si bien la concentración cortical de somatostatina es menor que en otros territorios del sistema nervioso central. La somatostatina cortical no es de procedencia hipotalámica; la mayor parte de las neuronas somatostatinérgicas de la corteza cerebral pertenece a un sistema neuronal intrínseco de proyecciones cortas. La liberación de somatostatina en estas neuronas está regulada por modificaciones electrolíticas y por acción de neurotransmisores (EPELBAUM y cols., 1977; DELFS y cols., 1980; ROBBINS y cols., 1982).

Algunas interneuronas amacrinas de la retina contienen somatostatina (RORSTAD y cols., 1979); en esta localización el péptido podría desempeñar un papel como neurotransmisor (ESKAY y cols., 1980).

## 5.2. SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO

En el sistema nervioso periférico la somatostatina se localiza principalmente en las neuronas sensitivas. Los cuerpos neuronales de estas células se sitúan en los ganglios raquídeos, y sus prolongaciones centripetas llegan al asta posterior de la médula espinal a través de la raíz posterior de la misma. Aquí las terminaciones neurales establecen contacto con otras terminaciones de neuronas sensitivas y con un importante grupo de células peptidérgicas entre las que se incluyen las células productoras de endorfinas. En esta localización la función de la somatostatina está relacionada con la percepción del tacto, dolor, temperatura y posiblemente aferencias viscerales (HOKFELT y cols., 1980).

Muchas neuronas simpáticas almacenan no sólo catecolaminas sino que contienen también somatostatina. Esta asociación sugiere que las catecolaminas pueden interactuar con la somatostatina en la regulación celular (HOKFELT y cols., 1977). La somatostatina se ha identificado también en neuronas parasimpáticas, entre las que se incluyen las del nervio vago (LUNDBERG y cols., 1978).

### 5.3. PANCREAS

La somatostatina está presente en las células D de los islotes pancreáticos, así como en las terminaciones nerviosas pancreáticas (POLAK y cols., 1975). En la especie humana, las células D se encuentran dispersas por todas las zonas del islote y están en íntimo contacto anatómico con los demás tipos celulares del páncreas endocrino. Esta distribución permite a la somatostatina ejercer un control local (control paracrino) de la secreción de las hormonas insulares, principalmente insulina y glucagón (ORCI y cols., 1975; POLAK y cols., 1975; GERICH, 1981). Estudios recientes (KAWAI y cols., 1982) sugieren, sin embargo, que la somatostatina segregada en los islotes podría tener menos acceso a las células secretoras de insulina y glucagón que la somatostatina que alcanza el páncreas procedente de la circulación sistémica.

### 5.4. TRACTO GASTROINTESTINAL

Casi toda la somatostatina intestinal está contenida en células endocrinas semejantes a las células D del páncreas y que reciben también esta denominación (POLAK y cols., 1975; ARNOLD y LANKISCH, 1980). En la

especie humana, la concentración de células secretoras de somatostatina experimenta un gradiente desde el estómago hasta el colon, siendo el antro gástrico la región de más alta concentración de células D. Estas células endocrinas se encuentran en la profundidad de las criptas del estómago e intestino. Están provistas de una serie de microvellosidades situadas en la zona de contacto con el lumen que actúan de sensores para detectar los cambios en el contenido intestinal que regulan la secreción de somatostatina, principalmente la concentración de iones  $H^+$  y algunos nutrientes (figura 2). La somatostatina se segrega en el espacio intersticial de la pared intestinal desde donde alcanza los capilares y llega a la circulación sistémica y también al lumen intestinal (LARSSON, 1980).

En el seno de la pared intestinal, la somatostatina puede interactuar con los receptores situados en las membranas de otras células intestinales secretoras de hormonas (gastrina, glucagón, secretina, colecistoquinina) ejerciendo una acción inhibidora de la secreción hormonal (LARSSON, 1980). La somatostatina segregada en el seno del lumen intestinal también modifica la secreción de gastrina y ácido clorhídrico.

Los plexos submucoso y mientérico del tracto gastrointestinal también contienen neuronas secretoras de somatostatina (SUNDLER y cols., 1980).

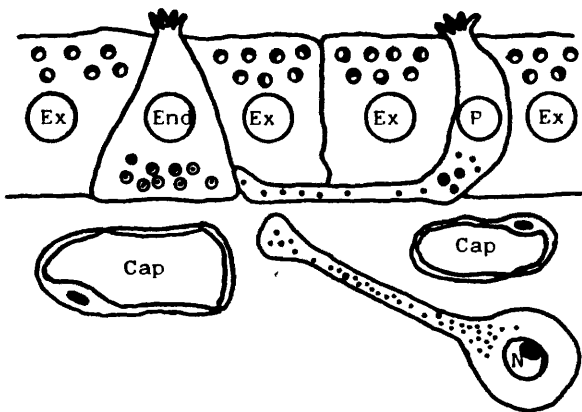


Figura 2.- Localización en la pared intestinal de las células exocrinas (Ex), endocrinas (End), paracrinas (P), neuronas (N) y capilares (Cap). Las células endocrinas están provistas de una serie de microvellosidades situadas en la zona de contacto con el lumen que detectan cambios en el contenido intestinal (según LARSSON, 1980).

#### 5.5. OTRAS LOCALIZACIONES

Las glándulas salivales poseen células secretoras de somatostatina de aspecto similar a las células D. El péptido está presente en la saliva y es capaz de disminuir el flujo salival (GIROD y cols., 1980).

Algunas células parafoliculares del tiroides (células C) contienen somatostatina junto con calcitonina, mientras que otras parecen contener únicamente esta última hormona (VAN NOORDEN y cols., 1977). La somatostatina es sintetizada también por las células del carcinoma medular de tiroides (BIRNBAUM y cols., 1980). Parece ser que la somatostatina actuaría localmente en el tiroides inhibiendo la liberación de calcitonina (GORDIN y cols., 1978), si bien este hecho no ha sido totalmente demostrado.

La presencia de somatostatina inmunorreactiva ha sido identificada en los túbulos colectores del riñón de sapo, así como en la vejiga de este animal (BOLAFFI y cols., 1980); sin embargo, no se han efectuado hallazgos similares en mamíferos.

## 6. REGULACION DE LA SECRECION

### 6.1. FLUJOS IONICOS

La liberación hipotalámica de somatostatina parece depender fundamentalmente de una despolarización de la membrana celular. En todos los sistemas neuronales que han sido estudiados en detalle el péptido se localiza en gránulos de secreción situados en las terminaciones neuronales. Desde aquí la hormona es liberada en respuesta a estímulos despolarizantes tanto químicos como eléctricos. La incubación con altas concentraciones de potasio estimula la liberación de somatostatina en sinaptosomas de hipotálamo de rata (WAKABAYASHI y cols., 1977), en terminales neuronales de la neurohipófisis y eminencia media (PATEL y cols., 1977, 1978) y en las células corticales cerebrales (ROBBINS y cols., 1982).

La secreción de somatostatina es un fenómeno dependiente de calcio y puede ser bloqueado mediante una disminución de la concentración de calcio en el medio de cultivo (WAKABAYASHI y cols., 1977; IVERSEN y cols., 1978), sustituyendo el calcio por manganeso (PATEL y cols., 1977), bloqueando los canales de calcio con cobalto y verapamil (ROBBINS y cols., 1982) o utilizando

quelantes del calcio (MAEDA y FROHMAN, 1980). Por otro lado, el incremento de la concentración intracitoplásmica de calcio mediante el ionóforo A23187 estimula la liberación de somatostatina aun en presencia de bajas concentraciones de potasio (BERELOWITZ y cols., 1978).

El flujo de sodio también desempeña un cierto papel en la secreción de somatostatina. La liberación de esta hormona inducida por altas concentraciones de potasio se ve potenciada si se disminuye la concentración extracelular de sodio (PATEL y cols., 1977, 1978). Por otra parte, la veratridina, un alcaloide que mantiene los canales de sodio en una configuración abierta, induce una liberación de somatostatina (ROBBINS y cols., 1982), fenómeno que puede ser inhibido por exposición simultánea de las células a tetrodotoxina, un agente bloqueante de los canales del sodio (BENNETT y cols., 1979; ROBBINS y cols., 1982).

La estimulación de la liberación de somatostatina por el ionóforo A23187 puede ser bloqueada por la trifluoperazina, un inhibidor de la calmodulina, a pesar de una adecuada captación de calcio por el citosol, lo cual indica un posible papel de la calmodulina en la estimulación de la liberación de somatostatina (RICHARDSON y TWENTE, 1983).

## 6.2. NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS

Algunos neurotransmisores influyen en la secreción de somatostatina (figura 3). Así, la dopamina estimula la liberación de somatostatina en fragmentos hipotalámicos de rata (NEGRO-VILAR y cols., 1978; MAEDA y FROHMAN, 1980) e incrementa la tasa de secreción y la concentración de somatostatina en la sangre portal hipofisaria cuando se administra a ratas por vía intravenosa (CHIHARA y cols., 1979; KATO y cols., 1979). Este efecto estimulante de la dopamina lo presenta también su precursor, la L-dopa, y la bromocriptina, un agonista de los receptores dopaminérgicos (MAEDA y FROHMAN, 1980). Por el contrario, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos con pimocide (NEGRO-VILAR y cols., 1978) o haloperidol (MAEDA y FROHMAN, 1980) reduce la liberación de somatostatina inducida por dopamina.

La noradrenalina es otro neurotransmisor capaz de estimular la liberación de somatostatina en fragmentos de eminencia media. Esta acción es bloqueada por la fentolamina, un antagonista de los receptores alfa-adrenérgicos (NEGRO-VILAR y cols., 1978). Estos resultados no han podido ser confirmados por todos los autores (MAEDA y FROHMAN, 1980; ABE y cols., 1981).

CHIHARA y cols. (1979) han encontrado que la acetilcolina estimula la liberación de somatostatina

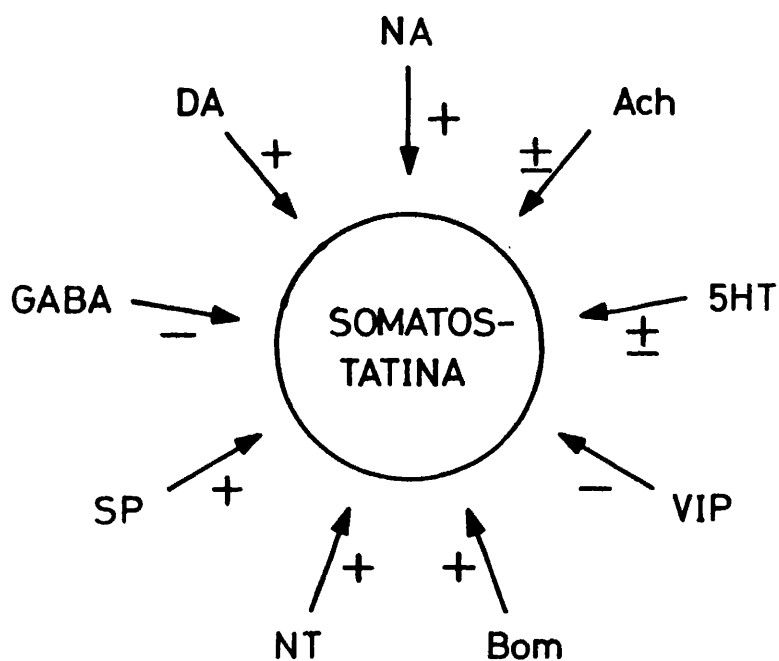


Figura 3.- Resumen esquemático de los neurotransmisores y neuropéptidos que influyen positiva (+) o negativamente (-) en la secreción hipotalámica de somatostatina. NA: noradrenalina; DA: dopamina; Ach: acetilcolina; 5HT: 5-hidroxi-triptamina; GABA: ácido gamma-aminobutírico; SP: sustancia P; NT: neurotensina; Bom: bombesina; VIP: péptido intestinal vasoactivo; ± indica carencia de efectos o datos contradictorios.

en la sangre portal hipofisaria. MAEDA y FROHMAN (1980), por su parte, no han observado modificaciones de la secreción de esta hormona tras estimulación colinérgica, mientras que RICHARDSON y cols. (1980) encontraron una inhibición colinérgica de la secreción de somatostatina en la rata.

La 5-hidroxitriptamina (serotonina) no parece influir en la liberación de somatostatina (CHIHARA y cols., 1979; MAEDA y FROHMAN, 1980).

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) inhibe la liberación hipotalámica de somatostatina (GAMSE y cols., 1980; TAKAHARA y cols., 1980) aunque no afecta la secreción del péptido en otros territorios del sistema nervioso (SAWYNOK y cols., 1982).

Un derivado del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), el dibutiril-AMPC, carece de efecto sobre la liberación de somatostatina en fragmentos hipotalámicos de rata (MAEDA y FROHMAN, 1980).

Algunos neuropéptidos pueden influir también positiva o negativamente en la liberación de somatostatina. La sustancia P y la neurotensina son dos neuropéptidos capaces de estimular la liberación de somatostatina del hipotálamo de rata in vitro (PIMSTONE y cols., 1979; SHEPPARD y cols., 1979a) y de incrementar los niveles de somatostatina en la sangre portal hipofisaria (SAITO y SAITO, 1980).

Las encefalinas, tanto la met-encefalina como

la leu-encefalina, no parecen tener un efecto directo sobre la liberación de somatostatina (SHEPPARD y cols., 1979a). La bombesina, por el contrario, incrementa los niveles de somatostatina en la sangre portal hipofisaria (ABE y cols., 1981), lo que explica la reducción de los niveles circulantes de GH que origina. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), sin embargo, estimula la liberación de GH a través de una inhibición de la liberación hipotalámica de somatostatina.

### 6.3. OTROS FACTORES

La glucosa se comporta como un inhibidor de la secreción de somatostatina (BERELOWITZ y cols., 1982). Por otra parte, la interferencia con la captación de glucosa mediante la 3-O-metil-D-glucosa, floricina o citocalasina B provoca una estimulación de la liberación de somatostatina hipotalámica. De modo similar, una inhibición del metabolismo de la glucosa con 2-desoxi-D-glucosa estimula la liberación de la hormona de una manera dosis dependiente. La hipoglucemia insulínica origina un incremento en los niveles plasmáticos periféricos de somatostatina, si bien el origen del péptido es difícil de precisar (WASS y cols., 1980). La insulina, per se, se comporta también como un estimulador de la liberación

hipotalámica de somatostatina (BERELOWITZ y cols., 1982).

El glucagón en administración intraventricular origina un incremento de la concentración de somatostatina en la sangre portal hipofisaria (ABE y cols., 1978). Sin embargo, la administración de glucagón por vía intravenosa carece de efecto sobre la secreción de somatostatina.

Hasta la fecha no existe evidencia de que la GH sea capaz de inhibir su propia secreción mediante un sistema de retroalimentación positiva de asa corta ("short-loop positive feedback") que actúe sobre la liberación hipotalámica de somatostatina. La hipofisectomía disminuye el contenido hipotalámico de somatostatina en la rata (BAKER y YEN, 1976), y el contenido reducido de somatostatina en ratas hipofisectomizadas puede restablecerse mediante la administración de GH (KANATSUKA y cols., 1979), lo que apoyaría la hipótesis del mencionado sistema de retroalimentación. Además, el tratamiento de ratas con GH incrementa la concentración hipotalámica de somatostatina (KANATSUKA y cols., 1979) y la administración intraventricular de GH es capaz de estimular la liberación de somatostatina hipotalámica de una manera dosis dependiente (CHIHARA y cols., 1981).

La GH también puede afectar la secreción de somatostatina a través de las somatomedinas. Se ha comprobado que la somatomedina A (SHEPPARD y cols., 1979) y la somatomedina C (BERELOWITZ y cols., 1981b)

son capaces de provocar una liberación de somatostatina en el hipotálamo de rata.

La somatostatina puede también controlar su propia secreción a través de un mecanismo de retroalimentación ultracorto ("ultrashort feedback"). La administración intraventricular de esta hormona en ratas origina un incremento paradójico de la liberación hipofisaria de GH, lo cual puede explicarse como resultado de una autoinhibición de la somatostatina endógena (LUMPKIM y cols., 1980).

En los islotes pancreáticos, otros estímulos para la secreción de somatostatina por las células D los constituyen la glucosa, algunos aminoácidos y ciertas hormonas gastrointestinales como la gastrina, colecistoquinina, secretina y polipéptido inhibidor gástrico (SCHUSDZIARRA y cols., 1978). El péptido inhibidor vasoactivo, la sustancia P y la neurotensina también liberan somatostatina de los islotes pancreáticos (SZECOWKA y cols., 1980; SAITO y SAITO, 1980). El glucagón es un potente estimulador de la liberación de somatostatina por los islotes (SCHAUDER y cols., 1977). Por otra parte, se han detectado incrementos en los niveles plasmáticos de somatostatina en sangre arterial y en vena porta tras ingestión de varios alimentos (CHAYVIALLE y cols., 1980; SCHUSDZIARRA y cols., 1980). Todos estos hallazgos sugieren que la secreción de somatostatina se incrementaría durante el periodo de elevación de la concentración

de nutrientes y hormonas gastrointestinales y que este péptido participaría en la regulación tanto de los procesos absortivos como de la función endocrina del páncreas (SCHUSDZIARRA y cols., 1978).

### 7. NIVELES PLASMATICOS

Los niveles plasmáticos de somatostatina en sujetos normales son difíciles de evaluar debido a que el radioinmunoensayo de somatostatina presenta serias dificultades. El plasma humano tiene capacidad para degradar tanto la somatostatina nativa como los análogos tirosilados utilizados como trazadores en el radioinmunoensayo (KRONHEIM y cols., 1978). Por otra parte, el plasma contiene una proteína transportadora de somatostatina y otras sustancias todavía no bien caracterizadas que interfieren con la unión del anticuerpo (OGAWA y cols., 1977; LUNDQUIST y cols., 1980). La filtración en gel del plasma antes de la realización del radioinmunoensayo evita la degradación del trazador y la interferencia con la unión del anticuerpo, proporciona una casi completa recuperación de la somatostatina plasmática y permite la determinación de la somatostatina inmunorreactiva de un peso molecular aparente de 1600 (MACKES y cols., 1981).

En la tabla 2 se recogen los valores de somatostatina plasmática en sujetos normales estimados por diversos autores. Salvo las cifras encontradas por LARSSON y cols. (1977), GALMICHE y cols. (1978) y PIPELEERS y cols. (1979), el resto de los valores oscilan entre

unos 50 a 70 pg/ml, equivalentes a unos 30 a 43 pmol/l. Por el contrario, los pacientes con somatostatinooma (tabla 3) presentan valores plasmáticos de somatostatina que alcanzan valores entre 1000 y 30000 pg/ml (611 a 18330 pmol/l), considerablemente elevados con respecto a los valores normales (GALMICHE y cols., 1978; KREJS y cols., 1979; PIPELEERS y cols., 1979; PENMAN y cols., 1980a; PATEL y cols., 1983).

Se ha descrito también la producción de somatostatina por tumores de naturaleza no endocrina secretores de hormona. Así, en concreto, PENMAN y cols. (1980b) describen la secreción de somatostatina en tres pacientes con neoplasias pulmonares y tóxicas, con unos niveles plasmáticos que oscilaban entre 38 y 403 ng/ml (23 a 246 nmol/l).

La forma en que la somatostatina circula en el plasma es compleja. Con filtración en gel y ulterior radioinmunoensayo se determinan dos fracciones en la somatostatina inmunorreactiva del plasma. Una primera fracción tiene un peso molecular aparente de 150000, y su significado fisiológico no está claro, aunque su presencia parece ser debida a las enzimas degradativas y a proteínas de unión (OGAWA y cols., 1977). La segunda fracción, de peso molecular aparente de 1600, parece corresponder al péptido somatostatina-14 (MACKES y cols., 1981).

Las concentraciones plasmáticas medias halladas

TABLA 2.- NIVELES PLASMATICOS DE SOMATOSTATINA  
EN SUJETOS NORMALES

Autores y año	pg/ml	pmol/l
LARSSON y cols. (1977)	100 a 300	61 a 183
KRONHEIM y cols. (1978)	88 $\pm$ 8	54 $\pm$ 5
GALMICHE y cols. (1978)	274 $\pm$ 9	167 $\pm$ 5
PIPELEERS y cols. (1979)	675 $\pm$ 95	412 $\pm$ 60
WRIGHT y cols. (1980)	17 a 81	10 a 50
MACKES y cols. (1981)	40 a 100	24 a 61

TABLA 3.- NIVELES PLASMATICOS DE SOMATOSTATINA  
EN ALGUNOS CASOS DE SOMATOSTATINOMA

Autores y año	pg/ml	pmol/l
LARSSON y cols. (1977)	107000*	65377*
GALMICHE y cols. (1978)	7000 - 9000	4277 - 5500
KREJS y cols. (1979)	9000 - 13000	5500 - 7943
PIPELEERS y cols. (1979)	30800	18819
PENMAN y cols. (1980a)	7500 - 16800	4583 - 10265
PENMAN y cols. (1980a)	1700*	1039*
PATEL y cols. (1983)	1170	715

\*Niveles en la vena pancreática

por la mayoría de los autores (tabla 2) se encuentran en el orden de magnitud capaz de afectar las funciones endocrinas de la hipófisis, el páncreas y el tracto gastrointestinal, lo cual confirma la hipótesis de que la somatostatina actuaría como una verdadera hormona circulante.

En sujetos normales, la vida media de la somatostatina en el plasma oscila entre 1 y 3 minutos (SHEPPARD y cols., 1979b).

Se ha demostrado que extractos de encéfalo de rata, crudos y parcialmente purificados, inactivaban a la somatostatina (MARKS y STERN, 1975). Aunque posee un grupo amino N-terminal, parece que la hidrólisis por medio de una aminopeptidasa no es una vía importante de degradación de la somatostatina. Por medio de los índices relativos de liberación de aminoácidos de la somatostatina durante la incubación en homogenados de encéfalo se pudo demostrar que los aminoácidos medios (Phe<sup>7</sup>, Trp<sup>8</sup>, Thr<sup>10</sup>) y no los N-terminales (Ala<sup>1</sup>, Gly<sup>2</sup>) ni los C-terminales (Ser<sup>13</sup>, Cys<sup>14</sup>) eran los primeros liberados, indicando que el paso limitante de la degradación de la somatostatina estaría probablemente a cargo de una endopeptidasa neutra.

La forma reducida lineal de la somatostatina y los análogos de esta última que carecen del dipéptido N-terminal, como (des-Ala<sup>1</sup>, Gly<sup>2</sup>-N-Cys<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>)-somatostatina o (des-Ala<sup>1</sup>, Gly<sup>2</sup>, N-acetil-Cys<sup>3</sup>)-somatostatina, son

también preferentemente hidrolizados por una endopeptidasa (MARKS y STERN, 1975). Estos resultados apoyan totalmente el concepto de que la degradación no se inicia con la escisión por medio de una aminopeptidasa.

## 8. ACCIONES

La somatostatina es probablemente el mejor ejemplo de factor hipotalámico caracterizado por sus acciones en la glándula pituitaria que ha mostrado poseer no sólo una amplia distribución dentro y fuera del sistema nervioso central, sino también una extensa gama de acciones en órganos y tejidos muy diferentes.

### 8.1. MODALIDADES DE ACCION HORMONAL

La somatostatina no es sólo una hormona con múltiples efectos en los distintos sistemas orgánicos sino que también presenta varias modalidades para ejercer sus acciones y llevar a cabo esos efectos (figura 4).

En unas ocasiones la hormona es sintetizada en neuronas y liberada por las terminaciones neurales a una hendidura sináptica que debe atravesar para llegar a los receptores específicos situados en otra neurona, cuya actividad modifica. En estos casos la somatostatina se comporta como un neurotransmisor.

En otras ocasiones la hormona se sintetiza también en neuronas y se libera por los terminales al

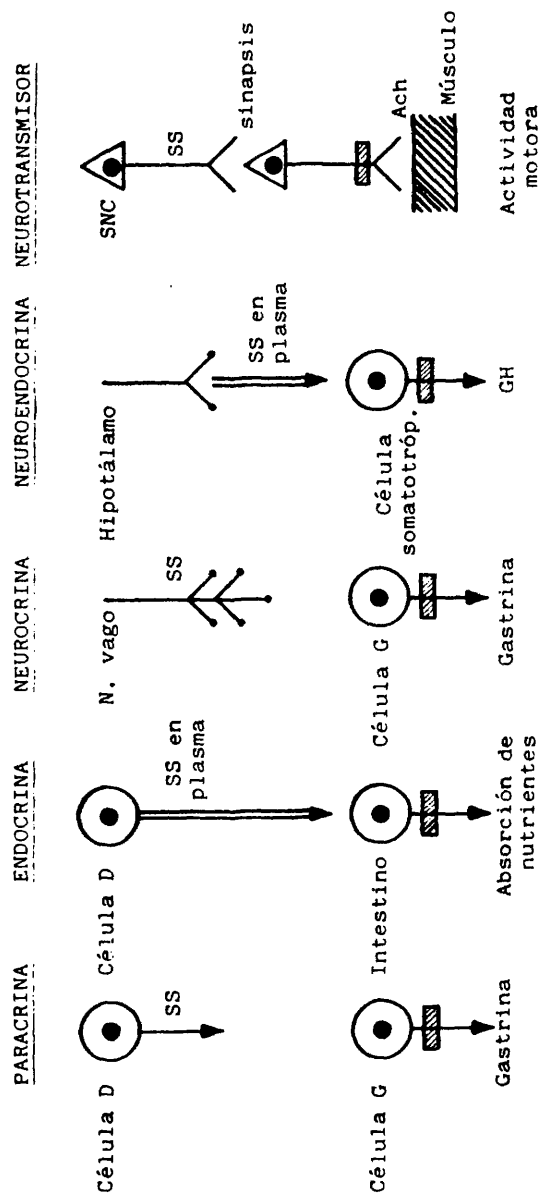


Figura 4.- Algunas modalidades de la acción hormonal de la somatostatina (SS) (según WILLIAMS, 1981).

espacio extracelular desde donde interacciona con los receptores de células situadas a una cierta distancia a las que afecta en sus funciones. Este es el caso de la somatostatina liberada en el sistema porta hipotálamo-hipofisario con misión reguladora de la liberación de GH, que constituye un ejemplo de la acción neuroendocrina de la hormona.

Otras veces la acción de la somatostatina puede ser de naturaleza paracrina, esto es, la hormona es sintetizada por células endocrinas, liberada y captada por receptores de células cercanas cuya actividad puede ser alterada. Un ejemplo lo constituye la somatostatina liberada por las células D de los islotes pancreáticos que actúa sobre las células A y B cercanas, productoras respectivamente de glucagón e insulina.

La acción de la somatostatina puede producirse también en las inmediaciones del lugar de liberación por un mecanismo neurocrino. En estos casos la hormona, sintetizada en neuronas, se libera desde éstas al espacio extracelular y es captada por receptores de células cercanas con las que interacciona. Tiene lugar este mecanismo hormonal en el caso de la somatostatina liberada por el nervio vago que alcanza las células G productoras de gastrina.

La somatostatina desempeña también una acción puramente endocrina. La hormona sintetizada en una determinada localización se libera al plasma y es captada

por receptores específicos de células situadas a distancia, a las que afecta en sus funciones. Este mecanismo explicaría también algunas de las acciones descritas de la somatostatina.

Finalmente, la somatostatina sintetizada en las células endocrinas del tracto gastrointestinal puede liberarse al lumen intestinal y ser captada por receptores específicos de células situadas a lo largo del intestino a cierta distancia del punto de secreción. La somatostatina modifica, por este mecanismo además de los ya comentados, la secreción de gastrina y de ácido clorhídrico, razón por la que ha sido clasificada como una "lumona" u hormona luminal (LARSSON, 1980; UVNAS-WALLENSTEN, 1980).

La somatostatina coexiste y se segrega junto con la calcitonina en algunas células parafoliculares del tiroides y, además, puede inhibir la liberación de esta última hormona. Este hecho ha sido interpretado por algunos autores (GORDIN y cols., 1978), como un sistema de control, denominado "regulación autocrina" en el que la somatostatina liberada por la célula difundiría al espacio intersticial e interaccionaría con receptores específicos situados en las mismas células que la segregaron (REICHLIN, 1983).

## 8.2. ACCIONES HIPOFISARIAS

### 8.2.1. SECRECION DE HORMONA DEL CRECIMIENTO

El primer efecto biológico conocido de la somatostatina fue la inhibición de la secreción de GH en cultivos de células hipofisarias (BRAZEAU y cols., 1973). La somatostatina, efectivamente, es capaz de suprimir la respuesta de la GH al ejercicio (PRANGE-HANSEN y cols., 1973), a la hipoglucemia insulínica (HALL y cols., 1973), a la L-dopa (SILER y cols., 1973), arginina (MORTIMER y cols., 1974), pentobarbital (BRAZEAU y cols., 1974), estimulación eléctrica de los núcleos amigdaloides ventromedial y basolateral del hipotálamo (MARTIN, 1974), isoproterenol y clorpromacina (KATO y cols., 1974; SAWANO y cols., 1974), morfina, neurotensina y sustancia P (BROWN y VALE; 1975), dibutiril-AMPc (PERACCHI y cols., 1976), succión del pezón (CHEN y cols., 1974), alimentos (BESSER y cols., 1974b) y prostaglandinas E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> (GIULIANO y cols., 1979; SZABO y FROHMAN, 1975). La somatostatina también inhibe los picos episódicos de GH que se observan durante el sueño (PARKER y cols., 1974; LUCKE y cols., 1976) y la vigilia (WARD y cols., 1975). Más recientemente se ha podido demostrar que la somatostatina impide el efecto estimulador del GRF sobre las células somatotrópicas de la hipófisis (WEHREBERG y cols., 1982).

Resulta claro, por tanto, que la secreción de GH está regulada por el efecto estimulante del GRF y el efecto inhibitor de la somatostatina (figura 5).

La somatostatina está implicada, además, en los mecanismos de retroalimentación que controlan la secreción de GH. Como se muestra en la figura 5, la GH potencia la secreción hipotalámica de somatostatina, lo que conlleva una reducción de la liberación de la propia GH. Por otra parte, la somatomedina C, un péptido producido en el hígado bajo el control de la GH, también estimula la liberación de somatostatina e inhibe de este modo la secreción de GH (BERELOWITZ y cols., 1981b; ABE y cols., 1983).

La somatostatina suprime además los elevados niveles circulantes de GH que se observan en pacientes con insuficiencia hepática o renal, y en pacientes con malnutrición protéo-calórica. Los niveles altos de GH encontrados en estos pacientes se deben a un exceso de producción de esta hormona (PIMSTONE y cols., 1975). La hipersecreción de GH que se observa en los casos de enanismo de Laron también puede suprimirse con somatostatina (LARON y cols., 1977). La anormal secreción de GH que presentan algunos pacientes con síndrome carcinoide puede ser anulada con somatostatina (GOMEZ-PAN y cols., 1979).

Los elevados niveles de GH propios de la acromegalia pueden suprimirse mediante la administración

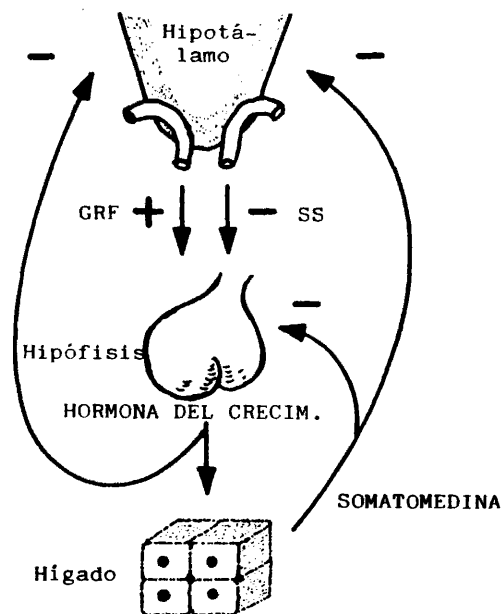


Figura 5.- Factores hipotalámicos que regulan la secreción de hormona del crecimiento. GRF: factor liberador de hormona del crecimiento, SS: somatostatina; + indica estimulación y - indica inhibición.(modificado de REICHLIN, 1983).

de somatostatina (HALL y cols., 1973; BESSER y cols., 1974a). Sin embargo, los efectos de la somatostatina sobre los niveles de GH en pacientes acromegálicos son de escasa duración; la acción de una inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea de somatostatina dura aproximadamente una hora, si bien puede ser prolongada mezclando el péptido con zinc-protamina (BESSER y cols., 1974a).

#### 8.2.2. SECRECIÓN DE TIROTROPINA

La somatostatina inhibe la liberación de tirotropina (TSH) en preparaciones hipofisarias aisladas (VALE y cols., 1975) y reduce los niveles basales de esta hormona en la rata (CHIHARA y cols., 1978) y en el hombre (WEEKE y cols., 1975).

La somatostatina es capaz también de inhibir la respuesta de la TSH a la TRH de una manera no competitiva (HALL y cols., 1973). Investigaciones posteriores mostraron un efecto inhibitorio de la somatostatina in vitro sobre la respuesta de la TSH a la teofilina (VALE y cols., 1974), monobutiril-AMPC y prostaglandina E<sub>2</sub> (BELANGER y cols., 1974).

De un modo similar, los elevados niveles basales de TSH que se observan en pacientes con hipotiroidismo primario pueden ser reducidos por acción de la somatostatina

(BESSER y cols., 1974b; LUCKE y cols., 1975). Además, la administración de anticuerpos anti-somatostatina potencia la respuesta de la TSH a la TRH o a la exposición al frío; todo ello parece indicar que la secreción hipofisaria de TSH está controlada por la interrelación entre TRH y somatostatina, así como por el efecto de retroalimentación de las hormonas tiroideas.

La acción de la somatostatina sobre las hormonas tiroideas ha sido recientemente estudiada. La administración exógena de somatostatina no modifica los niveles séricos de tiroxina ( $T_4$ ) ni de triyodotironina ( $T_3$ ) en sujetos normales, pero disminuye la concentración de  $T_3$  total y libre e incrementa la concentración de  $T_3$  inversa ( $rT_3$ ) en pacientes hipertiroideos (DE ROSA y cols., 1983). Ello parece indicar un efecto extratiroideo de la somatostatina sobre el metabolismo periférico de las yodotironinas.

También se ha demostrado que la somatostatina ejerce un efecto inhibitor de la liberación de TRH en el hipotálamo de rata in vitro (HIROOKA y cols., 1978).

### 8.2.3. SECRECIÓN DE PROLACTINA

La somatostatina no produce ningún efecto sobre los niveles basales de prolactina ni sobre la respuesta de esta hormona a la hipoglucemia insulínica o a

la TRH (HALL y cols., 1973; SILER y cols., 1974; CARR y cols., 1975). La acción estimulante de la secreción de prolactina producida por la administración de arginina y la acción inhibidora propia de la L-dopa no son afectadas por la somatostatina (SILER y cols., 1973).

Algunos autores (GRANT y cols., 1974) han encontrado una acción inhibidora por parte de la somatostatina de la liberación de prolactina en pacientes con acromegalia, aunque este efecto no ha podido ser confirmado por otros autores (BESSER y cols., 1974b).

En ratas tratadas con estradiol la somatostatina ejerce un efecto inhibitor de la liberación de prolactina (COOPER y SHIN, 1981; SAUNDERS y cols., 1983). Recientemente, GOOREN y cols. (1984) han encontrado que la somatostatina es también capaz de inhibir la liberación de prolactina en sujetos agonadales tratados con estrógenos y acetato de ciproterona.

#### 8.2.4. SECRECIÓN DE CORTICOTROPINA

En el hombre, la somatostatina carece de efecto sobre la secreción basal de corticotropina (ACTH) y sobre la secreción de la misma en respuesta al stress (HALL y cols., 1973; BESSER y cols., 1974a). Sin embargo, se ha demostrado una disminución de la secreción de ACTH en cultivos de células hipofisarias (RICHARDSON

y SCHONBRUNN, 1981) y una supresión de los elevados niveles de ACTH en pacientes con síndrome de Nelson (TYRREL y cols., 1975).

#### 8.2.5. SECRECION DE GONADOTROPINAS

Las secreciones basales de hormona luteinizante (LH) y de hormona folículo-estimulante (FSH) no se ven afectadas por la somatostatina (HALL y cols., 1973; SILER y cols., 1973). Tampoco se influye la respuesta de estas hormonas a la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH). Sin embargo, la pequeña elevación de los niveles de FSH inducida en el hombre por la TRH es inhibida por la somatostatina (HALL y cols., 1973).

Un resumen de las acciones de la somatostatina sobre las distintas hormonas hipofisarias se presenta en la tabla 4.

### 8.3. ACCIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO

#### 8.3.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Dada la amplia distribución de la somatostatina

TABLA 4.- ACCIONES HIPOFISARIAS DE LA SOMATOSTATINA\*

HORMONA	ACCIONES
Hormona del crecimiento (GH)	Inhíbe la respuesta de la GH a: ejercicio, hipoglucemia insulínica, L-dopa, arginina, pentobarbital, estimulación eléctrica hipotalámica, isoproterenol, clorpromacina, morfina, neurotensina, sustancia P, dibutilil-AMPc, hipertermia, succión, alimentos, prostaglandinas E <sub>1</sub> y E <sub>2</sub> y GRF.
Tirotropina (TSH)	Reduce los niveles basales de TSH en sujetos normales y en pacientes con hipotiroidismo primario. Inhibe la respuesta de la TSH a la TRH, teofilina, monobutilil-AMPc y prostaglandina E <sub>2</sub> .
Prolactina (PRL)	Carece de efecto sobre los niveles basales de PRL y su respuesta a la TRH o a la hipoglucemia insulínica. Reduce los niveles circulantes de PRL en algunos pacientes con acromegalia.
Corticotropina (ACTH)	Carece de efecto sobre los niveles basales de ACTH y su respuesta al stress.
Gonadotropinas	Carece de efecto sobre los niveles basales de LH y de FSH y su respuesta a la LHRH.

\*Modificado de Reichlin (1983)

en el sistema nervioso central cabría pensar que este péptido desarrollase ciertas acciones en zonas encefálicas extrahipotalámicas. Los primeros estudios relacionados con los efectos de la somatostatina sobre la actividad eléctrica neuronal indicaron que la aplicación de somatostatina disminuía la excitabilidad espontánea y evocada de un cierto número de neuronas de las cortezas cerebral y cerebelosa, hipotálamo y médula espinal (RENAUD, 1979). Esta acción, que en algunos aspectos recuerda a la del neurotransmisor inhibitorio ácido gamma-aminobutírico (GABA), no era bloqueada por los antagonistas del GABA. La somatostatina, además, puede antagonizar las convulsiones inducidas por la estrocnina e incrementar la duración de la anestesia barbitúrica (McCANN, 1982). Sin embargo, otros autores han encontrado que la somatostatina ejerce una acción excitadora sobre la actividad eléctrica espontánea de las neuronas (DICTER y DELFS, 1981), tal vez mediada a través de una inhibición de neuronas inhibitorias que provocaría la descarga de otras neuronas.

Algunos aspectos de la sensibilidad se ven también afectados por la somatostatina. En las raíces de los ganglios dorsales el péptido parece modificar los impulsos dolorosos dirigidos centralmente mediante el control de la liberación de sustancia P en la zona de entrada de la raíz dorsal de la médula espinal (REICHLIN, 1981a).

### 8.3.2. EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA

Se han observado diversas alteraciones conductuales tras la inyección intracerebroventricular de somatostatina (REICHLIN, 1982). La inyección de esta hormona en los ventrículos o en el hipocampo del conejo origina un efecto de alerta, disminuyendo las ondas lentas y el sueño paradójico y, a dosis altas, ocasiona signos de irritación patológica tales como hiperquinesia, conducta estereotipada, temblor muscular y rigidez, catatonía e incluso convulsiones tónico-clónicas (IOFFE y cols., 1978).

Los cambios de conducta inducidos por la somatostatina no se antagonizan con naloxona, lo que parece indicar que no son debidos a interacción con receptores opiáceos (REICHLIN, 1983).

Otros patrones de conducta observados tras la administración central de somatostatina incluyen una disminución del sueño, incoordinación motora y analgesia. Estos hallazgos son más compatibles con los de los autores (DICHTER y DELFS, 1981) que encuentran un aumento de las descargas neuronales tras la aplicación local del péptido, e indican que la somatostatina ejerce probablemente importantes efectos neurales en diversos territorios cerebrales, incluyendo la corteza motora, el hipocampo y el sistema límbico.

### 8.3.3. LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

La amplia distribución de las células secretoras de somatostatina en el sistema nervioso central y su proximidad con los ventrículos y espacios subaracnoideos hace que la somatostatina se segregue en el líquido cefalorraquídeo. El péptido es relativamente estable en este líquido (REICHLIN, 1983). El lugar de la liberación de somatostatina al líquido cefalorraquídeo es anatómicamente difuso y no se limita al hipotálamo. Las concentraciones de este péptido en el líquido varían según un ritmo circadiano en el que los valores mínimos tienen lugar durante el día (BERELOWITZ y cols., 1981a). Los niveles determinados en una serie de 39 voluntarios entre las 8 y las 9 de la mañana dieron un resultado de  $62.8 \pm 6.38$  pg/ml ( $38.4 \pm 3.9$  pmol/l,  $\bar{x} \pm$  E.S.M.) (RUBINOW y cols., 1983). Los pacientes con acromegalia poseen niveles normales de somatostatina en el líquido cefalorraquídeo, lo cual no implica que en estos pacientes la secreción hipotalámica de somatostatina sea normal, ya que la somatostatina lícual refleja predominantemente la secreción de la médula espinal y el cerebro (SØRENSEN y cols., 1980; WASS y cols., 1980).

#### 8.3.4. SISTEMA NERVIOSO VEGETATIVO

En cuanto a la actividad del sistema nervioso simpático, la somatostatina y sus análogos producen una inhibición completa de la secreción suprarrenal de adrenalina estimulada por bombesina, 2-desoxiglucosa, carbachol y otros factores (BROWN y cols., 1979). Esto sugiere que los receptores de somatostatina deben estar localizados o deben tener influencia en alguna vía final común implicada en el tono simpático.

La somatostatina y sus análogos actúan también en el sistema nervioso central para influenciar la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea de la rata (BROWN y FISHER, 1980; DEL BARRE y cols., 1977) y del perro (WEITZMAN y cols., 1979). Se ha sugerido que la disminución de la presión sanguínea originada por la somatostatina en perros es secundaria a una disminución de los niveles plasmáticos de catecolaminas (WEITZMAN y cols., 1979).

Recientemente, KESSLER y cols. (1983) han descrito un incremento de la actividad de la tirosina-hidroxilasa en el ganglio cervical superior de la rata por parte de la somatostatina, y sugieren que este péptido podría regular el metabolismo noradrenérgico, posiblemente a través de la mediación de receptores de sustancia P.

La somatostatina, al igual que ocurre con

la TRH, es capaz de revertir la hipotermia inducida por bombesina, carbachol y neurotensina; sin embargo, la somatostatina administrada por vía intracisternal o intracerebroventricular no produce hipertermia (BROWN y TACHE, 1981).

#### 8.4. ACCIONES EN EL PANCREAS ENDOCRINO

La somatostatina, que en el páncreas endocrino es sintetizada por las células D, inhibe la secreción de insulina, glucagón y de la propia somatostatina, desempeñando de esta manera una regulación paracrina de la función insular (ARIMURA y FISHBACK, 1981; GERICH, 1981). Varios neurotransmisores influyen a su vez sobre la secreción de somatostatina pancreática. La noradrenalina ejerce un papel estimulante, mientras que la acetilcolina realiza una función inhibitoria de la secreción de somatostatina (figura 6).

El efecto de la liberación de neurotransmisores en el islote es complejo. La acetilcolina provoca directamente la secreción de insulina y glucagón; esta acción se ve amplificada por la inhibición simultánea de la secreción de somatostatina. Por otro lado, la noradrenalina estimula la liberación de somatostatina, lo cual incrementaría el efecto inhibitorio de las

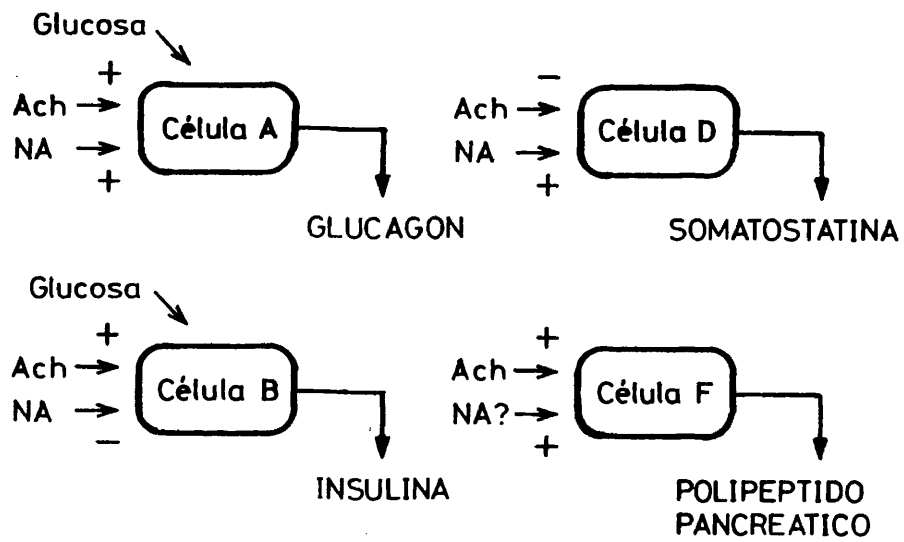


Figura 6.- Regulación autonómica de las células insulares. Ach: acetilcolina; NA: noradrenalina; + indica estimulación y - indica inhibición (modificado de PORTE y HALTER, 1981).

catecolaminas sobre la liberación de insulina, pero inhibiría la estimulación por las catecolaminas de la secreción de glucagón (PORTE y HALTER, 1981).

Otros estímulos para la secreción de somatostatina por las células D de los islotes los constituyen el glucagón, el déficit de insulina, algunos aminoácidos, la glucosa y varios péptidos intestinales como la colecistoquinina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (REICHLIN, 1983). Se han encontrado receptores para somatostatina en las células A (productoras de glucagón), B (productoras de insulina) e incluso en las células D sintetizadoras de somatostatina (PATEL y cols., 1982). Sin embargo, el mecanismo por el que estas interacciones hormonales determinan la función pancreática no es conocido en su totalidad (figura 7).

La somatostatina interacciona con las células A según el típico mecanismo de retroalimentación negativa: el glucagón estimula la liberación de somatostatina mientras que la somatostatina inhibe la liberación de glucagón. La interacción de la somatostatina con la célula B es más compleja: la insulina probablemente inhibe la liberación de somatostatina y la somatostatina inhibe también la secreción de insulina. El déficit de insulina, además, puede inducir hipersecreción de somatostatina. Sin embargo, la sensibilidad de la célula A a la inhibición por somatostatina es mucho mayor que la sensibilidad de la célula B, por ello se piensa que

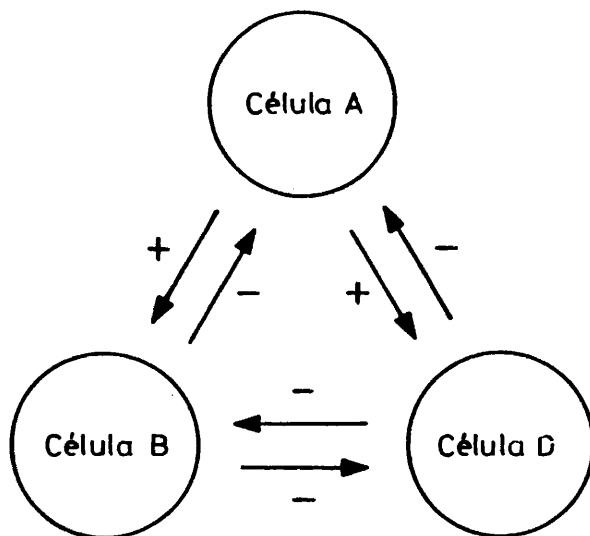


Figura 7.- Esquema simplificado de las interacciones entre los tres tipos principales de células endocrinas pancreáticas: células A, productoras de glucagón; B, productoras de insulina, y D, productoras de somatostatina; + indica estimulación y - indica inhibición.

el sistema de retroalimentación negativa del glucagón puede ser la función predominante de la somatostatina en los islotes pancreáticos y se da una mayor importancia al eje glucagón-somatostatina que al eje insulina-somatostatina. No obstante, el efecto sobre la función de la célula A es transitorio, mientras que sobre la célula B la acción de la somatostatina es más persistente, lo que explicaría la hiperglucemia moderada en pacientes que reciben somatostatina durante un tiempo prolongado (KAWAI y cols., 1982; REICHLIN, 1983).

Posiblemente, la somatostatina endógena desempeña un papel fisiológico en la regulación de la secreción de insulina y glucagón. El efecto agudo de la administración de somatostatina es un descenso del nivel plasmático de glucosa secundario a la inhibición de la liberación de glucagón; sin embargo, la infusión de somatostatina durante varias horas da lugar a hiperglucemia, presumiblemente como consecuencia del predominio a largo plazo de los efectos inhibidores sobre la secreción de insulina (REICHLIN, 1983).

#### 8.5. ACCIONES EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL

La mayoría de los efectos gastrointestinales de la somatostatina parecen ser de naturaleza paracrina,

ya que el péptido es sintetizado por células endocrinas intestinales similares a las células D pancreáticas (POLAK y cols., 1975; ARNOLD y LANKISCH, 1980). Sin embargo, la somatostatina puede influenciar las funciones digestivas por un mecanismo endocrino a través de la circulación periférica e incluso a través de su secreción intraluminal (UVNAS-WALLENSTEN, 1980). Las múltiples acciones que posee la somatostatina a nivel gastrointestinal se resumen en la tabla 5.

La administración intravenosa de somatostatina es capaz de suprimir la secreción gástrica de ácido clorhídrico y de pepsina, así como la secreción de gastrina (GOMEZ-PAN y cols., 1975; CREUTZFELDT y ARNOLD, 1978; REED y cols., 1978; CHEW, 1983; GESPACH y cols., 1983).

La somatostatina probablemente forma parte de un mecanismo de retroalimentación negativa regulador de la secreción de gastrina y de ácido clorhídrico (THOMAS, 1980).

La hormona disminuye también la secreción salival basal, así como las secreciones exocrinas del páncreas, tanto en lo que respecta a la producción de bicarbonato como de enzimas, y la secreción intestinal (ADLER y cols., 1980).

La liberación de un gran número de hormonas gastrointestinales, entre las que podemos citar la secretina, colecistoquinina, péptido intestinal vasoactivo, péptido inhibidor gástrico, enteroglucagón y motilina,

TABLA 5.- ACCIONES GASTROINTESTINALES DE LA SOMATOSTATINA\*

FUNCIONES	ACCIONES
Secreciones exocrinas	Inhibe la secreción gástrica de pepsina, ácido clorhídrico y factor intrínseco, la secreción pancreática (bicarbonato y enzimas) y las secreciones intestinal y biliar.
Secreciones endocrinas	Inhibe la secreción de gastrina, secretina, CCK, VIP, VIP, enteroglucagón, polipéptido pancreático, motilina, neurotensina, sustancia P.
Motilidad	Inhibe el vaciamiento gástrico, la motilidad intestinal y la motilidad de la vesícula biliar.
Flujo sanguíneo	Disminuye el flujo sanguíneo mesentérico e incrementa las resistencias vasculares mesentéricas.
Absorción	Disminuye la absorción de calcio, glucosa, galactosa, glicerol, fructosa, xilosa, lactosa, aminoácidos, triglicéridos y agua.

\*Modificado de Reichlin (1983)

así como de neurotransmisores como las catecolaminas, acetilcolina, neurotensina y sustancia P, también experimenta una inhibición por acción de la somatostatina (SCHUSDZIARRA y cols., 1978).

La gluconeogénesis que se produce en las células hepáticas en respuesta al péptido inhibidor gástrico, péptido intestinal vasoactivo y secretina es inhibida también por la somatostatina (MATSUMURA y cols., 1980).

La somatostatina inhibe el vaciamiento gástrico y disminuye la motilidad duodenal y las contracciones de la vesícula biliar, estando este último efecto posiblemente mediado a través de su acción inhibidora de la liberación de colecistoquinina (SCHUSDZIARRA y cols., 1978). En el íleo aislado de cobayo la somatostatina produce una inhibición de las contracciones que no se antagoniza con naloxona (JHAMANDAS y ELLIOT, 1980).

En los últimos años se ha observado que la somatostatina puede inhibir la formación de úlceras de stress en las ratas (VARA-THORBECK y cols., 1980) y ha sido utilizada en el tratamiento de la hemorragia esofágica y gástrica en el hombre (LIMBERG y KOMMERELL, 1980; RUBIES-PRAT, 1983). En efecto, la hormona es capaz de disminuir el flujo sanguíneo intestinal y probablemente el flujo gástrico incrementando las resistencias vasculares mesentéricas (REICHLIN, 1983).

En humanos anestesiados ha podido demostrarse que la somatostatina reduce el flujo sanguíneo en las

arterias hepática común, esplénica, ileocólica y cólica izquierda (TYDEN y cols., 1979). Las acciones de la somatostatina sobre la circulación portal han sido estudiadas recientemente por MacLELLAN y cols. (1983). Estos autores encuentran una reducción significativa del flujo sanguíneo hepático en la rata tras la inyección de somatostatina en una vena sistémica, pero no han observado modificaciones tras la inyección del péptido en la circulación portal. Sugieren, por tanto, que la somatostatina ejercería su acción a través de la circulación esplácnica pre-hepática más bien que directamente en la vena porta (MacLELLAN y cols., 1983).

En lo que respecta a los procesos absortivos el efecto global de la somatostatina consiste en una disminución de la absorción de nutrientes en el estómago e intestino delgado, como consecuencia de su acción inhibidora de la motilidad y de las secreciones de estos órganos (REICHLIN, 1983). Además, la somatostatina bloquea el transporte de iones en el colon (DHARMSATHAPHORN y cols., 1980a). Por otra parte disminuye la ingesta a través de un efecto sobre los mecanismos de la saciedad (PORTE y HALTER, 1981), por lo que el péptido podría desempeñar un papel fisiológico en la regulación de la velocidad de absorción gastrointestinal (SCHUSDZIARRA y cols., 1979).

#### 8.6. OTRAS ACCIONES

La somatostatina posee otras acciones inhibitoras en diversos territorios orgánicos. Inhibe, por ejemplo, la liberación de calcitonina y de hormona paratiroidea (HARGIS y cols., 1978), lo cual resulta coherente con su acción inhibitora de la liberación de hormonas gastrointestinales. In vitro, la somatostatina ha sido capaz de bloquear la liberación de hormona paratiroidea estimulada por bajos niveles de calcio plasmático, isoproterenol y dibutiril-AMPc (KUKREJA y cols., 1980). Como ya se mencionó anteriormente, algunas células parafoliculares tiroideas contienen somatostatina y calcitonina (VAN NOORDEN y cols., 1977). La liberación de somatostatina puede conducir a una disminución de la secreción de calcitonina por un mecanismo autocrino (GORDIN y cols., 1978; REICHLIN, 1983).

La somatostatina altera la agregación plaquetaria y bloquea la leucocitosis en respuesta a endotoxinas (McCANN, 1982). Induce la secreción en los mastocitos, observándose al microscopio que esta respuesta secretora a somatostatina implica una exocitosis de los gránulos de histamina muy similar a la obtenida con el clásico compuesto 48/80 (THEOHARIDES y cols., 1981). Este es uno de los pocos efectos estimulantes que se conocen de la somatostatina.

En el riñón la somatostatina se comporta como un potente inhibidor de la secreción de renina inducida por furosemida (GOMEZ-PAN y cols., 1976; ROSENTHAL y cols., 1976). La somatostatina no modifica la actividad de renina plasmática en sujetos sanos ni en pacientes hipertensos con renina baja; sin embargo, reduce significativamente los valores de renina de pacientes con hipertensión esencial con renina alta o normal (ROSENTHAL y cols., 1978a, 1978b). Se han supuesto también algunas acciones inhibitoras en los túbulos renales (FORREST y cols., 1980). Se piensa que la somatostatina podría desempeñar un cierto papel en la regulación de la función renal ya que, en el perro, ha podido demostrarse que interfiere con la acción antidiurética de la vasopresina (REID y ROSE, 1977).

En lo que respecta al sistema cardiocirculatorio hay pocos datos acerca de los efectos de la somatostatina. Se sabe que este péptido origina en aurículas aisladas de cobayo una disminución de la fuerza contráctil, si bien parece ser inactivo en otras especies como la rata y el conejo (QUIRION y cols., 1979). Este efecto inotrópico negativo de la somatostatina se acompaña de una inhibición selectiva del efecto inotrópico positivo provocado por la neurotensina en la misma preparación antes mencionada (QUIRION y cols., 1979).

La somatostatina impide los incrementos en la presión arterial y en la actividad de renina plasmática

producidos por orciprenalina (ROSENTHAL y cols., 1977) sin afectar los niveles plasmáticos de noradrenalina (CHRISTENSEN y cols., 1975). La administración intravenosa de somatostatina produce un incremento inicial en la presión arterial sistólica que dura unos dos o tres minutos y que se continúa con un periodo de disminución de la presión arterial que alcanza su punto más bajo a los 30-60 minutos (MOULOPOULOS y cols., 1978). Además, la somatostatina es capaz de prolongar el efecto hipotensor del diazóxido (MOULOPOULOS y cols., 1978). Otros autores, sin embargo, han encontrado un efecto hipertensor de la somatostatina (TYDEN y cols., 1979; SAID, 1983) o ningún efecto sobre la presión arterial (ROSENTHAL y cols., 1978a, 1978b).

La somatostatina tampoco modifica el volumen minuto cardíaco ni el volumen por latido en condiciones normales, pero logra descender estos parámetros en condiciones de hiperreninemia inducida por furosemida en pacientes con hipertensión esencial con renina alta (ROSENTHAL y cols., 1978a, 1978b).

En fechas recientes, GRECO y cols. (1984) han observado una disminución de la frecuencia cardíaca en un grupo de pacientes con psoriasis tratados con somatostatina. Estos mismos autores han administrado somatostatina a seis pacientes con taquicardia supraventricular, consiguiendo restablecer el ritmo sinusal en cinco de ellos. Posiblemente la somatostatina está presente

en fibras vagales y desempeña un cierto papel fisiológico en el control de la función cardíaca (GRECO y cols., 1984).

#### 8.7. ACCIONES DE LA SOMATOSTATINA-28

Se han estudiado las acciones de la somatostatina-28 sobre la secreción hipofisaria humana, habiéndose demostrado que este polipéptido suprimía la respuesta de la GH a la arginina (RODRIGUEZ-ARNAO y cols., 1981; MILLAR y cols., 1983) y a la hipoglucemia insulínica (MILLAR y cols., 1983). La somatostatina-28 parece ser más potente y parece ejercer un efecto más prolongado que la somatostatina-14 (RODRIGUEZ-ARNAO y cols., 1981; MILLAR y cols., 1983; GOMEZ-PAN Y RODRIGUEZ-ARNAO, 1983).

Las acciones de la somatostatina-28 sobre la liberación de TSH parecen ser cualitativa y cuantitativamente similares a las ejercidas por el tetradecapéptido. La secreción de prolactina y de ACTH no se ve alterada por acción de la somatostatina-28 (GOMEZ-PAN y RODRIGUEZ-ARNAO, 1983).

La somatostatina-28 carece de efecto sobre la motilidad intestinal y sobre la circulación mesentérica (KONTUREK y cols., 1981). Es, no obstante, más potente

que la somatostatina-14 en su efecto inhibidor de la secreción exocrina pancreática y en su efecto inhibidor de la secreción de insulina y glucagón estimulada por bombesina (KONTUREK y cols., 1981).

Las diferencias entre las acciones inhibitorias de la somatostatina-14 y la somatostatina-28, así como sus distintos lugares de unión a receptores (SRIKANT y PATEL, 1981a), sugieren que la somatostatina-28 no es simplemente un precursor de la somatostatina-14, sino que posee algunas funciones fisiológicas independientes.

## 9. MECANISMO DE ACCION

El mecanismo de acción de la somatostatina parece ser bastante similar en todos los órganos en los que esta hormona desarrolla algún efecto. No obstante, los procesos íntimos de este mecanismo no han sido, hasta el presente, perfectamente comprendidos. A continuación se revisan y comentan algunos detalles de los aspectos más importantes concernientes al mecanismo de la acción de la somatostatina según los datos publicados en los últimos años.

### 9.1. RECEPTORES

Las acciones de la somatostatina parecen requerir la presencia de unos receptores específicos que se han identificado y caracterizado en la hipófisis de rata (AGUILERA y PARKER, 1982; SRIKANT y PATEL, 1982), células tumorales de hipófisis de rata (SCHONBRUNN y TASHJIAN, 1978; REUBI y cols., 1982) y membranas celulares de hipófisis bovinas (LEITNER y cols., 1979). La mayoría de los autores (SCHONBRUNN y TASHJIAN, 1978; AGUILERA y PARKER, 1982) opina que los receptores hipofisarios

para somatostatina constituyen una población uniforme de sitios de unión de alta afinidad. REUBI y cols. (1982), por su parte, describen una unión de alta afinidad para la somatostatina en homogenados de membranas procedentes de un tumor hipofisario rico en células somatotrópicas y sugieren, al contrario que otros autores, la existencia de varios subtipos de receptores para la somatostatina en la hipófisis.

La existencia de somatostatina ligada a la membrana de células somatotrópicas, tirotrópicas y lactotrópicas, así como en la matriz citoplásmica, gránulos de secreción y componente eucromatínico de células hipofisarias, ha sido demostrada mediante técnicas inmunohistoquímicas (MOREL y cols., 1983).

SRIKANT y PATEL (1981b) han identificado y caracterizado receptores específicos para somatostatina en el cerebro de rata utilizando ( $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ )-somatostatina como radioligando. Estos receptores, presentes en membranas obtenidas de sinaptosomas, pueden ser activados por análogos activos de la somatostatina.

En el tracto gastrointestinal la desfosforilación de las proteínas podría ser responsable de al menos algunos de los efectos fisiológicos de la somatostatina. El péptido es un potente y aparentemente selectivo activador de la fosfoproteína-fosfatasa en homogenados y extractos citosólicos obtenidos de hígado y páncreas, células gástricas y células intestinales (REYL y LEWIN, 1981).

LEWIN y REYL (1982) sugieren la existencia de un receptor intracelular para la somatostatina con propiedades características de subunidad reguladora de la fosfoproteína-fosfatasa. Es decir, los efectos inhibidores de la somatostatina sobre varias funciones celulares podrían estar mediados por desfosforilación de sustratos. Estos receptores intracelulares han sido identificados en células de la mucosa gástrica; en este tejido se han encontrado tres especies moleculares distintas: una de un peso molecular de 130000, que representa el sitio específico de unión para la somatostatina y que está desprovista de actividad enzimática, y otras dos porciones, de pesos moleculares aparentes de 64000 y 13000, que son las unidades catalíticas capaces de desfosforilar la  $^{32}\text{P}$ -histona, pero que no se unen a la somatostatina (REYL y LEWIN, 1982). Por lo tanto, la desfosforilación de sustratos podría ser el efecto primario que desencadenase las acciones fisiológicas de la somatostatina en la mucosa gástrica y tal vez en otros órganos del tracto digestivo.

A este respecto es también significativo el hecho de que la adición de somatostatina a preparaciones in vitro de membranas plasmáticas sinápticas obtenidas del hipocampo disminuye la fosforilación de las proteínas específicas (DOKAS y cols., 1983). Esto sugiere que la somatostatina es también capaz de afectar la fosforilación proteica de las membranas plasmáticas

sinápticas, probablemente por interacción con sitios específicos de la membrana capaces de unirse a la hormona.

Se han encontrado, por otra parte, receptores para somatostatina en los acinos pancreáticos (ESTEVE y cols., 1982). En este tejido, tras la unión a la membrana celular, el péptido es internalizado y, al parecer, interacciona con moléculas intracelulares previamente al desarrollo de sus efectos (ESTEVE y cols., 1982).

En la aurícula aislada de cobayo, QUIRION y cols. (1979) sugieren que la somatostatina produce su efecto inotrópico negativo a través de una interacción con receptores específicos muy probablemente localizados en la membrana celular. Esta interacción daría lugar posteriormente a una reducción en el flujo de entrada de calcio al interior celular. El efecto inotrópico negativo de la somatostatina persiste aun después del tratamiento de las preparaciones con una mezcla de inhibidores formada por practolol, fentolamina, metisergida, difenhidramina, cimetidina, atropina e indometacina, lo que sugiere que la somatostatina actúa directamente y no a través del bloqueo de los receptores alfa o beta-adrenérgicos, receptores  $H_1$  o  $H_2$ , serotoninérgicos o muscarínicos, ni a través de la liberación de prostaglandinas (QUIRION y cols., 1979).

En otros tejidos, como por ejemplo, el riñón, donde la somatostatina estimula la síntesis de glucosa a partir de lactato y piruvato, DILEEPAN y cols. (1982)

han descrito una inhibición de la acción del péptido por el prazosín, un antagonista de los receptores alfa-1 adrenérgicos, y una ausencia de esta inhibición por parte de la yohimbina, antagonista específico de receptores alfa-2 adrenérgicos. Por ello, el efecto estimulante de la somatostatina sobre la neogluco génesis renal parece que podría estar mediado a través de una interacción con receptores de tipo alfa-1 adrenérgicos.

## 9.2. NUCLEOTIDOS CICLICOS

Los nucleótidos cíclicos, principalmente el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y el monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), intervienen como segundos mensajeros en la acción de un gran número de hormonas. Ha podido comprobarse que la somatostatina disminuye la síntesis tanto basal como estimulada de AMPc en cultivos tisulares de hipófisis anterior de rata y oveja, y que esta disminución se corresponde con la inhibición de la liberación de GH y TSH (BELANGER y cols., 1974; BERGEAT y cols., 1974; BRYCE y cols., 1975; SHEPPARD y cols., 1979c; KRAICER y SPENCE, 1981; DORFLINGER y SCHONBRUNN, 1983).

El efecto inhibitor de la secreción ácida gástrica por parte de la somatostatina también parece

ser debido a un control selectivo y directo de la producción de AMPc inducida por la histamina en las células parietales a través de un sitio de reconocimiento diferente del receptor histamínico  $H_2$  (CHEW, 1983; GESPACH y cols., 1983). El péptido es, sin embargo, incapaz de inhibir el incremento de los niveles de AMPc originado por la prostaglandina  $E_1$  o por los inhibidores de fosfodiesterasa (BATZRI, 1981).

La somatostatina inhibe también la síntesis de AMPc estimulada por secretina en los acinos pancreáticos de cobayo (ESTEVE y cols., 1982).

En lo que respecta a los niveles de GMPc, otro posible mensajero de la acción hormonal, VESELY (1980) ha comprobado que la somatostatina incrementa los niveles de este nucleótido en la hipófisis y el cerebro de rata. La somatostatina, a concentraciones del orden de 2 pmol/l incrementa la actividad de la guanil-ciclase en el cerebro y otros órganos como el hígado, páncreas, estómago e intestino delgado de rata. Sin embargo, a concentraciones más altas (20  $\mu$ mol/l), el péptido produce una marcada inhibición de la actividad de la guanil-ciclase en todos los tejidos estudiados, lo que podría explicar algunas discrepancias obtenidas en investigaciones previas. No todos los investigadores, en efecto, han podido comprobar un incremento en los niveles intracelulares de GMPc por acción de la somatostatina (SHEPPARD y cols., 1979c; KRAICER y SPENCE,

1981).

### 9.3. FENOMENOS DISTALES A LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS

Además de la inhibición de la generación del AMPc o de un posible efecto potenciador de la síntesis de GMPc, la somatostatina ha mostrado capacidad para bloquear de modo consistente algunos fenómenos implicados en la secreción distales o ulteriores a la síntesis de los nucleótidos cíclicos mencionados.

La somatostatina, efectivamente, suprime la liberación de GH y de TSH inducida por análogos del AMPc como el N<sup>6</sup>-monobutiril y el N<sup>6</sup>-2-O-dibutiril-AMPc y por otros secretagogos que estimulan la acumulación del AMPc. Estas sustancias incluyen los inhibidores de fosfodiesterasa (teofilina, 3-isobutiril-1-metilxantina) y los estimulantes directos del AMPc tales como las prostaglandinas E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> o la elevación de la concentración extracelular de potasio (BELANGER y cols., 1974; BERGEAT y cols., 1974; BRYCE y cols., 1975; STACHURA, 1977; HAYASAKI-KIMURA y TAKAHASHI, 1979; SHEPPARD y cols., 1979c; KRAICER y SPENCE, 1981; STACHURA, 1981). En el tejido paratiroideo in vitro, KUKREJA y cols. (1980) sugieren que la inhibición de la secreción de hormona paratiroidea por la somatostatina es debida a una acción

distal al AMPc, ya que el efecto del péptido es más marcado en el caso de estimulación con isoproterenol. Todo ello parece indicar que una parte importante del mecanismo de acción de la somatostatina se ejercería impidiendo la expresión celular que conlleva el incremento en los niveles intracelulares de AMPc. Por otra parte, la somatostatina no parece ejercer su acción a través de una estimulación de la síntesis de las proteínas. La cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, no es capaz de impedir la inhibición de la secreción de GH ejercida por la somatostatina in vitro (VALE y cols., 1975).

#### 9.4. FLUJOS IONICOS

Varios autores han apuntado la posibilidad de que la somatostatina pudiera influenciar el proceso de exocitosis a través de una interferencia con los mecanismos iónicos que controlan este fenómeno y, más concretamente, a través de una reducción del flujo de entrada de calcio al interior de las células.

Las sustancias que incrementan la concentración intracelular de calcio favoreciendo la entrada de este catión a las células, o bien originando una redistribución intracelular del mismo, son, en efecto, agentes que

potencian la secreción de GH. La somatostatina, de hecho, puede impedir los fenómenos exocíticos dependientes de calcio en la hipófisis de rata (SCHOFIELD y cols., 1974).

La elevación de la concentración extracelular de potasio también estimula la secreción de GH. El potasio a altas concentraciones actúa a través de una despolarización de la membrana plasmática que origina un incremento ulterior del flujo de entrada de calcio (KRAICER y SPENCE, 1981). En esta secreción de GH inducida por altas concentraciones de potasio no intervendría, en principio, ningún nucleótido cíclico. Algunos autores, sin embargo, han encontrado que las altas concentraciones extracelulares de potasio pueden actuar, al menos en parte, a través de un incremento del AMPc intracelular (KRAICER y SPENCE, 1981). Por otra parte, el ionóforo A23187, un antibiótico ácido monocarboxílico, incrementa la permeabilidad al calcio en las membranas celulares, lo que origina un aumento del calcio libre intracelular mediado a través de un incremento del flujo de entrada desde el exterior y desde los organelos intracelulares que almacenan este catión (figura 8).

Pues bien, el incremento en la liberación de GH inducido tanto por alto potasio como por el ionóforo A23187 puede ser bloqueado por la somatostatina a concentraciones del orden de  $6 \times 10^{-10}$  M (0.6 nM), o mediante la disminución de la concentración de calcio en el medio

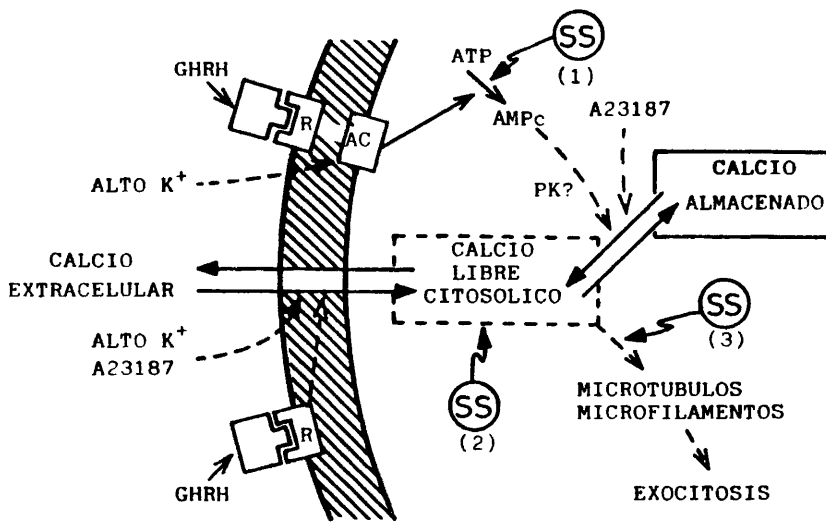


Figura 8.- Esquema representativo de las actuales ideas sobre el mecanismo de acción de la somatostatina en células somatotrópicas hipofisarias. La somatostatina (SS) ejercería su acción antagonista de la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) actuando mediante (1) una disminución de los niveles de AMPc, (2) una disminución de los niveles de calcio libre citosólico y (3) un bloqueo de los fenómenos intracelulares posteriores a la elevación del calcio libre citosólico. La somatostatina bloquea también el efecto secretor de GH originado por altas concentraciones de potasio (alto K<sup>+</sup>) o por el ionóforo A23187. Explicación más detallada en el texto. PK: proteína quinasa dependiente del AMPc; R: receptor de la GHRH; AC: adenil ciclasa (modificado de KRAICER y SPENCE, 1981).

extracelular. La somatostatina, sin embargo, no altera el ligero incremento en los niveles de AMPc originado por las altas concentraciones de potasio. Este hecho es consistente con una acción de la somatostatina más allá (distal) de la señal del AMPc, la cual operaría bloqueando el aumento en los niveles de calcio citosólico libre procedente tanto del exterior celular como de los organelos intracelulares (KRAICER y SPENCE, 1981). El hecho de que la somatostatina sea capaz de reducir la captación de calcio inducida por altas concentraciones de potasio y por el ionóforo A23187 es consistente con la hipótesis de que el péptido, tras ligarse a su receptor, podría actuar disminuyendo la entrada de calcio al interior de la célula, originando de este modo un descenso del calcio citosólico que bloquearía la liberación de GH (BICKNELL y SCHOFIELD, 1976,1977; SCHOFIELD y BICKNELL, 1978; SHEPPARD y cols., 1979c; KRAICER y SPENCE, 1981).

El efecto de la somatostatina sobre la captación de calcio ha podido ser directamente evaluado mediante la utilización de radionucleidos. En islotes pancreáticos aislados de rata la somatostatina, a concentraciones del orden de 1 nM, inhibe la captación de  $^{45}\text{Ca}$  estimulada por glucosa en medios que contienen calcio a bajas concentraciones (OLIVER, 1976). Es significativo el hecho de que la somatostatina a las mismas concentraciones a las que inhibe la secreción de insulina también desarrolla su acción sobre los flujos de  $^{45}\text{Ca}$ .

PACE y TARVIN (1981), trabajando también en islotes pancreáticos aislados de rata, han demostrado que las sustancias que interfieren con el flujo de salida de potasio en células insulares pueden bloquear los efectos de la somatostatina sobre la secreción de insulina y sobre los efectos electrofisiológicos de altos niveles de glucosa en las células endocrinas pancreáticas. Estos autores proponen que la acción primaria de la somatostatina consiste en un incremento del flujo de salida de potasio que, a su vez, disminuye la acumulación de calcio intracelular. Esta disminución del calcio intracelular conduciría a un desacoplamiento entre el estímulo provocado por la glucosa y la secreción de la célula B.

La acción inotrópica negativa que muestra la somatostatina ha dado lugar a algunos estudios acerca del mecanismo de la acción de este péptido en preparaciones cardíacas aisladas. QUIRION y cols. (1979) han comprobado que el efecto inotrópico negativo depende de una interacción de la somatostatina con receptores específicos, y que este efecto se ve potenciado al disminuir la concentración extracelular de calcio en el medio de incubación. Por otro lado, el incremento de la concentración de calcio extracelular provocaba una significativa reducción en la capacidad de la somatostatina para estimular sus receptores, es decir, el calcio parecía comportarse como un antagonista de la somatostatina en la aurícula de cobayo. Estos resultados sugieren que la acción

inotrópica negativa de la somatostatina en esta preparación podría ser debida a una interferencia del péptido con el transporte del calcio hacia el interior celular (QUIRION y cols., 1979). La somatostatina, por otra parte, no tiene ningún efecto sobre la ATP-asa Na/K-dependiente (PACE y TARVIN, 1981) y carece de propiedades bloqueantes de los receptores beta adrenérgicos cardíacos (QUIRION y cols., 1979)..

Sintetizando lo revisado hasta aquí podemos resumir el mecanismo de acción de la somatostatina de la siguiente forma (figura 8). La secreción hipofisaria de GH requiere un aumento de la concentración intracelular de calcio. Este catión puede proceder del medio extracelular o bien de los organelos intracelulares que lo almacenan. El estímulo fisiológico que provoca el incremento en el calcio libre citosólico lo constituye la interacción de la hormona liberadora de GH (GHRH o GRF) con sus receptores específicos situados en la membrana plasmática de las células somatotrópicas (BRAZEAU y cols., 1982). Esta interacción estimula la actividad de la adenilciclase, por medio de la cual se genera un aumento en los niveles intracelulares de AMPc (BRAZEAU y cols., 1982; CRONIN y cols., 1982). El incremento en los niveles de AMPc estimula los movimientos intracelulares de calcio desde los organelos que lo almacenan hasta el citosol, efecto probablemente mediado por una proteína quinasa

dependiente del AMPc (BRAZEAU y cols., 1982). El GRF puede actuar también directamente en la membrana plasmática incrementando la permeabilidad de la misma al calcio, lo que aumentaría el flujo de entrada de este ión (KRAICER y SPENCE, 1981).

Sobre este mecanismo de secreción de GH inducida por su hormona liberadora, la somatostatina ejerce un efecto de naturaleza no competitiva que no implica alteraciones en la unión del GRF a sus receptores hipofisarios. Análogamente esto es también válido para el efecto inhibitor de la secreción de TSH inducida por TRH (VALE y cols., 1975; HARWOOD y GREWE, 1983). Este antagonismo no competitivo ejercido por la somatostatina se verificaría pues según un triple efecto (GOMEZ-PAN y RODRIGUEZ-ARNAO, 1983): (1) supresión de la formación de AMPc, (2) reducción del incremento en la concentración intracelular de calcio, y (3) bloqueo de los fenómenos intracelulares posteriores a la elevación del calcio libre citosólico necesarios para la secreción hormonal (figura 8).

## 10. APLICACIONES TERAPEUTICAS

La somatostatina se ha utilizado como agente terapéutico en ensayos clínicos, aunque su uso no se ha generalizado todavía. Tres han sido los principales territorios en los que la somatostatina ha mostrado ser un tratamiento potencialmente útil. En primer lugar, algunos trastornos endocrino-metabólicos como la diabetes mellitus y la acromegalia; en segundo término, ciertos tumores como los productores de GH y los derivados del sistema APUD (apudomas), y, finalmente, la somatostatina se ha utilizado en el tratamiento de un gran número de enfermedades y trastornos gastrointestinales.

La tabla 6 recoge las principales aplicaciones terapéuticas de la somatostatina.

### 10.1. DIABETES MELLITUS

La infusión de somatostatina en sujetos normales suprime la secreción de GH, insulina y glucagón, y origina un descenso transitorio de la glucemia debido a la inhibición de la secreción de glucagón. Una infusión mantenida de somatostatina da lugar a un ulterior efecto

TABLA 6.- USOS CLINICOS DE LA SOMATOSTATINA

<u>Trastornos endocrinos:</u>	Diabetes mellitus tipo I Acromegalia
<u>Tumores:</u>	Adenomas secretores de GH Gastrinomas Insulinomas Glucagonomas Vipomas Carcinoide
<u>Trastornos gastrointestinales:</u>	Hemorragia digestiva por úlcera gástrica Gastritis de stress Úlcera de duodeno Pancreatitis aguda Fístulas pancreáticas
<u>Otros procesos:</u>	Psoriasis Nesidioblastosis

hiperglucémico debido a la disminución predominante de la secreción de insulina (KAWAI y cols., 1982; REICHLIN, 1983).

En pacientes con diabetes mellitus tipo I la somatostatina disminuye la glucemia y retrasa, aunque no evita, la aparición de hiperglucemia y cetosis cuando se suspende la administración de insulina (GERICH, 1981); este efecto se atribuye a la acción supresora de la liberación de glucagón. La acción protectora de la cetosis no se relaciona con la inhibición de la liberación de GH, aunque se ha sugerido que quizá tal acción sobre la GH podría ser de aplicación terapéutica para prevenir la microangiopatía diabética (BARUH y cols., 1981; MIROUZE, 1981).

En la diabetes mellitus tipo II el efecto de la somatostatina es, sin embargo, perjudicial, ya que su administración origina un efecto hiperglucemiante por su acción frenadora de la liberación de insulina (GERICH, 1981).

La somatostatina se ha utilizado junto con la insulina para disminuir la gravedad de las variaciones glucémicas en la diabetes lábil. No obstante, se han realizado aún pocos estudios sobre este aspecto (GERICH, 1981).

## 10.2. ACROMEGALIA

Como ya se mencionó (apartado 8.2.1), la somatostatina es capaz de disminuir los altos niveles plasmáticos de GH que se encuentran en pacientes con acromegalia (HALL y cols., 1973; BESSER y cols., 1974a). La dosis mínima eficaz en este trastorno es de 1.3  $\mu\text{g}/\text{min}$  en infusión intravenosa. Las infusiones prolongadas de somatostatina suprimen la liberación de GH, insulina y glucagón en los pacientes acromegálicos y evitan las bruscas elevaciones de GH (BESSER y cols., 1974b). El inconveniente que presenta el tratamiento de la acromegalia con somatostatina deriva de la naturaleza peptídica de esta hormona que obliga a su administración por vía intravenosa, así como de la escasa duración de su acción.

## 10.3. TUMORES ENDOCRINOS

Un cierto número de tumores endocrinos hipersecretorios pueden ser controlados mediante la administración de somatostatina. Se incluyen entre éstos los adenomas secretorios de GH, gastrinomas, insulinomas, glucagonomas y vipomas. En el síndrome carcinóide la somatostatina disminuye la eliminación urinaria de ácido

5-hidroxiindolacético, suprime los fenómenos vasomotores cutáneos y evita la diarrea (DHARMSATHAPHORN y cols., 1980b).

Nuevamente debemos señalar que la necesidad de una infusión intravenosa continuada así como la corta duración de la acción del péptido resultan serios inconvenientes a la hora de plantear un tratamiento continuado con somatostatina.

#### 10.4. ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

En patología gastrointestinal la somatostatina ha sido utilizada para el tratamiento de la hemorragia digestiva por úlcera gástrica y de la gastritis de stress. En los casos de hemorragia ésta cede en el transcurso de unas pocas horas tras la administración del péptido. La dosis terapéutica utilizada suele ser un bolo intravenoso de 250 µg seguido por la infusión de 250 µg/hora (RENE y cols., 1980). En algunos ensayos clínicos la somatostatina ha mostrado ser superior a la cimetidina en el tratamiento de las hemorragias gástricas; esta mayor eficacia tal vez está relacionada con el hecho de que la somatostatina consigue un pH gástrico superior a 7, imposible de obtener con cimetidina (KAYASSEH y cols., 1980; MIKHAILIDIS y cols., 1981). Su efecto beneficioso se debe tanto

a la disminución del flujo sanguíneo al estómago como a la inhibición de la secreción de gastrina y ácido clorhídrico.

La somatostatina ha demostrado ser eficaz también en el tratamiento de pacientes con úlcera de duodeno. La explicación de este hallazgo se debe a que a su efecto inhibidor de la secreción ácida gástrica se une un mecanismo de protección tisular sobre las células de la mucosa gástrica. SZABO y USADEL (1982) han demostrado que las lesiones provocadas en el tracto gastrointestinal por un cierto número de agentes tóxicos pueden ser evitadas mediante el tratamiento previo con somatostatina, por lo que estos autores sugieren que el péptido ejerce un cierto efecto citoprotector.

En pacientes con pancreatitis aguda la somatostatina puede producir mejoría clínica y disminución de la amilasemia. Estos efectos derivan tanto de su acción inhibidora de la secreción exocrina pancreática como de su acción bloqueante de la liberación de otras hormonas gastrointestinales (USADEL y cols., 1980). La acción citoprotectora anteriormente citada (SZABO y USADEL, 1982) quizá sea también importante en el efecto terapéutico de la somatostatina en la pancreatitis aguda.

Se ha demostrado también la utilidad de la somatostatina en la profilaxis de la pancreatitis en pacientes a los que se somete a cirugía pancreática; la somatostatina favorece, además, el cierre de las

fístulas pancreáticas y ejerce un efecto profiláctico sobre el shock (USADEL y cols., 1980).

#### 10.5. OTRAS APLICACIONES

Se ha descrito la utilidad de la somatostatina en el tratamiento de la psoriasis (GRECO y cols., 1984). La hipoglucemia infantil debida a nesidioblastosis, un trastorno del desarrollo pancreático caracterizado por la presencia de células insulares hiperfuncionantes y anatómicamente desorganizadas, ha sido tratada con éxito variable mediante la administración de somatostatina como medida de emergencia y como método para evaluar la utilidad de la pancreatectomía (HIRSCH y cols., 1977; ROTI y cols., 1981).

#### 10.6. ANALOGOS DE SOMATOSTATINA

La somatostatina-28 tiene una vida media más prolongada, una acción más potente y un efecto de rebote de menor cuantía que la somatostatina-14. Sin embargo, la somatostatina-28 no influye sobre la circulación mesentérica ni sobre la motilidad intestinal, por lo

que no resultaría útil en el tratamiento de las hemorragias por hipertensión portal (KONTUREK y cols., 1981).

Con objeto de soslayar los inconvenientes que presenta la utilización de un péptido no absorbible por vía oral y de escasa vida media, se ha intentado la síntesis de análogos estructurales de somatostatina que presenten ventajas terapéuticas sobre el compuesto original. Un análogo de somatostatina tendrá interés terapéutico si por un lado presenta una fácil absorción digestiva y una larga vida media de eliminación, o bien, por otro lado, si muestra poseer un espectro más reducido de acción, esto es, una especificidad en sus acciones biológicas, lo que permitiría su utilización en determinados procesos patológicos con una disminución del número de efectos colaterales.

Se ha conseguido un análogo de somatostatina sustituyendo el L-triptófano y la L-cisteína de las posiciones 8 y 14 por D-triptófano y D-cisteína, respectivamente (KAHN y cols., 1981). Este compuesto ejerce un intenso efecto supresor sobre la secreción de glucagón con el consiguiente descenso de la glucemia. Recientemente se han sintetizado también un hexapéptido (VEBER y cols., 1981) y un octapéptido (BAUER y cols., 1982) análogos de la somatostatina que parecen ser más potentes y selectivos que la hormona original. Sus acciones y su potencial utilidad clínica están todavía en estudio.

#### 11. EFECTOS INDESEABLES E INCONVENIENTES

La utilización terapéutica de la somatostatina puede dar lugar a algunos efectos colaterales y secundarios indeseables debido a la multiplicidad de acciones que posee esta hormona.

La administración continuada de somatostatina da lugar a la aparición de hiperglucemia debido al efecto supresor de la liberación de insulina (GERICH, 1981).

La somatostatina produce también un síndrome de malabsorción especialmente de grasas, dada su acción bloqueante de los procesos absortivos (REICHLIN, 1983).

No se han descrito alteraciones importantes de la función cardiovascular tras la administración intravenosa de somatostatina en sujetos normales. Sin embargo su utilización crónica puede producir un incremento de la tensión arterial y disminución de la frecuencia cardíaca, así como náuseas, vómitos y diarrea (LUNDBAEK, 1978).

Se ha reconocido también la posibilidad de originar anomalías hematológicas, ya que en monos se han detectado alteraciones hemorrágicas en el pulmón y anomalías en la agregación plaquetaria (REICHLIN, 1983); si bien otros estudios (GERICH, 1981) indican que la somatostatina carece de efectos sobre la agregación

plaquetaria o los factores de la coagulación.

Se desconocen los posibles efectos a largo plazo del tratamiento con somatostatina sobre la hipófisis anterior y otras células endocrinas.

Entre los inconvenientes más notables que presenta el tratamiento con esta hormona figura, en primer lugar, la necesidad de su administración por vía intravenosa, ya que debido a su naturaleza peptídica no es posible su absorción digestiva.

La corta vida media plasmática de la somatostatina hace necesaria su infusión continua en los casos en que se desee mantener unos determinados niveles en sangre. Este inconveniente puede superarse en cierto modo administrando somatostatina conjugada con zinc-protamina por vía subcutánea, o mediante la utilización de análogos de somatostatina con acción más prolongada (véase apartado 10.6).

Un problema adicional lo constituye la posibilidad de formación de anticuerpos anti-somatostatina que puedan bloquear la acción de la somatostatina endógena y originar un efecto de rebote al suprimir la administración de somatostatina exógena (RUBIES-PRAT, 1983).

12. TRASTORNOS CLINICOS  
DE LA SECRECION DE SOMATOSTATINA

12.1. TRASTORNOS NEUROLOGICOS

Dada la amplia distribución de la somatostatina en el sistema nervioso y sus importantes acciones fisiológicas, tiene gran interés el estudio de las alteraciones que experimenta este péptido en enfermedades neurológicas. La información de que se dispone en la actualidad sobre este aspecto es escasa y se resume a continuación.

Se ha demostrado que la concentración cerebral de somatostatina en pacientes con enfermedad de Alzheimer se encuentra disminuida en algunas regiones como el hipocampo, la corteza frontal y parietal y la circunvolución temporal superior (DAVIES y cols., 1980).

En lo que respecta a los tumores cerebrales, se sabe que en líneas celulares derivadas de glioblastoma, meduloblastoma, neuroma, meningioma, craneofaringioma, astrocitoma, hemangioma, cordoma y neuroblastoma no se ha encontrado somatostatina inmunorreactiva (REICHLIN, 1983). HOCHMAN y cols. (1981) han descrito un caso de hamartoma hipotalámico que contenía somatostatina

inmunorreactiva.

Se han observado, por otra parte, elevaciones patológicas en la concentración de somatostatina en el líquido cefalorraquídeo en algunos trastornos del sistema nervioso central, como la compresión medular, tumores cerebrales y encefalopatías metabólicas (PATEL y cols., 1977). En pacientes con esclerosis múltiple en fase activa se ha descrito, por el contrario, una disminución de la concentración de somatostatina en el líquido cefalorraquídeo (SORENSEN y cols., 1980). RUBINOW y cols. (1983) describen una reducción significativa de los niveles de somatostatina en este líquido en pacientes con depresión unipolar, niveles que volvían a la normalidad con el tratamiento del proceso de base.

## 12.2. TRASTORNOS GASTROINTESTINALES

Como ya se mencionó anteriormente, el estómago posee células D productoras de somatostatina, principalmente en su región antral, y esta hormona influye de manera importante en los procesos de secreción gástrica mediante interacción con diferentes factores hormonales (CHEW, 1983; GESPACH y cols., 1983) y mediante una acción directa sobre las propias células gástricas (LEWIN y REYL, 1982; REYL y LEWIN, 1982).

Se ha pensado que el déficit de somatostatina podría desempeñar un papel patogénico en el desarrollo de la úlcera de duodeno, enfermedad que se caracteriza por una excesiva secreción de ácido clorhídrico y, en algunas ocasiones, de gastrina. Actualmente se piensa que la regulación de las células G antrales secretoras de gastrina se lleva a cabo fundamentalmente por el efecto estimulante de la bombesina, liberada por neuronas peptidérgicas vagales, y por el efecto inhibitor de la somatostatina procedente de las células D antrales (SCHUBERT y MAKHLOUF, 1982). La úlcera duodenal podría resultar de un desequilibrio de este sistema originado por una escasa actividad somatostatinérgica. La demostración de este hipótesis requeriría la cuantificación de las células D y de la concentración de somatostatina inmunorreactiva en el antro en pacientes ulcerosos y su comparación con sujetos normales. Sin embargo, la citada hipótesis no ha podido ser comprobada hasta el momento y algunos autores no encuentran diferencias entre las concentraciones de somatostatina antral en pacientes con úlcera de duodeno y en individuos normales (ARNOLD y LANKISCH, 1980). Los estudios morfométricos de cuantificación de células D que se han realizado hasta la fecha (BALIBREA CANTERO, 1983) proporcionan datos discordantes, de manera que resulta difícil hablar con certidumbre del posible papel patogénico de la somatostatina en la enfermedad ulcerosa duodenal. No

por ello deja de ser significativo el hecho de que la hormona inhibe la formación de úlceras de stress (VARA-THORBECK y cols., 1980) y es útil en el tratamiento de la úlcera de duodeno y otros trastornos gastrointestinales (véase apartado 10.4).

### 12.3. SOMATOSTATINOMA

Es un hecho conocido que la somatostatina puede estar presente en células de tumores endocrinos y no endocrinos (ABE y cols., 1977; PEARSE y cols., 1977); pero sólo desde hace unos años han comenzado a describirse tumores de células D secretoras de somatostatina que constituyen la base histológica de una nueva entidad nosológica conocida con el nombre de somatostatinooma (tabla 7).

LARSSON y cols. (1977) describieron el primer caso de un tumor productor de somatostatina. Se trataba de una mujer de 55 años que presentaba diarrea, esteatorrea, hipoclorhidria, intolerancia a la glucosa y un síndrome similar al carcinóide con niveles de ácido 5-hidroxi-indolacético normales. Durante el estudio se descubrió un tumor localizado en la cabeza del páncreas con metástasis hepáticas. Este tumor estaba formado por células indistinguibles de las células D. Casi todas las células

TABLA 7.- CASOS PUBLICADOS DE SOMATOSTATINOMA

Autores y año	Cuadro acompañante
LARSSON y cols. (1977)	Síndrome carcinoide con 5HIAA normal
GANDA y cols. (1977)	—
KOVACS y cols. (1977)	ACTH ↑
GALMICHE y cols. (1978)	Calcitonina ↑
DE NUTTE y cols. (1978)	—
KREJS y cols. (1979)	Calcitonina ↑
PENMAN y cols. (1980a)	Insulina ↑ ACTH ↑
AXELROD y cols. (1981)	IgG K con componente M
PIPELEERS y cols. (1983)	Tumor duodenal
DAYAL y cols. (1983)	Tumor duodenal

5HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético.

↑ indica niveles plasmáticos elevados.

tumorales mostraron una tinción citoplásmica granular con suero anti-somatostatina que no se presentaba con sueros contra otras hormonas. El radioinmunoensayo demostró que el tumor contenía grandes cantidades de somatostatina inmunorreactiva. Las muestras de sangre obtenidas por cateterización selectiva de las venas pancreáticas contenían niveles altos de somatostatina (hasta 107 ng/ml, 65 nmol/l). En sangre periférica se detectaron concentraciones normales o bajas de insulina, polipéptido pancreático y gastrina, y concentraciones de glucagón por debajo de los límites normales.

GANDA y cols. (1977) describieron el caso de una mujer diabética en la que se realizó una colecistectomía por colecistitis crónica. En la intervención se extirpó una masa pancreática que se identificó, por biopsia, como un carcinoma de células insulares sin metástasis. En una segunda laparotomía se resecó la totalidad del tumor con lo que desapareció la diabetes y la paciente no volvió a tener recidiva tumoral. El ulterior análisis del suero de esta paciente (PATEL y cols., 1983) mostró niveles elevados tanto de somatostatina-14 (1170 pg/ml, 715 pmol/l) como de somatostatina-28 (3599 pg/ml, 2879 pmol/l).

Poco tiempo después, KOVACS y cols. (1977) publicaron el caso de un carcinoma de células insulares que contenía somatostatina inmunorreactiva acompañado por un síndrome de secreción ectópica de ACTH. El paciente,

un hombre de 54 años, presentaba hipertensión, hiperglucemia, alcalosis metabólica hipopotasémica e historia de poliuria y polidipsia. El estudio del tumor con inmunoperoxidasa mostró somatostatina inmunorreactiva en el citoplasma de las células tumorales; algunas de estas células también presentaron ACTH inmunorreactiva. Estos autores no cuantificaron la somatostatina en sangre periférica ni en la masa tumoral.

GALMICHE y cols. (1978) estudiaron el caso de una mujer de 70 años con diarrea crónica, esteatorrea, insuficiencia pancreática exocrina, intolerancia a la glucosa, niveles bajos de insulina, aclorhidria y presencia de un tumor pancreático. El radioinmunoensayo de somatostatina en sangre periférica dio valores de 7000 a 9000 pg/ml (4277 a 5500 pmol/l). Además, encontraron también niveles elevados de calcitonina sin alteraciones importantes de los niveles de calcio y fosfato. El examen del tumor mostró que estaba constituido por células D que contenían somatostatina y calcitonina (detectadas por técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa). Los niveles de ambas hormonas descendieron tras la escisión quirúrgica del tumor, elevándose además los niveles de insulina (GALMICHE y cols., 1980).

DE NUTTE y cols. (1978) describieron el caso de un paciente diabético con malabsorción, tumor pancreático y metástasis hepáticas a las que se asociaba hipersomatostatínemia. En este caso la tolbutamida intravenosa

provocó un marcado incremento en la somatostatina plasmática, mientras que la estreptozotocina (estreptozocina) disminuyó progresivamente estos niveles, por lo que los mencionados autores plantearon la utilidad terapéutica de este último compuesto. Los niveles plasmáticos de somatostatina que presentaba este paciente alcanzaron un valor de 30800 pg/ml (18819 pmol/l) (PIPELEERS y cols., 1979), siendo el valor normal considerado por estos autores de  $675 \pm 95$  pg/ml ( $412 \pm 60$  pmol/l).

KREJS y cols. (1979) estudiaron un caso similar. Se trataba de un enfermo de 52 años con diabetes, diarrea y un tumor en la cabeza del páncreas con metástasis hepáticas. El paciente presentaba unos niveles plasmáticos de somatostatina de 9000 a 13000 pg/ml (5500 a 7943 pmol/l), así como elevación de la calcitonina sérica y disminución de la motilina con el resto de las hormonas dentro de los límites normales.

Dos casos más fueron descritos por PENMAN y cols. (1980a). Uno de ellos, una mujer con infiltración pancreática, metástasis hepáticas y nódulos peritoneales, presentaba niveles de somatostatina de 7500 a 16800 pg/ml (4583 a 10265 pmol/l; valores normales: 17 a 81 pg/ml, 10 a 50 pmol/l). Los niveles de insulina también estaban elevados. Fue tratada con diazóxido y 5-fluorouracilo, disminuyendo sus niveles de somatostatina. El otro caso, un varón con diabetes y síndrome de Cushing con ACTH elevada, tenía una masa pancreática sin metástasis

y sus niveles de somatostatina alcanzaron los 160 pg/ml (98 pmol/l) en la arteria pancreática y 1700 pg/ml (1039 pmol/l) en la vena pancreática.

AXELROD y cols. (1981) describieron un caso de somatostatinooma con algunas manifestaciones nuevas de este síndrome, tales como la presencia de metástasis en diversos órganos (hígado, piel, hueso), presencia de inmunoglobulina G tipo K (IgG K) con componente monoclonal (M) y marcada hiperglucemia con cetonuria que requería terapia insulínica.

PIPELEERS y cols. (1983) publicaron cinco casos de somatostatinooma, cuatro localizados en el páncreas y uno en el duodeno, en los que destacaba la gran heterogeneidad en las manifestaciones clínicas de los pacientes: uno de ellos padecía colelitiasis, esteatorrea y diabetes; dos presentaban severos ataques de hipoglucemia, y otros dos, ictericia obstructiva. Encontraron también estos autores valores de somatostatina circulante elevados, tanto en situación basal como tras estímulo con tolbutamida.

DAYAL y cols. (1983) estudiaron las características morfológicas de tres somatostatinoomas de duodeno mediante técnicas histoquímicas, inmunocitoquímicas y ultraestructurales. Todos los tumores mostraron una arquitectura mixta con áreas prominentes de diferenciación glandular. Se encontraron cuerpos de psammoma, casi exclusivamente localizados en el lumen glandular. Un tumor mostró numerosos gránulos de secreción

intracitoplásmicos que contenían somatostatina, pero ninguno de los tumores segregaba hormonas distintas de la somatostatina.

Del conjunto de datos publicados hasta la fecha puede concluirse que el somatostatinoma es un apudoma caracterizado por la presencia de un tumor pancreático o duodenal, generalmente con metástasis hepáticas, diabetes mellitus, hipoclorhidria, colelitiasis, diarrea, esteatorrea, anemia y pérdida de peso. El origen de este tumor reside en las células D secretoras de somatostatina. Es posible, según VARAS LORENZO (1982), que el somatostatinoma pueda formar parte del síndrome de la neoplasia endocrina múltiple tipo I.

El diagnóstico de este síndrome debe sospecharse ante la presencia de los síntomas citados, si bien debe confirmarse con la detección de niveles elevados de somatostatina sérica, acompañada o no de la secreción inapropiada de otras hormonas, a lo que debe sumarse la localización del tumor mediante técnicas morfológicas (arteriografía, ecografía, tomografía axial computarizada) y su caracterización histológica e inmunocitoquímica. La secreción excesiva de somatostatina que se produce en este tipo de tumor llega a producir en ocasiones niveles plasmáticos que alcanzan hasta 30 veces los valores normales (tabla 3). Si los valores no son muy elevados pueden efectuarse pruebas funcionales para determinar la autonomía de la secreción mediante la

administración de arginina, leucina y glucagón (VARAS LORENZO, 1982).

El tratamiento del somatostatinoma es quirúrgico, si bien algunos autores han empleado quimioterapia con estreptozotocina (DE NUTTE y cols., 1978) o con diazóxido y 5-fluorouracilo (PENMAN y cols., 1980a).

101

## II. MATERIAL Y METODOS

## 1. ESTUDIOS DE CONTRACCION Y FRECUENCIA

### 1.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 1.1.1. MONTAJE DE LAS PREPARACIONES

En nuestros experimentos hemos utilizado cobayos de ambos sexos, de pesos comprendidos entre 350 y 500 gramos. Los animales se sacrificaban mediante un golpe en la nuca y decapitación posterior. Seguidamente se extraía el corazón y se colocaba en una placa de Petri con solución de Tyrode en la que se hacía burbujear gas carbógeno. Dentro de la placa se realizaba la disección de las aurículas y a continuación se procedía al montaje de las mismas. La técnica empleada para el montaje de las aurículas de cobayo era similar a la descrita por STEWART (1958) para el corazón de cobayo y posteriormente modificada por SERRANO y cols. (1970).

Las aurículas de cobayo se fijaban sobre los electrodos de platino por su base y el reborde auricular se ataba al transductor de registro. Tras su montaje en los electrodos, las preparaciones se introducían en copas de Allhin que contenían 10 ml de solución de

Tyrode mantenida a 34° C y en la que se hacía burbujear la mezcla carbógena. Un esquema simplificado del equipo utilizado en la realización de nuestros experimentos aparece en la figura 9.

Todas las aurículas eran sometidas a una tensión basal de 1 gramo y se dejaban estabilizar durante un periodo de 30 minutos antes de iniciar cada experimento.

#### 1.1.2. MANTENIMIENTO DE LAS PREPARACIONES

En la presente Tesis hemos utilizado dos copas de Allhin de 10 ml de capacidad. Estas copas poseen como característica principal una doble pared de vidrio, la cual forma parte de un circuito cerrado por cuyo interior circula agua caliente a una temperatura constante de 34° C en todo su recorrido, gracias a un dispositivo que actúa como bomba y termostato al mismo tiempo, un ULTRA THERMOSTAT K5 COLORA.

El lavado de las preparaciones se realizó en el seno de las copas por el sistema de rebosamiento del líquido de perfusión. Este líquido de perfusión, antes de llegar a las copas, pasa por un serpentín, donde se pone en íntimo contacto con el agua caliente del circuito cerrado del sistema de calentamiento procedente del ULTRA THERMOSTAT K5 COLORA. De este modo el líquido nutricio y de lavado de las preparaciones no afecta

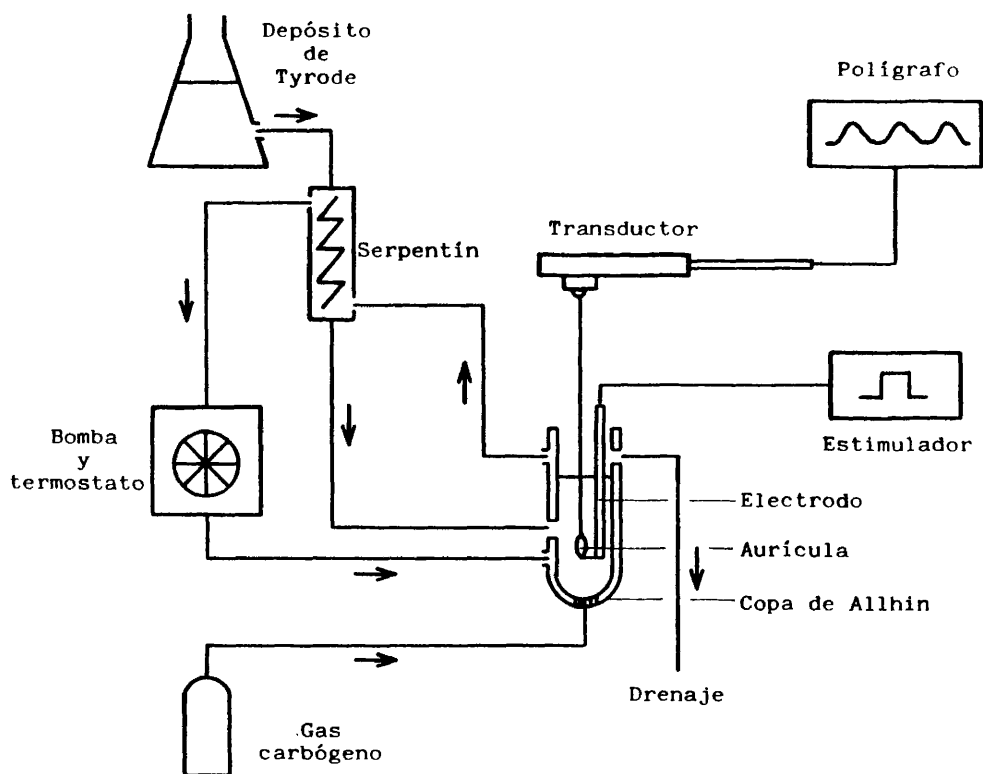


Figura 9.- Esquema simplificado del equipo utilizado para el montaje y mantenimiento de las preparaciones en el baño de órganos. A la izquierda se representan los sistemas de perfusión, calentamiento y oxigenación. A la derecha se representan los aparatos utilizados para la estimulación de las preparaciones y para el registro de las contracciones.

a éstas por cambios de temperatura.

La solución de Tyrode que hemos utilizado en nuestros experimentos tenía la siguiente composición:

	<u>mM</u>	<u>g/l</u>
NaCl	137	8.0
KCl	2.7	0.2
CaCl <sub>2</sub>	1.8	0.2
MgCl <sub>2</sub>	1.05	0.1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.42	0.05
NaHCO <sub>3</sub>	11.9	1.0
Glucosa	5.5	1.0

En algunos experimentos se modificó la concentración de CaCl<sub>2</sub> para obtener un líquido nutritivo de bajo contenido en ión Ca<sup>2+</sup> (0.9 mM); en otros experimentos la concentración de NaCl se redujo a un 70% del valor previamente mencionado, sustituyéndose en este caso el NaCl eliminado por sucrosa con objeto de evitar modificaciones en la osmolaridad.

La oxigenación de las preparaciones se realizó mediante una mezcla carbógena (Sociedad Española de Oxígeno, S.A.) cuya composición porcentual era de un 94.9% de O<sub>2</sub> y un 5.1% de CO<sub>2</sub>. La oxigenación de las preparaciones se lograba mediante un burbujeo continuo de la mezcla carbógena en el seno del líquido nutritivo, a través de una membrana microporosa situada en la parte in-

ferior de las copas de Allhin.

#### 1.1.3. SISTEMA DE ESTIMULACION

Para estimular eléctricamente las aurículas izquierdas (no automáticas) de cobayo hemos utilizado unos electrodos bipolares de platino. Los citados electrodos van introducidos en un tubo de vidrio incurvado en ángulo recto. El extremo inferior del electrodo está cerrado por una resina epoxi y termina en dos hilos de platino. En el extremo superior los terminales se conectaban a un estimulador GRASS tipo SD9.

En todos los experimentos en que se empleaban las aurículas izquierdas, éstas eran estimuladas regularmente a una frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) utilizando pulsos rectangulares de 1 milisegundo de duración ( $S_1$ ) y de un voltaje 20 a 50% superior al voltaje umbral.

#### 1.1.4. SISTEMA DE REGISTRO

En las aurículas de cobayo el registro de la fuerza contráctil y de la frecuencia cardíaca se realizaba en un polígrafo GRASS modelo 7 de cuatro canales, a través de transductores fuerza-desplazamiento GRASS

FT03. Este polígrafo permite efectuar los registros de las contracciones con velocidades de salida del papel comprendidas entre 2.5 mm/min y 100 mm/s.

1.2. DETERMINACION DE PARAMETROS EN AURICULAS DERECHAS  
ESPONTANEAS

Las aurículas derechas, que latían espontáneamente, se estabilizaban durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se determinaba la frecuencia basal (latidos/minuto), así como la amplitud de la fuerza contráctil (mg). El valor de cada uno de estos parámetros era el promedio de las medidas de tres contracciones sucesivas registradas a la velocidad máxima de salida del papel (100 mm/s).

Para determinar el tiempo de recuperación del nodo del seno (TRNS), las aurículas espontáneas se estimulaban a una frecuencia de 5 Hz ( $300 \text{ min}^{-1}$ ) durante 30 segundos. Al cabo de este tiempo se suspendía la estimulación y se medía el periodo de tiempo comprendido entre el último latido estimulado y el primer latido espontáneo (TAMARGO, 1980a; TAMARGO y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984).

La frecuencia máxima de estimulación auricular (FMEA) se determinaba estimulando las aurículas a

frecuencias progresivamente crecientes hasta alcanzar una frecuencia a la que las contracciones no seguían la estimulación eléctrica (TAMARGO, 1980a; TAMARGO y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984).

Para estudiar los efectos de la somatostatina sobre las respuestas contráctiles lentas, las aurículas derechas eran equilibradas durante 30 minutos en solución de Tyrode. A continuación las preparaciones se hacían inexcitables en pocos segundos, al ser despolarizadas por altas concentraciones de potasio (27 mM de KCl) (PAPPANO, 1970; TEJERINA y cols., 1983). En estas condiciones la excitabilidad y la actividad contráctil eran restauradas (respuestas lentas) en la aurícula despolarizada gracias a la adición de isoproterenol ( $10^{-6}$  M) al baño. Las aurículas seguidamente se estimulaban eléctricamente a una frecuencia de 0.4 Hz ( $24 \text{ min}^{-1}$ ). Cuando las contracciones lentas se estabilizaban, la solución era reemplazada por otra que contenía alto potasio, isoproterenol y la concentración deseada de somatostatina, y la amplitud de las contracciones se comparaba con la obtenida en presencia de isoproterenol antes de la adición de somatostatina.

### 1.3. DETERMINACION DE PARAMETROS EN AURICULAS IZQUIERDAS

Las aurículas izquierdas se estimulaban

regularmente a una frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ). Al cabo de los 30 minutos de estabilización se realizaba la medición de la amplitud de la fuerza contráctil a partir de registros de tensión isométricos, siendo cada medida siempre la media de 3 contracciones sucesivas registradas a la velocidad máxima de salida del papel (100 mm/s).

Mediante este mismo procedimiento se determinaban también en el mismo registro el tiempo necesario para alcanzar el máximo tensional, el tiempo total empleado para la contracción y la máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil ( $df/dt \text{ máx}$ ) (BARRIGON y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984).

Para estudiar el fenómeno de la potenciación post-éxtrasistólica las aurículas izquierdas se conducían con un estímulo simple ( $S_1$ ) como hemos hecho habitualmente a lo largo de todos nuestros experimentos a una frecuencia constante de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ). A intervalos de al menos 5 minutos de duración se introducía un extraestímulo ( $S_2$ ) durante 10 contracciones basales. El extraestímulo  $S_2$ , de 1 milisegundo de duración y amplitud 20 a 50% superior al umbral, se introducía con un retraso de 40-50 milisegundos sobre el estímulo basal. Tras esta serie de estímulos apareados se suprimía  $S_2$  y las aurículas seguían siendo estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz (DE MELLO, 1976; BARRIGON y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984).

La realización de las curvas que relacionan la amplitud de la contracción auricular con los diversos intervalos de reposo, se llevaba a cabo siguiendo la técnica de BAYER y cols. (1975). Tras el periodo de equilibrio en el que las aurículas izquierdas eran estimuladas a una frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ), se efectuaban diversos intervalos de reposo en los que se suspendía la estimulación; estos intervalos oscilaron entre 2 y 8 segundos. A continuación se volvía a estimular con las mismas características de la situación basal y la amplitud de la fuerza contráctil de la primera contracción que se producía tras el reposo se expresaba como un porcentaje de la amplitud que poseía la contracción basal en el periodo anterior al reposo (BAYER y cols., 1975; BARRIGON y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984).

La realización de las curvas que relacionan la frecuencia de estímulo con la fuerza contráctil desarrollada se efectuaba conduciendo las aurículas, tras el periodo de estabilización, a una frecuencia de 0.25 Hz ( $15 \text{ min}^{-1}$ ) e incrementando de modo progresivo la frecuencia hasta 3 Hz ( $180 \text{ min}^{-1}$ ). Tras cada modificación de la frecuencia de estímulo se dejaba un periodo de tiempo suficiente para alcanzar la estabilización, al cabo del cual se determinaba la amplitud de las contracciones desarrolladas. El valor de la fuerza contráctil obtenido a la frecuencia de 1 Hz se tomó como control, expresándose el resto de las determinaciones como porcentajes con respecto

a este control (TAMARGO y cols., 1982).

#### 1.4. MEDICION DE PARAMETROS Y OBTENCION DE VALORES

Para el estudio de los efectos de la somatostatina sobre los parámetros que se mencionan en los apartados anteriores se tomaban, en primer lugar, los valores controles previos a la adición de cualquier concentración del péptido. A continuación se añadían concentraciones crecientes de somatostatina ( $10^{-9}$  M a  $5 \times 10^{-6}$  M) al baño de una manera acumulativa. Los intervalos entre dos dosis sucesivas de somatostatina eran de 10 minutos, ya que los estudios previos de tiempo-respuesta indicaron que el efecto del péptido se estabilizaba en este periodo de tiempo.

Para comparar los resultados obtenidos, los valores controles de los parámetros medidos en cada experimento eran tomados como 100%; los valores obtenidos en presencia de somatostatina se calculaban y graficaban como porcentaje de los valores controles para cada experimento.



1.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS  
RESPUESTAS A ISOPROTERENOL Y CLORURO DE CALCIO

Para estudiar el efecto de la somatostatina sobre las respuestas inotrópicas y cronotrópicas positivas del isoproterenol se efectuó el siguiente diseño experimental (BARRIGON y cols., 1982; TAMARGO y cols., 1982; TEJERINA y cols., 1983; DIEZ y cols., 1984). En primer lugar se realizaba una curva dosis respuesta control al isoproterenol; el rango de concentraciones utilizadas de este fármaco abarcaba desde  $10^{-11}$  hasta  $10^{-6}$  M. En estas condiciones se medían las respuestas cronotrópica e inotrópica en las aurículas derechas. Después de la obtención de curvas dosis respuesta estables, se repetía el mismo procedimiento 10 minutos después de la adición de somatostatina al baño. En la nueva curva dosis respuesta se medían los mismos parámetros que en la curva control y se expresaban como porcentaje referido al control. Las concentraciones de somatostatina utilizadas en estos experimentos fueron de  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M.

Para estudiar el efecto de la variación de la concentración extracelular de calcio sobre la acción inotrópica negativa de la somatostatina se utilizó una solución de Tyrode pobre en calcio ( $0.9 \text{ mM Ca}^{2+}$ ). Mediante la adición de cantidades sucesivas de una solución de

cloruro de calcio era posible incrementar de forma progresiva la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular desde 0.9 mM hasta 1.8, 3.6, 5.4 y 7.0 mM y, de este modo, realizar una curva dosis respuesta a calcio de manera similar a la anteriormente descrita con isoproterenol (BARRIGON y cols., 1982; TAMARGO y cols., 1982; TEJERINA y cols., 1983; DIEZ y cols., 1984). La realización de estas curvas en ausencia y en presencia de las dosis deseadas de somatostatina ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) nos ha permitido estudiar la variación del efecto de este péptido en presencia de diversas concentraciones de calcio en el líquido extracelular.

#### 1.6. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOMATOSTATINA EN PRESENCIA DE TYRODE 70% Na

Para la realización de este tipo de experimentos se incubaron las preparaciones en una solución nutritiva cuyo contenido en NaCl se había reducido al 70% de su valor normal (BARRIGON y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984). En estas condiciones se llevaron a cabo curvas dosis respuesta a la somatostatina con idéntica metodología a la mencionada en el apartado 1.4.

## 2. ESTUDIOS DE POTENCIALES DE ACCION

### 2.1. MONTAJE, MANTENIMIENTO Y ESTIMULACION DE LAS PREPARACIONES

Para el registro de los potenciales de acción las aurículas derechas e izquierdas de cobayo se extraían del animal mediante el procedimiento descrito en el apartado 1.1.1. Las aurículas se colocaban en una cámara de lucita de 10 ml de capacidad y se fijaban mediante alfileres a una superficie de cera-parafina. En esta cámara las preparaciones se perfundían de forma continua con la solución de Tyrode cuya composición se ha detallado previamente (apartado 1.1.2). La solución se mantenía oxigenada con mezcla carbógena y a una temperatura constante de  $34.1 \pm 0.5^\circ \text{C}$  durante todo el experimento.

Las preparaciones se estimulaban a la frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) mediante electrodos bipolares de platino a través de los cuales enviábamos estímulos básicos ( $S_1$ ) y estímulos de prueba ( $S_2$ ). Los estímulos eran pulsos rectangulares de 1 ms de duración y de una intensidad 20% superior al voltaje umbral, obtenidos de un estimulador digital CIBERTEC modelo CS-220. En todos los casos las preparaciones se equilibraban durante

al menos 30 minutos antes de obtener los registros control.

## 2.2. TECNICAS DE REGISTRO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Después del periodo de estabilización se procedía al registro de los potenciales de acción intracelulares utilizando microelectrodos de vidrio rellenos de KCl 3M y con una resistencia de punta comprendida entre 10 y 30 megaohmios. La señal se conectaba a un amplificador WPI modelo 701 de alta impedancia de entrada y con una neutralización de capacidad variable. La señal de salida se conectaba a un osciloscopio TEKTRONIX 5130N de memoria y se fotografiaba con una cámara GRASS modelo C-4R en película KODAK de 35 mm. La velocidad de despolarización de la fase 0 del potencial de acción ( $dV/dt$ ) se determinaba utilizando un diferenciador electrónico EHRLER (R.F.A.).

Tras la obtención de los valores control se perfundían las preparaciones con concentraciones crecientes de somatostatina ( $10^{-9}$  M a  $10^{-6}$  M). El tiempo de perfusión con cada concentración era de 10 minutos. Finalizada la perfusión con somatostatina se procedía a lavar la preparación, perfundiéndola nuevamente con solución de Tyrode durante 60 minutos, observándose durante este tiempo si se recuperaban los valores control.

De los registros fotográficos obtenidos con

cada concentración de somatostatina se calculaban los siguientes parámetros (TAMARGO y cols., 1979; RODRIGUEZ y TAMARGO, 1980; TAMARGO, 1980b; MANZANARES y TAMARGO, 1983; DIEZ y cols., 1984; TEJERINA y cols., 1984): potencial de reposo (mV), amplitud del potencial de acción (mV), velocidad máxima de despolarización durante la fase 0 (V máx, V/s) y duración del potencial de acción (ms) medida al 50% ( $DPA_{50}$ ) y al 90% ( $DPA_{90}$ ) de repolarización.

### 2.3. PERIODO REFRACTARIO EFECTIVO

Se denomina periodo refractario efectivo al tiempo en el que no es posible inducir un potencial de acción propagado, es decir, el intervalo de tiempo más corto que puede existir entre dos potenciales de acción propagados (TAMARGO y cols., 1979; TAMARGO, 1980b; MANZANARES y TAMARGO, 1983; TEJERINA y cols., 1984). Para su determinación, las preparaciones se estimulaban a una frecuencia basal ( $S_1$ ) de 1 Hz y, a intervalos variables, se interpolaba un estímulo prematuro ( $S_2$ ), de 1 ms de duración y con un voltaje doble del  $S_1$ , a través de los electrodos de estimulación. El estímulo prematuro se introducía primeramente hacia la mitad de la fase 4 y se iba acercando progresivamente a la cola (fase 3) del potencial de acción básico precedente,

hasta que no se obtenía respuesta propagada alguna. El estímulo  $S_2$  se interpolaba cada 5 pulsos básicos gracias a la utilización del estimulador digital programable.

#### 2.4. TIEMPO DE RECUPERACION

Se denomina tiempo de recuperación al periodo de tiempo necesario para que la velocidad máxima de despolarización durante la fase 0 ( $V_{\text{máx}}$ ) recupere totalmente su amplitud tras la obtención de un potencial de acción propagado (RODRIGUEZ y TAMARGO, 1980; TAMARGO, 1980b; MANZANARES y TAMARGO, 1983; TEJERINA y cols., 1984). Este parámetro se determinaba introduciendo un extraestímulo ( $S_2$ ), con un voltaje doble del  $S_1$ , a intervalos de tiempo variables con respecto al estímulo basal  $S_1$ . El estímulo  $S_2$  se introducía cada 5 pulsos básicos ( $S_1$ ).

#### 2.5. POTENCIALES DE ACCION LENTOS (CALCIO-DEPENDIENTES)

Los potenciales de acción lentos se indujeron en las aurículas de cobayo mediante la perfusión de

las mismas con una solución de Tyrode que contenía 27 mM de KCl y la posterior adición de  $10^{-6}$  M de isoproterenol o bien 5 mM de cafeína (TAMARGO y cols., 1979; TAMARGO, 1980b; TEJERINA y cols., 1984). Los efectos de la somatostatina ( $10^{-9}$  M -  $10^{-6}$  M) sobre los potenciales de acción lentos así obtenidos se estudiaron siguiendo una metodología similar a la descrita en el apartado 2.2, si bien la frecuencia básica de estimulación de estos experimentos era de 0.12 Hz ( $7.2 \text{ min}^{-1}$ ).

#### 2.6. MUSCULOS PAPILARES DE COBAYO

En otro grupo de experimentos hemos estudiado los efectos de la somatostatina sobre las propiedades electrofisiológicas del músculo papilar de cobayo. Para ello, después de la muerte del animal se extraía el corazón y se colocaba en una placa de Petri que contenía solución de Tyrode oxigenada y caliente. Dentro de la placa se realizaba la disección de los músculos papilares ventriculares, obteniéndose dos o tres de ellos de cada corazón. Los procesos ulteriores de montaje, mantenimiento y estimulación de los músculos papilares, así como las técnicas de registro y diseños experimentales eran idénticos a los descritos previamente para las aurículas de cobayo (apartados 2.1 y 2.2).

En los músculos papilares hemos determinado los siguientes parámetros: potencial de reposo (mV), amplitud del potencial de acción (mV), velocidad máxima de despolarización durante la fase 0 (V máx, V/s) y duración del potencial de acción (ms) medida al 50% ( $DPA_{50}$ ) y al 90% ( $DPA_{90}$ ) de repolarización.

Mediante técnicas similares a las descritas en los apartados 2.3 y 2.4 se han determinado también el periodo refractario efectivo y el tiempo de recuperación de las fibras ventriculares.

### 3. ESTUDIOS DE FLUJOS DE $^{45}\text{Ca}$

#### 3.1. CAPTACION DE $^{45}\text{Ca}$

##### 3.1.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para determinar la captación de  $^{45}\text{Ca}$  ("  $^{45}\text{Ca}$  uptake") en aurículas aisladas de cobayo hemos utilizado aurículas izquierdas hemiseccionadas. La mitad de la aurícula se utilizaba como control y la otra mitad como experimental. Las técnicas para el montaje, mantenimiento y estimulación de las preparaciones fueron idénticas a las descritas en el apartado 1.1. Las aurículas izquierdas se dividían en dos partes iguales antes de su montaje en los electrodos; la mitad control y la mitad experimental se situaban en copas de Allhin diferentes.

Las hemiaurículas izquierdas, incubadas en solución de Tyrode que contenía 1.8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , se estimulaban eléctricamente a una frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) durante un periodo de 30 minutos para lograr su estabilización. Transcurrido este periodo se comenzaba la realización del experimento añadiendo a la hemiaurícula experimental la concentración deseada

de somatostatina, o bien modificando las condiciones de estimulación o la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular.

Hemos efectuado diversos tipos de diseños experimentales de captación de  $^{45}\text{Ca}$ . Nuestros experimentos pueden ser divididos en los cuatro grupos siguientes (tabla 8).

#### 3.1.1.1. Grupo 1: Experimentos en condiciones basales

Transcurridos los 30 minutos de estabilización, con Tyrode-1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y frecuencia de estímulo de  $60 \text{ min}^{-1}$  (1 Hz), se añadía a la preparación experimental la concentración deseada de somatostatina ( $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  M) y se dejaban transcurrir otros 10 minutos. Al cabo de este tiempo se adicionaba, a ambas preparaciones, la cantidad adecuada de una solución de  $^{45}\text{CaCl}_2$  para obtener en el baño una actividad específica de 37 kBq/ml ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ). Las preparaciones se dejaban expuestas al  $^{45}\text{Ca}$  un tiempo de 2, 5 o bien 10 minutos. De este modo toda diferencia observada en la captación de  $^{45}\text{Ca}$  por las hemiaurículas control y experimental sólo puede ser explicada por la adición de somatostatina, único factor que diferencia las dos hemiaurículas.

TABLA 8.- RESUMEN DE LOS CUATRO TIPOS DE DISEÑOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LA CAPTACION DE  $^{45}\text{Ca}$ .

Grupo	Fase	Tiempo (min)	Frecuencia (min <sup>-1</sup> )	$[\text{Ca}^{2+}]_o$ (mM)	Añadir C	Añadir E	
1	1	30	60	1.8	-	-	
	2	10	60	1.8	-	SS	
	3	2					
		5	60	1.8	$^{45}\text{Ca}$	$^{45}\text{Ca}$	
		10					
2	1	30	60	1.8	-	-	
	2	15	FD	1.8	-	-	
	3	10	FD	1.8	-	SS	
	4	5	FD	1.8	$^{45}\text{Ca}$	$^{45}\text{Ca}$	
3	1	30	60	1.8	-	-	
	2	15	60	CD	-	-	
	3	10	60	CD	-	SS	
	4	5	60	CD	$^{45}\text{Ca}$	$^{45}\text{Ca}$	
4	1	30	60	1.8	-	-	
	2	10	60	CD	-	-	
	3	5	FD	CD	-	-	
	4	10	FD	CD	-	SS	
	5	5	FD	CD	$^{45}\text{Ca}$	$^{45}\text{Ca}$	

C: hemiaurícula control; E: hemiaurícula experimental;  
 FD: frecuencia de estímulo deseada; CD:  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  deseada;  
 SS: somatostatina.

3.1.1.2. Grupo 2: Experimentos con frecuencia variable

En estos experimentos, tras el periodo de estabilización, se modificaba la frecuencia basal de  $60 \text{ min}^{-1}$  a la frecuencia deseada ( $15$  o bien  $180 \text{ min}^{-1}$ ), y se dejaban estabilizar nuevamente las preparaciones durante 15 minutos más. A continuación, y sin modificar esta nueva frecuencia de estímulo, se exponía la hemiaurícula experimental a la concentración de somatostatina deseada ( $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  M) durante otros 10 minutos. Al cabo de este tiempo se adicionaba a ambas preparaciones el  $^{45}\text{Ca}$  en cantidad adecuada para proporcionar una actividad específica de  $37 \text{ kBq/ml}$  ( $1 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ ).

3.1.1.3. Grupo 3: Experimentos con concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  variable

De manera similar a los experimentos del grupo anterior, tras el periodo de estabilización en condiciones basales, la solución de Tyrode- $1.8 \text{ mM Ca}^{2+}$  era sustituida por otra cuya concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  había sido modificada ( $0.45$  o bien  $5.4 \text{ mM}$ ). En estas condiciones se mantenían las preparaciones durante un periodo de tiempo de 15 minutos. El resto del diseño experimental era idéntico a lo ya mencionado en el grupo anterior.

3.1.1.4. Grupo 4: Experimentos con frecuencia y concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup> variables

En este último grupo de experimentos, tras los 30 minutos de estabilización en condiciones basales, se modificaba la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular, dejando transcurrir un nuevo periodo de 10 minutos. Posteriormente se alteraba la frecuencia de estimulación permitiendo otros 5 minutos de estabilización. El procedimiento seguido durante los 15 minutos restantes del experimento era igual a lo ya mencionado en los dos grupos anteriores.

3.1.2. PREPARACION DE LAS HEMIAURICULAS PARA EL CONTAJE RADIATIVO

Al final de cada experimento las preparaciones se desmontaban y se introducían tres veces en un recipiente que contenía 500 ml de Tyrode-0 Ca<sup>2+</sup> durante 2 segundos cada vez, con el fin de eliminar la radiactividad adherida superficialmente. Seguidamente se colocaban en un papel de filtro, donde eran cuidadosamente disecadas separándose hilos y tejido fibroso. Las hemiaurículas así preparadas se colocaban entre dos láminas de papel de filtro seco y se sometían a una presión constante de 300 granos durante 1.5 minutos. A continuación se introducían en

viales de borosilicato de sodio para contaje radiactivo y se determinaban sus pesos, por diferencia, en una balanza METTLER modelo H64. El resultado así obtenido se denomina peso húmedo ("wet weight") (MEINERTZ y cols., 1973a, 1973b).

A continuación se añadían a los viales de contaje 500  $\mu$ l de solueno-350, dejándolos en estufa a 50° C durante un periodo de 12 horas. Los viales se cerraban herméticamente para evitar la formación de color. Tras la completa digestión de las preparaciones se decoloraban éstas añadiendo a cada vial 200  $\mu$ l de isopropanol y 200  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes, manteniéndolos a temperatura ambiente durante 20 minutos para posteriormente incubarlos en estufa a 50° C durante 45 minutos.

Para neutralizar la basicidad de la solución obtenida, debida fundamentalmente al solubilizador, se añadían 10  $\mu$ l de ácido acético glacial. Finalmente, se adicionaban 10 ml de la mezcla centelleadora y se agitaba, quedando ya las preparaciones dispuestas para el contaje radiactivo.

Por otro lado, al final de cada experimento se tomaban también una o varias muestras de 100  $\mu$ l de la solución de Tyrode que bañaba las preparaciones, tanto controles como experimentales, con el fin de poder comparar la radiactividad hallada en el tejido con la existente en el líquido nutricio. A estas muestras se

añadían 500  $\mu$ l de agua destilada y 10 ml de líquido de centelleo.

### 3.1.3. LIQUIDO DE CENTELLEO

El líquido de centelleo utilizado para el contaje de las muestras radiactivas estaba compuesto por tolueno como disolvente, 2,5-difeniloxazol (PPO) como centelleador, e iso-octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Tritón X-100) como agente surfactante. En su preparación mezclábamos tolueno con Tritón X-100 en proporción 2:1 (volumen/volumen) y añadíamos 4 gramos de PPO por cada litro de mezcla. El líquido de centelleo se conservaba hasta el momento de su utilización en un barril de acero inoxidable, protegido de la luz y en lugar fresco.

### 3.1.4. TECNICA DE MEDIDA DE LA RADIATIVIDAD

Los viales utilizados para el contaje de la radiactividad contenida en las preparaciones eran de borosilicato de sodio, de escaso contenido en potasio y, en consecuencia, de bajo fondo radiactivo, con una capacidad de 20 ml. En todas las determinaciones se utilizaba un vial que no contenía radiactividad (vial fondo). El contaje se realizaba en un contador de centelleo

líquido INTERTECHNIQUE modelo SL-3000, de modo automático y con un tiempo de contaje de 20 minutos. La radiactividad determinada en el vial fondo era restada de todos y cada uno de los viales de los experimentos de modo automático.

### 3.1.5. CORRECCION DE LA EXTINCION Y CALCULO DE LA EFICACIA DE CONTAJE

Los datos obtenidos en el contador nos proporcionaban la radiactividad de cada vial medida en cuentas por minuto (cpm). Este valor no corresponde exactamente con el número de desintegraciones por minuto (dpm) que experimenta la muestra radiactiva medida, debido a que toda muestra presenta una cierta extinción ("quenching") que hace que las partículas beta emitidas por el  $^{45}\text{Ca}$  cedan parte de su energía al extintor y que el espectro de esta radiación se desplace hacia energías más bajas. En estas condiciones el rendimiento o eficacia de contaje, es decir, la relación cpm/dpm, se encuentra disminuida.

Para corregir la extinción hemos utilizado el método de calibración por el patrón interno. Este método consiste en añadir a cada vial ya medido una actividad conocida de  $^{45}\text{Ca}$  (patrón interno). Dado que nuestros valores experimentales han oscilado entre 4000

y 25000 cpm, optamos por utilizar un patrón interno de una actividad de aproximadamente 8000 dpm.

El día de la corrección de la extinción (1 septiembre 1984) disponíamos de una solución de  $^{45}\text{CaCl}_2$  cuya actividad específica conocida era exactamente 14.49 kBq/ml (0.39  $\mu\text{Ci/ml}$ ), de la que se tomaron muestras de 10  $\mu\text{l}$  que se añadieron a todos y cada uno de los viales cuya eficacia se deseaba calcular. Estos 10  $\mu\text{l}$  contenían una actividad de 14.49 (kBq/ml) x 10 ( $\mu\text{l}$ ) = 0.1449 kBq = 144.9 desintegraciones/segundo = 8694 dpm.

Si llamamos C a la actividad del patrón interno en dpm, P a las cpm del problema (vial cuyas dpm hay que medir), y S a las cpm obtenidas al contar la radiactividad del problema junto con el patrón interno añadido; entonces es evidente que S - P serían las cpm del patrón interno para un grado dado de extinción. La eficacia de contaje sería:

$$E = \frac{S - P}{C}$$

Y la actividad (dpm) del problema sería:

$$A = \frac{P}{E}$$

Debido al gran número de datos manejados en el cálculo de la eficacia de contaje y de la actividad

(dpm) de cada muestra, hemos utilizado el siguiente programa, adaptable a cualquier microordenador o calculadora programable:

```
10 REM *PROGRAMA PARA CORRECCION DE LA EXTINCION*
20 INPUT "ACTIVIDAD PATRON"; C
30 INPUT "CPM PROBLEMA"; P
40 INPUT "CPM SUMA"; S
50 E = (S - P)/C
60 A = P/E
70 PRINT "EFICACIA= "; E
80 PRINT "ACTIVIDAD PROBLEMA= "; RND(A,-2); "DPM"
90 GOTO 30
100 END
```

### 3.1.6. CALCULO DE LA CAPTACION DE <sup>45</sup>Ca

La captación aparente de calcio se define como la cantidad de calcio tomada por el tejido basada en la comparación de la radiactividad hallada en el tejido y la radiactividad presente en el líquido nutricio (GROSSMAN y FURCHGOTT, 1964a), y se expresa en mmol Ca/kg peso húmedo.

Para calcular este parámetro hemos utilizado la siguiente fórmula, similar a la empleada por GROSSMAN y FURCHGOTT (1964a, 1964b, 1964c), GODFRAIND (1976),

GODFRAIND y DIEU (1981) y GODFRAIND y MILLER (1983):

$$\text{Captación (mmol Ca/kg)} = \frac{A \text{ (dpm)} \times Mm \text{ (mmol Ca/l)}}{P \text{ (kg)} \times AEm \text{ (dpm/l)}}$$

Donde:

A = actividad de la aurícula en dpm.

Mm = mmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  por litro del medio de incubación.

P = peso de la aurícula en kg.

AEm = actividad específica del medio en dpm/litro.

### 3.2. SALIDA DE $^{45}\text{Ca}$

#### 3.2.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para determinar el flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  (" $^{45}\text{Ca}$  efflux") hemos utilizado aurículas derechas que latían espontáneamente y aurículas izquierdas no estimuladas eléctricamente. No se utilizaron en estos experimentos aurículas hemiseccionadas.

Las aurículas se montaban utilizando las mismas técnicas descritas en el apartado 1.1. No utilizamos, sin embargo, estimulación eléctrica ni copas de Allhin,

ya que los experimentos de flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  requieren la utilización de un gran número de tubos de ensayo donde se van introduciendo sucesivamente las preparaciones. Para el mantenimiento de todos estos tubos a una temperatura constante se utilizó un baño de órganos marca HERON. La oxigenación con carbógeno se conseguía mediante pipetas Pasteur acodadas que se introducían en los citados tubos.

Para la realización de nuestro diseño experimental las preparaciones se introducían inicialmente en tubos de ensayo que contenían 5 ml de solución de Tyrode oxigenada y caliente ( $34^{\circ}\text{C}$ ). Transcurridos 30 minutos de estabilización, las aurículas se llevaban a un segundo tubo que contenía 5 ml de la misma solución de Tyrode marcada con  $^{45}\text{Ca}$  (actividad específica de 74 kBq/ml, 2  $\mu\text{Ci/ml}$ ). En esta solución radiactiva permanecían las preparaciones durante dos horas, tiempo considerado suficiente para que el calcio radiactivo se distribuya homogéneamente en los líquidos extra e intracelulares (BARRIGON y cols., 1982).

Finalizado este periodo de captación, las aurículas se introducían en un tercer tubo que contenía 5 ml de solución de Tyrode y en él se agitaban suavemente durante 5 segundos, con la finalidad de eliminar la radiactividad adherida superficialmente a la preparación y a los elementos del montaje (hilos, electrodos). Inmediatamente después se comenzaba el periodo de lavado que consistía en introducir sucesivamente las preparaciones

en tubos de ensayo de 2 ml de capacidad que contenían solución de Tyrode no radiactiva (concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , 1.8 mM). El tiempo de permanencia de las preparaciones en cada tubo era rigurosamente controlado, siendo de 2 minutos para el primer tubo, de 3 minutos para el segundo y de 5 minutos para los restantes diez tubos. La duración de cada periodo de lavado era, por tanto, de 60 minutos. De este modo, los tubos de ensayo contenían sucesivamente la radiactividad perdida por las preparaciones a los 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos del lavado. A los tubos correspondientes a los minutos 20, 25 y 30 se les añadía previamente  $10^{-6}$  M o  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina.

### 3.2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CONTAJE RADIOACTIVO

Al final de cada experimento las aurículas se desmontaban y, sin realizar ningún lavado de las mismas, se colocaban en un papel de filtro donde eran cuidadosamente disecadas. El tratamiento posterior de las aurículas para el contaje radiactivo era idéntico al descrito previamente en el apartado 3.1.2.

Asimismo, al final de cada experimento se tomaba una muestra de 500  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tubos de 2 ml. Estas muestras se introducían en viales de borosilicato a los que se añadían 10 ml del líquido

de centelleo cuya composición se describe en el apartado 3.1.3.

Los métodos para la determinación de la radiactividad tanto de las aurículas como de las muestras de líquido nutritivo, así como para la corrección de la extinción y cálculo de la eficacia de contaje eran los mismos que se han descrito en los apartados 3.1.4 y 3.1.5.

3.2.3. CALCULO DEL PORCENTAJE DE <sup>45</sup>Ca RESTANTE EN LA AURICULA

Los datos proporcionados por el contador en los experimentos de flujo de salida de <sup>45</sup>Ca corresponden a la radiactividad existente en la aurícula al final del periodo de lavado, y en cada muestra de 500 µl de los tubos de 2 ml. Con estos datos es posible calcular la radiactividad inicial existente en la aurícula al comienzo del lavado y la radiactividad que permanece en ella en cada uno de los tiempos en que se ha fraccionado el periodo de lavado de 60 minutos.

Una vez corregida la extinción, se multiplicaba por cuatro el número de dpm obtenido en cada muestra del lavado para calcular la radiactividad existente en los 2 ml del tubo, esto es, la radiactividad perdida por la preparación en el periodo de tiempo a que corresponde

el tubo considerado. Las cifras así obtenidas eran sumadas por orden, obteniéndose así los valores en dpm de la radiactividad perdida por la aurícula desde el tiempo inicial hasta el minuto 60. A la radiactividad perdida en los 60 minutos se añadía la radiactividad contada en la aurícula; el resultado obtenido representaba la radiactividad total inicial existente en la preparación y se consideraba como 100%.

Si llamamos T a la radiactividad total inicial de la aurícula (dpm) y P a la radiactividad en dpm que la preparación ha perdido desde el comienzo del lavado hasta un tiempo t cualquiera, el cálculo del porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula en ese tiempo t se realizaba fácilmente mediante la expresión:

$$^{45}\text{Ca restante} = \frac{T - P}{T} \times 100$$

La representación gráfica del porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula (escala logarítmica) frente al tiempo (escala lineal) daba lugar a las curvas de flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$ .

La realización de todos los cálculos necesarios para la representación de las curvas de flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  se llevaba a cabo automáticamente mediante la utilización de los siguientes programas:

-135-

Programa 1:

```
10 REM *SUMAS PARCIALES DE RADIATIVIDAD PERDIDA*
20 D = 0
30 INPUT "X= ";X
40 IF X = 0 THEN 70
50 Y = 4*X
60 PRINT "Y= ";Y
70 D = D + Y
80 PRINT "D= ";D
90 GOTO 30
100 INPUT "AURICULA= ";A
110 T = D + A
120 PRINT "TOTAL= ";T
130 END
```

Programa 2:

```
10 REM *CALCULO DEL CA RESTANTE*
20 INPUT "TOTAL= ";T
30 INPUT "DATO= ";D
40 PRINT "CA RESTANTE "; RND((T-D)*100/T,-3)
50 GOTO 30
60 END
```

3.2.4. CALCULO DEL COEFICIENTE DE VELOCIDAD DE SALIDA  
DE  $^{45}\text{Ca}$  ( $k_{\text{cm}}$ )

Para calcular el coeficiente de velocidad de salida de  $^{45}\text{Ca}$  ("rate coefficient for  $^{45}\text{Ca}$  efflux",  $k_{\text{cm}}$ ) hemos utilizado el método descrito por HOLLAND y cols. (1978).

En primer lugar se calculaba la pendiente para cada intervalo de tiempo representado en la curva de salida. La pendiente se calculaba como el cambio, durante el intervalo considerado, en el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula, dividido por la duración en minutos de ese intervalo. Posteriormente calculábamos, por interpolación lineal, el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en el punto medio de cada intervalo. La pendiente (%/min) dividida por el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante (%) en el punto medio de cada intervalo constituye una estimación del coeficiente de velocidad de salida para ese tiempo (expresado en  $\text{min}^{-1}$ ).

Llamando  $r_1$  y  $r_2$  a los porcentajes de  $^{45}\text{Ca}$  restantes en la aurícula en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ , respectivamente, la pendiente (h) se calcula como:

$$h = \frac{r_1 - r_2}{t_2 - t_1}$$

El coeficiente de velocidad ( $k_{\text{cm}}$ ) para el

intervalo  $t = t_2 - t_1$  es

$$k_{cm} = \frac{h}{r}$$

donde  $r$  representa el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula en el punto medio de cada intervalo, obtenido por interpolación lineal.

El coeficiente de velocidad de salida se representaba en escala lineal frente al tiempo. Los valores del  $k_{cm}$  obtenidos durante los 5 primeros minutos no se consideraron debido a que las pérdidas de  $^{45}\text{Ca}$  durante este periodo se deben en una gran cantidad a salida de  $^{45}\text{Ca}$  de la superficie del tejido.

También hemos representado el coeficiente de velocidad de salida en función del  $^{45}\text{Ca}$  restante en las aurículas con objeto de estudiar si existe o no una relación lineal entre estas dos variables en nuestros modelos experimentales.

#### 4. FARMACOS Y PRODUCTOS

##### QUIMICOS UTILIZADOS

##### 4.1. LIQUIDOS NUTRICIOS

En la preparación de la solución de Tyrode utilizada como líquido nutricio en todos nuestros experimentos hemos utilizado las siguientes sustancias químicas (MERK): cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio hexahidratado, fosfato monosódico monohidratado, bicarbonato de sodio y glucosa.

##### 4.2. FARMACOS UTILIZADOS

En todos nuestros experimentos hemos utilizado somatostatina cíclica (STILAMIN<sup>R</sup>, Serono), tetradecapéptido de síntesis idéntico a la hormona homónima natural. Comercialmente el tetradecapéptido se presenta como un polvo blanco amorfo, que contiene un 3-15% (peso/peso) de agua. Cada ampolla contiene 250 µg de somatostatina ( $1.52 \times 10^{-7}$  moles) y 20 mg de manitol ( $1.10 \times 10^{-4}$  moles) como

excipiente. El contenido de las ampollas era disuelto en agua desionizada y bidestilada hasta obtener la concentración deseada necesaria para la realización de los experimentos.

En algunos experimentos hemos utilizado también otros compuestos como clorhidrato de isoproterenol (Sigma), cafeína (Sigma) y manitol (Merk).

Las soluciones de isoproterenol eran preparadas el mismo día de la realización del experimento; a estas soluciones añadíamos ácido ascórbico ( $10^{-4}$  M), se mantenían en hielo y se protegían de la luz para evitar la degradación del fármaco.

#### 4.3. PRODUCTOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACION DE LOS FLUJOS DE $^{45}\text{Ca}$

##### 4.3.1. PRODUCTOS RADIATIVOS

Hemos utilizado  $^{45}\text{Ca}$  en forma de solución acuosa de cloruro cálcico (Amersham Int.). Nuestra solución contenía el día de su adquisición una actividad total de 37 MBq (1 mCi) en un volumen de 0.5 ml. La actividad específica era, por tanto, de 74 MBq/ml (2 mCi/ml).

4.3.2. PRODUCTOS NECESARIOS PARA LA PREPARACION DEL LIQUIDO DE CENTELLEO

En la preparación del líquido de centelleo hemos utilizado los siguientes productos: Tolueno (Scharlau), iso-octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Tritón X-100, BDH Chemicals) y 2,5-difeniloxazol (PPO, Amersham/Searle).

4.3.3. PRODUCTOS NECESARIOS PARA LA PREPARACION DE LAS MUESTRAS RADIATIVAS

En el tratamiento y preparación de nuestras muestras para el conteo de su radiactividad hemos utilizado los siguientes productos: Solueno-350 (Packard), peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes (Merk), isopropanol (2-propanol, Merk) y ácido acético glacial (May & Barter).

## 5. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

### 5.1. DESCRIPCION DE LOS DATOS

Para comparar los resultados obtenidos en los distintos experimentos, los valores obtenidos antes de la adición de somatostatina u otro compuesto activo fueron utilizados como control y se consideraron como 100%. Las modificaciones de los distintos parámetros obtenidas con somatostatina o con otros compuestos (isoproterenol,  $\text{CaCl}_2$ ) se expresaron como porcentaje con respecto al valor control.

En los experimentos realizados con aurículas hemiseccionadas, una de las dos mitades se utilizaba como control, mientras que la otra era sometida a la acción de la somatostatina; para fines de comparación, los valores obtenidos con las hemiaurículas experimentales se expresaban como porcentajes con respecto a los obtenidos en las hemiaurículas controles.

En cada serie homogénea de experimentos se calculaba la media, la desviación estándar y el error estándar de la media según las siguientes fórmulas (SPIEGEL, 1961; DOMENECH, 1981a, 1982):

Media: 
$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Desviación estándar: 
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Error estándar de la media: 
$$E.S.M. = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$x_i$  = valor obtenido en el experimento  $i$ .

$n$  = número de experimentos.

Las cifras que aparecen en las distintas tablas y representaciones gráficas de esta Tesis se refieren a la media y al error estándar de la media ( $\bar{x} \pm E.S.M.$ ) para un determinado número de experimentos ( $n$ ).

## 5.2. COMPARACION DE MEDIAS

Para la comparación de los valores obtenidos en situación control con los obtenidos tras un procedimiento experimental se utilizó la prueba de comparación de medias en grupos con datos apareados mediante la  $t$  de Student calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$t = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}}$$
$$v = n - 1$$

Donde  $d$  representa la variable diferencia entre los valores control y experimental, siendo  $\bar{d}$  su media y  $s_d$  su desviación estándar;  $v$  representa el número de grados de libertad de esta  $t$ .

La aplicación correcta de esta prueba exige que la distribución  $d$  de las diferencias debe seguir una ley normal en la población origen. Cuando esta condición no se cumplía, lo cual se verificaba aplicando la prueba de Kolmogorov, las medias se comparaban mediante la prueba T de Wilcoxon (DOMENECH, 1982).

Para la comparación de las medias observadas en muestras con datos independientes se utilizó la prueba de la  $t$  de Student según la fórmula siguiente:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$
$$s = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Donde:

$\bar{x}_1$  = media de la primera muestra.

$\bar{x}_2$  = media de la segunda muestra.

$s_1$  = desviación estándar de la primera muestra.

$s_2$  = desviación estándar de la segunda muestra.

$n_1$  = número de datos de la primera muestra.

$n_2$  = número de datos de la segunda muestra.

$s$  = estimador de la desviación estándar poblacional.

$v$  = número de grados de libertad.

La aplicación correcta de esta prueba exige que ambas muestras procedan de poblaciones normales y de igual varianza. Por ello previamente se realizaba la prueba de comparación de dos varianzas observadas en grupos con datos independientes mediante la F de Snedecor:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

$$v_1 = n_1 - 1$$

$$v_2 = n_2 - 1$$

Donde  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $n_1$  y  $n_2$  representan los valores antes mencionados, y  $v_1$  y  $v_2$  son los grados de libertad de esta F.

Cuando las condiciones de aplicación de la prueba de comparación de medias en grupos con datos

independientes no se cumplían se aplicó la prueba U de Mann-Whitney (DOMENECH, 1982).

### 5.3. ANALISIS DE LA VARIANZA

En aquellas ocasiones en que el diseño experimental exigía la comparación de varias medias entre sí se utilizó el análisis de la varianza.

En los casos en que se trataba de comparar varias medias obtenidas en grupos con datos independientes se aplicó el análisis de la varianza con un factor de variación, seguido de comparaciones individuales entre las medias correspondientes a los diferentes niveles del factor mediante los métodos de Tukey y de Scheffé (DOMENECH, 1982).

Cuando era necesaria la comparación de varias medias observadas en grupos con datos apareados se utilizó el análisis de la varianza para planes factoriales de dos factores sin repetición. Nuevamente las comparaciones individuales entre las medias se realizaban mediante los métodos de Tukey y de Scheffé (DOMENECH, 1982).

#### 5.4. CORRELACION Y REGRESION

En algunas ocasiones ha sido conveniente estudiar la correlación entre dos variables experimentales (x e y) para determinar si estaban o no relacionadas. Para ello se calculaba la recta de regresión entre las dos variables por el método de mínimos cuadrados mediante la siguiente ecuación (DOMENECH, 1982):

$$y = \bar{y} + b_{y,x}(x - \bar{x})$$

$$b_{y,x} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Donde:

$\bar{y}$  = media de y.

$\bar{x}$  = media de x.

n = número de datos.

$b_{y,x}$  = pendiente de la recta de regresión o coeficiente de regresión de y sobre x.

Posteriormente se estudiaba la dependencia o independencia de las variables mediante el coeficiente de correlación  $r_{xy}$  entre x e y, de la siguiente forma:

$$r_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

$$v = n - 2$$

Todos los cálculos necesarios para la realización de estas pruebas estadísticas se realizaron automáticamente mediante una calculadora programable CASIO FX-702P.

La significación estadística se estudió utilizando tablas adecuadas (DIEM y LENTNER, 1975; DOMENECH, 1981b), y se consideraron significativas aquellas diferencias en las que  $P < 0.05$ .



143

### III. RESULTADOS



## 1. ESTUDIOS DE CONTRACCION Y FRECUENCIA

### 1.1. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA EN AURICULAS DERECHAS ESPONTANEAS

Hemos estudiado los efectos de la somatostatina, en un rango de concentraciones comprendido entre  $10^{-9}$  M y  $5 \times 10^{-6}$  M, sobre la amplitud y la frecuencia de las contracciones en aurículas derechas que latían espontáneamente. Los resultados se muestran en la figura 10. Los valores control para ambos parámetros en 14 experimentos han sido de  $497.8 \pm 72.4$  mg de fuerza contráctil y de  $177.1 \pm 8.2$  latidos/min, respectivamente. La somatostatina a concentraciones menores o iguales a  $10^{-8}$  M no modificaba significativamente la frecuencia sinusal; sin embargo, a concentraciones superiores producía una disminución dosis-dependiente y estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) de la frecuencia sinusal. A concentraciones iguales o superiores a  $10^{-8}$  M se observaba también una disminución dosis-dependiente y estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) de la amplitud de las contracciones. A la concentración máxima utilizada ( $5 \times 10^{-6}$  M) la somatostatina producía una disminución de la fuerza contráctil de un  $41.2 \pm 4.6\%$  ( $P < 0.001$ ) con respecto

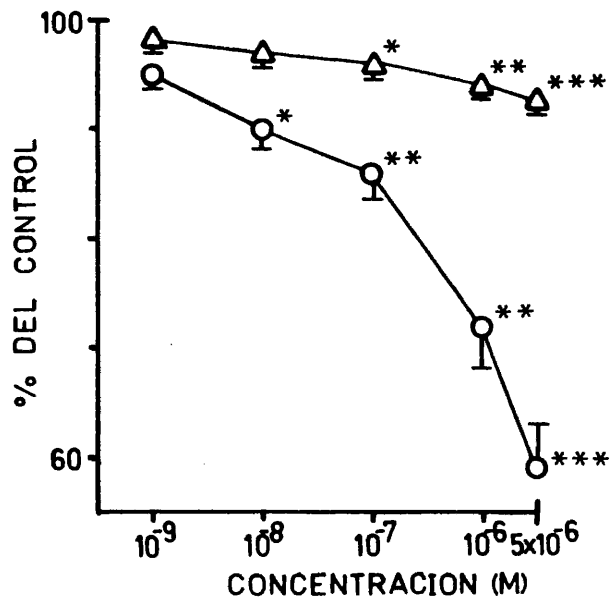


Figura 10.- Efecto de la somatostatina sobre la amplitud de la contracción (○) y frecuencia sinusal (Δ) de aurículas derechas espontáneas. Ordenadas: % de los valores controles. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media ± E.S.M. de 14 experimentos.

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

a los valores control, mientras que el descenso de la frecuencia cardíaca era sólo de un  $7.5 \pm 1.0\%$  ( $P < 0.001$ ).

Los efectos de la somatostatina aparecían al cabo de unos pocos segundos de su administración y su efecto máximo se alcanzaba generalmente a los 5-10 minutos de su adición al baño. Por otra parte, los citados efectos eran rápidamente revertidos mediante el lavado de las preparaciones con solución de Tyrode. También era posible revertir el efecto de la somatostatina elevando la concentración de calcio del baño hasta 3.6 mM o bien mediante la adición al mismo de  $10^{-6}$  M de isoproterenol; en estos dos últimos casos la amplitud de las contracciones se elevaba rápidamente, por encima incluso de los valores control (figura 11).

#### 1.2. EFECTOS COMPARATIVOS DE LA SOMATOSTATINA MAS MANITOL CON MANITOL SOLO

Dado que la preparación de somatostatina utilizada en nuestros experimentos contenía manitol como excipiente, realizamos una serie de experimentos encaminados a poner de manifiesto si este excipiente poseía alguna actividad farmacológica en las aurículas de cobayo o si, por el contrario, se trataba de un compuesto farmacológicamente inactivo.

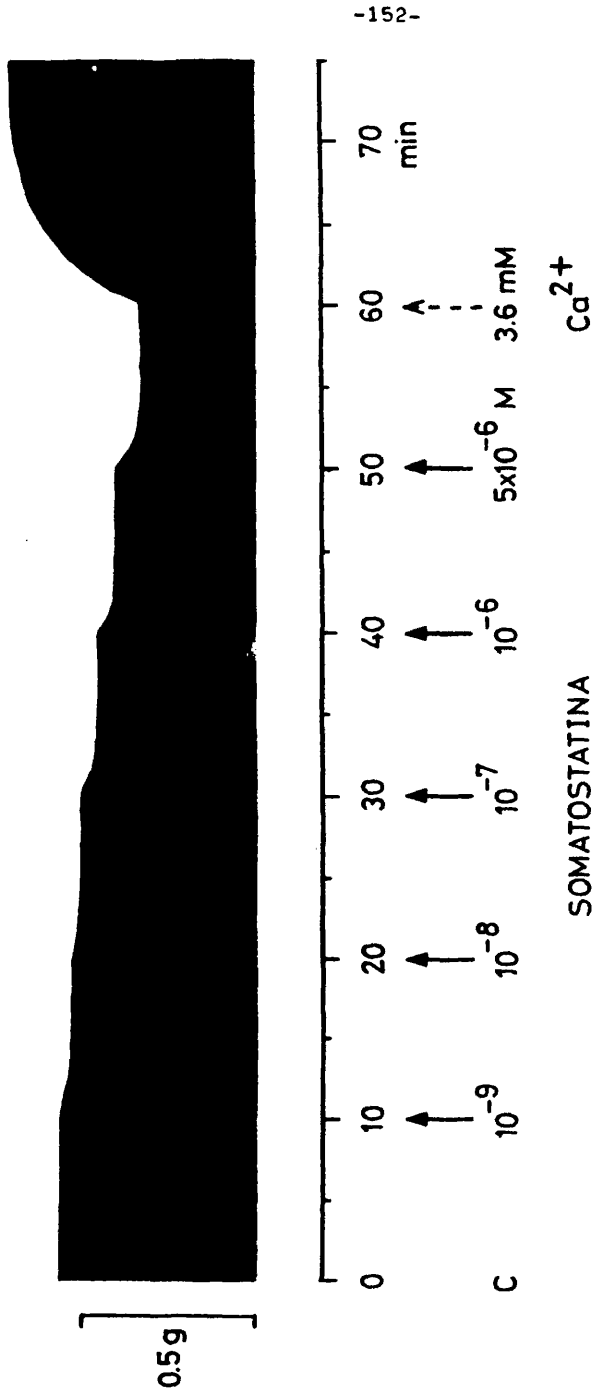


Figura 11.- Registro gráfico del efecto inotrópico negativo de la somatostatina en aurículas derechas espontáneas. Ordenadas: fuerza contráctil (g). Abscisas: tiempo (min). La concentración de somatostatina se incrementó de modo acumulativo cada 10 min (flechas continuas). Al llegar al efecto máximo se añadió cloruro de calcio (3.6 mM, flecha discontinua). C: control previo a la adición de somatostatina.

Las ampollas utilizadas en nuestros experimentos contenían una proporción aproximada de 20 mg de manitol por cada 250  $\mu\text{g}$  de somatostatina, es decir,  $1.10 \times 10^{-4}$  moles de manitol por cada  $1.53 \times 10^{-7}$  moles de somatostatina. Según esto, a cada mol de somatostatina acompañan 719 moles de manitol como excipiente.

Tras equilibración un grupo de aurículas derechas eran expuestas a concentraciones progresivamente crecientes de manitol, desde  $719 \times 10^{-9}$  M hasta  $3595 \times 10^{-6}$  M. A continuación, y tras el lavado de las preparaciones, éstas eran incubadas con concentraciones de somatostatina ( $10^{-9}$  M a  $5 \times 10^{-6}$  M) que contenían concentraciones de excipiente idénticas a las utilizadas en la primera parte del experimento. Los resultados obtenidos en 6 aurículas derechas en las que se determinó la frecuencia sinusal y la amplitud de las contracciones se muestran en la tabla 9. Puede observarse que el manitol per se no era capaz de modificar significativamente ni la frecuencia sinusal ni la amplitud de las contracciones, mientras que la somatostatina acompañada de cantidades idénticas de manitol producía, en las mismas preparaciones, sus típicos efectos cronotrópico e inotrópico negativos. Es decir, los efectos descritos anteriormente para la somatostatina son atribuibles solamente al polipéptido y no a su excipiente.

TABLA 9.- EFECTOS COMPARATIVOS DE LA SOMATOSTATINA (SS) MAS MANITOL (Man) CON MANITOL SOLO EN AURICULAS DERECHAS (media  $\pm$  E.S.M.; n = 6)

Concentración (M) SS / Man	Contracción AD (%)		Frecuencia AD (%)	
	SS + Man	Man	SS + Man	Man
10 <sup>-9</sup> / 719x10 <sup>-9</sup>	96.0 $\pm$ 1.7	96.0 $\pm$ 1.8	98.3 $\pm$ 1.4	98.5 $\pm$ 1.3
10 <sup>-8</sup> / 719x10 <sup>-8</sup>	92.1 $\pm$ 2.2*	100.1 $\pm$ 2.5	97.3 $\pm$ 2.4	97.3 $\pm$ 4.1
10 <sup>-7</sup> / 719x10 <sup>-7</sup>	84.8 $\pm$ 3.2*	101.7 $\pm$ 2.2	96.2 $\pm$ 2.5	98.8 $\pm$ 1.6
10 <sup>-6</sup> / 719x10 <sup>-6</sup>	70.2 $\pm$ 4.4**	104.0 $\pm$ 1.9	93.5 $\pm$ 2.2*	98.8 $\pm$ 1.8
5x10 <sup>-6</sup> / 3595x10 <sup>-6</sup>	61.5 $\pm$ 5.7***	105.8 $\pm$ 2.7	92.1 $\pm$ 1.7**	98.5 $\pm$ 3.2

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

1.3. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA EN AURICULAS IZQUIERDAS  
CONDUCIDAS ELECTRICAMENTE

También hemos estudiado los efectos inducidos por dosis acumulativas de somatostatina sobre los diferentes parámetros de la contracción isométrica en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente a una frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ). Los valores control (media  $\pm$  E.S.M.) para cada uno de los parámetros de la contracción isométrica de 14 aurículas izquierdas fueron los siguientes: amplitud de la contracción:  $731.3 \pm 10.6$  mg; tiempo hasta el máximo tensional:  $67.1 \pm 2.1$  ms; tiempo total de contracción:  $230.0 \pm 9.7$  ms; y máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil ( $df/dt$  máx):  $15.0 \pm 2.6$  mg/ms.

La somatostatina producía una disminución dosis-dependiente de la fuerza contráctil desarrollada por las aurículas izquierdas. Este descenso de la contractilidad alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) a concentraciones iguales o superiores a  $10^{-8}$  M (figura 12). La disminución de la fuerza contráctil inducida en aurículas izquierdas fue ligeramente superior a la originada en aurículas derechas espontáneas; así, a la concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M, la somatostatina provocaba en aurículas izquierdas una disminución de la contractilidad de un  $45.3 \pm 5.8\%$  con respecto a los valores control

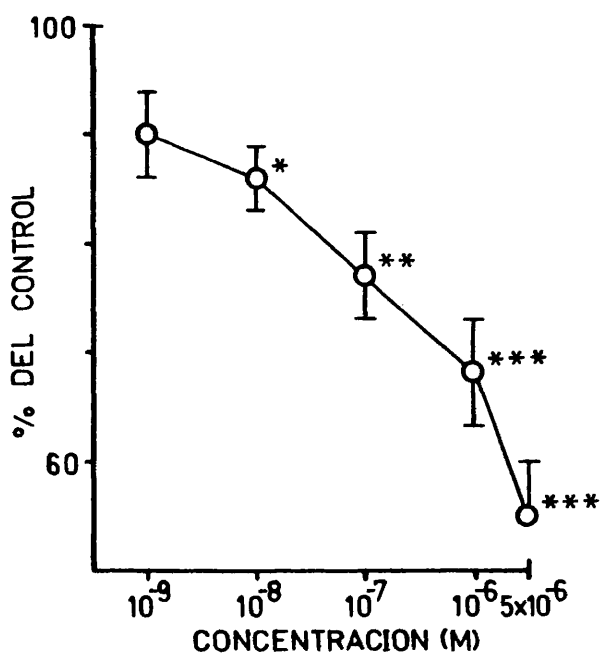


Figura 12.- Efecto de la somatostatina sobre la amplitud de la contracción de aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 14 experimentos.  
\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

( $P < 0.001$ ).

El efecto inotrópico negativo de la somatostatina se acompañaba de una disminución de la máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil ( $df/dt$  máx) que alcanzaba asimismo valores estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) a concentraciones iguales o superiores a  $10^{-9}$  M (figura 13). Sin embargo, no se observaron modificaciones significativas ni en el tiempo hasta el máximo contráctil ni en el tiempo total para la contracción.

Hay que señalar también que, al igual que sucedía en aurículas derechas, el efecto de la somatostatina podía ser rápidamente revertido mediante el lavado de las preparaciones con solución de Tyrode o bien mediante la adición al baño de  $\text{CaCl}_2$  (3.6 mM) o isoproterenol ( $10^{-6}$  M).

#### 1.4. EFECTOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE EL TIEMPO DE RECUPERACION DEL NODO DEL SENO Y LA MAXIMA FRECUENCIA DE ESTIMULACION AURICULAR

En aurículas derechas espontáneas hemos estudiado también los efectos de la somatostatina sobre el tiempo de recuperación del nodo del seno y la máxima frecuencia de estimulación auricular (figura 14). El valor control para el primero de estos parámetros calculado en 8

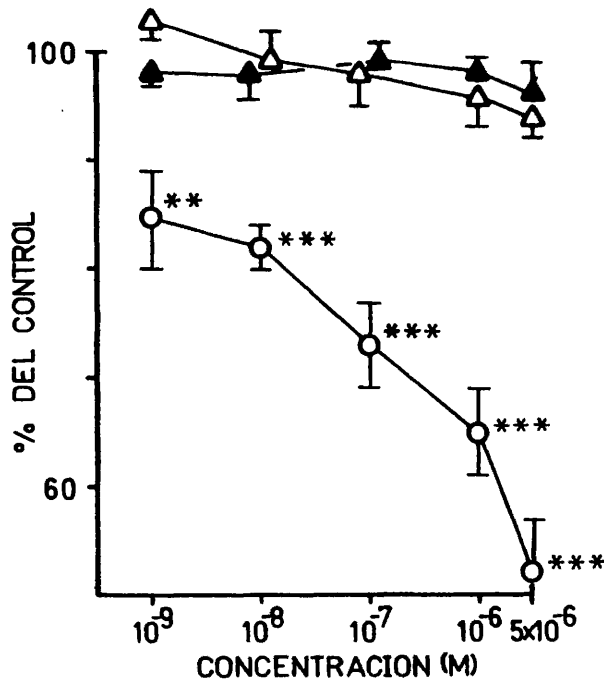


Figura 13.- Efecto de la somatostatina sobre la máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil (O), tiempo hasta el máximo tensional (Δ) y tiempo total de contracción (▲) en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. Ordenadas: % de los valores controles. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 14 experimentos.

\*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

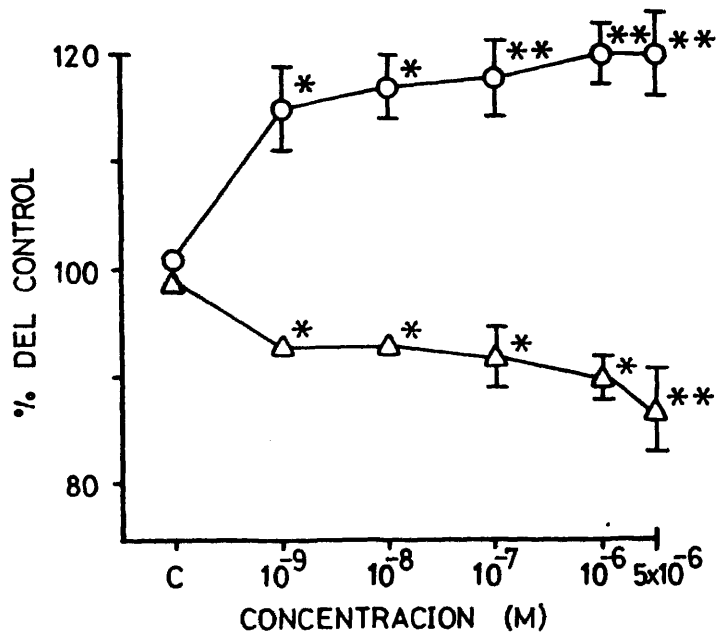


Figura 14.- Efecto de la somatostatina sobre el tiempo de recuperación del nodo del seno (O) y la máxima frecuencia de estimulación auricular (Δ) en aurículas derechas espontáneas. Ordenadas: % de los valores controles. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media ± E.S.M. de 8 experimentos. C: control.

\*P<0.05; \*\*P<0.01.

experimentos era de  $394.1 \pm 17.0$  ms. La somatostatina producía una prolongación del tiempo de recuperación del nodo del seno que alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) a concentraciones iguales o superiores a  $10^{-9}$  M. A la máxima concentración utilizada ( $5 \times 10^{-6}$  M), la somatostatina incrementaba en un  $20.1 \pm 3.9\%$  el tiempo de recuperación del nodo del seno ( $P < 0.01$ ).

En nuestros experimentos la máxima frecuencia de estimulación auricular medida en 8 aurículas derechas previamente a la adición de cualquier dosis de somatostatina era de  $645.3 \pm 23.2$  latidos/min. Como se muestra en la figura 14, la administración de somatostatina a las preparaciones producía una disminución dosis-dependiente de la máxima frecuencia de estimulación auricular. Este efecto resultó ser estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) a concentraciones de  $10^{-9}$  M de somatostatina, y alcanzó su máximo valor ( $13.5 \pm 4.1\%$ ,  $P < 0.01$ ) a concentraciones de  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina.

#### 1.5. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS CURVAS INTERVALO DE REPOSO-AMPLITUD CONTRACTIL

En otro grupo de experimentos las aurículas izquierdas eran estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) hasta que la respuesta contráctil alcanzaba

valores estables. En este momento la estimulación era suprimida durante intervalos de tiempo variables (1-8 s). Tras este intervalo de reposo se procedía a estimular las aurículas nuevamente a la frecuencia basal. La relación que existe entre el intervalo de reposo a que se somete una aurícula y la amplitud de la contracción que se produce al volver a estimularla se representa en la figura 15.

Puede observarse cómo una progresiva prolongación en el intervalo de reposo auricular ocasionaba un incremento progresivo de la amplitud de la respuesta contráctil del primer latido que seguía al periodo de reposo. La amplitud de esta contracción se expresa en la figura 15 como porcentaje de la que existía previamente al intervalo de reposo en situación control, la cual representa el 100%.

Como puede apreciarse la somatostatina producía su efecto inotrópico negativo característico así como un desplazamiento dosis-dependiente hacia abajo de la curva que relaciona el intervalo de reposo con la amplitud contráctil. A todas las concentraciones de somatostatina utilizadas este efecto sólo alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.001$ ) a intervalos de reposo de 1 s (que coinciden precisamente con la frecuencia basal de estimulación). Tras la administración de  $5 \times 10^{-6}$  M, la somatostatina también producía una depresión significativa para intervalos de reposo de 2 ( $P < 0.01$ )

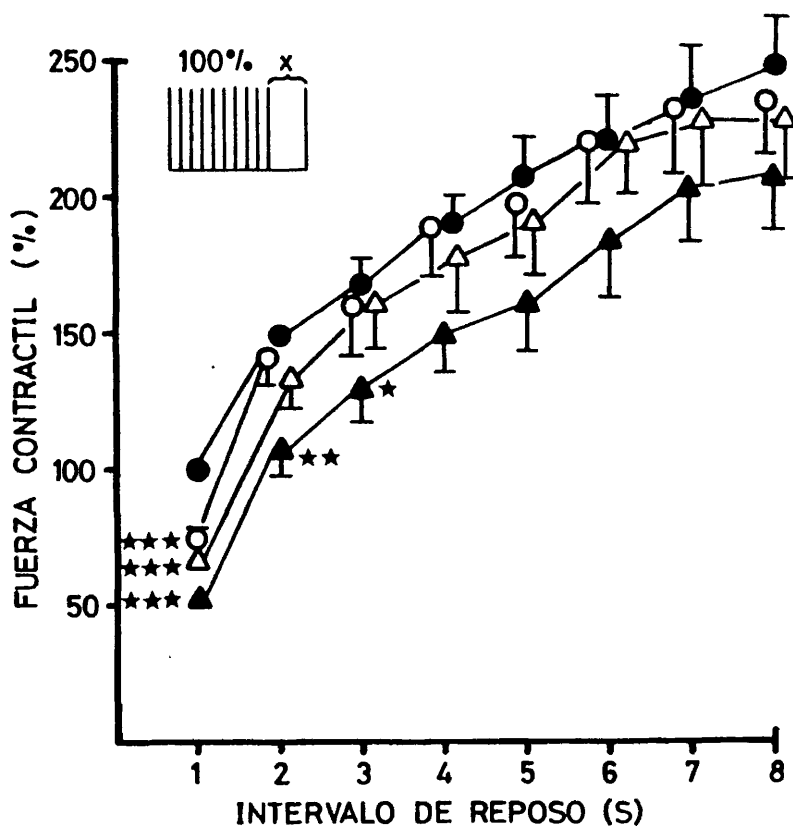


Figura 15.- Relación intervalo de reposo-amplitud de la contracción. La amplitud de la contracción obtenida durante el periodo de estabilización se tomó como 100% como se muestra en el esquema de la parte superior. Ordenadas: fuerza contráctil tras el reposo (% del valor control). Abscisas: intervalo de reposo (s). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 9 experimentos.

- (●) sin somatostatina,
- (○) somatostatina,  $10^{-7}$  M,
- (△) somatostatina,  $10^{-6}$  M,
- (▲) somatostatina,  $5 \times 10^{-6}$  M.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

y de 3 s ( $P < 0.05$ ), pero no a intervalos de tiempo superiores. Dicho con otras palabras, las diferencias encontradas no resultaron ser estadísticamente significativas en los intervalos de reposo mayores (parte derecha de la curva) y sí lo fueron en los intervalos de reposo menores (parte izquierda de la curva), pero sólo para la máxima dosis empleada. El hallazgo de diferencias significativas con todas las dosis en el intervalo de 1 s se explica simplemente por el efecto inotrópico negativo de la somatostatina ya descrito, dado que este intervalo de reposo coincide con el intervalo entre latidos que existe a una frecuencia basal de 1 Hz.

Dado que las curvas intervalo de reposo-amplitud contráctil permiten estudiar la cinética de la movilización del calcio desde sus depósitos intracelulares (BAYER y cols., 1975; BARRIGON y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984), hemos calculado las constantes de tiempo para las curvas obtenidas antes y después de la adición de  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina a las preparaciones. Estas constantes se calculaban hallando en primer lugar la amplitud de dichas curvas en el eje de ordenadas. A la ordenada del primer punto de cada curva (% de fuerza contráctil para 1 s) se le sumaban los 2/3 de la amplitud de la misma. Del valor así calculado se obtenía, por interpolación lineal, su abscisa correspondiente, que se consideraba como constante de tiempo (BAYER y cols.,

1975). Dichas constantes alcanzaban en nuestras preparaciones un valor de 4.53 s en condiciones control y de 4.47 s tras la adición de  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina. Ello sugeriría que la somatostatina no modifica la movilización de calcio desde sus depósitos intracelulares.

#### 1.6. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA POTENCIACION POST-EXTRASISTOLICA

Para estudiar el fenómeno de la potenciación post-extrasistólica en aurículas izquierdas se introducía durante 10 latidos seguidos un extraestímulo  $S_2$  a un intervalo de 40-50 ms del estímulo basal  $S_1$ . Al cabo de este tiempo se suprimía el extraestímulo y las aurículas seguían siendo estimuladas a la frecuencia basal. Esta estimulación pareada producía un incremento de la fuerza contráctil registrada (potenciación post-extrasistólica) que se determinaba en condiciones control y en presencia de diferentes concentraciones de somatostatina.

En 6 aurículas izquierdas estimuladas a 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) la amplitud de la fuerza contráctil basal alcanzaba valores de  $723.2 \pm 15.8$  mg. La estimulación pareada en estas aurículas producía un incremento de la fuerza contráctil hasta  $1860.7 \pm 39.5$  mg (potenciación post-extrasistólica), lo que supone un  $257.3 \pm 7.6\%$

del valor control. La somatostatina,  $10^{-6}$  M, reducía la amplitud contráctil en aurículas estimuladas a 1 Hz hasta  $451.3 \pm 9.2$  mg; sin embargo, tras su administración la potenciación post-extrasistólica máxima alcanzaba  $1631.0 \pm 45.1$  mg. Es decir, la potenciación post-extrasistólica obtenida en presencia de somatostatina era de un  $361.4 \pm 10.8\%$ , lo que representa un valor porcentualmente mayor ( $P < 0.001$ ) que el obtenido en condiciones control. Sin embargo, la somatostatina,  $10^{-9}$  M a  $10^{-6}$  M, no lograba modificar la magnitud total de la potenciación post-extrasistólica considerada en valores absolutos (para  $10^{-6}$  M,  $1631.0 \pm 45.1$  mg frente a un control de  $1860.7 \pm 39.5$  mg,  $P > 0.05$ ).

La comparación de la potenciación post-extrasistólica obtenida en condiciones control con la obtenida durante el periodo del efecto inotrópico negativo producido por concentraciones de  $10^{-9}$  M a  $10^{-6}$  M de somatostatina se muestra en la figura 16, que presenta los resultados de un experimento típico.

#### 1.7. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA RELACION FUERZA-FRECUENCIA EN AURICULAS IZQUIERDAS

La curva que relaciona la fuerza contráctil desarrollada por las aurículas izquierdas de cobayo

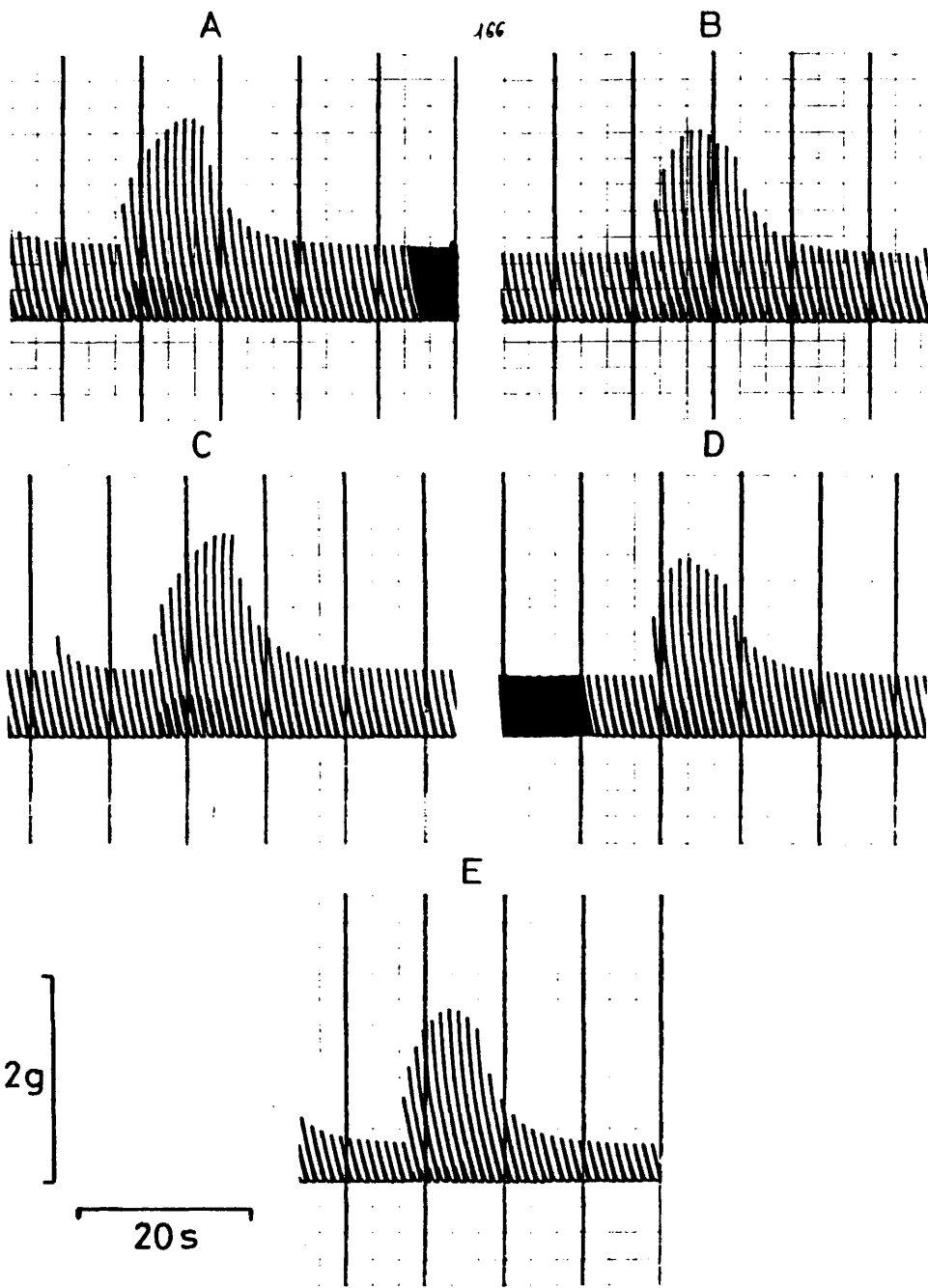


Figura 16

Figura 16.- Efecto de la somatostatina sobre el fenómeno de la potenciación post-extrasistólica en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. A representa la potenciación post-extrasistólica previa a la adición de somatostatina. El resto de los registros muestran la potenciación post-extrasistólica 10 minutos después de la adición al baño de somatostatina,  $10^{-9}$  M (B),  $10^{-8}$  M (C),  $10^{-7}$  M (D) y  $10^{-6}$  M (E).

con la frecuencia a que son estimuladas se representa en la figura 17. Como se muestra en esta figura, un incremento en la frecuencia de estimulación por encima de la frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) origina un aumento de la fuerza contráctil registrada. Por otra parte, una disminución de la frecuencia desde 60 a  $15 \text{ min}^{-1}$  también provoca un aumento de la contractilidad, si bien en esta ocasión es menos marcado. Es decir, en la aurícula de cobayo la relación fuerza-frecuencia presenta una respuesta bifásica.

La influencia de la somatostatina sobre la relación fuerza-frecuencia se estudió en 6 aurículas izquierdas. Se realizaron las curvas que relacionan la fuerza contráctil desarrollada con la frecuencia de estimulación en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de somatostatina ( $10^{-7}$  M a  $5 \times 10^{-6}$  M). El valor obtenido en condiciones control a una frecuencia de  $60 \text{ min}^{-1}$  se tomó como 100%, expresándose el resto de los valores como porcentaje con respecto a este control. La somatostatina (figura 17) disminuía la amplitud de las contracciones y producía un desplazamiento dosis-dependiente hacia abajo de la curva que relaciona la fuerza contráctil con la frecuencia de estimulación. Este desplazamiento aparecía a todas las frecuencias de estimulación utilizadas, si bien era más marcado a las frecuencias altas, es decir, en la rama ascendente de la derecha de la curva, que es progresivamente aplanada

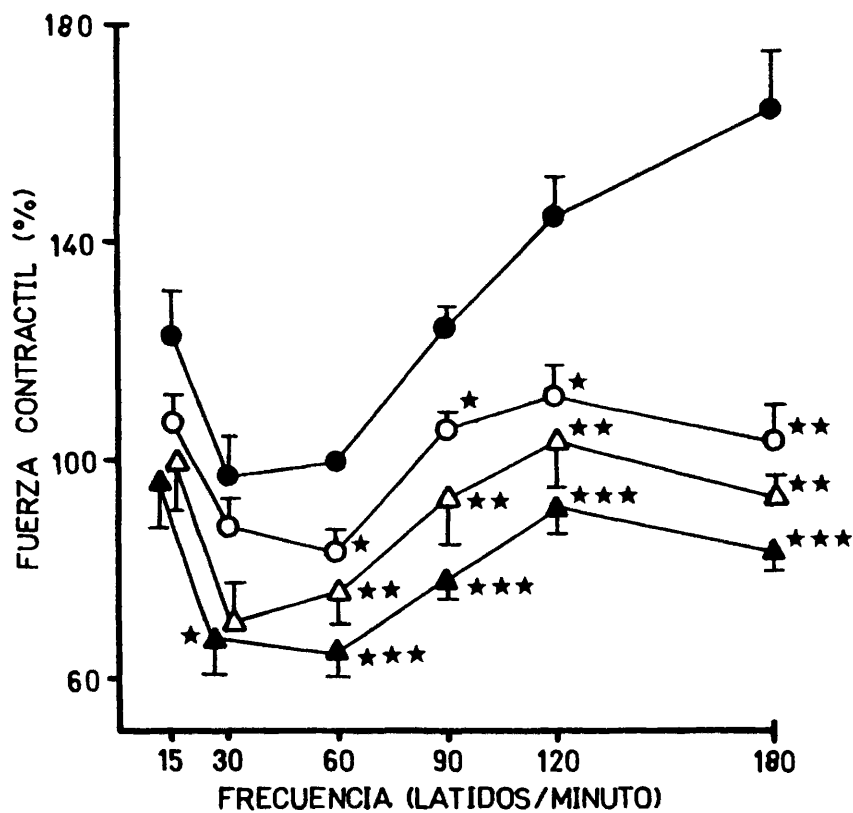


Figura 17.- Efecto de la somatostatina sobre la relación fuerza-frecuencia en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. La amplitud de la contracción obtenida a 60 min<sup>-1</sup> en ausencia de somatostatina se tomó como 100%. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: frecuencia de estimulación (latidos/minuto). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 6 experimentos.

(●) sin somatostatina,  
 (○) somatostatina, 10<sup>-7</sup> M,  
 (△) somatostatina, 10<sup>-6</sup> M,  
 (▲) somatostatina, 5x10<sup>-6</sup> M.

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

por acción de la somatostatina.

1.8. EFECTO DE LAS VARIACIONES DE LA CONCENTRACION  
EXTRACELULAR DE CALCIO SOBRE LA ACCION INOTROPICA  
NEGATIVA DE LA SOMATOSTATINA

Es un hecho conocido que la amplitud de las contracciones cardíacas aumenta cuando se incrementa la concentración de calcio o cuando se reduce la concentración de sodio en el medio extracelular (WILDBRANDT y KOLLER, 1948). En ambas situaciones el flujo de entrada de calcio al interior celular se encuentra elevado (NIEDERGERKE, 1963).

Para investigar el efecto que la concentración extracelular de calcio ejerce sobre la acción inotrópica negativa de la somatostatina, las aurículas izquierdas se incubaban en solución de Tyrode que contenía una concentración de calcio de 0.9 mM. La adición posterior de cantidades sucesivamente crecientes (0.9 a 7 mM) de  $\text{CaCl}_2$  permitía obtener curvas dosis-respuesta al calcio. Posteriormente se repetían estas curvas dosis-respuesta al calcio en presencia de somatostatina ( $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M). Los resultados se muestran en la figura 18.

Estos resultados, obtenidos en 8 aurículas

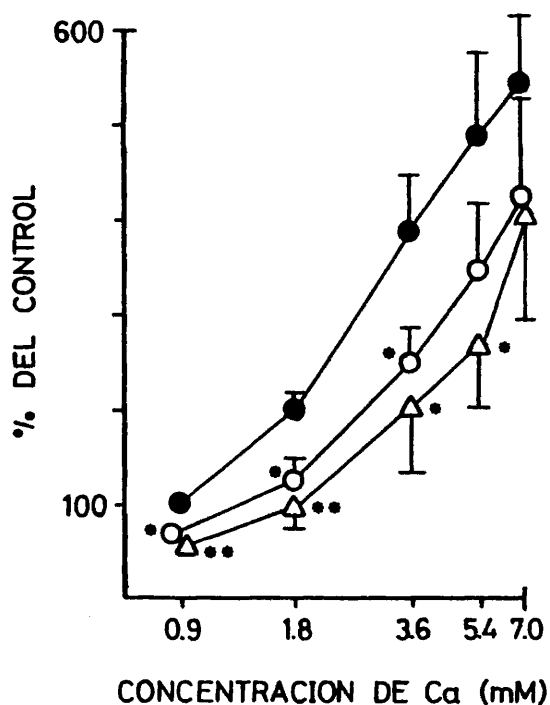


Figura 18.- Efecto de la somatostatina sobre la acción inotrópica positiva provocada por concentraciones crecientes de calcio en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. Ordenadas: fuerza contráctil (% del valor control). Abscisas: concentración de calcio (mM) en la solución de Tyrode, en escala logarítmica. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 8 experimentos.

- (●) sin somatostatina,
- (○) somatostatina,  $10^{-7}$  M,
- (△) somatostatina,  $10^{-6}$  M.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

izquierdas, indican que la somatostatina causaba un desplazamiento hacia abajo y hacia la derecha de la curva dosis-respuesta al calcio (figura 18). En presencia de  $10^{-7}$  M de somatostatina este desplazamiento alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) en el rango de concentraciones de calcio de 0.9 a 3.6 mM, no siendo significativo el desplazamiento para concentraciones de 5.4 y 7.0 mM de calcio. De manera similar, la somatostatina,  $10^{-6}$  M, desplazaba la curva dosis-respuesta al calcio hacia abajo y hacia la derecha, si bien en presencia de una concentración extracelular de calcio de 7.0 mM este desplazamiento no era estadísticamente significativo. Dicho con otras palabras, el desplazamiento de las mencionadas curvas dosis-respuesta resultaba más marcado a concentraciones bajas de calcio que a altas concentraciones de este catión.

Estos hallazgos parecen indicar, en consecuencia, que la elevación de la concentración extracelular de calcio es capaz de disminuir o de antagonizar el efecto inotrópico negativo producido por la somatostatina.

1.9. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION  
EXTRACELULAR DE SODIO SOBRE LA ACCION INOTROPICA  
NEGATIVA DE LA SOMATOSTATINA

En otro grupo de experimentos hemos estudiado el efecto inotrópico negativo de la somatostatina en aurículas derechas equilibradas en solución de Tyrode. A continuación este efecto se comparaba con la acción inotrópica negativa que ejercía la somatostatina sobre las mismas aurículas incubadas durante 30 minutos en una solución de Tyrode en la que un 30% de la concentración de sodio había sido reemplazada isoosmóticamente por sucrosa.

En 10 aurículas derechas la amplitud de las contracciones era de  $512.3 \pm 68.3$  mg en solución de Tyrode normal, y se elevaba a  $704.6 \pm 52.5$  mg ( $P < 0.001$ ) cuando se reducía la concentración de sodio en el baño al 70%. En la figura 19 se compara el efecto inotrópico negativo de la somatostatina obtenido en solución de Tyrode normal con el obtenido en la solución de Tyrode con 70% de sodio. Puede observarse que el efecto inotrópico negativo de la somatostatina se encuentra significativamente reducido ( $P < 0.01$  para  $10^{-7}$  M y  $P < 0.001$  para  $10^{-6}$  M) en un medio hiposódico. Es decir, de nuevo una situación que incrementa el flujo de entrada de calcio es capaz de antagonizar la acción inotrópica negativa de la somatostatina.

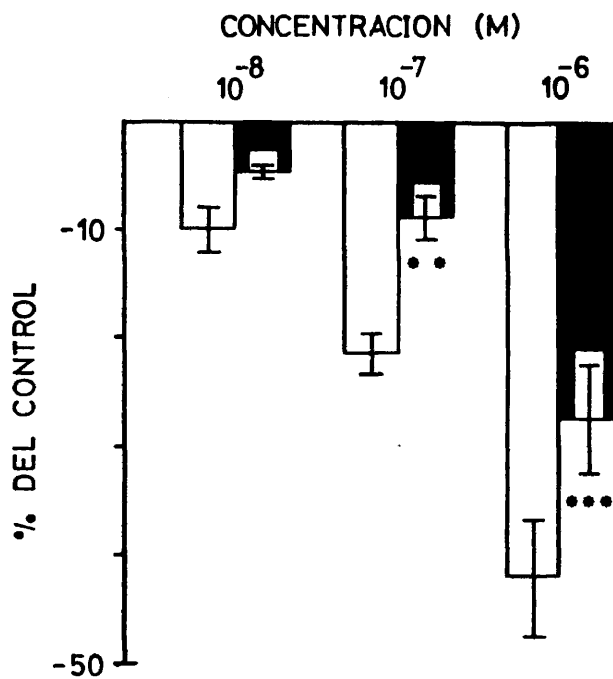


Figura 19.- Efecto inotrópico negativo de la somatostatina en aurículas derechas espontáneas en solución de Tyrode normal (columnas blancas) y en solución de Tyrode cuyo contenido en sodio se redujo a un 70% (columnas negras). Ordenadas: % de depresión de la fuerza contráctil. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada columna representa la media  $\pm$  E.S.M. de 10 experimentos.

\*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

1.10 EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS RESPUESTAS  
INOTROPICAS Y CRONOTROPICAS AL ISOPROTERENOL

Para estudiar el efecto de la somatostatina sobre las respuestas cronotrópicas e inotrópicas positivas producidas por el isoproterenol ( $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M) en aurículas derechas se llevaron a cabo curvas dosis-respuesta a este último fármaco en solución de Tyrode carente de somatostatina, las cuales se utilizaron como controles. Posteriormente se realizaron curvas dosis-respuesta similares en presencia de  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M de somatostatina.

El efecto de la somatostatina sobre la respuesta cronotrópica positiva inducida por el isoproterenol en 9 aurículas derechas se muestra en la figura 20. En estas preparaciones la somatostatina,  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M, disminuía la frecuencia sinusal desde  $170.3 \pm 5.8$  latidos/min, en condiciones control, hasta  $163.3 \pm 2.0$  y  $160.1 \pm 2.2$  latidos/min, respectivamente, lo que suponía una reducción estadísticamente significativa de la frecuencia sinusal de un  $4.1 \pm 1.2\%$  ( $P < 0.05$ ) y de un  $6.0 \pm 1.3\%$  ( $P < 0.01$ ), respectivamente, para las mencionadas concentraciones de somatostatina.

Como puede observarse en la figura 20, la somatostatina producía un desplazamiento dosis-dependiente hacia abajo de la curva dosis-respuesta cronotrópica al isoproterenol. Sin embargo, la somatostatina no parecía

ser capaz de bloquear el efecto cronotrópico positivo producido por el isoproterenol. Así, por ejemplo, el incremento de la frecuencia producido por la máxima dosis de isoproterenol utilizada ( $10^{-6}$  M) era de un  $36.2 \pm 2.7\%$  sobre los valores control en ausencia de somatostatina, mientras que en presencia de  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M de esta hormona este incremento alcanzaba un  $31.1 \pm 3.5\%$  y un  $29.9 \pm 3.7\%$ , respectivamente, valores que no diferían estadísticamente ( $P > 0.05$ ) del hallado en ausencia de somatostatina.

Hemos estudiado también la influencia de la somatostatina sobre la respuesta inotrópica positiva al isoproterenol. La figura 21 muestra los resultados obtenidos en 9 aurículas derechas. En estas preparaciones la somatostatina provocaba una disminución de la fuerza contráctil que alcanzaba un  $15.8 \pm 2.2\%$  a la concentración de  $10^{-7}$  M ( $P < 0.01$ ) y un  $49.3 \pm 5.1\%$  a  $10^{-6}$  M ( $P < 0.001$ ). Más aún, la somatostatina desplazaba la curva dosis-respuesta inotrópica al isoproterenol hacia abajo de una manera dosis-dependiente. Sin embargo, y de una forma muy similar a lo ya visto en las curvas de frecuencia, la somatostatina no deprimía el incremento máximo de fuerza contráctil inducido por el isoproterenol en estas preparaciones. Ello significa que el isoproterenol en presencia de somatostatina seguía ejerciendo su típico efecto inotrópico positivo.

En conclusión, en nuestras preparaciones de

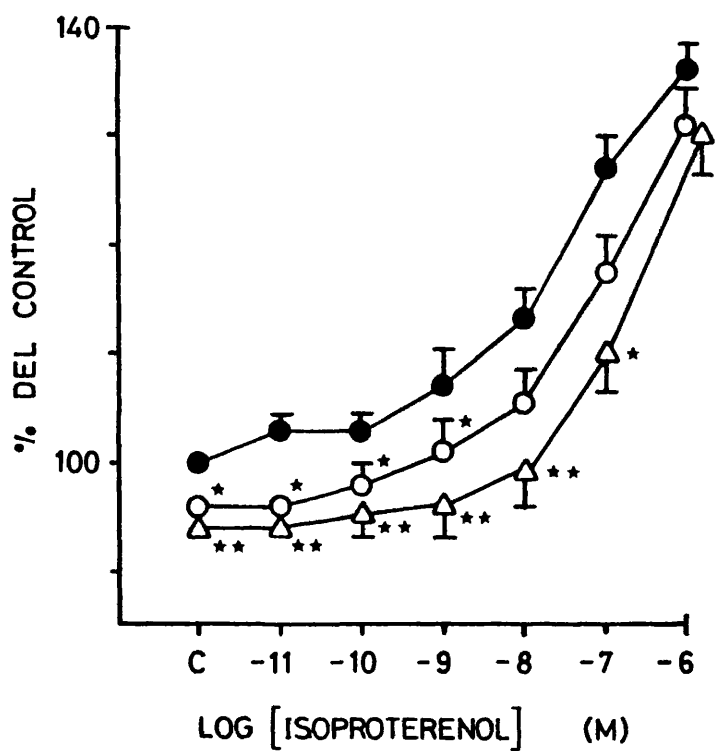


Figura 20.- Efecto de la somatostatina sobre la respuesta cronotrópica a isoproterenol en aurículas derechas espontáneas. Ordenadas: frecuencia sinusal (% del valor control). Abscisas: logaritmo de la concentración molar de isoproterenol. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 9 experimentos. C: control.

- (●) sin somatostatina,
- (○) somatostatina,  $10^{-7}$  M,
- (△) somatostatina,  $10^{-6}$  M.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

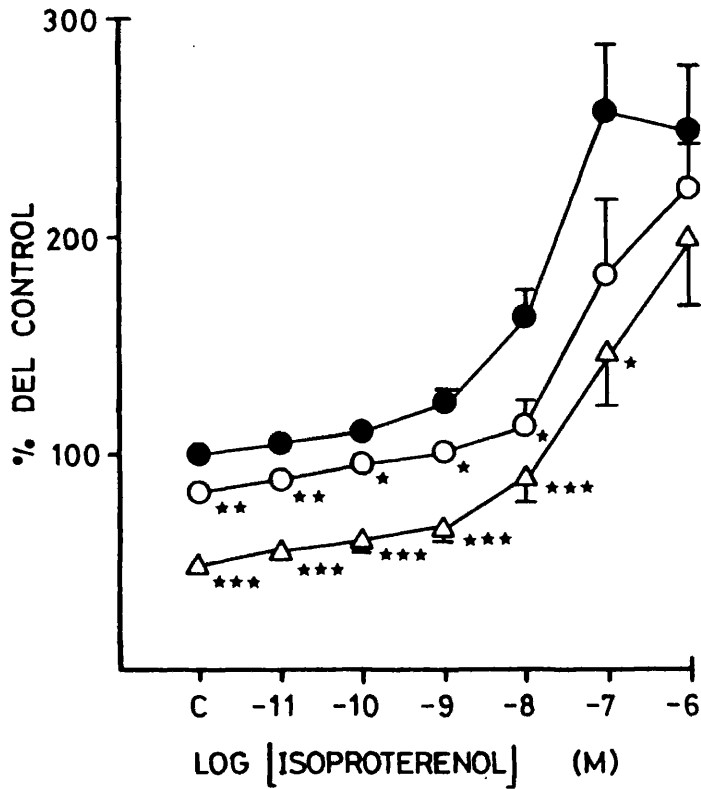


Figura 21.- Efecto de la somatostatina sobre la respuesta inotrópica a isoproterenol en aurículas derechas espontáneas. Ordenadas: fuerza contráctil (% del valor control). Abscisas: logaritmo de la concentración molar de isoproterenol. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 9 experimentos. C: control.

(●) sin somatostatina,  
(○) somatostatina,  $10^{-7}$  M,  
(△) somatostatina,  $10^{-6}$  M.  
\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

aurículas derechas, la somatostatina no era capaz de deprimir los efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos máximos inducidos por el isoproterenol. Ello parece indicar que el efecto inotrópico negativo de la somatostatina no se debe a una interferencia con los receptores beta-1 adrenérgicos cardíacos ni con la activación de una adenil-ciclasa dependiente de catecolaminas.

#### 1.11. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LAS CONTRACCIONES

##### LENTAS

En un grupo de experimentos las aurículas derechas se equilibraban en solución de Tyrode durante 30 minutos y a continuación se incubaban en solución de Tyrode con alto contenido en potasio (27 mM). En estas condiciones las preparaciones quedaban parcialmente despolarizadas y se hacían inexcitables. La adición de isoproterenol ( $10^{-6}$  M) permitía restaurar la excitabilidad (contracciones lentas), estimulándose entonces las preparaciones a una frecuencia constante de 0.4 Hz ( $24 \text{ min}^{-1}$ ) para evitar su deterioro.

En nuestros experimentos la amplitud de las contracciones lentas inducidas por el isoproterenol en 8 aurículas derechas parcialmente despolarizadas

alcanzó un valor de  $550.6 \pm 60.6$  mg. La somatostatina producía una disminución dosis-dependiente de estas contracciones lentas (figura 22). Esta disminución alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) a concentraciones de somatostatina iguales o superiores a  $10^{-9}$  M. La depresión de las contracciones lentas era tan marcada que llegaba a alcanzar un  $83.5 \pm 5.3\%$  al aplicar la concentración máxima de somatostatina utilizada,  $5 \times 10^{-6}$  M. Por otra parte, la disminución de la amplitud de las contracciones lentas que provocaba la somatostatina era rápidamente revertida incrementando la concentración de calcio en el líquido nutritivo, tal como puede observarse en la figura 23.

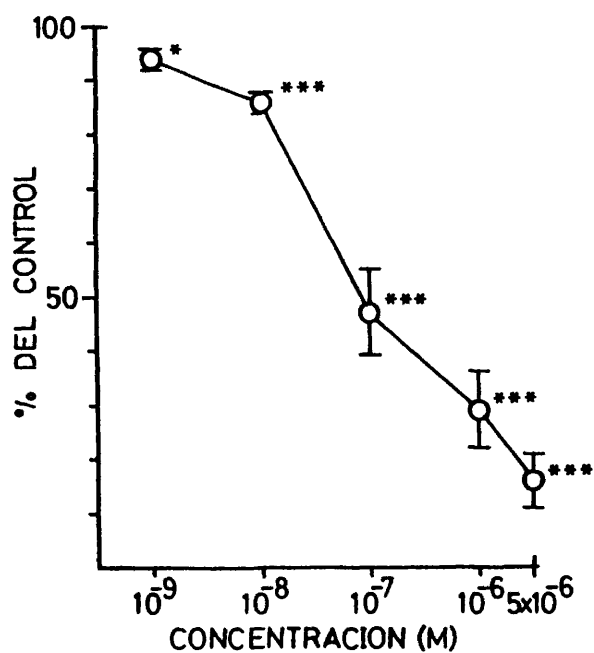


Figura 22.- Efecto de la somatostatina sobre las contracciones lentas inducidas por el isoproterenol ( $10^{-6}$  M) en aurículas despolarizadas por potasio (27 mM). Ordenadas: % del valor control. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 8 experimentos.

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

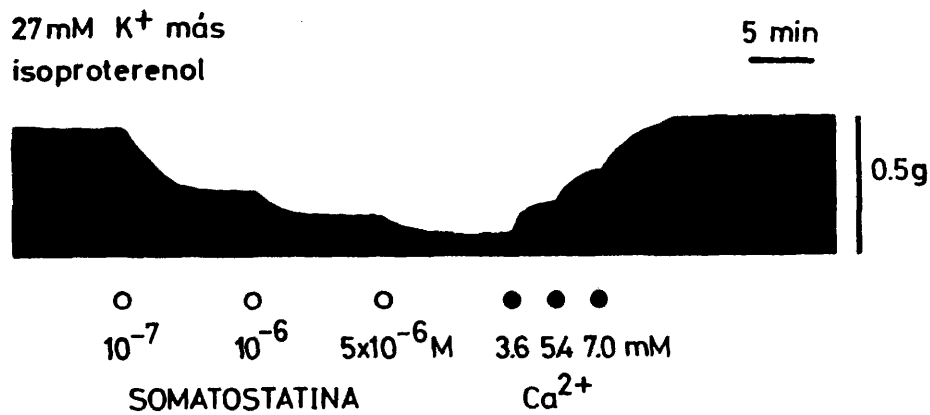


Figura 23.- Registro gráfico del efecto depresor de la somatostatina sobre las respuestas contráctiles lentas inducidas por isoproterenol ( $10^{-6}$  M) en aurículas despolarizadas por potasio (27 mM). El efecto inotrópico negativo de la somatostatina pudo revertirse incrementando la concentración de calcio en la solución de Tyrode. La frecuencia de estimulación se mantuvo en 0.4 Hz a lo largo de todo el experimento. Las calibraciones horizontal y vertical indican, respectivamente, el tiempo y la fuerza contráctil.

## 2. ESTUDIOS DE POTENCIALES DE ACCION

### 2.1. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCION AURICULARES

Los efectos electrofisiológicos de la somatostatina, en un rango de concentraciones comprendido entre  $10^{-9}$  M y  $10^{-6}$  M, han sido estudiados en aurículas de cobayo estimuladas a una frecuencia de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ). Los resultados se muestran en la tabla 10. Como puede observarse, la somatostatina no modificaba significativamente, a ninguna de las concentraciones ensayadas, ni el potencial de reposo auricular ni la amplitud del potencial de acción. Tampoco ejercía ningún efecto sobre el V máx o máxima velocidad de despolarización durante la fase 0. Sin embargo, la somatostatina era capaz de acelerar la repolarización incrementando las pendientes de las fases 2 y 3 del potencial de acción, lo cual explica el acortamiento dosis-dependiente observado en la duración del potencial de acción medido tanto al 50% ( $\text{DPA}_{50}$ ) como al 90% ( $\text{DPA}_{90}$ ) de repolarización. En efecto, la  $\text{DPA}_{50}$ , que en situación basal alcanzaba, en 13 aurículas, un valor de  $56.2 \pm 2.7$  ms, era reducida por  $10^{-9}$  M de somatostatina a  $46.9 \pm 3.1$  ( $P < 0.05$ ) y

TABLA 10.- EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN REGISTRADOS EN FIBRAS MUSCULARES AURICULARES DE COBAYO (media  $\pm$  E.S.M.; n = 13)

Concentración (M)	Potencial de reposo (mV)	Amplitud (mV)	V <sub>máx</sub> (V/s)	DPA <sub>50</sub> (ms)	DPA <sub>90</sub> (ms)	PRE (ms)
0	85.2 $\pm$ 0.7	107.9 $\pm$ 1.8	189.0 $\pm$ 8.9	56.2 $\pm$ 2.7	117.5 $\pm$ 5.6	113.9 $\pm$ 6.2
10 <sup>-9</sup>	85.9 $\pm$ 0.9	107.6 $\pm$ 1.9	186.7 $\pm$ 7.6	46.9 $\pm$ 3.1*	107.9 $\pm$ 5.7	106.0 $\pm$ 4.1
10 <sup>-8</sup>	85.7 $\pm$ 0.9	109.0 $\pm$ 2.4	190.8 $\pm$ 8.3	45.5 $\pm$ 3.0**	96.2 $\pm$ 5.5**	99.9 $\pm$ 4.2*
10 <sup>-7</sup>	85.9 $\pm$ 1.0	107.3 $\pm$ 2.1	192.3 $\pm$ 8.5	41.0 $\pm$ 3.2**	84.6 $\pm$ 2.5***	89.9 $\pm$ 4.9***
10 <sup>-6</sup>	86.6 $\pm$ 1.2	109.1 $\pm$ 2.0	189.5 $\pm$ 7.4	34.5 $\pm$ 5.5***	79.0 $\pm$ 4.8***	81.0 $\pm$ 4.0***

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

llegaba a ser, con la máxima dosis de somatostatina ensayada,  $10^{-6}$  M, de  $34.5 \pm 5.5$  ( $P < 0.001$ ). Por otro lado, los efectos de la somatostatina sobre la  $DPA_{90}$ , cuyo valor control era de  $117.5 \pm 5.6$  ms, sólo comenzaban a ser estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) a la concentración de  $10^{-8}$  M, que producía una disminución hasta  $96.2 \pm 5.5$  ms. A la concentración de  $10^{-6}$  M de somatostatina la  $DPA_{90}$  se acortaba hasta  $79.0 \pm 4.8$  ms ( $P < 0.001$ ). Es decir, la somatostatina se mostraba ligeramente más activa para reducir la  $DPA_{50}$  que la  $DPA_{90}$ .

Estos efectos aparecían a los 1-2 minutos de comenzar la perfusión con somatostatina, y se estabilizaban en 5-10 minutos. Todos los cambios electrofisiológicos inducidos por la somatostatina eran rápidamente revertidos tras el lavado de las preparaciones con solución de Tyrode.

## 2.2. EFECTOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE EL PERIODO REFRACTARIO EFECTIVO Y EL TIEMPO DE RECUPERACION AURICULARES

Hemos estudiado también en fibras musculares auriculares de cobayo los efectos de la somatostatina sobre la duración del periodo refractario efectivo (PRE) y del tiempo de recuperación (TR) auriculares, así como

sobre los cocientes  $PRE/DPA_{90}$  y  $PRE/TR$ .

El valor control para el PRE, evaluado en 13 experimentos, era de  $113.9 \pm 6.2$  ms. La somatostatina producía una disminución dosis-dependiente de este parámetro (tabla 10, figura 24) que alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) a concentraciones iguales o superiores a  $10^{-8}$  M. En consecuencia, a  $10^{-6}$  M la somatostatina reducía el PRE a  $81.0 \pm 4.0$  ms ( $P < 0.001$ ). Por otro lado, la duración de TR, determinado en 7 aurículas en condiciones control, era de  $151.7 \pm 15.3$  ms. La somatostatina inducía también una disminución dosis-dependiente de este parámetro, que alcanzaba valores de  $112.5 \pm 8.8$  ms ( $P < 0.01$ ) en presencia de  $10^{-6}$  M (figura 24).

La figura 25 muestra los efectos de la somatostatina sobre los cocientes  $PRE/DPA_{90}$  y  $PRE/TR$  obtenidos en aurículas de cobayo. Como puede observarse la somatostatina no producía modificaciones significativas de estos cocientes a ninguna de las concentraciones ensayadas.

En la figura 26 hemos representado la relación existente entre los cambios originados por la somatostatina sobre la  $DPA_{90}$  y el PRE. Resulta evidente que los puntos obtenidos con todas las concentraciones de somatostatina utilizadas ( $10^{-9}$  M -  $10^{-6}$  M) pueden ajustarse a una recta de regresión ( $y = 1.7759 + 0.8397x$ ) con un coeficiente de correlación próximo a la unidad ( $r = 0.9778$ ,  $P < 0.05$ ),

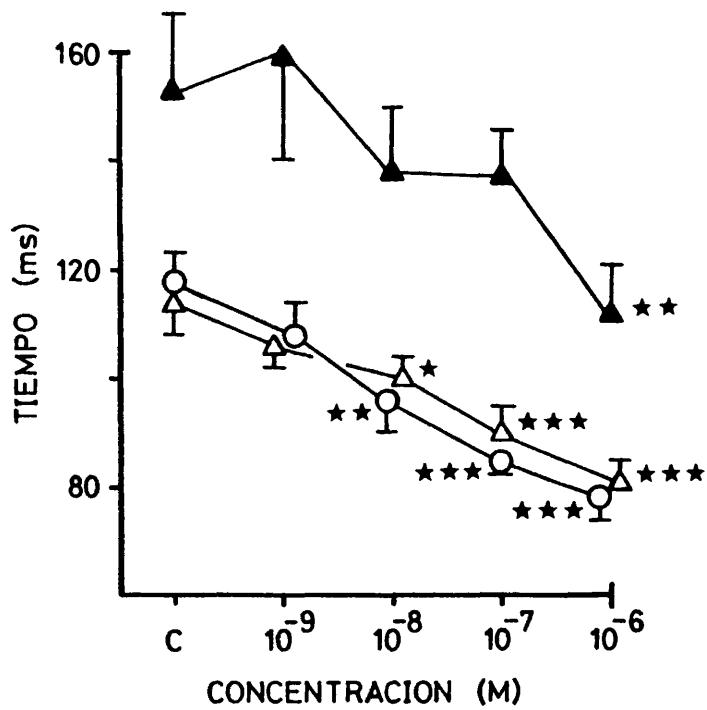


Figura 24.- Efecto de la somatostatina sobre la  $DPA_{90}$  (○), el PRE (△) y el TR (▲) en fibras musculares auriculares de cobayo. Ordenadas: duración de los citados parámetros (ms). Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 7-13 experimentos. C: control.  
\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

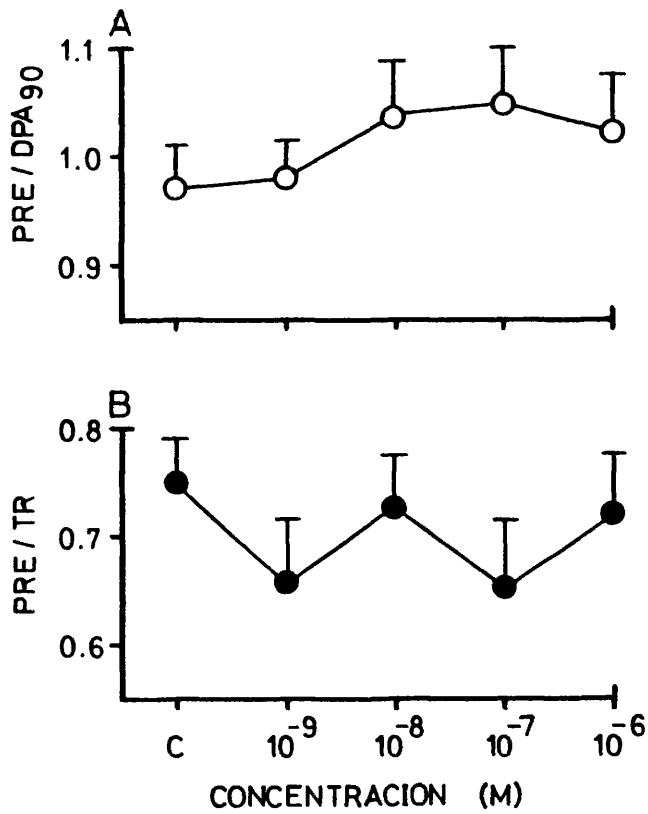


Figura 25.- Efecto de la somatostatina sobre el cociente PRE/DPA<sub>90</sub> (A) y sobre el cociente PRE/TR (B) en fibras musculares auriculares de cobayo. Ordenadas: valores de los mencionados cocientes. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 7-13 experimentos. C: control.

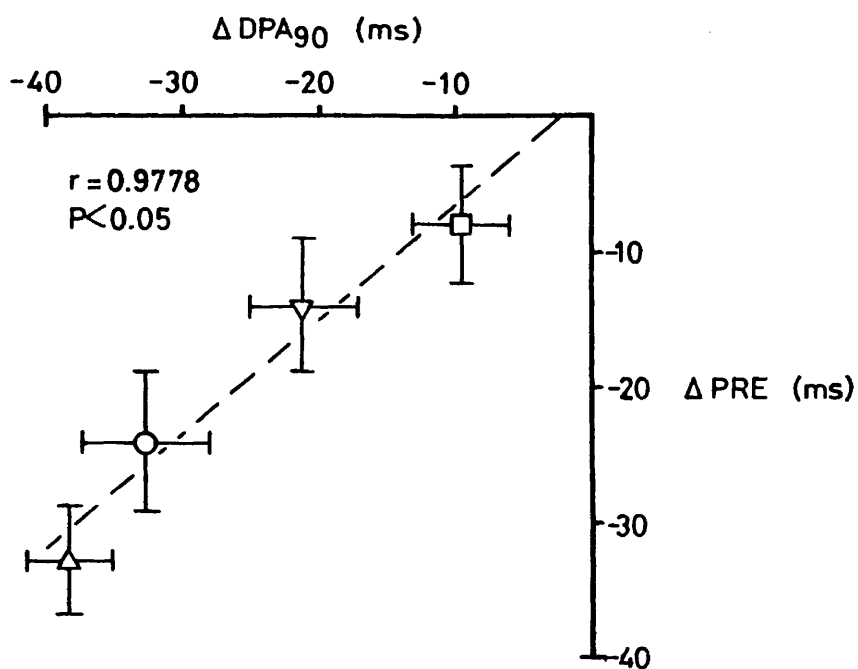


Figura 26.- Efecto de la somatostatina sobre la relación entre la  $DPA_{90}$  y el PRE en fibras musculares auriculares de cobayo. El incremento medio en el PRE ( $\Delta PRE$ ) en ms se representa en ordenadas; el incremento medio en la  $DPA_{90}$  ( $\Delta DPA_{90}$ ) en ms se representa en abscisas. Cada punto representa la media de 13 experimentos. Las líneas verticales y horizontales representan el E.S.M.

- (□) somatostatina,  $10^{-9}$  M,
- (▽) somatostatina,  $10^{-8}$  M,
- (○) somatostatina,  $10^{-7}$  M,
- (△) somatostatina,  $10^{-6}$  M.

y que esta recta no difiere sensiblemente de la línea de identidad, lo que sugeriría que el acortamiento observado en el PRE sería secundario al acortamiento producido por la somatostatina sobre la  $DPA_{90}$ . La ausencia de modificaciones en el cociente  $PRE/DPA_{90}$  también parece corroborar esta hipótesis.

### 2.3. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCION LENTOS

Los potenciales de acción lentos eran obtenidos en las aurículas de cobayo mediante la perfusión con una solución de Tyrode que contenía 27 mM de KCl a la que se añadía isoproterenol ( $10^{-6}$  M) o cafeína (5 mM). Tras incrementar la concentración extracelular de potasio de 2.7 a 27 mM se producía una despolarización parcial de las fibras auriculares hasta un nivel de potencial de membrana en el que la corriente rápida de entrada de sodio ( $I_{Na}$ ) estaba inactivada. Los potenciales de acción originados por el isoproterenol y la cafeína a ese nivel de potencial de membrana se denominan potenciales de acción lentos y dependen principalmente de la activación de la corriente lenta de entrada de calcio ( $I_{Si}$ ).

Los resultados obtenidos en 9 experimentos

se muestran en la tabla 11. El potencial de reposo de estas preparaciones en ausencia de somatostatina era de  $-47.4 \pm 1.0$  mV; la somatostatina,  $10^{-8}$  M -  $10^{-7}$  M, no modificaba este parámetro, pero a  $10^{-6}$  M originaba una discreta despolarización hasta  $-45.7 \pm 1.8$  mV ( $P < 0.05$ ). Además, la somatostatina producía una reducción dosis-dependiente tanto de la amplitud de los potenciales lentos como de la velocidad máxima de despolarización de los mismos. Para ambos parámetros esta reducción alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) a concentraciones iguales o superiores a  $10^{-8}$  M. De manera similar, la  $DPA_{50}$  y la  $DPA_{90}$  de los potenciales lentos calcio-dependientes experimentaban también un acortamiento dosis-dependiente por acción de la somatostatina que alcanzaba valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) a concentraciones de somatostatina iguales o superiores a  $10^{-8}$  M.

#### 2.4. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCION VENTRICULARES

También hemos estudiado, en otro grupo de experimentos, los efectos de la somatostatina ( $10^{-9}$  M -  $10^{-6}$  M) sobre los potenciales de acción registrados en músculos papilares ventriculares de cobayo estimulados

TABLA 11.- EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN LENTOS INDUCIDOS POR ISOPROTERENOL O CAFEINA EN AURÍCULAS DESPOLARIZADAS POR 27 mM DE POTASIO (media  $\pm$  E.S.M.; n = 9)

Concentración (M)	Potencial de reposo (mV)	Amplitud (mV)	V <sub>máx</sub> (V/s)	DPA <sub>50</sub> (ms)	DPA <sub>90</sub> (ms)
0	47.4 $\pm$ 1.0	70.5 $\pm$ 2.4	10.3 $\pm$ 0.5	66.8 $\pm$ 10.3	89.8 $\pm$ 9.2
10 <sup>-8</sup>	47.0 $\pm$ 0.9	67.1 $\pm$ 2.2*	8.9 $\pm$ 0.4*	49.4 $\pm$ 6.7*	67.4 $\pm$ 7.4*
10 <sup>-7</sup>	46.7 $\pm$ 0.8	64.4 $\pm$ 2.9**	7.2 $\pm$ 0.3**	47.4 $\pm$ 6.8**	63.1 $\pm$ 9.1**
10 <sup>-6</sup>	45.7 $\pm$ 1.8*	58.8 $\pm$ 4.1**	5.9 $\pm$ 0.9**	42.8 $\pm$ 9.3**	58.5 $\pm$ 9.5**

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

a una frecuencia basal de 1 Hz ( $60 \text{ min}^{-1}$ ). Nuestros resultados, en 9 experimentos, aparecen en la tabla 12. Puede apreciarse que, en condiciones control, el potencial de acción ventricular del cobayo presenta un nivel de potencial de membrana más elevado (más negativo) que el existente en la aurícula del mismo animal. De análoga manera la amplitud de la fase 0 del potencial de acción, así como la duración del mismo tanto al 50% como al 90% de repolarización alcanzan cifras mayores en el músculo papilar que en la aurícula de cobayo.

La perfusión de los músculos papilares con somatostatina no modificaba significativamente el potencial de reposo ventricular ni la amplitud y la V máx del potencial de acción. La somatostatina, sin embargo, era capaz de disminuir tanto la  $DPA_{50}$  como la  $DPA_{90}$  cuando se aplicaba a concentraciones de  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M, si bien, al perfundir con concentraciones superiores,  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M, ambos parámetros se incrementaban, llegando a alcanzar valores que no diferían significativamente de los obtenidos en condiciones control. De este modo, la  $DPA_{90}$ , que en ausencia de somatostatina era de  $150.8 \pm 10.2$  ms, experimentaba una reducción a  $121.9 \pm 9.5$  ( $P < 0.05$ ) y a  $116.1 \pm 8.9$  ms ( $P < 0.05$ ) cuando se perfundía, respectivamente, con  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M del polipéptido. El incremento de esta concentración a  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M prolongaba la  $DPA_{90}$  hasta  $139.1 \pm 11.0$  y  $137.6 \pm 11.7$  ms, respectivamente, valores que no diferían significativa-

TABLA 12.- EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN REGISTRADOS EN MUSCULOS PAPILARES VENTRICULARES DE COBAYO (media ± E.S.M.; n = 9)

Concentración (M)	Potencial de reposo (mV)	Amplitud (mV)	V <sub>máx</sub> (V/s)	DPA <sub>50</sub> (ms)	DPA <sub>90</sub> (ms)	PRE (ms)
0	89.7 ± 0.9	121.2 ± 0.8	116.3 ± 7.8	114.0 ± 9.1	150.8 ± 10.2	151.6 ± 10.7
10 <sup>-9</sup>	91.1 ± 1.1	121.5 ± 0.9	115.8 ± 8.2	83.0 ± 8.5*	121.9 ± 9.5*	113.6 ± 10.6*
10 <sup>-8</sup>	90.8 ± 1.0	122.9 ± 1.5	117.2 ± 6.5	80.6 ± 9.9*	116.1 ± 8.9*	110.2 ± 12.2*
10 <sup>-7</sup>	90.6 ± 0.9	123.3 ± 1.5	117.9 ± 8.0	102.3 ± 12.6	139.1 ± 11.0	129.1 ± 14.4
10 <sup>-6</sup>	91.1 ± 0.9	122.9 ± 1.3	118.1 ± 7.4	98.2 ± 11.7	137.6 ± 11.7	135.8 ± 12.4

\*P < 0.05.

mente del control. Cambios paralelos ocurrían con la  $DPA_{50}$ .

De modo similar a lo mencionado en las aurículas, los efectos de la somatostatina sobre los potenciales de acción ventriculares aparecían a los 1-2 minutos, se estabilizaban a los 5-10 minutos y desaparecían rápidamente al lavar las preparaciones con solución de Tyrode.

#### 2.5. EFECTOS DE LA SOMATOSTATINA SOBRE EL PERIODO REFRACTARIO EFECTIVO Y EL TIEMPO DE RECUPERACION VENTRICULARES

En los músculos papilares de cobayo hemos determinado también la duración del PRE y del TR. El valor control para el primero de estos dos parámetros, en 9 preparaciones era de  $151.6 \pm 10.7$  ms (tabla 12). La somatostatina disminuía este valor hasta  $113.6 \pm 10.6$  ( $P < 0.05$ ) y  $110.2 \pm 12.2$  ms ( $P < 0.05$ ) cuando se aplicaba a las concentraciones de  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M. Sin embargo, una elevación ulterior de la concentración de este péptido incrementaba la duración del PRE hasta valores que no diferían de los hallados en situación control (figura 27). El efecto de la somatostatina sobre el TR, que en condiciones control alcanzaba un valor de  $181.1 \pm 12.8$  ms ( $n = 9$ ), era muy similar al descrito

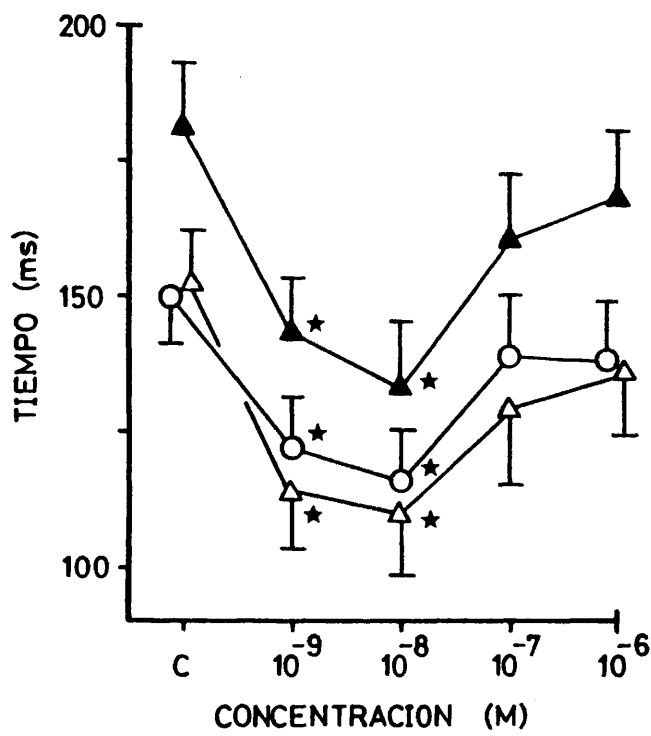


Figura 27.- Efecto de la somatostatina sobre la DPA<sub>90</sub> (○), el PRE (△) y el TR (▲) en fibras musculares ventriculares de cobayo. Ordenadas: duración de los citados parámetros (ms). Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media ± E.S.M. de 9 experimentos. C: control.

\*P<0.05

con el PRE, es decir, a un descenso inicial estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) con las concentraciones de  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M seguía una fase de ascenso con  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M que llegaba a alcanzar casi los valores previos a la adición del polipéptido. La figura 27 muestra el efecto bifásico que ejerce la somatostatina sobre el PRE y el TR, y cómo este efecto es paralelo al que tiene lugar sobre la  $DPA_{90}$ .

La figura 28 muestra la ausencia de efecto de la somatostatina sobre los cocientes  $PRE/DPA_{90}$  y  $PRE/TR$ , fenómeno que cabría esperar si las modificaciones en los parámetros antes citados,  $DPA_{90}$ , PRE y TR, fuesen realmente paralelas. Por último, la relación existente entre los cambios originados por el polipéptido sobre la  $DPA_{90}$  y el PRE aparecen en la figura 29. De manera análoga a lo ya descrito en aurículas, los puntos obtenidos con las cuatro dosis de somatostatina utilizadas pueden ajustarse a una recta ( $y = -4.235 + 1.036x$ ) con un elevado coeficiente de correlación ( $r = 0.9660$ ,  $P < 0.05$ ), lo que parece corroborar de nuevo que las modificaciones ejercidas por la somatostatina sobre el PRE serían secundarias a las producidas sobre la  $DPA_{90}$ .

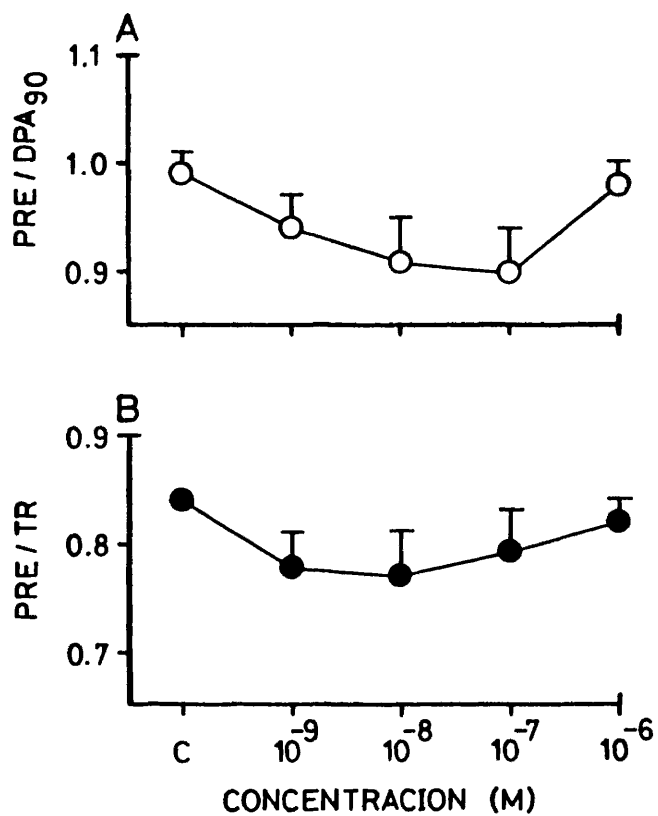


Figura 28.- Efecto de la somatostatina sobre el cociente PRE/DPA<sub>90</sub> (A) y sobre el cociente PRE/TR (B) en fibras musculares ventriculares de cobayo. Ordenadas: valores de los mencionados cocientes. Abscisas: concentración molar de somatostatina. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 9 experimentos. C: control.

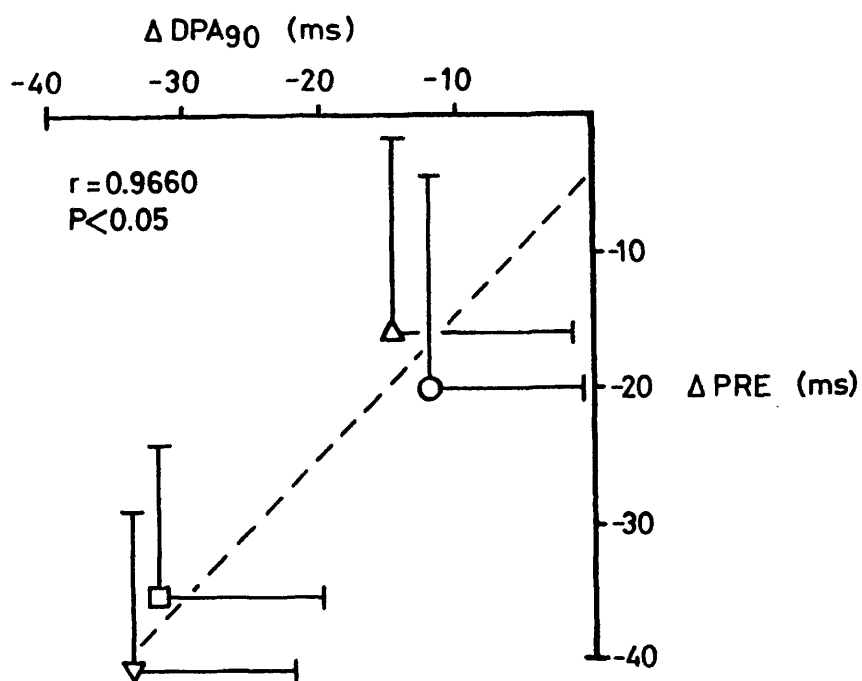


Figura 29.- Efecto de la somatostatina sobre la relación entre la  $DPA_{90}$  y el PRE en fibras musculares ventriculares de cobayo. El incremento medio en el PRE ( $\Delta PRE$ ) en ms se representa en ordenadas; el incremento medio en la  $DPA_{90}$  ( $\Delta DPA_{90}$ ) en ms se representa en abscisas. Cada punto representa la media de 9 experimentos. Las líneas verticales y horizontales representan el E.S.M.

- (□) somatostatina,  $10^{-9}$  M,
- (▽) somatostatina,  $10^{-8}$  M,
- (○) somatostatina,  $10^{-7}$  M,
- (△) somatostatina,  $10^{-6}$  M.

### 3. ESTUDIOS DE FLUJOS DE $^{45}\text{Ca}$

#### 3.1. CAPTACION DE $^{45}\text{Ca}$

Hemos estudiado los efectos de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas izquierdas de cobayo hemiseccionadas. En cada experimento una mitad de la aurícula servía como control y otra como experimental para estudiar los efectos de la somatostatina. Nuestros experimentos pueden dividirse básicamente en dos grupos: un primer grupo, en el que estudiábamos la captación de  $^{45}\text{Ca}$  que se producía en condiciones basales (frecuencia de estimulación =  $60 \text{ min}^{-1}$ , concentración extracelular de calcio,  $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.8 \text{ mM}$ ), y un segundo grupo en el que determinábamos la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en condiciones en las que se modificaba la frecuencia o bien la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  o bien ambos parámetros a la vez. En el primer grupo de experimentos hemos cuantificado la captación de  $^{45}\text{Ca}$  a los 2, 5 y 10 minutos de exposición a la solución de Tyrode radiactiva; en el segundo grupo se fijó como tiempo de exposición al  $^{45}\text{Ca}$  un periodo de 5 minutos en todos los experimentos. Previamente a la exposición de las preparaciones al  $^{45}\text{Ca}$ , éstas se equilibraban durante 30 minutos en solución de Tyrode.

En total hemos estudiado 114 hemiaurículas controles y otras tantas experimentales. El peso medio ( $\pm$  E.S.M.) de las hemiaurículas controles era de  $19.86 \pm 1.39$  mg y la eficacia del contaje radiactivo para las mismas alcanzaba la cifra de  $57.89 \pm 0.76\%$ . Estos valores no presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) con los obtenidos en las hemiaurículas sometidas a la acción de la somatostatina, que pesaban  $20.15 \pm 1.62$  mg y cuya eficacia de contaje era de  $58.27 \pm 0.84\%$ .

Los resultados obtenidos en las hemiaurículas que sirvieron como controles se han resumido en las tablas 13 y 14. La tabla 13 muestra los valores de captación de  $^{45}\text{Ca}$  obtenidos en un medio con una  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  de 1.8 mM y a una frecuencia de estimulación de  $60 \text{ min}^{-1}$ . Puede apreciarse que un incremento en el tiempo de exposición aumenta la captación de  $^{45}\text{Ca}$  de una manera aproximadamente exponencial, siendo el valor máximo alcanzado en nuestras preparaciones de  $1.635 \pm 0.079$  mmol/kg a los 10 minutos de exposición al  $^{45}\text{Ca}$ . La tabla 14, a su vez, pone de manifiesto el hecho de que la captación de  $^{45}\text{Ca}$  puede ser modificada alterando la frecuencia de estimulación y la concentración de calcio en el líquido nutritivo. La elevación y el descenso de la  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  conllevan modificaciones paralelas en la captación de  $^{45}\text{Ca}$ . Asimismo, el aumento y la disminución de la frecuencia de estimulación también eleva y deprime, respectivamente, la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en las aurículas de cobayo.

TABLA 13.- CAPTACION DE  $^{45}\text{Ca}$  EN HEMIAURICULAS  
CONTROLES A LOS TIEMPOS DE EXPOSICION INDICADOS  
(FRECUENCIA DE ESTIMULACION =  $60 \text{ min}^{-1}$  ;  
 $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.8 \text{ mM}$ )

Tiempo (min)	n	Peso (mg)	Captacion (mmol/kg)
2	16	$19.62 \pm 3.27$	$0.6795 \pm 0.0375$
5	16	$20.17 \pm 2.41$	$1.2244 \pm 0.0712$
10	16	$18.44 \pm 2.52$	$1.6355 \pm 0.0786$

n: número de experimentos.

TABLA 14.- CAPTACION DE  $^{45}\text{Ca}$ , TRAS 5 MINUTOS DE EXPOSICION, EN HEMIAURICULAS CONTROLES A LAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACION Y  $|\text{Ca}^{2+}|_o$  INDICADAS

Frecuencia ( $\text{min}^{-1}$ )	$ \text{Ca}^{2+} _o$ (mM)	n	Peso (mg)	Captación (mmol/kg)
15	0.45	12	19.78 $\pm$ 2.82	0.1922 $\pm$ 0.0184
15	1.8	8	21.26 $\pm$ 3.19	0.8532 $\pm$ 0.0217
15	5.4	4	19.97 $\pm$ 1.81	2.1656 $\pm$ 0.1735
60	0.45	12	19.31 $\pm$ 2.19	0.2673 $\pm$ 0.0090
60	1.8	16	20.17 $\pm$ 2.41	1.2244 $\pm$ 0.0712
60	5.4	8	23.27 $\pm$ 1.57	2.4188 $\pm$ 0.1231
180	0.45	8	21.48 $\pm$ 3.69	0.3336 $\pm$ 0.0375
180	1.8	10	17.41 $\pm$ 2.49	1.5359 $\pm$ 0.1014
180	5.4	4	19.32 $\pm$ 3.03	2.7572 $\pm$ 0.3147

n: número de experimentos.

### 3.2. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA CAPTACION DE $^{45}\text{Ca}$

El efecto de la somatostatina ( $10^{-6}$  M y  $5 \times 10^{-6}$  M) sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  tras 2, 5 y 10 minutos de exposición se muestra en la figura 30. En esta figura las columnas blancas indican la captación obtenida en el tiempo indicado en ausencia de somatostatina, mientras que las columnas negras muestran la captación en presencia del polipéptido en las hemiaurículas correspondientes a las utilizadas como control. Todos los experimentos se realizaron en solución de Tyrode con una  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  de 1.8 mM y con una frecuencia de estimulación de  $60 \text{ min}^{-1}$ .

Como puede apreciarse, la somatostatina, a la concentración de  $10^{-6}$  M, apenas modificaba la captación de  $^{45}\text{Ca}$  a los 2 minutos de exposición, pero disminuía significativamente la captación a los 5 ( $P < 0.01$ ) y a los 10 minutos ( $P < 0.001$ ). A la mayor dosis utilizada,  $5 \times 10^{-6}$  M, la somatostatina disminuía la captación de  $^{45}\text{Ca}$  a todos los tiempos estudiados; esta disminución era significativa tanto a los 2 ( $P < 0.05$ ) como a los 5 ( $P < 0.001$ ) y 10 minutos ( $P < 0.001$ ). No se observaban diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las captaciones de las hemiaurículas utilizadas como controles en los experimentos con  $10^{-6}$  M y con  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina para cada uno de los tiempos considerados.

La figura 31 muestra los anteriores datos

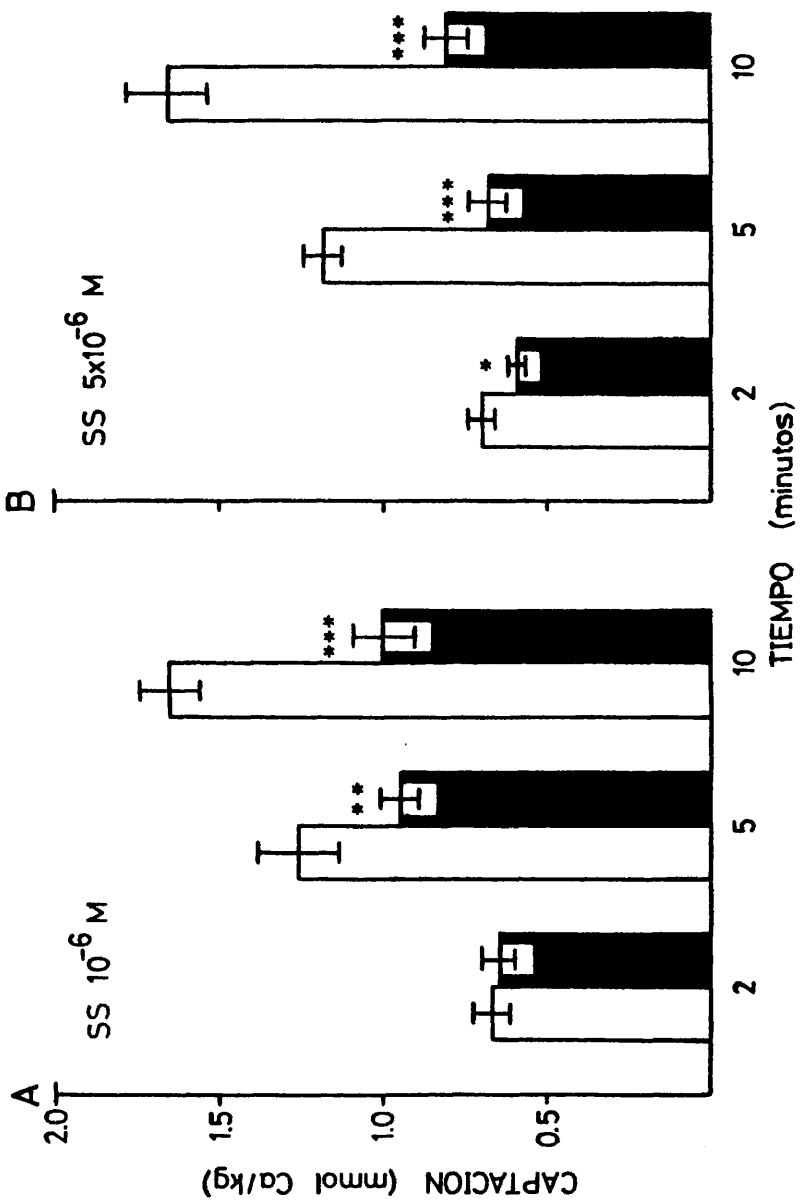


Figura 30.- Efecto de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas izquierdas incubadas en solución de Tyrode y estimuladas a una frecuencia de  $60 \text{ min}^{-1}$ . Ordenadas: captación de  $^{45}\text{Ca}$  (mmol/kg). Abscisas: tiempo de exposición al  $^{45}\text{Ca}$  (minutos). Las columnas blancas representan la captación en las hemiaurículas controles; las columnas negras indican la captación en las correspondientes hemiaurículas experimentales con somatostatina,  $10^{-6} \text{ M}$  (A) y  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  (B). Cada columna representa la media  $\pm$  E.S.M. de 8 experimentos. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

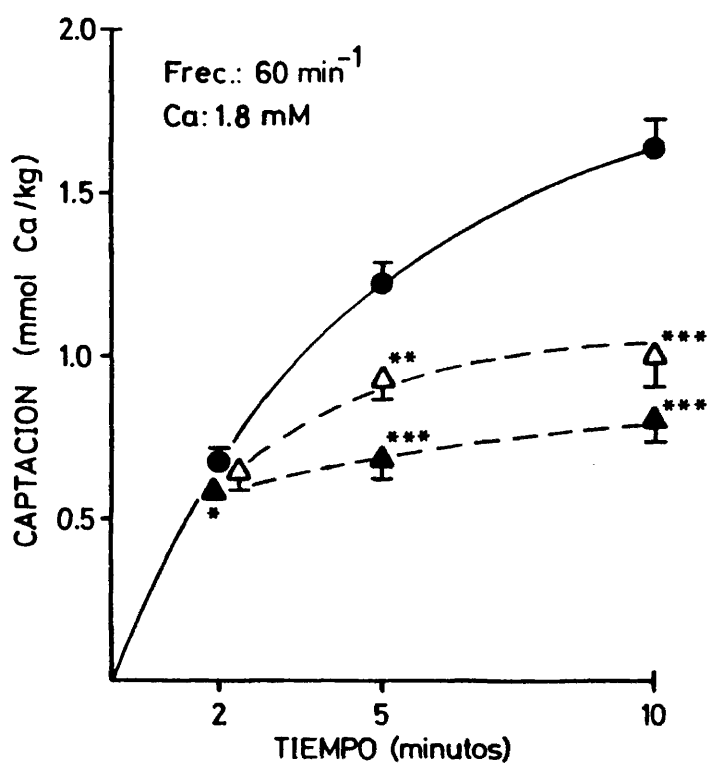


Figura 31.- Efecto de la somatostatina sobre la captación de <sup>45</sup>Ca en aurículas izquierdas incubadas en solución de Tyrode y estimuladas a una frecuencia de 60 min<sup>-1</sup>. Ordenadas: captación de <sup>45</sup>Ca (mmol Ca/kg). Abscisas: tiempo de exposición al <sup>45</sup>Ca (minutos). Cada punto representa la media + E.S.M. de 16 experimentos (curva control) o de 8 experimentos (curvas experimentales).

(●) sin somatostatina,  
(△) somatostatina, 10<sup>-6</sup> M,  
(▲) somatostatina, 5x10<sup>-6</sup> M.

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

de un modo globalizado. La curva de captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas de cobayo era desplazada hacia abajo por la somatostatina de una manera dosis dependiente. Este desplazamiento originaba además, un cambio de forma de la curva de captación que, de ser aproximadamente exponencial en condiciones normales, pasaba a tener una forma aplanada por efecto de la somatostatina.

Considerando el tiempo de exposición de 5 minutos, que fue utilizado en el resto de nuestros experimentos, hemos apreciado una reducción en la captación de  $^{45}\text{Ca}$  por acción de la somatostatina que alcanzaba un  $24.92 \pm 5.04\%$  a la concentración de  $10^{-6}$  M y un  $42.08 \pm 3.76\%$  a la concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M. A los 10 minutos de exposición la captación de  $^{45}\text{Ca}$  se reducía en aproximadamente un 50% ( $49.96 \pm 4.27$ ,  $P < 0.001$ ) por  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina, por lo que esta concentración constituye la dosis eficaz 50 ( $\text{DE}_{50}$ ) para la captación de  $^{45}\text{Ca}$  al tiempo mencionado.

### 3.3. EFECTO DE LAS VARIACIONES DE LA FRECUENCIA SOBRE LA ACCION DE LA SOMATOSTATINA

Como hemos visto anteriormente (véase apartado 1.7 y figura 17), un incremento en la frecuencia de estimulación auricular de 60 a  $180 \text{ min}^{-1}$  originaba una

potenciación del efecto inotrópico negativo de la somatostatina. Por otra parte, un descenso de la frecuencia de estimulación a  $15 \text{ min}^{-1}$  no sólo no conseguía incrementar el efecto inotrópico negativo de la somatostatina, sino que más bien reducía este efecto. En un grupo de experimentos hemos determinado la acción de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  tras 5 minutos de exposición a distintas frecuencias de estimulación con objeto de establecer si modificaciones de la misma podrían influir en la disminución de la captación provocada por la somatostatina. Los resultados se muestran en las figuras 32A y 32B.

Como puede apreciarse en la figura 32A, cuando las aurículas se incubaban en un medio con una concentración de calcio de 1.8 mM, un incremento de la frecuencia de estimulación originaba un aumento de la captación de  $^{45}\text{Ca}$ . La somatostatina reducía la captación de  $^{45}\text{Ca}$  de una manera dosis-dependiente a todas las frecuencias de estimulación estudiadas; esta reducción era, sin embargo, más marcada a frecuencias altas que a frecuencias bajas de estimulación. Así, a  $10^{-6}$  M, la somatostatina disminuía la captación de  $^{45}\text{Ca}$  desde  $1.536 \pm 0.101$  hasta  $1.126 \pm 0.117$  mmol/kg ( $26.69 \pm 3.22\%$  de inhibición;  $P < 0.01$ ) cuando se estimulaba a  $180 \text{ min}^{-1}$ , pero sólo reducía la captación de  $^{45}\text{Ca}$  desde  $0.853 \pm 0.022$  hasta  $0.803 \pm 0.021$  mmol/kg ( $5.86 \pm 1.13\%$  de inhibición;  $P > 0.05$ ) en los experimentos en que la

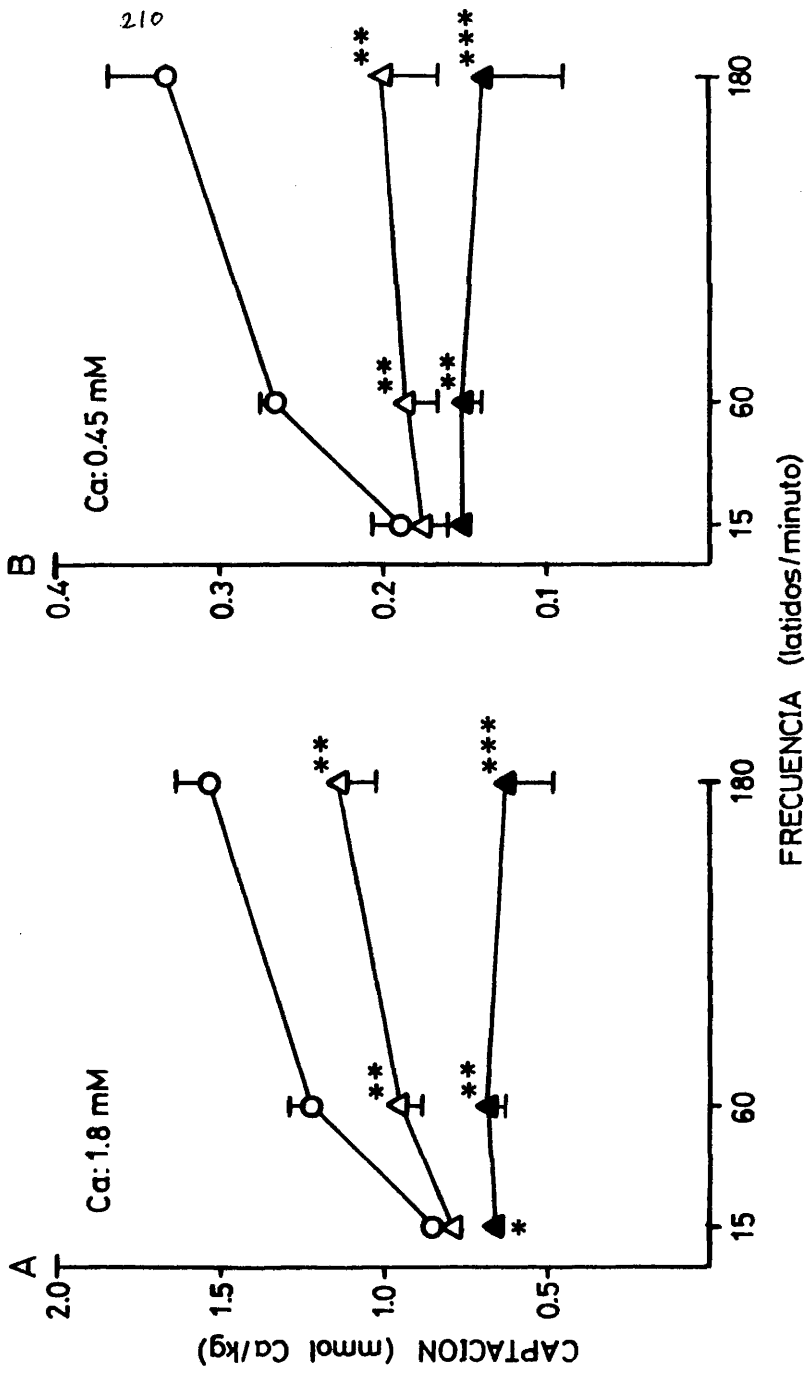


Figura 32.- Efecto de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas izquierdas tras 5 minutos de exposición, a diferentes frecuencias de estimulación e incubadas en soluciones de Tyrode que contenían 1.8 mM (A) o 0.45 mM de calcio (B). Ordenadas: captación de  $^{45}\text{Ca}$  (mmol/kg). Abscisas: frecuencia de estimulación (latidos/minuto). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 4-16 experimentos.

(○) sin somatostatina,  
(△) somatostatina,  $10^{-6}$  M,  
(▲) somatostatina,  $5 \times 10^{-6}$  M.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

frecuencia de conducción era de  $15 \text{ min}^{-1}$ .

Cuando las preparaciones se mantenían en una solución de Tyrode cuya  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  se había reducido a  $0.45 \text{ mM}$  (figura 32B) también se observaba que un incremento en la frecuencia de estimulación aumentaba la captación de  $^{45}\text{Ca}$  por las aurículas, si bien en este caso la magnitud de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  era mucho menor que cuando las preparaciones se incubaban en  $1.8 \text{ mM}$  de calcio. En estas condiciones la somatostatina desplazaba la curva que relaciona la frecuencia de estimulación con la captación de  $^{45}\text{Ca}$  hacia abajo de una manera dosis dependiente. Ello significa que era capaz de reducir la captación de  $^{45}\text{Ca}$  a todas las frecuencias estudiadas; además, y como ya vimos antes, este efecto era más pronunciado cuando las preparaciones se estimulaban a frecuencias altas ( $180 \text{ min}^{-1}$ ) que cuando se estimulaban a la frecuencia basal ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) o a una frecuencia baja ( $15 \text{ min}^{-1}$ ).

También hemos comparado el efecto inhibitor de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  provocado por  $10^{-6} \text{ M}$  de somatostatina en presencia de una  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  normal ( $1.8 \text{ mM}$ ) o baja ( $0.45 \text{ mM}$ ) para una frecuencia de estimulación de  $180 \text{ min}^{-1}$ . Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  era de  $1.8 \text{ mM}$  el porcentaje de inhibición de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  provocado por  $10^{-6} \text{ M}$  era de un  $26.69 \pm 3.22\%$ , mientras que en un medio con  $0.45 \text{ mM}$  de calcio este porcentaje de inhibición alcanzaba un  $40.12 \pm 5.18\%$ , siendo la diferencia entre estos dos valores estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ).

En conclusión, este grupo de experimentos pone de manifiesto que el efecto inhibitor que presenta la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  puede potenciarse o reducirse elevando o disminuyendo, respectivamente, la frecuencia de estimulación. Este hallazgo se observaba en presencia de una  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  tanto normal como baja; una  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  baja, además, parecía potenciar la acción de la somatostatina.

#### 3.4. EFECTO DE LAS VARIACIONES DE LA CONCENTRACION EXTRACELULAR DE CALCIO SOBRE LA ACCION DE LA SOMATOSTATINA

En otra serie de experimentos hemos estudiado la influencia que ejerce la concentración extracelular de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) sobre la acción inhibitora de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  ejercida por la somatostatina. Para ello hemos comparado los valores de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en las hemiaurículas controles a distintas  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  con los obtenidos en presencia de somatostatina. Con estos datos era posible trazar unas curvas dosis-respuesta al calcio (figura 33) en las que representábamos la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ .

Una elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  origina un incremento del flujo de entrada de este catión que en nuestras

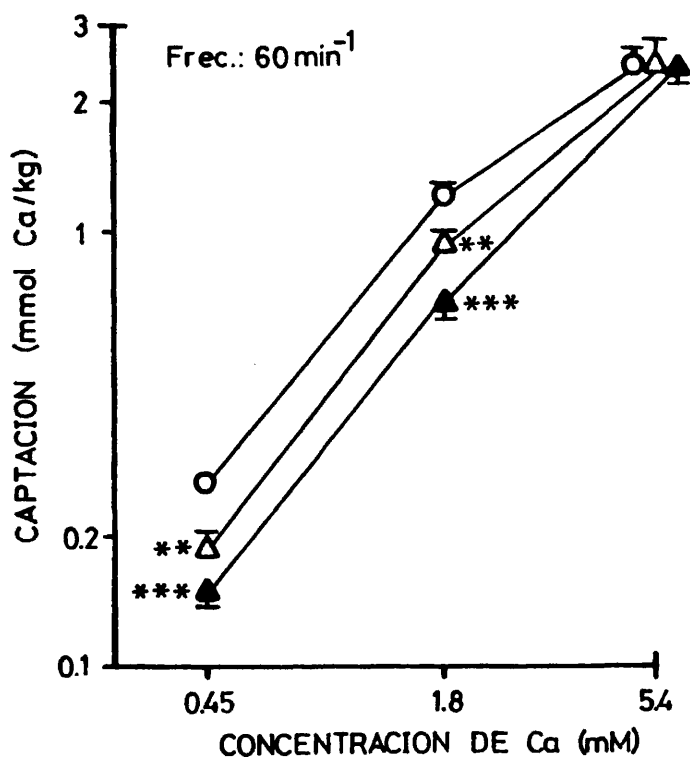


Figura 33.- Efecto de la somatostatina sobre la captación de <sup>45</sup>Ca en aurículas izquierdas, tras 5 minutos de exposición, a diferentes concentraciones extracelulares de calcio, manteniéndose una frecuencia de estimulación constante de 60 min<sup>-1</sup>. Ordenadas: captación de <sup>45</sup>Ca (mmol Ca/kg) en escala logarítmica. Abscisas: concentración extracelular de calcio (mM) en escala logarítmica. Cada punto representa la media ± E.S.M. de 4-16 experimentos.

(O) sin somatostatina,  
(Δ) somatostatina, 10<sup>-6</sup> M.  
(▲) somatostatina, 5x10<sup>-6</sup> M.

\*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

preparaciones, tras 5 minutos de exposición a  $^{45}\text{Ca}$  y a una frecuencia de estimulación de  $60 \text{ min}^{-1}$ , se traducía en un aumento de la captación desde  $0.267 \pm 0.009 \text{ mmol/kg}$  para una  $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 0.45 \text{ mM}$  hasta  $2.419 \pm 0.123 \text{ mmol/kg}$  para una  $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 5.4 \text{ mM}$ . Como muestra la figura 33, la somatostatina era capaz de disminuir la captación de  $^{45}\text{Ca}$  de una manera dosis-dependiente cuando las preparaciones se incubaban en concentraciones de calcio normales (1.8 mM) o bajas (0.45 mM); esta disminución resultaba ser estadísticamente significativa tanto para  $10^{-6} \text{ M}$  ( $P < 0.01$ ) como para  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  ( $P < 0.001$ ) de somatostatina. Sin embargo, la somatostatina no modificaba apenas la captación de  $^{45}\text{Ca}$  cuando el experimento se realizaba en presencia de una alta  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  (5.4 mM). En efecto, en estas condiciones la captación control, que era de  $2.419 \pm 0.123 \text{ mmol/kg}$ , descendió a  $2.415 \pm 0.291 \text{ mmol/kg}$  ( $P > 0.05$ ) y a  $2.406 \pm 0.297 \text{ mmol/kg}$  ( $P > 0.05$ ) tras la administración de  $10^{-6} \text{ M}$  y  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , respectivamente, de somatostatina.

La expresión porcentual de este fenómeno por el que el calcio parece antagonizar el efecto inhibitor de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  se representa en el diagrama de rectángulos de la figura 34. Una concentración de  $10^{-6} \text{ M}$  de somatostatina era capaz de deprimir la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en un  $29.74 \pm 4.26\%$  ( $P < 0.01$ ) en presencia de 0.45 mM de calcio, y en un  $24.92 \pm 5.04\%$  ( $P < 0.01$ ) en presencia de 1.8 mM de calcio; sin embargo, la misma dosis de hormona deprimía sólo

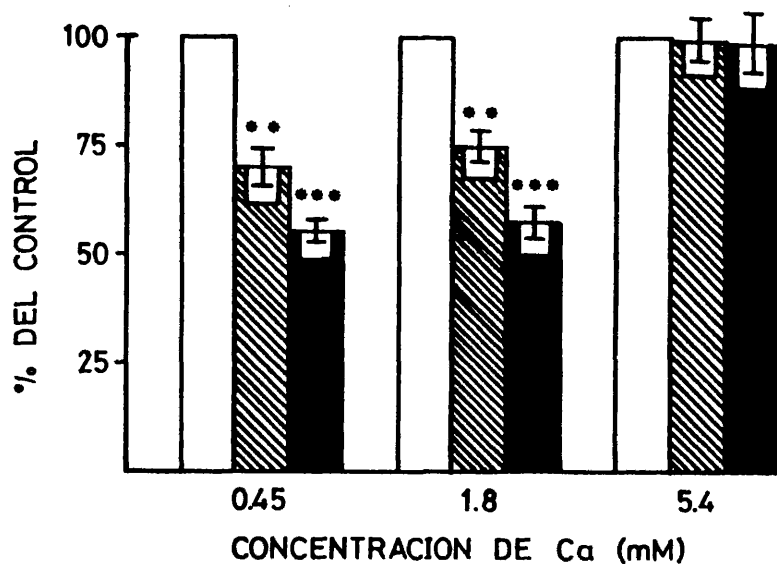


Figura 34.- Efecto de las variaciones de la concentración extracelular de calcio sobre la acción inhibitoria de la captación de <sup>45</sup>Ca ejercida por la somatostatina en aurículas izquierdas estimuladas a 60 min<sup>-1</sup> y tras un tiempo de exposición de 5 minutos. En ordenadas se representa el porcentaje de captación de <sup>45</sup>Ca con respecto al control sin somatostatina (considerado como 100%). En abscisas se representan las distintas concentraciones extracelulares de calcio. Las columnas blancas corresponden a los experimentos controles. El efecto de 10<sup>-6</sup> M y 5x10<sup>-6</sup> M de somatostatina se representa, respectivamente, por columnas rayadas y negras. Cada columna indica la media ± E.S.M. de 4-16 experimentos.

\*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

en un  $0.25 \pm 4.10\%$  ( $P > 0.05$ ) la captación cuando el medio de incubación contenía 5.4 mM de calcio. Un efecto análogo puede apreciarse con la concentración más alta,  $5 \times 10^{-6}$  M, de somatostatina ensayada.

Finalmente, hemos estudiado el efecto de la somatostatina sobre la curva que relaciona la captación de  $^{45}\text{Ca}$  con la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  cuando la frecuencia de estimulación se elevaba a  $180 \text{ min}^{-1}$ . En estas condiciones (figura 35) los resultados son muy similares a los obtenidos con una frecuencia de estimulación de  $60 \text{ min}^{-1}$ . La somatostatina,  $5 \times 10^{-6}$  M, redujo de una manera estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) la captación de  $^{45}\text{Ca}$  tanto en presencia de 0.45 mM como de 1.8 mM de calcio. No modificó, sin embargo, la captación cuando la solución de Tyrode contenía una concentración elevada de calcio.

En resumen, los experimentos realizados en presencia de distintas concentraciones de calcio en el líquido nutricio indican que la somatostatina producía una mayor inhibición de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  cuando se reducía la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  a 0.45 mM y que prácticamente dejaba de tener efecto en presencia de 5.4 mM de calcio. Estos resultados han sido comprobados tanto en condiciones de estimulación basales ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) como en preparaciones en las que se elevaba la frecuencia de estimulación a  $180 \text{ min}^{-1}$ .

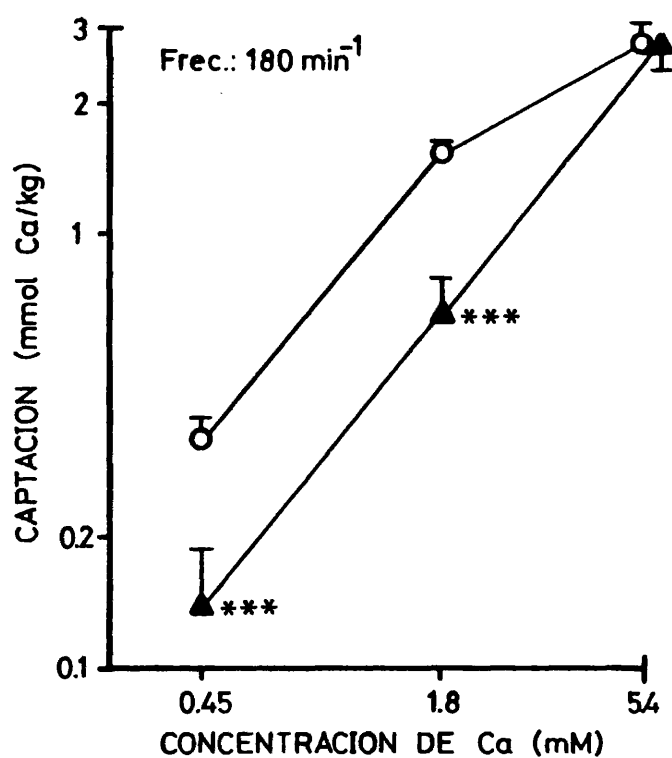


Figura 35.- Efecto de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas izquierdas, tras 5 minutos de exposición, a diferentes concentraciones extracelulares de calcio, manteniéndose una frecuencia de estimulación constante de  $180 \text{ min}^{-1}$ . Ordenadas: captación de  $^{45}\text{Ca}$  (mmol Ca/kg) en escala logarítmica. Abscisas: concentración extracelular de calcio (mM) en escala logarítmica. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de 4-10 experimentos.

(O) sin somatostatina,  
(▲) somatostatina,  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

\*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.5. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE EL FLUJO DE SALIDA DE <sup>45</sup>Ca

#### 3.5.1. AURICULAS IZQUIERDAS EN REPOSO

Hemos estudiado el efecto de la somatostatina sobre el flujo de salida de <sup>45</sup>Ca en aurículas izquierdas en reposo. Tras un periodo de incubación en <sup>45</sup>Ca de 2 horas de duración se realizaba el lavado de las preparaciones mediante la introducción de las mismas en diversos tubos que contenían solución de Tyrode no radiactiva. Los intervalos de tiempo de permanencia en estos tubos se controlaban estrechamente, y en algunos de ellos se había añadido previamente la concentración deseada de somatostatina ( $10^{-6}$  M o  $5 \times 10^{-6}$  M). El porcentaje de <sup>45</sup>Ca que quedaba en las preparaciones se calculaba para cada intervalo de tiempo y se representaba semilogarítmicamente frente al tiempo de lavado (figura 36).

En unos experimentos iniciales, realizados en 4 aurículas izquierdas en reposo, el porcentaje de <sup>45</sup>Ca que quedaba en las preparaciones al cabo de los 60 minutos que duraba el lavado era de un  $7.53 \pm 0.91\%$ . En estos experimentos (no representados) la somatostatina ( $10^{-6}$  M) no era capaz de modificar la curva de salida de <sup>45</sup>Ca. En 6 experimentos posteriores encontramos un

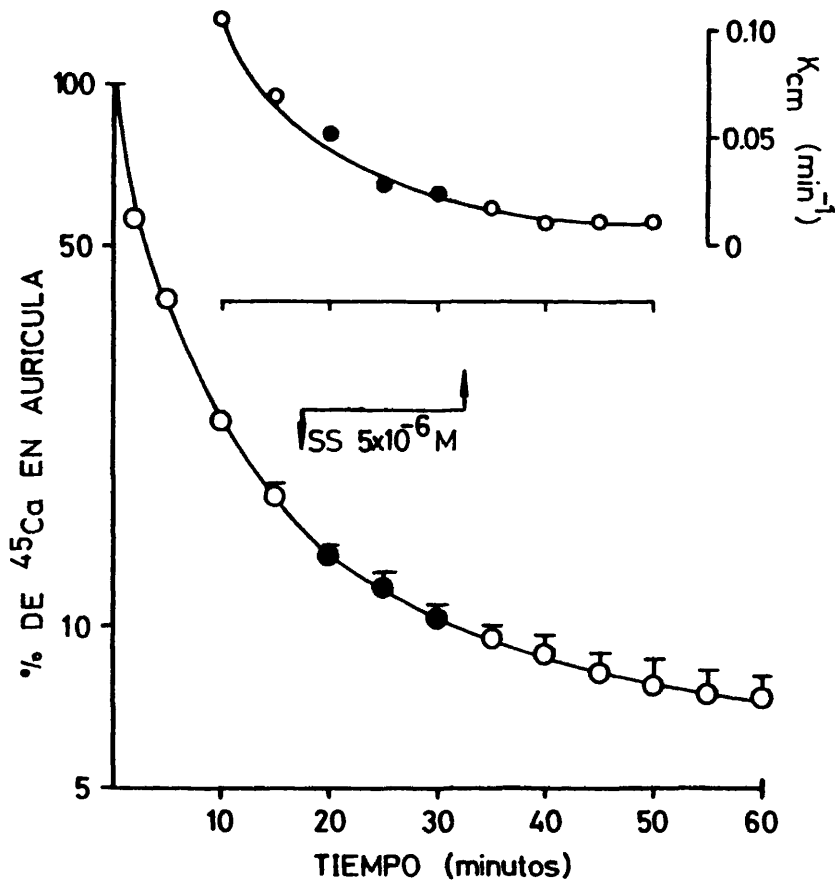


Figura 36.- Efecto de la somatostatina sobre el flujo de salida de <sup>45</sup>Ca en aurículas izquierdas no estimuladas e incubadas durante 2 horas en <sup>45</sup>Ca. Ordenadas: % de <sup>45</sup>Ca restante en las aurículas en escala logarítmica. Abscisas: tiempo (min). El panel superior muestra el efecto de la somatostatina sobre el coeficiente de velocidad de salida de <sup>45</sup>Ca (k<sub>cm</sub>). Cada punto representa la media + E.S.M. de 6 experimentos. Las flechas indican el intervalo de exposición a la somatostatina (5x10<sup>-6</sup> M).

porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en las aurículas a los 60 minutos de un  $7.41 \pm 0.72\%$ . En esta ocasión, utilizando  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina en los minutos 20 al 30 del lavado, tampoco pudimos observar ninguna modificación de la curva de salida de  $^{45}\text{Ca}$  ejercida por la somatostatina (figura 36).

Para evaluar la salida de  $^{45}\text{Ca}$  hemos empleado la aproximación empírica de REUTER y SEITZ (1968) y calculado el coeficiente de velocidad de salida de  $^{45}\text{Ca}$  desde las células auriculares al medio extracelular ( $k_{\text{cm}}$ ). El  $k_{\text{cm}}$  se calculaba como el cociente entre la pendiente de la curva en cada intervalo y el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en el punto medio del intervalo considerado (HOLLAND y cols., 1978). Ha sido demostrado que la velocidad de salida de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas de cobayo es función del cuadrado de la cantidad de calcio restante en el tejido (REUTER y SEITZ, 1968) y que esta relación da lugar a una línea recta al representar el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula frente al coeficiente de velocidad (HOLLAND y cols., 1978). Esta relación expresa la velocidad de salida como función de la cantidad de  $^{45}\text{Ca}$  restante en el tejido. En nuestros experimentos hemos encontrado, que esta relación se ajusta a una recta (figura 37), siendo el coeficiente de correlación obtenido en el ajuste por el método de mínimos cuadrados de 0.9921 ( $P < 0.001$ ), es decir, hemos encontrado una relación lineal entre el  $k_{\text{cm}}$  y el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$

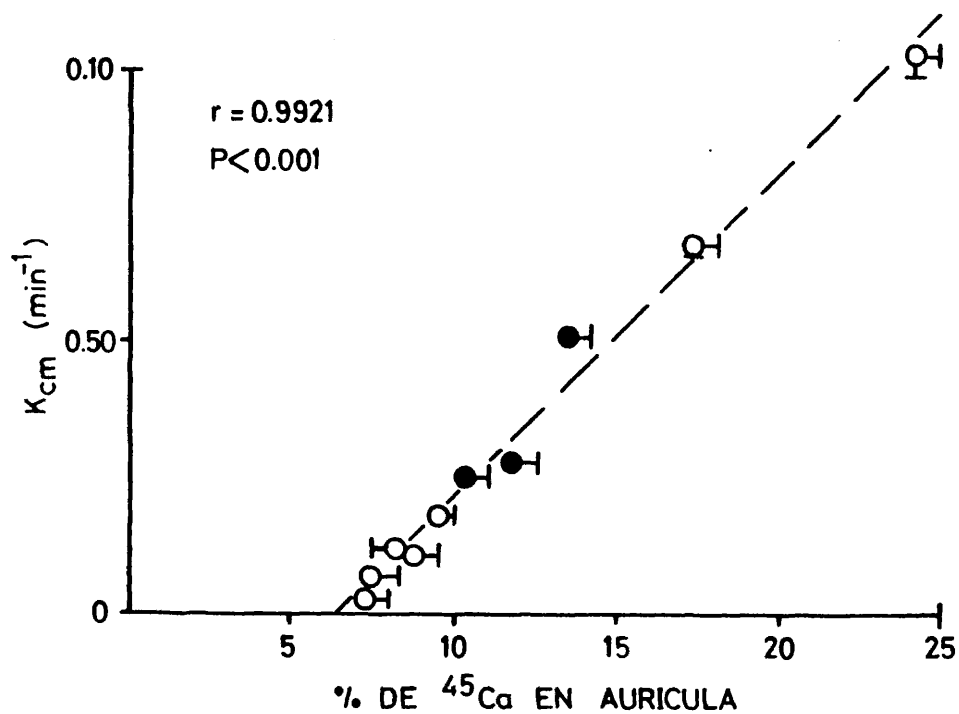


Figura 37.- Relación entre el coeficiente de velocidad de salida de  $^{45}\text{Ca}$  ( $k_{cm}$ ,  $\text{min}^{-1}$ , en ordenadas) y el % de  $^{45}\text{Ca}$  restante en las aurículas (en abscisas) en ausencia (○) y en presencia (●) de  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina. Datos tomados de los experimentos representados en la figura 36.

restante en las aurículas izquierdas no estimuladas eléctricamente sometidas a la acción de la somatostatina.

### 3.5.2. AURICULAS DERECHAS ESPONTANEAS

En otro grupo de experimentos hemos estudiado la influencia de la somatostatina ( $5 \times 10^{-6}$  M) sobre el flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas derechas espontáneas. El porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  que persistía en 6 aurículas derechas al cabo de los 60 minutos de lavado era de un  $7.07 \pm 0.87\%$ . En estas preparaciones la somatostatina alteraba ligeramente la curva de salida de  $^{45}\text{Ca}$  produciendo un incremento en el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  retenido por el tejido en los minutos en que fue aplicada (figura 38); ello parece indicar que de algún modo la somatostatina podría impedir la salida de  $^{45}\text{Ca}$  desde el interior celular. Si esto fuera cierto cabría esperar que se encontrara una elevación del  $k_{\text{cm}}$  inmediatamente después de que la somatostatina dejara de ejercer su acción. En efecto, hemos encontrado que durante el intervalo de tiempo de la acción de la somatostatina (minutos 20 al 30) el  $k_{\text{cm}}$  oscilaba entre  $0.043 \pm 0.002$  y  $0.040 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ , y que este parámetro se elevaba hasta  $0.059 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$  en el minuto 35, es decir, 5 minutos después del periodo de acción de la somatostatina (figura 38).

Como consecuencia de estos hallazgos, la relación

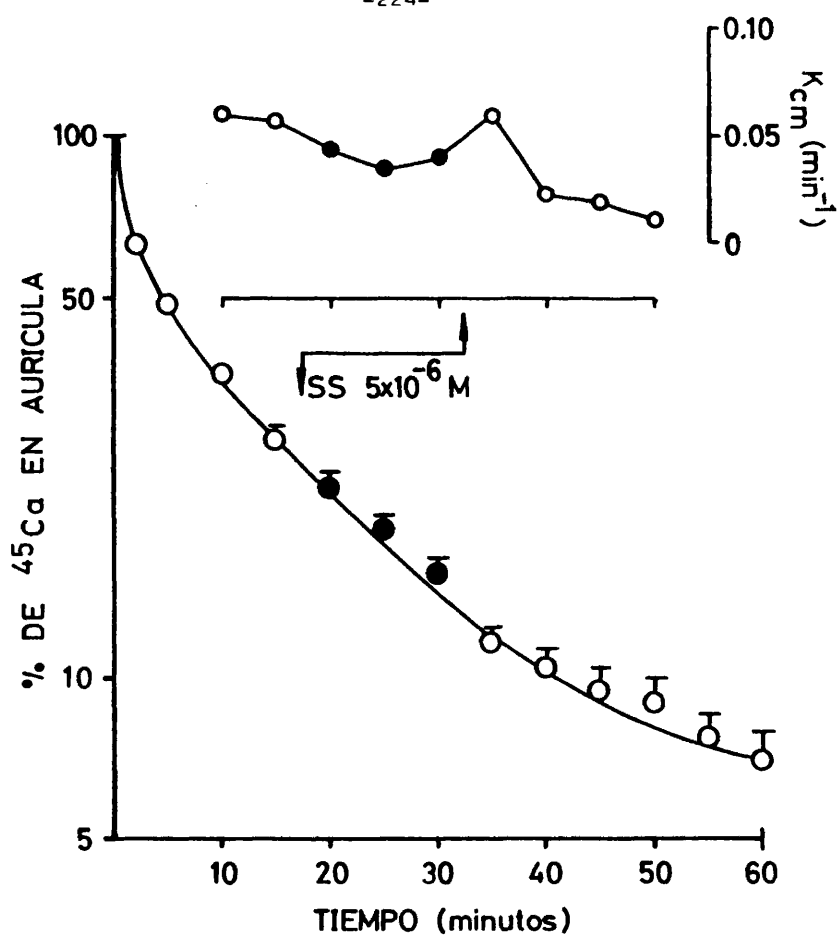


Figura 38.- Efecto de la somatostatina sobre el flujo de salida de <sup>45</sup>Ca en aurículas derechas espontáneas tras 2 horas de incubación en <sup>45</sup>Ca. Ordenadas: % de <sup>45</sup>Ca restante en las aurículas en escala logarítmica. Abscisas: tiempo (min). El panel superior muestra el efecto de la somatostatina sobre el coeficiente de velocidad de salida de <sup>45</sup>Ca (k<sub>cm</sub>). Cada punto representa la media + E.S.M. de 6 experimentos. Las flechas indican el intervalo de exposición a la somatostatina (5x10<sup>-6</sup> M).

existente entre el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en las aurículas y el coeficiente de velocidad  $k_{\text{cm}}$  obtenida en los experimentos de aurículas derechas quedaba ampliamente distorsionada y el ajuste lineal no era posible. No podemos afirmar, por tanto, que exista una relación lineal entre los dos parámetros mencionados en aurículas derechas sometidas a la acción de la somatostatina.



**IV. DISCUSSION**

---



En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de la somatostatina (STILAMIN<sup>R</sup>, Serono), tetradecapéptido cíclico inhibidor de la secreción de la hormona del crecimiento, sobre:

a) Las respuestas inotrópicas y cronotrópicas en aurículas aisladas de cobayo.

b) Los potenciales de acción registrados en fibras musculares auriculares y ventriculares de cobayo.

c) Los flujos de <sup>45</sup>Ca en aurículas aisladas de cobayo.

El rango de concentraciones utilizado en nuestro estudio ha sido de  $10^{-9}$  M a  $5 \times 10^{-6}$  M (1.64 a 8190 ng/ml). La elección de este intervalo se fundamentó en que, según nuestros experimentos iniciales, concentraciones menores a  $10^{-9}$  M eran prácticamente inactivas en las aurículas de cobayo, y, por otro lado, en que la dificultad para la obtención del producto nos impedía rebasar la concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M.

A continuación pasamos a discutir los resultados obtenidos así como los razonamientos llevados a cabo para proponer un mecanismo de acción específico de la somatostatina en el miocardio de cobayo.

### 1. RESPUESTAS INOTROPICAS Y CRONOTROPICAS

Los resultados de esta Tesis muestran que en las aurículas aisladas de cobayo la somatostatina producía una disminución dosis-dependiente de la amplitud de la fuerza contráctil similar a la observada previamente por otros autores (QUIRION y cols., 1979). Este efecto inotrópico negativo se acompañaba de un descenso paralelo de la velocidad máxima de desarrollo de fuerza contráctil ( $df/dt$  máx), si bien otros parámetros de la contracción, como son el tiempo hasta el máximo tensional y el tiempo total de contracción, no experimentaban modificaciones significativas por acción de la somatostatina. La disminución de la amplitud de las respuestas contráctiles alcanzaba en nuestras preparaciones una magnitud similar tanto en aurículas izquierdas como en aurículas derechas, siendo el efecto inotrópico negativo máximo conseguido con la más alta concentración de somatostatina ensayada ( $5 \times 10^{-6}$  M) de aproximadamente un 40% de reducción de la fuerza contráctil en ambas aurículas. Por tanto, la dosis eficaz 50 ( $DE_{50}$ ) de la somatostatina para este efecto no ha podido ser calculada ya que, por razones de disponibilidad del producto, no nos era posible utilizar concentraciones superiores a  $5 \times 10^{-6}$  M.

Por otra parte, en las aurículas derechas,

la somatostatina producía una ligera, aunque significativa, disminución de la frecuencia sinusal. Este efecto cronotrópico negativo, que alcanzaba un valor de aproximadamente un 7.5% a la concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina, no fue encontrado por QUIRION y cols. (1979), cuyos datos indicaban que la somatostatina no modificaba la frecuencia de latidos en las aurículas de cobayo. Las razones para explicar esta discrepancia parecen hallarse en varios hechos: en primer lugar, en el escaso número de experimentos realizados por los citados autores (únicamente 7); y, en segundo lugar, en que la máxima concentración de somatostatina por ellos empleada era de  $10^{-6}$  M. Por otra lado, estos autores no determinaron el tiempo de recuperación del nodo del seno (TRNS). El TRNS es un índice más sensible de la función sinusal que la frecuencia espontánea de latidos, y se ha mostrado útil en el desenmascaramiento de disfunciones sinusales ocultas (NARULA, 1975). Pues bien, nuestros resultados muestran que la somatostatina, a las dosis a las que enlentecía la frecuencia sinusal, era también capaz de prolongar el TRNS, lo cual pone de manifiesto una acción depresora del polipéptido sobre la función sinusal.

En las aurículas de cobayo una disminución de la frecuencia de las contracciones puede dar lugar a modificaciones en la amplitud de las mismas (fenómeno de la escalera, KOCH-WESER y BLINKS, 1963). Por tanto, dado que la depresión de la frecuencia sinusal producida

por la somatostatina era muy ligera, no es lógico esperar que el efecto inotrópico negativo de la somatostatina esté influenciado por una reducción paralela de la frecuencia de latidos. Esto explicaría por qué el efecto inotrópico negativo era similar en aurículas derechas espontáneas y en aurículas izquierdas estimuladas eléctricamente.

El manitol, monosacárido utilizado como excipiente en el preparado de somatostatina utilizado en esta Tesis, se mostraba inactivo per se en nuestras preparaciones, tanto en lo que se refiere a modificaciones en la frecuencia como en la amplitud de las contracciones, por lo que concluimos que todos los resultados experimentales obtenidos deben atribuirse exclusivamente a la somatostatina.

Otro de los hallazgos que debe ser reseñado como significativo es el efecto que las variaciones de la frecuencia de estimulación producían sobre las diversas acciones de la somatostatina. En fibras auriculares de cobayo un incremento progresivo de la frecuencia de estimulación desde 15 hasta 180 latidos por minuto producía una respuesta contráctil bifásica, disminuyendo la contractilidad al incrementar la frecuencia desde 15 a  $60 \text{ min}^{-1}$ , mientras que a frecuencias superiores la contractilidad aumentaba progresivamente (KOCH-WESER y BLINKS, 1963). En nuestros experimentos hemos comprobado que el efecto inotrópico negativo de la somatostatina era más marcado cuando las aurículas se conducían a frecuencias superiores a  $60 \text{ min}^{-1}$ . Como consecuencia

la somatostatina producía un desplazamiento dosis-dependiente hacia abajo de la curva que relaciona la fuerza contráctil con la frecuencia de estimulación y, además, originaba una inversión de la rama ascendente derecha de la citada curva. Resultados similares se han descrito con diversos antagonistas del calcio (McCANS y cols., 1974; BAYER y cols., 1975; McDONALD y cols., 1980; PELZER y cols., 1982; TUNG y MORAD, 1983; TEJERINA y cols., 1984). Este fenómeno frecuencia-dependiente podría reflejar un retraso en la reactivación de los canales lentos. La dependencia de la frecuencia y el retraso en el tiempo de reactivación del canal han sido explicados por un bloqueo utilización-dependiente de los canales lentos (McDONALD y cols., 1980). Es decir, un agente bloqueante de los canales lentos sería tanto más eficaz cuanto más frecuente sea la activación (utilización) de los canales, por ello, la somatostatina apenas es capaz de afectar la ISI a bajas frecuencias de estimulación, pero provoca una marcada depresión de la misma a frecuencias altas (TEJERINA y cols., 1984).

La somatostatina, según nuestros resultados, parece comportarse de una manera parecida a algunos antagonistas del calcio (por ejemplo, el verapamil). Muy en concordancia con estos hallazgos, hemos comprobado también que la disminución de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  que origina la somatostatina en las aurículas de cobayo (véase más adelante) puede potenciarse incrementando

la frecuencia de estimulación de las mismas. Por el contrario, una disminución de la frecuencia y, por tanto, una menor utilización de los canales lentos disminuye, y en algunas ocasiones llega a abolir, el efecto de la hormona.

A la vista de los anteriores resultados nos hemos preguntado cuál podría ser el mecanismo de acción de la somatostatina en el miocardio aislado de cobayo que explicase sus acciones cronotrópica e inotrópica negativas. Dado que la somatostatina es un compuesto de naturaleza peptídica con un peso molecular relativamente elevado (1638) que limita su penetración a través del sarcolema, parece razonable pensar que su principal lugar de acción fuera la superficie externa de la membrana celular. El rápido comienzo de su acción inotrópica negativa, así como la rápida desaparición de este efecto tras el lavado de las preparaciones parecen apoyar esta hipótesis. Más aún, QUIRION y cols. (1979) demostraron que una mezcla de bloqueantes de receptores específicos cardíacos no modificaba el efecto inotrópico negativo de la somatostatina, lo que sugería indirectamente la posible existencia de receptores específicos para somatostatina en el sarcolema de las fibras auriculares de cobayo (véase apartado 9.1 de la Introducción). Esta posibilidad no es remota ya que otros autores han identificado receptores que fijan somatostatina en diversos tejidos, tales como la hipófisis de rata (AGUILERA y

PARKER, 1982; SRIKANT y PATEL, 1982), células tumorales de hipófisis de rata (SCHONBRUNN y TASHJIAN, 1978; REUBI y cols., 1982), membranas celulares de hipófisis bovinas (LEITNER y cols., 1979) y sinaptosomas cerebrales de rata (SRIKANT y PATEL, 1981b).

Algunos de nuestros datos experimentales parecen, además, descartar la posibilidad de que la somatostatina pudiera ejercer parte de sus efectos cardíacos a través de un mecanismo de acción intracelular. En efecto, hemos encontrado que la somatostatina, a las mismas concentraciones a las que disminuye la fuerza contráctil, no es capaz de modificar los valores absolutos de la potenciación post-extrasistólica. El mecanismo íntimo de esta potenciación ha sido explicado a través de un aumento de la concentración de calcio en los depósitos intracelulares debido a un incremento del flujo de entrada de calcio inducido por el segundo potencial de acción (EDMONDS y cols., 1972). Asumiendo que esta teoría sea correcta, podría esperarse que la somatostatina no modificase en absoluto la magnitud total de la potenciación post-extrasistólica si el polipéptido fuese incapaz de ejercer algún efecto sobre la movilización del calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico. En nuestros experimentos la somatostatina no modificaba la potenciación post-extrasistólica en valores absolutos, por tanto, el incremento porcentual que experimentaba esta potenciación por acción del polipéptido se explicaría simplemente

por la acción inotrópica negativa que desarrolla esta hormona como consecuencia de su capacidad para bloquear el flujo de entrada de calcio (véase más adelante).

Por otro lado, la somatostatina no modificaba en nuestras preparaciones la cinética de movilización del calcio desde sus depósitos intracelulares, según muestran los resultados obtenidos en las curvas que relacionan el intervalo de reposo con la amplitud contráctil. La somatostatina reducía la fuerza contráctil desarrollada a todos los intervalos de reposo estudiados, si bien este efecto era más pronunciado a intervalos de reposo cortos y no alcanzaba diferencias significativas a intervalos mayores a ninguna de las concentraciones empleadas. La amplitud de la contracción de prueba inducida tras el intervalo de reposo parece estar determinada por el calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico al comienzo del citado intervalo (BAYER y cols., 1975; BASS, 1976; BARRIGON y cols., 1982; DIEZ y cols., 1984). Por tanto, la incapacidad de la somatostatina para modificar significativamente estas curvas, junto con la ausencia de modificaciones en las constantes de tiempo de las mismas, nos permiten afirmar que el efecto inotrópico negativo del polipéptido no se debía a una disminución de la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares que almacenan este catión.

Resumiendo este punto podemos concluir que la acción de la somatostatina en el miocardio aislado

de cobayo posiblemente depende de una interacción de esta hormona con un receptor específico situado en la superficie externa del sarcolema. A pesar de que algunos autores han demostrado, en otros tejidos, receptores intracelulares para somatostatina (REYL y LEWIN, 1982), o internalización del péptido tras su interacción con receptores de membrana (ESTEVE y cols., 1982), ninguno de nuestros datos experimentales nos permite afirmar que la somatostatina desempeñe algún tipo de acción intracelular en las aurículas aisladas de cobayo.

La acción inotrópica negativa de la somatostatina en nuestras preparaciones era influenciada de manera importante por las concentraciones extracelulares de calcio ( $[Ca^{2+}]_o$ ) y sodio ( $[Na^+]_o$ ). Efectivamente, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_o$  desde 1.8 mM hasta 5.4 ó 7.0 mM reducía claramente el efecto inotrópico negativo de la somatostatina, mientras que en presencia de una  $[Ca^{2+}]_o$  de 0.9 mM la somatostatina seguía siendo capaz de disminuir significativamente la fuerza contráctil auricular. Es decir, el calcio era capaz de antagonizar la acción inotrópica negativa de la somatostatina. Por otra parte, la incubación de las preparaciones con solución de Tyrode cuya  $[Na^+]_o$  se había reducido en un 30% disminuía significativamente el efecto inotrópico negativo de la somatostatina. Dado que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_o$  y la reducción en la  $[Na^+]_o$  son dos situaciones en las que el flujo de entrada de calcio a las células

auriculares se encuentra aumentado (NIEDERGERKE, 1963; LANGER, 1973) estos resultados sugieren que los efectos cronotrópico e inotrópico negativos que presenta la somatostatina podrían ser debidos, al menos en parte, a una disminución del flujo de entrada de calcio en las fibras auriculares. A una conclusión similar conduce el hallazgo de que el efecto inotrópico negativo que presenta la somatostatina en aurículas derechas e izquierdas podía revertirse al incrementar la  $[Ca^{2+}]_o$  desde 1.8 mM hasta 3.6 mM, o al adicionar al baño isoproterenol ( $10^{-6}$  M), un fármaco que incrementa el flujo de entrada de calcio a través de los canales lentos de la membrana de las fibras auriculares (REUTER, 1974; REUTER y SCHOLZ, 1977).

La somatostatina, a concentraciones capaces de disminuir significativamente la fuerza contráctil, no alteraba en nuestros experimentos las máximas respuestas cronotrópicas e inotrópicas inducidas por el isoproterenol, lo que confirma (QUIRION y cols., 1979) que el polipéptido carece de propiedades bloqueantes de receptores beta-1 adrenérgicos cardíacos y que su acción inotrópica negativa no es consecuencia del bloqueo de una adenil-ciclasa activada por catecolaminas.

Un antagonismo entre calcio y somatostatina similar al anteriormente descrito ha podido ser demostrado también en islotes pancreáticos (CURRY y BENNET, 1974; TAMINATO y cols., 1975; FUJIMOTO y ENSINCK, 1976), células

antrales gástricas (BOLMAN y cols., 1978) y en células somatotrópicas purificadas (KRAICER y SPENCE, 1981). QUIRION y cols. (1979) también publicaron unos resultados similares a los nuestros en aurículas de cobayo. Tomados en conjunto, todos estos datos indican que la somatostatina podría interferir con el transporte de calcio al interior celular en diversos tipos tisulares. Esta afirmación se ha visto confirmada por el hecho de que el efecto antisecretor de la somatostatina podía ser revertido por un aumento en la  $|Ca^{2+}|_0$  o por el ionóforo A23187, compuesto que incrementa la permeabilidad al calcio en las membranas celulares (FUJIMOTO y ENSINCK, 1976; KRAICER y SPENCE, 1981). Más aún, el incremento en el flujo de entrada de calcio originado por altas concentraciones de potasio y por el propio ionóforo A23187 puede ser disminuido por la somatostatina (BICKNELL y SCHOFIELD, 1976; SCHOFIELD y BICKNELL, 1978; KRAICER y SPENCE, 1981).

## 2. POTENCIALES DE ACCION RAPIDOS Y LENTOS CARDIACOS

### 2.1. POTENCIALES RAPIDOS

Con el fin de caracterizar los efectos electrofisiológicos de la somatostatina hemos estudiado sus efectos sobre los potenciales de acción rápidos de fibras musculares auriculares y ventriculares perfundidas con solución de Tyrode. En ambos tipos de fibras la fase 0 de rápida despolarización es debida a la activación de una corriente rápida de entrada de sodio,  $I_{Na}$  (DECK y TRAUTWEIN, 1964; DUDEL y cols., 1967; BEELER y REUTER, 1970; TRAUTWEIN, 1973; NOBLE, 1979; CARMELIET y VERECKE, 1979). La conductancia al sodio ( $g_{Na}$ ) es, por tanto, responsable de la amplitud y velocidad máxima de despolarización ( $V_{máx}$ ) de dichos potenciales de acción (WEIDMANN, 1955). En nuestros experimentos la somatostatina no era capaz, a ninguna de las concentraciones ensayadas, de modificar ni la amplitud ni la  $V_{máx}$  de los potenciales de acción registrados en fibras auriculares y ventriculares, lo que sugiere que la somatostatina no produce ningún efecto depresor sobre la activación de la  $I_{Na}$  en las células cardíacas.

La repolarización de las fibras musculares

de cobayo ha sido atribuida al juego de dos corrientes de signo opuesto: la activación de la corriente lenta de entrada de calcio o  $ISi$  (REUTER, 1967; BEELER y REUTER, 1970; GIEBISCH y WEIDMANN, 1971; TRAUTWEIN, 1973; NOBLE, 1979; ZIPES y cols., 1982) y la activación de una corriente de salida de potasio o  $IX_1$  (NOBLE y TSIEN, 1968; NOBLE, 1979). La activación de la  $ISi$  parece ser responsable de la fase 2 o "plateau" del potencial de acción de las células musculares, siendo la inactivación de la  $ISi$  junto con la activación de la  $IX_1$  los mecanismos iónicos responsables de la fase 3 de rápida repolarización final (GIEBISCH y WEIDMANN, 1971; CARMELIET y VEREECKE, 1979).

Nuestros resultados demuestran que en fibras musculares auriculares la somatostatina producía un acortamiento dosis-dependiente de la duración del potencial de acción medido al 50% de repolarización ( $DPA_{50}$ ), lo que sugiere que este polipéptido podría inhibir la activación de la  $ISi$ . Ello conduciría a una disminución de la amplitud y duración de la fase 2 del potencial de acción que explicaría nuestros hallazgos. Sin embargo, y aunque en fibras musculares no está tan bien demostrado como en las fibras de Purkinje, se ha demostrado que la entrada de calcio a través de los canales lentos es capaz de activar la conductancia al potasio ( $gK$ ), responsable de la fase 3 del potencial de acción (ISENBERG, 1977a, 1977b, 1977c). Ello implicaría que la somatostatina

al inhibir la ISI debería reducir la  $g_K$  y, por tanto, prolongar la fase final de la repolarización, por lo que la duración del potencial de acción al 90% de repolarización ( $DPA_{90}$ ) no debería modificarse o incluso debería prolongarse con respecto a los valores controles. Sin embargo, en nuestros experimentos la somatostatina producía un acortamiento de la  $DPA_{90}$  de las fibras auriculares, lo que sugeriría que esta hormona podría incrementar la  $g_K$  contrarrestando el efecto que la inhibición de la ISI ejerce sobre la  $IX_1$ . De hecho, PACE y TARVIN (1981) han podido demostrar que, en células B pancreáticas, la somatostatina incrementa la permeabilidad al potasio y aumenta la salida de  $^{86}\text{Rb}$ , radioisótopo utilizado como indicador de los movimientos de potasio.

En las fibras ventriculares la somatostatina ejerce un efecto bifásico sobre la  $DPA_{50}$  y la  $DPA_{90}$ : a concentraciones menores o iguales a  $10^{-8}$  M acorta la duración del potencial de acción de forma similar a lo observado en las fibras auriculares, sin embargo, a concentraciones superiores la somatostatina prolonga tanto la  $DPA_{50}$  como la  $DPA_{90}$ , alcanzándose a la concentración de  $10^{-6}$  M valores similares a los hallados en condiciones control. Es difícil explicar esta conducta bifásica de la somatostatina sobre la duración del potencial de acción de las fibras ventriculares. No obstante, es bien conocido que las características de la  $IX_1$  son diferentes en ambos tejidos y que existen fármacos,

como por ejemplo la lidocaína (KABELA, 1973) o la adenosina (BELHASSEN y PELLEG, 1984) que ejercen efectos opuestos en fibras musculares auriculares y ventriculares. Más aún, la adenosina (BELHASSEN y PELLEG, 1984) no parece inhibir la ISI en las fibras musculares ventriculares y, sin embargo, es capaz de inhibir claramente esta corriente en las fibras musculares auriculares. Sería pues posible que en las fibras musculares ventriculares a dosis bajas la somatostatina inhibiese la ISI e incrementase la  $IX_1$ , mientras que a dosis altas la inhibición de la ISI redujese la  $IX_1$ , siendo este último efecto el predominante, con lo que aparecería una progresiva prolongación de la  $DPA_{50}$  y de la  $DPA_{90}$ .

Finalmente, en fibras musculares auriculares la somatostatina no sólo acortaba la  $DPA_{90}$ , sino que también producía un acortamiento paralelo del periodo refractario efectivo (PRE) y del tiempo de recuperación (TR) auriculares. Por otro lado, en las fibras ventriculares, la somatostatina daba lugar a una respuesta bifásica del PRE y del TR similar a la observada en la  $DPA_{90}$ . Sin embargo, las modificaciones originadas sobre el PRE y el TR parecen explicarse exclusivamente por las modificaciones que la somatostatina ejerce sobre la  $DPA_{90}$ , y esto parece ser cierto tanto en las fibras auriculares como en las ventriculares. En efecto, en ambos tipos de fibras hemos comprobado una correlación lineal significativa entre los cambios producidos por

la somatostatina sobre la  $DPA_{90}$  y el PRE, y que la recta de regresión no difiere sensiblemente de la línea de identidad. Más aún, como índice de este paralelismo hemos observado que los cocientes  $PRE/DPA_{90}$  y  $PRE/TR$  no se modificaban significativamente a ninguna de las concentraciones de somatostatina estudiadas, tanto en fibras auriculares como en fibras ventriculares.

Dado que el PRE y el TR son dos parámetros que permiten evaluar la reactivación de la INa (SEKIYA y VAUGHAN WILLIAMS, 1963; GETTES y REUTER, 1974; TAMARGO y cols., 1979) nuestros resultados parecen concluir que la somatostatina no modifica ni la activación ni la reactivación de la INa tanto en las fibras musculares auriculares como ventriculares de cobayo.

## 2.2. POTENCIALES LENTOS

Otro de los resultados que apoyan la hipótesis de la acción inhibidora del flujo de entrada de calcio por parte de la somatostatina son los referentes a los efectos de esta hormona sobre las llamadas respuestas cardíacas lentas. Como ya se ha mencionado, las respuestas lentas se obtienen en fibras musculares auriculares o ventriculares en las que el potencial de membrana se ha despolarizado por encima del potencial umbral de activación de la INa (-55 mV); es decir, en estas

fibras la INa está completamente inactivada (DUDEL y RUDEL, 1970). Esta despolarización parcial de las fibras cardíacas puede inducirse incrementando la concentración extracelular de potasio ( $|K^+|_o$ ) por encima de 22 mM (WEIDMANN, 1955; REUTER, 1973). En presencia de esta elevada  $|K^+|_o$  las fibras se hacen inexcitables. La excitabilidad cardíaca puede ser restaurada por agentes que incrementan la conductancia al calcio a través de los canales lentos, tales como las catecolaminas (isoproterenol) o los inhibidores de fosfodiesterasa (cafeína) (REUTER, 1967; PAPPANO, 1970; REUTER y SCHOLTZ, 1977). El verapamil y otros antagonistas del calcio, así como la hiperpolarización de la membrana cardíaca son capaces de inhibir estas respuestas (GILMOUR y ZIPES, 1983). Las características de los potenciales de acción responsables de las respuestas lentas son muy similares a las existentes normalmente en los potenciales de acción de los nodos sinusal y aurículo-ventricular (AV) (CARMELIET y VEREECKE, 1979); su fase 0 es debida a la activación de la ISi, por lo que la amplitud y la V máx del potencial de acción son pequeños, lo que explica la lenta velocidad de conducción de estas respuestas (CRANEFIELD, 1975). La repolarización de estos potenciales se debe, por una parte, a la inactivación de la ISi y, por otra, a la activación de la corriente de salida de potasio  $I_{X_1}$ .

En consecuencia, el registro de los potenciales

de acción lentos inducidos en aurículas parcialmente despolarizadas nos permitía estudiar el flujo de entrada de calcio a través de los canales lentos (restauración de la excitabilidad) y, por lo tanto, estudiar los efectos de la somatostatina sobre la ISI sin necesidad de recurrir a técnicas de clamp de voltaje (TRITTHART y cols., 1973). La somatostatina producía en nuestras preparaciones una disminución dosis-dependiente de las contracciones lentas inducidas por isoproterenol en aurículas despolarizadas por potasio. Además, el polipéptido deprimía también de modo dosis-dependiente la amplitud y la  $V_{\text{máx}}$  de los potenciales de acción lentos inducidos por el isoproterenol o por la cafeína en fibras auriculares despolarizadas. Ambas acciones tenían lugar en el mismo rango de concentraciones de somatostatina capaces de producir efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos en aurículas incubadas en solución de Tyrode normal. Por lo tanto, la acción inhibitoria de la somatostatina sobre las respuestas lentas sugiere claramente que su efecto inotrópico negativo se debería, al menos en parte, a una inhibición del flujo de entrada de calcio a través de los canales lentos.

Por otra parte, la somatostatina también originaba una reducción dosis-dependiente tanto de la  $DPA_{50}$  como de la  $DPA_{90}$  de las respuestas lentas auriculares. Ello sugiere que parte de los efectos de la somatostatina podrían ser explicados por un incremento en la  $gK$  que

sería responsable de esta aceleración de la repolarización y, en consecuencia, del acortamiento de la duración de los potenciales lentos. Una consideración similar se mencionó anteriormente a propósito de los potenciales rápidos.

### 3. FLUJOS DE $^{45}\text{Ca}$

En último término, para confirmar nuestra hipótesis de que el mecanismo responsable de la acción inotrópica negativa de la somatostatina era consecuencia de su capacidad para inhibir el flujo de entrada de calcio, hemos llevado a cabo una serie de experimentos encaminados a determinar los efectos de esta hormona sobre los flujos de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas aisladas de cobayo. Es un hecho conocido que la incubación de las aurículas de cobayo en un líquido nutricio que contenga  $^{45}\text{Ca}$  origina una captación de este radioisótopo, y que esta captación puede incrementarse al aumentar la frecuencia de estimulación o tras la elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  (GROSSMAN y FURCHGOTT, 1964a, 1964b). También ha podido demostrarse que algunos compuestos capaces de producir un efecto inotrópico positivo por incrementar el flujo de entrada de calcio en las fibras cardíacas son capaces de producir un aumento de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  (HOLLAND y cols., 1978; BARRIGON y cols., 1982). Nuestros resultados muestran que la somatostatina producía una reducción dosis-dependiente de la captación de  $^{45}\text{Ca}$ . Esta reducción se ponía de manifiesto a los 5 y 10 minutos de incubación con  $^{45}\text{Ca}$  con  $10^{-6}$  M de somatostatina, y a los 2, 5 y 10 minutos con  $5 \times 10^{-6}$  M de somatostatina. Ello parece

pues confirmar que una disminución en el flujo de entrada de calcio sería responsable de la acción inotrópica negativa de esta hormona. Resultados similares han sido descritos por OLIVER (1976), quien demostró que la somatostatina inhibía la captación de  $^{45}\text{Ca}$  estimulada por 16.7 mM de glucosa en islotes pancreáticos aislados de rata incubados en un medio con baja  $|\text{Ca}^{2+}|_o$ .

Nosotros, además, hemos podido comprobar que el efecto de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas de cobayo podía potenciarse mediante una reducción de la  $|\text{Ca}^{2+}|_o$ . En efecto, en presencia de una  $|\text{Ca}^{2+}|_o$  de 0.45 mM la somatostatina producía una mayor inhibición de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  que cuando las preparaciones se incubaban con 1.8 mM de calcio. Por el contrario, la elevación de la  $|\text{Ca}^{2+}|_o$  hasta 5.4 mM anulaba prácticamente todo efecto de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$ . Por lo tanto, la dependencia de la  $|\text{Ca}^{2+}|_o$  que muestra el efecto de la somatostatina sobre la captación de  $^{45}\text{Ca}$  resulta muy similar a la que ya se comentó previamente con respecto a la acción inotrópica negativa del polipéptido.

Igualmente, hemos podido demostrar que así como el efecto inotrópico negativo de la somatostatina era más marcado a frecuencias rápidas ( $180 \text{ min}^{-1}$ ) que a frecuencias lentas ( $15 \text{ min}^{-1}$ ), la somatostatina también producía una inhibición de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  que era más marcada a altas frecuencias que a bajas frecuencias

de estimulación.

Por otra parte, nuestros experimentos de flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas izquierdas en reposo, demuestran que la somatostatina carecía de efectos sobre la curva de lavado de  $^{45}\text{Ca}$  tras 2 horas de incubación en solución de Tyrode radiactiva. La somatostatina carecía también de efectos significativos sobre el coeficiente de velocidad de salida de  $^{45}\text{Ca}$  ( $k_{\text{cm}}$ ) y no modificaba la relación existente entre el  $k_{\text{cm}}$  y el  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula. Estos datos tomados en conjunto sugieren que la somatostatina no ejerce ningún efecto sobre el flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas en reposo.

Sin embargo, la somatostatina ( $5 \times 10^{-6}$  M) producía una ligera disminución de la salida de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas derechas espontáneas que se manifestaba por un discreto aumento en el  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula en presencia de somatostatina, y por una brusca elevación del  $k_{\text{cm}}$  5 minutos después de la retirada de la hormona. La interpretación de las diferencias encontradas entre las aurículas derechas e izquierdas podría atribuirse quizás al hecho de que los movimientos de calcio a través del sarcolema se encuentran muy atenuados en el miocardio en reposo (LANGER, 1973; KATZ, 1983); en cualquier caso el significado que pueda tener el leve descenso de la salida de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas derechas sometidas a la acción de la somatostatina permanece poco claro. Sería posible, quizás, que la somatostatina, a altas

-249-

concentraciones fuese capaz de bloquear de un modo inespecífico no sólo la entrada de calcio, sino también la salida de este ión y tal vez de otros iones.

#### 4. REPERCUSIONES CLINICAS

Antes de finalizar esta discusión es conveniente enunciar algunas consideraciones sobre la importancia clínica que puedan revestir los resultados presentados en esta Tesis. En primer lugar, hay que hacer notar que el intervalo de concentraciones de somatostatina utilizado en nuestros experimentos, comprendido entre  $10^{-9}$  M y  $5 \times 10^{-6}$  M (1.64 a 8190 ng/ml), rebasa con mucho los niveles plasmáticos de esta hormona existentes en los sujetos normales, que oscilan entre 50 y 70 pg/ml según unos autores (KRONHEIM y cols., 1978; WRIGHT y cols., 1980; MACKES y cols., 1981), o entre 100 y 675 pg/ml según otros (LARSSON y cols., 1977; GALMICHE y cols., 1978; PIPELEERS y cols., 1979) (tabla 2). Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 3, muchos de los valores de concentración plasmática de somatostatina en pacientes con somatostatinooma están comprendidos en el intervalo de concentraciones utilizado por nosotros. Los pacientes portadores de este tipo de tumor poseen, en promedio, unos niveles plasmáticos de somatostatina que oscilan entre 1000 y 30000 pg/ml (GALMICHE y cols., 1978; KREJS y cols., 1979; PIPELEERS y cols., 1979; PENMAN y cols., 1980a; PATEL y cols., 1983). Más aún, la producción de somatostatina por tumores de naturaleza no endocrina

(secreción ectópica) da lugar también a niveles plasmáticos muy elevados de esta hormona, situados entre 38 y 403 ng/ml (PENMAN y cols., 1980b). En estos dos últimos grupos de pacientes podría ser posible observar algunos de los efectos cardiodepresores de la somatostatina descritos en esta Tesis.

Otro aspecto interesante que merece ser tenido en cuenta es el hecho de que la somatostatina ha sido utilizada en un gran número de procesos gastrointestinales severos, como hemorragias digestivas (KAYASSEH y cols., 1980; RENE y cols., 1980; MIKHAILIDIS y cols., 1981) y pancreatitis agudas (USADEL y cols., 1980; SZABO y USADEL, 1982), que requieren la administración de grandes dosis de la hormona por vía intravenosa. Parece razonable pensar que una dosis de 250  $\mu$ g de somatostatina inyectada en forma de bolo intravenoso, seguida de la infusión de 250  $\mu$ g/hora, tal como recomiendan algunos autores (RENE y cols., 1980) para el tratamiento de los procesos gastrointestinales mencionados, origine en las estructuras cardíacas concentraciones de hormona suficientes como para provocar algunos de los efectos descritos por nosotros en el miocardio aislado de cobayo.

Las repercusiones clínicas que la somatostatina podría originar en los grupos de pacientes mencionados pueden deducirse de sus efectos sobre las propiedades electromecánicas de las células cardíacas. Dado que la somatostatina no altera ni la amplitud ni la V máx

de los potenciales de acción auriculares y ventriculares parece improbable que modifique la excitabilidad y la velocidad de conducción en las fibras de trabajo de aurículas y ventrículos del corazón humano, factores que dependen fundamentalmente de la activación de la INa. Sin embargo, en las células de los nodos sinusal y AV, en las que la INa está parcialmente inactivada, y en las que la fase 0 del potencial de acción depende fundamentalmente de la activación de la ISi (CARMELIET y VEREECKE, 1979), es posible que se observen algunos efectos de la somatostatina. Por tanto, los efectos inhibidores de esta hormona sobre la ISi podrían dar lugar a bradicardia sinusal y a un cierto grado de retraso en la conducción AV. En efecto, LUNDBAEK (1978) señalaba, entre los efectos indeseables de la administración crónica de somatostatina, la producción de una disminución de la frecuencia cardíaca. GRECO y cols. (1984) refieren también una disminución de la frecuencia de latidos en un grupo de pacientes con psoriasis tratados con somatostatina.

Por otra parte, el enlentecimiento de la conducción AV originado por la somatostatina podría llegar a interrumpir una taquicardia por reentrada que utilizase el nodo AV como parte de su circuito. De hecho, ha podido demostrarse recientemente (GRECO y cols., 1984) que en cinco de seis pacientes con taquicardia supraventricular paroxística o taquicardia de la unión

la administración intravenosa de 175-200 µg de somatostatina conseguía en pocos minutos restablecer el ritmo sinusal. Este efecto era precedido por una disociación AV variable y transitoria, lo cual sugería que el efecto de la somatostatina sobre la taquicardia supraventricular se debía muy probablemente a una acción depresora sobre el nodo AV, tal vez relacionada con una inhibición del flujo de entrada de calcio a través de los canales lentos.

La demostración por parte de ROSENTHAL y cols. (1978a, 1978b) de que la infusión intravenosa de somatostatina en pacientes hipertensos originaba un descenso del volumen minuto cardíaco y del volumen por latido es otro argumento a favor de que esta hormona ejerce una acción depresora en el corazón humano.

El efecto hipotensor de la somatostatina que han descrito algunos autores (MOULOPOULOS y cols., 1978) también podría explicarse por una inhibición del flujo de entrada de calcio en el músculo liso vascular, similar al que se produce en el miocardio, sin embargo, este aspecto farmacodinámico no ha sido estudiado aún en profundidad.

Por todo lo hasta aquí referido, pensamos que los posibles efectos cardiodepresores de la somatostatina en el hombre deberían ser tenidos en cuenta cuando esta hormona o sus análogos se utilizasen como agentes terapéuticos en el tratamiento de diversos procesos patológicos.



254

## V. CONCLUSIONES



1. En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de la somatostatina sintética (STILAMIN<sup>R</sup>, Serono;  $10^{-9}$  M a  $5 \times 10^{-9}$  M) sobre:

a) Las propiedades inotrópicas y cronotrópicas de las aurículas aisladas de cobayo.

b) Los potenciales de acción registrados en aurículas y músculos papilares aislados de cobayo.

c) Los flujos de <sup>45</sup>Ca en aurículas aisladas de cobayo.

2. La somatostatina producía una disminución dosis-dependiente de la amplitud de las contracciones y de la frecuencia sinusal en aurículas derechas espontáneas, y una disminución de la amplitud de las contracciones, así como de la  $df/dt$  máx, en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. Estos efectos podían revertirse mediante el lavado de las preparaciones o bien al incrementar la  $[Ca^{2+}]_o$  o al adicionar isoproterenol al baño. Asimismo, estos efectos no eran compartidos por el manitol, excipiente que acompaña a la somatostatina sintética.

3. En aurículas derechas espontáneas la somatostatina producía una prolongación del tiempo de recuperación del nodo del seno y una disminución de la máxima frecuencia de estimulación auricular.

4. En aurículas izquierdas estimuladas a diversas frecuencias, la somatostatina producía un desplazamiento dosis-dependiente hacia abajo de la curva que relaciona la fuerza contráctil con la frecuencia de estimulación. Asimismo, la somatostatina desplazaba hacia abajo de una manera dosis-dependiente la curva que relaciona el intervalo de reposo con la amplitud contráctil, si bien este desplazamiento sólo resultaba significativo para cortos intervalos de reposo. Sin embargo, el fenómeno de la potenciación post-extrasistólica no experimentaba, en valores absolutos, ninguna modificación por acción de la somatostatina.

5. La somatostatina desplazaba la curva dosis-respuesta a calcio hacia la derecha, siendo el desplazamiento menos marcado a medida que se elevaba la  $|\text{Ca}^{2+}|_o$ . Por otra parte, la disminución de la  $|\text{Na}^+|_o$  reducía el efecto inotrópico negativo de la somatostatina.

6. La somatostatina desplazaba hacia abajo las curvas dosis-respuesta cronotrópicas e inotrópicas positivas al isoproterenol, si bien no impedía los efectos máximos del fármaco sobre ambos parámetros.

7. La somatostatina, además, deprimía de modo dosis-dependiente la amplitud de las contracciones lentas inducidas por el isoproterenol en aurículas despolarizadas

por 27 mM de  $K^+$ .

8. La somatostatina no modificaba el potencial de reposo auricular, ni la amplitud ni la  $V$  máx del potencial de acción; sin embargo, era capaz de acelerar la repolarización acortando tanto la  $DPA_{50}$  como la  $DPA_{90}$  de una manera dosis-dependiente. Este acortamiento se acompañaba de una disminución dosis-dependiente tanto del PRE como del TR auriculares. No obstante, la somatostatina no modificaba significativamente los cocientes  $PRE/DPA_{90}$  ni  $PRE/TR$ .

9. Sobre los potenciales de acción lentos inducidos por el isoproterenol o la cafeína en aurículas despolarizadas por 27 mM de  $K^+$ , la somatostatina producía una reducción dosis-dependiente de la amplitud y de la  $V$  máx, y acortaba la  $DPA_{50}$  y la  $DPA_{90}$ . Estos cambios se acompañaban a las concentraciones más altas ensayadas de una discreta reducción del potencial de reposo.

10. En los músculos papilares de cobayo, la somatostatina no modificaba el potencial de reposo ventricular, la amplitud ni la  $V$  máx del potencial de acción; pero producía una disminución de la  $DPA_{50}$  y la  $DPA_{90}$  cuando se administraba a las concentraciones de  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M. A  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M, la somatostatina incrementaba la  $DPA_{50}$  y la  $DPA_{90}$  hasta valores que no

difierían significativamente de los controles.

11. El PRE y el TR ventriculares experimentaban por acción de la somatostatina modificaciones paralelas a las descritas para la  $DPA_{50}$  y la  $DPA_{90}$ , es decir, una reducción a  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M, y un posterior incremento a  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M. Los cocientes  $PRE/DPA_{90}$  y  $PRE/TR$  no se modificaban significativamente a ninguna de las concentraciones ensayadas de somatostatina, y la relación encontrada entre los incrementos de PRE y  $DPA_{90}$  originados por esta hormona era lineal.

12. La somatostatina disminuía de una manera dosis-dependiente la captación de  $^{45}\text{Ca}$  en aurículas izquierdas conducidas eléctricamente. Esta disminución de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  se potenciaba al incrementar la frecuencia de estimulación y al reducir la  $|\text{Ca}^{2+}|_o$ . Por el contrario, un descenso de la frecuencia de estimulación o una elevación de la  $|\text{Ca}^{2+}|_o$  revertían total o parcialmente las acciones de la somatostatina.

13. En aurículas izquierdas en reposo la somatostatina no modificaba el flujo de salida de  $^{45}\text{Ca}$  ni el coeficiente de velocidad de salida de  $^{45}\text{Ca}$  ( $k_{cm}$ ). Tampoco modificaba la recta que relaciona el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  restante en la aurícula con el  $k_{cm}$ . En aurículas derechas, sin embargo, la somatostatina

producía un ligero incremento en el porcentaje de  $^{45}\text{Ca}$  retenido por el tejido, así como una elevación del  $k_{\text{cm}}$ , inmediatamente después de que la somatostatina dejaba de ejercer su acción; ello parece sugerir que la somatostatina impediría la salida de  $^{45}\text{Ca}$  en estas preparaciones.

14. Todos estos resultados parecen indicar que el mecanismo por el que la somatostatina ejerce su acción inotrópica negativa sería consecuencia de su capacidad para inhibir el flujo de entrada de calcio a la célula cardíaca a través de los canales lentos, es decir, inhibiendo la corriente lenta de entrada de calcio,  $\text{I}_{\text{Si}}$ . Esta acción se produciría posiblemente como consecuencia de la interacción de la somatostatina con receptores específicos situados en la superficie externa del sarcolema. Algunos de nuestros resultados sugieren, además, que la somatostatina podría incrementar el flujo de salida de potasio de las células cardíacas.

15. Finalmente, consideramos que los efectos miocárdicos de la somatostatina descritos en esta Tesis deberían ser tenidos en cuenta en la clínica humana, especialmente en aquellas situaciones en las que se administran por vía intravenosa grandes cantidades de esta hormona.



222

## VI. BIBLIOGRAFIA

---



- ABE, H., CHIHARA, K., MINAMITANI, N., IWASAKI, I., CHIBA, T., MATSUKURA, S. and FUJITA, T.: Stimulation by bombesin of immunoreactive somatostatin release into rat hypophyseal portal blood. Endocrinology 109: 229-234, 1981.
- ABE, H., KATO, Y., CHIBA, T., TAMINATO, T. and FUJITA, T.: Plasma immunoreactive somatostatin levels in rat hypophyseal portal blood: effect of glucagon administration. Life Sci. 23: 1647-1654, 1978.
- ABE, H., MOLITCH, M.E., VAN WYK, J.J. and UNDERWOOD, L.E.: Human growth hormone and somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. Endocrinology 113: 1319-1324, 1983.
- ABE, K., ADACHI, I., MIYAKAWA, S., TANATA, M., YAMAGUCHI, K., TANAKA, N., KAMEYA, T. and SHIMOSATO, Y.: Production of calcitonin, adrenocorticotropic hormone and melanocyte-stimulating hormone in tumours derived from amine precursor uptake and decarboxilation cells. Cancer Res. 37: 4190-4194, 1977.
- ADLER, G., KOCH, A. and KERN, H.F.: Effect of somatostatin on rat exocrine pancreatic secretory process in normal and diseased state. Z. Gastroenterol. 18: 418-426, 1980.
- AGUILERA, G. and PARKER, S.: Pituitary somatostatin receptors. Characterization by binding with a non degradable peptide analogue. J. Biol. Chem. 257: 1134-1137, 1982.
- ALPERT, L.C., BRAWER, J.R., PATEL, Y.C. and REICHLIN, S.: Somatostatinergic neurons in anterior hypothalamus: immunohistochemical localization. Endocrinology 98: 255-258, 1976.
- ARIMURA, A. and FISHBACK, J.B.: Somatostatin: regulation of secretion. Endocrine Rev. 2: 396-436, 1981.
- ARIMURA, A., SATO, H., DUPONT, A., NISHI, N. and SCHALLY, A.V.: Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. Science 189: 1007-1009, 1975.
- ARNOLD, R. and LANKISCH, P.G.: Somatostatin and the gastrointestinal tract. Clin. Gastroenterol. 9: 733-753, 1980.

- AXELROD, L., BUSH, M.A., HIRSCH, H.J. and LOO, S.W.H.: Malignant somatostatinoma: clinical features and metabolic studies. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52: 886-896, 1981.
- BAKER, B.L. and YEN, Y.Y.: The influence of hypophysectomy on the stores of somatostatin in the hypothalamus and pituitary stem. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151: 599-602, 1976.
- BALIBREA CANTERO, J.L.: Somatostatina (GH-RIH) y ulcus gastroduodenal. Med. Clin. (Barc.) 80: 119-120, 1983.
- BARRIGON, S., DE MIGUEL, B., TAMARGO, J. and TEJERINA, T.: The mechanism of the positive inotropic action of ketamine on isolated atria of the rat. Br. J. Pharmacol. 76: 85-93, 1982.
- BARUH, S., SHERMAN, L. and MARKOWITZ, S.: Diabetic ketoacidosis and coma. Med. Clin. North Am. 65: 117-132, 1981.
- BASS, O.: The decay of the potentiated state in sheep and calf ventricular myocardial fibers. Cir. Res. 39: 396-399, 1976.
- BATZRI, S.: Direct action of somatostatin on dispersed mucosal cells from guinea-pig stomach. Biochim. Biophys. Acta (G) 677: 521-524, 1981.
- BAUER, W., BRINER, U., DOEPFNER, W., HALLER, R., HUGUENIN, R., MARBACH, P., PETCHER, T.J. and PLESS, J.: SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. Life Sci. 31: 1133-1140, 1982.
- BAYER, R., HENNEKES, R., KAUFMANN, R. and MANNHOLD, R.: Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D600 in mammalian myocardium. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 290: 49-68, 1975.
- BEELER, G. and REUTER, H.: Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. J. Physiol., London 201: 191-209, 1970.
- BELANGER, A., LABRIE, F., BORGEAT, P., SAVARY, M., COTE, J. and BROUIN, J.: Inhibition of growth hormone and thyrotropin release by growth hormone release inhibiting hormone. Molec. Cel. Endocrinol. 1: 329-339, 1974.

- BELHASSEN, B. and PELLEG, A.: Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects. J. Am. Coll. Cardiol. 4: 414-424, 1984.
- BENNETT, G.W., EDWARDSON, J.A., MARCANO DE COTTE, D., BERELOWITZ, M., PIMSTONE, B.L. and KRONHEIM, S.: Release of somatostatin from rat brain synaptosomes. J. Neurochem. 32: 1127-1130, 1979.
- BENNETT-CLARKE, C., ROMAGNANO, M.A. and JOSEPH, S.A.: Distribution of somatostatin in the rat brain: telencephalon and diencephalon. Brain Res. 188: 473-486, 1980.
- BENOIT, R., BOHLEN, P., BRAZEAU, P., LING, N. and GUILLEMIN, R.: Isolation and characterization of rat pancreatic somatostatin. Endocrinology 107: 2127-2129, 1980.
- BERELOWITZ, M., DUDLAK, D. and FROHMAN, L.A.: Release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cerebral cortex. Effects of glucose and glucoregulatory hormones. J. Clin. Invest. 69: 1293-1301, 1982.
- BERELOWITZ, M., KRONHEIM, S., PIMSTONE, B.L. and SHEPPARD, M.: Potassium stimulated calcium dependent release of immunoreactive somatostatin from incubated rat hypothalamus. J. Neurochem. 31: 1537-1539, 1978.
- BERELOWITZ, M., PERLOW, M.J., HOFFMAN, H.J. and FROHMAN, L.A.: The diurnal variation of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone and somatostatin in the cerebrospinal fluid of the rhesus monkey. Endocrinology 109: 2102-2109, 1981a.
- BERELOWITZ, M., SZABO, M., FROHMAN, L.A., FIRESTONE, S., CHU, L. and HINTZ, R.L.: Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. Science 212: 1279-1281, 1981b.
- BESSER, G.M., MORTIMER, C.H., CARR, D., SCHALLY, A., COY, D., EVERED, D., KASTIN, A., TURNBRIDGE, W., THORNER, M. and HALL, R.: Growth hormone release inhibiting hormone in acromegaly. Br. Med. J. 1: 352-355, 1974a.

- BESSER, G.M., MORTIMER, C.H., McNEILLY, A.S., THORNER, M., BATISTONI, G., BLOOM, S., KASTRUP, K., HANSEN, K., HALL, R., COY, D., KASTIN, A. and SCHALLY, A.: Long term infusion of growth hormone-release inhibiting hormone in acromegaly: effects on pituitary and pancreatic hormones. Br. Med. J. 4: 622-627, 1974b.
- BICKNELL, R.J. and SCHOFIELD, J.G.: Mechanism of action of somatostatin: inhibition of ionophore A23187-induced release of growth hormone from dispersed bovine pituitary cells. FEBS Letters 68: 23-26, 1976.
- BICKNELL, R.J. and SCHOFIELD, J.G.: Mechanism of action of somatostatin: effect of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  translocation and growth hormone release from dispersed bovine anterior pituitary cells. J. Endocrinol. 72: 31P, 1977.
- BIRNBAUM, R.S., MUSZYNSKI, M. and ROSS, B.A.: Tumor and plasma somatostatin-like immunoreactivity in transplantable rat medullary thyroid carcinoma. Cancer Res. 40: 4192-4196, 1980.
- BOHLEN, P., BENOIT, R., LING, N., GUILLEMIN, R. and BRAZEAU, P.: Isolation and characterization of rat hypothalamic somatostatin-14. Endocrinology 108: 2008-2010, 1981.
- BOLAFFI, J.L., REICHLIN, S., GOODMAN, D.B.P. and FORREST, J.N., Jr.: Somatostatin: occurrence in urinary bladder epithelium and renal tubules of the toad, Bufo marinus. Science 210: 644-646, 1980.
- BOLMAN, III, R.H., COOPER, E.W. and WELLS, S.A., Jr.: Somatostatin inhibition and reversal of parathyroid hormone-, calcium- and acetylcholine-induced gastrin release in the pig. Endocrinology 103: 259-266, 1978.
- BORGEAT, P., LABRIE, P., DROUIN, J., BELANGER, A., IMMER, H., SESTANJ, K., IVELSON, V., GOTZ, M., SCHALLY, A., COY, D. and COY, E.: Inhibition of adenosine 3',5' monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by growth hormone release inhibiting hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56: 1052-1059, 1974.

- BOWERS, C.Y., FOLKERS, K., KNUDSEN, R., LAM, Y.-K., WAN, Y.-P., HUMPHRIES, J. and CHANG, D.: Hypothalamic peptide hormones: chemistry and physiology. En: DE GROOT, L.J., CAHILL, G.F., ODELL, W.D., MARTINI, L., PLOTTS, J.T., Jr., NELSON, D.H., STEINBERGER, E. and WINEGRAD, A.I. (eds.): Endocrinology, vol. 1. Grune & Stratton, New York, 1979; pp. 65-93.
- BRAZEAU, P., LING, N., ESCH, F., BOHLEN, P., MOUGIN, C. and GUILLEMIN, R.: Somatocrinin (growth hormone releasing factor) in vitro bioactivity:  $Ca^{2+}$  involvement, cAMP mediated action and additivity of effect with  $PGE_2$ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 109: 588-594, 1982.
- BRAZEAU, P., RIVIER, J., VALE, W. and GUILLEMIN, R.: Inhibition of growth hormone secretion in the rat by synthetic somatostatin. Endocrinology 94: 184-187, 1974.
- BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., LING, N., BUTCHER, M., RIVIER, J. and GUILLEMIN, R.: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 179: 77-79, 1973.
- BROWN, M.R. and FISHER, D.A.: Glucoregulation and the sympathetic nervous system: CNS control of brain peptides. En: BLOOM, F. (ed.): Peptides: integrators of cell and tissue functions. Raven Press, New York, 1980; pp. 81-97.
- BROWN, M., RIVIER, J. and VALE, W.: Somatostatin: central nervous system actions of glucoregulation. Endocrinology 104: 1709-1715, 1979.
- BROWN, M. and TACHE, Y.: Hypothalamic peptides: central nervous system control of visceral functions. Fed. Proc. 40: 2565-2569, 1981.
- BROWN, M. and VALE, W.: Growth hormone release in the rat: effects of somatostatin and thyrotropin-releasing factor. Endocrinology 97: 1151-1156, 1975.
- BRYCE, D., YEN, M., FUNDERBURK, C., TODD, H. and HERTELENDY, F.: Studies on growth hormone secretion. VII: Effects of somatostatin on plasma GH, insulin, and glucagon in sheep. Diabetes 24: 842-850, 1975.

- CARMELIET, E. and VEREECKE, J.: Electrogenesis of the action potential and automaticity. En: BERNE, R., SPERALAKIS, N. and GEIGER, S. (eds.): Handbook of Physiology. The Cardiovascular System, vol. 1. Bethesda, Maryland, American Physiological Society, 1979; pp. 269-334.
- CARR, D., GOMEZ-PAN, A., WEIGHTMAN, D.R., ROY, V., HALL, R., BESSER, G.M., THORNER, M., McNEILLY, A., SCHALLY, A., KASTIN, A. and COY, D.: Growth hormone-release inhibiting hormone: actions on thyrotrophin and prolactin secretion after thyrotrophin-releasing hormone. Br. Med. J. 3: 67-69, 1975.
- CHAYVIALLE, J.A., MIYATA, M., RAYFORD, P.L. and THOMPSON, J.C.: Effects of test meal, intragastric nutrients, and intraduodenal bile on plasma concentrations of immunoreactive somatostatin and vasoactive intestinal peptide in dogs. Gastroenterology 79: 844-852, 1980.
- CHEN, H.J., MUELLER, G.P. and MEITES, J.: Effects of L-dopa and somatostatin on suckling-induced release of prolactin and growth hormone. Endocrine Res. Commun. 1: 283-291, 1974.
- CHEW, C.S.: Inhibitory action of somatostatin on isolated gastric glands and parietal cells. Am. J. Physiol. 245: G221-G229, 1983.
- CHIHARA, K., ARIMURA, A., CHIHARA, M. and SCHALLY, A.V.: Studies on the mechanism of growth hormone and thyrotropin response to somatostatin antiserum in anesthetized rats. Endocrinology 103: 1916-1923, 1978.
- CHIHARA, K., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Effect of intraventricular injection of dopamine, norepinephrine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on immunoreactive somatostatin release into rat hypophyseal portal blood. Endocrinology 104: 1656-1662, 1979.
- CHIHARA, K., MINAMITANI, N., KAJI, H., ARIMURA, A. and FUJITA, T.: Intraventricularly injected growth hormone stimulates somatostatin release into rat hypophyseal portal blood. Endocrinology 109: 2279-2281, 1981.
- CHRISTENSEN, N., CHRISTENSEN, S., HANSEN, A. and LUNDBAEK, K.: The effect of somatostatin on plasma noradrenaline and plasma adrenaline concentrations during exercise and hypoglycemia. Metabolism 24: 1267-1272, 1975.

- COOPER, G.R. and SHIN, S.H.: Somatostatin inhibits prolactin secretion in the estradiol primed male rat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 59: 1082-1088, 1981.
- COY, D.H., COY, E.J., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Solid phase synthesis of growth hormone release inhibiting factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 1267-1273, 1973.
- CRANFIELD, P.F.: The conduction of the cardiac impulse: the slow response and cardiac arrhythmias. Mount Kisco, N.Y., Futura, 1975.
- CREUTFELDT, W. and ARNOLD, R.: Somatostatin and the stomach: exocrine and endocrine aspects. Metabolism 27: 1309-1313, 1978.
- CRONIN, M.J., ROGOL, A.D., DABNEY, L.G. and THORNER, M.O.: Selective growth hormone and cyclic AMP stimulating activity is present in a human pancreatic islet cell tumor. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55: 381-383, 1982.
- CURRY, D.L. and BENNETT, L.L.: Reversal of somatostatin inhibition of insulin secretion by calcium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 1015-1019, 1974.
- DAVIES, P., KATZMAN, R. and TERRY, R.D.: Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. Nature 288: 279-280, 1980.
- DAYAL, Y., DOOS, W.G., O'BRIEN, M.J., NUNNEMACHER, G., DELELLIS, R.A. and WOLFE, H.J.: Psammomatous somatostatinomas of the duodenum. Am. J. Surg. Pathol. 7: 653-665, 1983.
- DECK, K.A. and TRAUTWEIN, W.: Ionic currents in cardiac excitation. Pflügers Arch. 280: 63-80, 1964.
- DEL BARRE, B., SENON, D. and SCHMIDT, H.: Cyclic 3'5'-adenosine monophosphate and central circulatory control in cats and dogs. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 4: 341-348, 1977.
- DELFS, J., ROBBINS, R., CONNOLLY, J.L., DICHTER, M. and REICHLIN, S.: Somatostatin production by rat cerebral neurons in dissociated cell culture. Nature 283: 676-677, 1980.

- DE MELLO, W.C.: On the mechanism of histamine action in cardiac muscle. Eur. J. Pharmacol. 35: 315-324, 1976.
- DE NUTTE, N., SOMERS, G., GEPTS, W., JACOBS, M. and PIPELEERS, D.: Pancreatic hormone release in tumour-associated hypersomatostatinemia. Diabetologia 15: 227, 1978.
- DE ROSA, G., CORSELLO, S.M., DELLA CASA, S., DE ROSA, E. and RAIMONDO, S.: Effect of somatostatin on the pituitary-thyroid axis. Ann. Endocrinol. (Paris) 44: 355-360, 1983.
- DHARMSATHAPHORN, K., RACUSEN, L. and DOBBINS, J.W.: Effect of somatostatin on ion transport in the rat colon. J. Clin. Invest. 66: 813-820, 1980a.
- DHARMSATHAPHORN, K., SHERWIN, R.S., CATALAND, S., JAFFE, B. and DOBBINS, J.: Somatostatin inhibits diarrhea in the carcinoid syndrome. Ann. Intern. Med. 92: 68-69, 1980b.
- DICHTER, M.A. and DELFS, J.R.: Somatostatin and cortical neurons in cell culture. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 28: 145-157, 1981.
- DIEM, K. y LENTNER, C.: Documenta Geigy. Tablas científicas, 7ª ed. Geigy División Farmacéutica. Barcelona, 1975.
- DIEZ, J., DELGADO, C. and TAMARGO, J.: An analysis of the positive inotropic effect of AR-L 115 BS on isolated rat atria. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 269: 70-82, 1984.
- DILEEPAN, K.N., KHAWAJA, A.M. and WAGLE, S.R.: Studies on the mechanism of action of somatostatin on renal gluconeogenesis: evidence for the involvement of  $\alpha_1$ -adrenergic stimuli. Arch. Biochem. Biophys. 213: 169-176, 1982.
- DOMENECH, J.M.: Estadística descriptiva. Herder, Barcelona, 1981a.
- DOMENECH, J.M.: Tablas de estadística. Herder, Barcelona, 1981b.
- DOMENECH, J.M.: Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores. Herder, Barcelona, 1982.

- DOKAS, L.A., ZWIERS, H., COY, D.H. and GISPEN, W.H.: Somatostatin and analogs inhibit endogenous synaptic plasma membrane protein phosphorylation in vitro. Eur. J. Pharmacol. 88: 185-193, 1983.
- DORFLINGER, L.J. and SCHONBRUNN, A.: Somatostatin inhibits basal and vasoactive intestinal peptide-stimulated hormone release by different mechanisms in GH pituitary cells. Endocrinology 113: 1551-1558, 1983.
- DUDEL, J., PEPPER, K., RUDEL, R. and TRAUTWEIN, W.: The dynamic chloride component of membrane current in Purkinje fibers. Pflügers Arch. 295: 197-212, 1967.
- DUDEL, J. and RUDEL, R.: Voltage and time dependence of excitatory sodium current in cooled sheep Purkinje fibers. Pflügers Arch. 315: 136-158, 1970.
- EDMONDS, R.E., GREENSPAN, K. and BAILEY, J.C.: Role of premature action potential in contractile potentiation: a study of paired potentiation. Cardiovasc. Res. 6: 368-374, 1972.
- EPELBAUM, J., WILLOUGHBY, J.O., BRAZEAU, P. and MARTIN, J.B.: Effects of brain lesions and hypothalamic deafferentation on somatostatin distribution in the rat brain. Endocrinology 101: 1495-1502, 1977.
- ESCH, F., BOHLEN, P., LING, N., BENOIT, R., BRAZEAU, P. and GUILLEMIN, R.: Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and somatostatin-25. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6827-6831, 1980.
- ESKAY, R.L., LONG, R.T. and IUVONE, P.M.: Evidence that TRH, somatostatin and substance P are present in neurosecretory elements of the vertebrate retina. Brain Res. 196: 554-559, 1980.
- ESTEVE, J.P., SOSINI, C., VAYSE, N., BALAS, D., ANTONIOTTI, H., WUNSCH, E. and RIBET, A.: Binding of <sup>125</sup>I-somatostatin to receptors in isolated acini from guinea pig pancreas: demonstration of internalization of somatostatin. European Pancreatic Club XIV Meeting, Essen, 1982, n. 41.

- FORREST, J.N., Jr., REICHLIN, S. and GOODMAN, D.B.: Somatostatin: An endogenous peptide in the toad urinary bladder inhibits vasopressin-stimulated water flow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4984-4987, 1980.
- FUJIMOTO, W. and ENSINCK, J.W.: Somatostatin inhibition of insulin and glucagon secretion in rat islet culture: reversal by ionophore A23187. Endocrinology 98: 259-262, 1976.
- GALMICHE, J.P., CHAYVIALLE, J.A., DuBOIS, P.M., DAVID, L., DESCOS, F., PAULIN, C., DUCASTELLE, T., COLIN, R. and GEFFROY, P.: Calcitonin-producing pancreatic somatostatinoma. Gastroenterology 78: 1577-1583, 1980.
- GALMICHE, J.P., COLIN, R., DuBOIS, P.M., CHAYVIALLE, J.A., DESCOS, F., PAULIN, C. and GEFFROY, P.: Calcitonin secretion by a pancreatic somatostatinoma. N. Engl. J. Med. 299: 1252, 1978.
- GAMSE, R., VACCARO, D.E., GAMSE, G., DiPACE, M., FOX, T.O. and LEEMAN, S.E.: Release of immunoreactive somatostatin from hypothalamic cells in culture. Inhibition by gamma-aminobutyric acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5552-5556, 1980.
- GANDA, O.P., WEIR, G.C., SOELDNER, J.S., LEGG, M.A., CHICK, W.L., PATEL, Y.C., EBEID, A.M. GABBAY, K.H. and REICHLIN, S.: Somatostatinoma: a somatostatin-containing tumor of the endocrine pancreas. N. Engl. J. Med. 269: 963-967, 1977.
- GERICH, J.E.: Somatostatin and diabetes. Am. J. Med. 70: 619-626, 1981.
- GESPACH, C., HUIBON HOA, D. and ROSSELIN, G.: Regulation by vasoactive intestinal peptide, histamine, somatostatin-14 and -28 of cyclic adenosine monophosphate levels in gastric glands isolated from the guinea pig fundus or antrum. Endocrinology 112: 1597-1606, 1983.
- GETTES, J. and REUTER, H.: Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. J. Physiol., London 240: 703-724, 1974.
- GIEBISCH, G. and WEIDMANN, S.: Membrane currents in mammalian ventricular heart muscle fibers using a voltage-clamp technique. J. Gen. Physiol. 57: 290-296, 1971.

- GILMOUR, R.F. and ZIPES, D.P.: Basic electrophysiology of the slow inward current. En: STONE, P.H. and ANTMAN, E.M.: Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. Futura Publishing Company. Mount Kisco, New York, 1983; pp. 1-37.
- GIROD, C., DUBOIS, M.P. and DURAND, N.: Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-like immunoreactivity in scattered cells of the duct system of the submandibular glands in the monkey, Macaca irus. Histochemistry 69: 137-143, 1980.
- GIULIANO, D., TORELLA, R., SGAMBATO, S. and D'ONOFRIO, E.: Effects of alfa- and beta-adrenergic inhibition and somatostatin on plasma glucose, free fatty acids, insulin, glucagon and growth hormone responses to prostaglandin E<sub>1</sub> in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 302-308, 1979.
- GODFRAIND, T.: Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of noradrenaline and lanthanum. J. Physiol., London 260: 21-35, 1976.
- GODFRAIND, T. and DIEU, D.: The inhibition by flunarizine of the norepinephrine-evoked contraction and calcium influx in rat aorta and mesenteric arteries. J. Pharmacol. Exp. Ther. 217: 510-515, 1981.
- GODFRAIND, T. and MILLER, R.C.: Specificity of action of Ca<sup>++</sup> entry blockers. A comparison of their actions in rat arteries and in human coronary arteries. Circulation Res. 52 (suppl. I): I-81-I-91, 1983.
- GOMEZ-PAN, A., REED, J.D., ALBINUS, M., SHAW, B., HALL, R., BESSER, G.M., COY, D.H., KASTIN, A.J. and SCHALLY, A.V.: Direct inhibition of gastric acid and pepsin secretion by growth-hormone release-inhibiting hormone in cats. Lancet 1: 888-890, 1975.
- GOMEZ-PAN, A. and RODRIGUEZ-ARNAO, M.D.: Somatostatin and growth hormone releasing factor: synthesis, location, metabolism and function. Clin. Endocrinol. Metab. 12: 469-507, 1983.
- GOMEZ-PAN, A., SCANLON, M.F., THORNER, M.O., REES, L.H., SCHALLY, A.V., HALL, R. and BESSER, G.M.: Effect of somatostatin on abnormal growth hormone and prolactin secretion in patients with the carcinoid syndrome. Clin. Endocrinol. 10: 575-581, 1979.

- GOMEZ-PAN, A., SNOW, M., PIERCY, D., ROBSON, V., WILKINSON, R., HALL, R., EVERED, D.C., BESSER, G.M., SCHALLY, A.V., KASTIN, A.J. and COY, D.H.: Actions of growth hormone-release inhibiting hormone (somatostatin) on the renin aldosterone system. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 240-243, 1976.
- GOOREN, L.J.G., HARMSSEN-LOUMAN, W. and VAN KESSEL, H.: Somatostatin inhibits prolactin release from lactotroph primed with oestrogen and cyproterone acetate in man. J. Endocrinol. 103: 333-335, 1984.
- GORDIN, A., LAMBERG, B.-A., PELKONEN, R. and ALMQVIST, S.: Somatostatin inhibits the pentagastrin-induced release of serum calcitonin in medullary carcinoma of the thyroid. Clin. Endocrinol. 8: 289-293, 1978.
- GRANT, N.H., SARANTAKIS, D. and YARDLEY, J.P.: Actions of growth hormone release inhibiting hormone on prolactin release in rat pituitary cell cultures. J. Endocrinol. 61: 163-164, 1974.
- GRECO, A.V., GHIRLANDA, G., BARONE, C., BERTOLI, A., CAPUTO, S., UCCIOLI, L. and MANNA, R.: Somatostatin in paroxysmal supraventricular and junctional tachycardia. Br. Med. J. 288: 28, 1984.
- GROSSMAN, A. and FURCHGOTT, R.F.: The effects of external calcium concentration on the distribution and exchange of calcium in resting and beating guinea-pig auricles. J. Pharmacol. Exp. Ther. 143: 107-119, 1964a.
- GROSSMAN, A. and FURCHGOTT, R.F.: The effects of frequency of stimulation and calcium concentration on <sup>45</sup>Ca exchange and contractility on the isolated guinea-pig auricle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 143: 120-130, 1964b.
- GROSSMAN, A. and FURCHGOTT, R.F.: The effects of various drugs on calcium exchange in the isolated guinea-pig left auricle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 145: 162-172, 1964c.
- HALL, R., BESSER, G.M., SCHALLY, A.V., COY, D.H., EVERED, D., GOLDIE, D.J., KASTIN, A.J., McNEILLY, A.S., MORTIMER, C.H., PHENEKOS, C., TURNBRIDGE, W.M.G. and WEIGHTMAN, D.: Actions of growth hormone-release inhibiting hormone in healthy men and acromegaly. Lancet 2: 581-584, 1973.

- HARGIS, G.K., WILLIAMS, G.A., REYNOLDS, W.A., CHERTOW, B.S., KUKREJA, S.C., BOWSER, E.W. and HENDERSON, W.J.: Effect of somatostatin on parathyroid hormone and calcitonin secretion. Endocrinology 201: 745-750, 1978.
- HARWOOD, J.P. and GREWE, G.: Actions of growth hormone releasing factor (GRF) and somatostatin (SRIF) on growth hormone and cyclic AMP production in culture anterior pituitary cells. Abstracts of the 65th Annual Meeting of the Endocrine Society, 1983; p. 83 (Abstract 10).
- HAYASAKI-KIMURA, N. and TAKAHASHI, K.: Studies on the action of somatostatin on growth hormone release in relation to calcium and cAMP. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161: 312, 1979.
- HELLMAN, B. and LERNMARK, A.: Inhibition of the in vitro secretion of insulin by an extract of pancreatic alfa<sub>1</sub> cells. Endocrinology 84: 1484-1487, 1969.
- HIROOKA, Y., HOLLANDER, C.S., SUZUKI, S., FERDINAND, P. and JUAN, S.-I.: Somatostatin inhibits release of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4509-5413, 1978.
- HIRSCH, H., LOO, S., EVANS, N., CRIGLER, J., FILLER, R. and GABBAY, K.: Hypoglycemia of infancy and nesidioblastosis studies with somatostatin. N. Engl. J. Med. 296: 1323-1326, 1977.
- HOBART, P., CRAWFORD, R., SHEN, L., PICTET, R. and RUTTER, W.J.: Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding two distinct somatostatin precursors found in the endocrine pancreas of anglerfish. Nature 288: 137-141, 1980.
- HOCHMAN, H.I., JUDGE, D.M. and REICHLIN, S.: Precocious puberty and hypothalamic hamartoma. Pediatrics 67: 236-244, 1981.
- HOKFELT, T., ELFVIN, L.G., ELDE, R., SCHULTZBERG, M., GOLDSTEIN, M. and LUFT, R.: Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3587-3591, 1977.
- HOKFELT, T., JOHANSSON, O., LJUNGDAHL, A., LUNDBERG, J.M. and SCHULTZBERG, M.: Peptidergic neurones. Nature 284: 515-521, 1980.

- HOLLAND, D.R., ARMSTRONG, W.McD. and STEINGERG, M.I.: Calcium fluxes and contractility in isolated guinea pig atrium: effect of A23187. Am. J. Physiol. 235: C13-C19, 1978.
- IMMER, H.U., SESTANJ, K., NELSON, V.R. and GOTZ, M.: Synthesis of somatostatin. Helv. Chim. Acta 57: 730-734, 1974.
- IOFFE, S., HAVLICEK, V., FRIESEN, H. and CHERNICK, V.: Effect of somatostatin and L-glutamate on neurons of the sensorimotor cortex in awake habituated rabbits. Brain Res. 153: 414-418, 1978.
- ISENBERG, G.: Cardiac Purkinje fibres. Resting, action and pacemaker potential under the influence of  $[Ca^{2+}]_i$  as modified by intracellular injection techniques. Pflügers Arch. 371: 51-59, 1977a.
- ISENBERG, G.: Cardiac Purkinje fibres. The slow inward current component under the influence of modified  $[Ca^{2+}]_i$ . Pflügers Arch. 371: 61-69, 1977b.
- ISENBERG, G.: Cardiac Purkinje fibres.  $[Ca^{2+}]_i$  controls the potassium permeability via the conductance components  $g_{K1}$  and  $g_{K2}$ . Pflügers Arch. 371: 77-85, 1977c.
- IVERSEN, L.L., IVERSEN, S.D., BLOMM, F., DOUGLAS, C., BROWN, M. and VALE, W.: Calcium dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. Nature 273: 161-163, 1978.
- JHAMANDAS, K. and ELLIOTT, J.: Comparative effects of somatostatin and enkephalines on the guinea pig ileum and the rat vas deferens. Can. J. Physiol. Pharmacol. 58: 1389-1392, 1980.
- KABELA, E.: The effects of lidocaine on potassium efflux from various tissues of dog heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 184: 611-618, 1973.
- KAHN, G.R., BHATHEME, S.J., RECANT, L. and RIVIER, J.: Use of somatostatin analogs in a patient with a glucagonoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 53: 543-549, 1981.
- KANATSUKA, A., MAKINO, H., MATSUSHIMA, Y., OSEGAWA, M., YAMAMOTO, M. and KUMAGAI, A.: Effect of hypophysectomy and growth hormone administration on somatostatin content in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 29: 186-190, 1979.

- KATO, Y., ABE, H. and IMURA, H.: Stimulation by TRH and dopamine of somatostatin release into the hypophyseal portal blood in the rat. En: ITO, M., KUBOTA, K., TSUKAHARA, N. and YAGI, K.: Integrative Control Functions of the Brain, vol 2. Tokyo, Kodansha, 1979; pp. 294-295.
- KATO, Y., CHIHARA, K., OHGO, S. and IMURA, H.: Inhibiting effect of somatostatin on growth hormone release induced by isoprenaline or chlorpromazine in rats. J. Endocrinol. 62: 687-688, 1974.
- KATZ, A.M.: Role of calcium in contraction of cardiac muscle. En: STONE, P.H. and ANTMAN, E.M.: Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. Futura Publishing Company. Mount Kisco, New York, 1983; pp. 39-58.
- KAWAI, K., IPP, E., ORCI, L., PERRELET, A. and UNGER, R.H.: Circulating somatostatin acts on the islets of Langerhans by way of a somatostatin-poor compartment. Science 218: 477-478, 1982.
- KAYASSEH, L., GYR, K., KELLER, V., STALDER, G.A. and WALL, M.: Somatostatin and cimetidine in peptic ulcer haemorrhage: a randomised controlled trial. Lancet 1: 844-846, 1980.
- KESSLER, J.A., ADLER, J.E. and BLACK, I.B.: Substance P and somatostatin regulate sympathetic noradrenergic function. Science 221: 1059-1061, 1983.
- KOCH-WESER, J. and BLINKS, J.: The influence of the interval between beats on myocardial contractility. Pharmacol. Rev. 15: 601-652, 1963.
- KONTUREK, S.J., TASLER, J., JAWOREK, J., PAWLIK, W., WALUS, K.M., SCHUSDZIARRA, V., MEYERS, C.A., COY, D.H. and SCHALLY, A.V.: Gastrointestinal secretory, motor, circulatory, and metabolic effects of prosomatostatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1967-1971, 1981.
- KOVACS, K., HORVATH, E., EZRIN, C., SEPP, H. and ELKAN, I.: Immunoreactive somatostatin in pancreatic islet-cell carcinoma accompanied by ectopic ACTH syndrome. Lancet 1: 1365-1366, 1977.
- KRAICER, J. and SPENCE, J.W.: Release of growth hormone from purified somatotrophs: use of high  $K^+$  and the ionophore A23187 to elucidate interrelations among  $Ca^{++}$ , adenosine 3'5'-monophosphate, and somatostatin. Endocrinology 108: 651-657, 1981.

- KREJS, G.J., ORCI, L., CONLON, M., RAVAZZOLLA, M., GLENN, R.D., RASKIN, P., COLLINS, S.M., McCARTHY, D.M., BAETENS, D., RUBENSTEIN, A., ALDOR, T.A.M. and UNGER, R.H.: Somatostatinoma syndrome: biochemical, morphologic and clinical features. N. Engl. J. Med. 301: 285-292, 1979.
- KRISCH, B.: Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of somatostatin-immunoreactive elements in the rat brain. Cell Tissue Res. 195: 499-513, 1978.
- KRISCH, B.: Differing immunoreactivities of somatostatin in the cortex and the hypothalamus of the rat: a light and electron microscope study. Cell Tissue Res. 212: 457-464, 1980.
- KRISCH, B.: Somatostatin-immunoreactive fiber projections into the brain stem and the spinal cord of the rat. Cell Tissue Res. 217: 531-552, 1981.
- KRONHEIM, S., BERELOWITZ, M. and PIMSTONE, B.L.: The characterization of somatostatin-like immunoreactivity in human serum. Diabetes 27: 523-529, 1978.
- KRULICH, L., DHARIWAL, A.P.S. and McCANN, S.M.: Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. Endocrinology 83: 783-790, 1968.
- KUKREJA, S.C., HARGIS, G.K., BOWSER, E.N. and WILLIAMS, G.A.: Mode of action of somatostatin in inhibiting parathyroid hormone secretion. Horm. Metab. Res. 12: 621-624, 1980.
- LANGER, G.A.: Heart: excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol. 35: 55-86, 1973.
- LARON, Z., PERTZELAN, A., DORON, M., ASSA, S. and KERET, R.: The effect of dihydrosomatostatin in dwarfism with high plasma immunoreactive growth hormone. Horm. Metab. Res. 9: 338-339, 1977.
- LARSSON, L.I.: Gastrointestinal cells producing endocrine, neurocrine and paracrine messengers. Clin. Gastroenterol. 9: 485-516, 1980.
- LARSSON, L.I., HIRSCH, M.A., HOLST, J.J., INGEMANSSON, S., KUHL, C., LINDKAER JENSEN, S., LUNDQVIST, G., REHFELD, J.F. and SCHWARTZ, T.W.: Pancreatic somatostatinoma: clinical features and physiological implications. Lancet 1: 666-668, 1977.

- LAUBER, M., CAMIER, M. and COHEN, P.: Higher molecular weight forms of immunoreactive somatostatin in mouse hypothalamic extracts. Evidence of processing in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6004-6008, 1979.
- LEITNER, J.W., RIFKIN, R.M., MAMAN, A. and SUESMAN, K.E.: Somatostatin binding to pituitary plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87: 919-927, 1979.
- LEWIN, M.J.M. and REYL, F.: Molecular basis of somatostatin action. Hepato-Gastroenterology 29: 94, 1982.
- LIMBERG, B. and KOMMERELL, B.: Somatostatin for cimetidine-resistant gastroduodenal hemorrhage. Lancet 2: 861-866, 1980.
- LUCKE, C., HOFFKEN, B. and VON ZUR MUHLEN, A.: The effect of somatostatin on TSH levels in patients with primary hypothyroidism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 1082-1084, 1975.
- LUCKE, C., HOFFKEN, B. and VON ZUR MUHLEN, A.: Studies on the postponed growth hormone secretion following the infusion of somatostatin. Acta Endocrinol. 82: 460-466, 1976.
- LUMPKIN, M., NEGRO-VILAR, A. and McCANN, S.M.: Paradoxical elevation of GH by intraventricular somatostatin administration: a possible ultra short loop feedback. Program of the 63rd Meeting of the Endocrine Society, 1980; p. 176 (Abstract 406).
- LUNDBAEK, K.: Somatostatin: clinical importance and outlook. Metabolism 27: 1463-1469, 1978.
- LUNDBERG, J.M., HOKFELT, T., NILSSON, G., TERENIUS, L., REHFELD, J., ELDE, R. and SAID, S.: Peptide neurons in the vagus, splanchnic and sciatic nerves. Acta Physiol. Scand. 104: 499-501, 1978.
- LUNDQUIST, G., GUSTAVSSON, S., ELDE, R. and ARIMURA, A.: A radioimmunosorbent assay for plasma somatostatin. Clin. Chim. Acta 101: 183-191, 1980.
- MACKES, K., ITOH, M., GREENE, K. and GERICH, J.: Radioimmunoassay of human plasma somatostatin. Diabetes 30: 728-734, 1981.
- MacLELLAN, D.G., SHULKES, A. and HARDY, K.J.: Effect of somatostatin on liver blood flow in the rat. Hormone Res. 17: 103-107, 1983.

- MAEDA, K. and FROHMAN, L.A.: Release of somatostatin and thyrotropin-releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro. Endocrinology 106: 1837-1842, 1980.
- MANZANARES, J. and TAMARGO, J.: Electrophysiological effects of imipramine in non-treated and in imipramine-pretreated rat atrial fibers. Br. J. Pharmacol. 79: 167-175, 1983.
- MARKS, N. and STERN, F.: Inactivation of somatostatin (GH-RIH) and its analogs by crude and partially purified rat brain extracts. FEBS Letters 55: 220-224, 1975.
- MARTIN, J.B.: Inhibition effect of somatostatin (SRIF) on the release of growth hormone induced in the rat by electrical stimulation. Endocrinology 94: 497-502, 1974.
- MATSUMURA, M., AKIYOSHI, H. and SAITO, S.: Effects of somatostatin on gastrointestinal hormone-induced glycogenolysis and gluconeogenesis in cultured liver cells. Gastroenterol. Jap. 15: 439-443, 1980.
- MCCANN, S.M.: Physiology and pharmacology of LHRH and somatostatin. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22: 491-515, 1982.
- MCCANS, J., LINDENMAYER, G., MUNSON, R., EVANS, R. and SCHWARTZ, A.: A dissociation of positive staircase (Bowditch) from ouabain-induced positive inotropism. Cir. Res. 35: 439-447, 1974.
- MCDONALD, T., PELZER, D. and TRAUTWEIN, W.: On the mechanism of slow calcium current block in heart. Pflügers Arch. 385: 175-179, 1980.
- MEINERTZ, T., NAWRATH, H. and SCHOLZ, H.: Adrenaline, DB-c-AMP and myocardial <sup>45</sup>Ca exchange. Comparative studies in rat and guinea-pig auricles. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279: 313-325, 1973a.
- MEINERTZ, T., NAWRATH, H. and SCHOLZ, H.: Stimulatory effects of DB-c-AMP and adrenaline on myocardial contraction and <sup>45</sup>Ca exchange. Experiments at reduced calcium concentration and low frequencies of stimulation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279: 327-338, 1973b.

- MEYERS, C.A., MURPHY, W.A., REDDING, T.W., COY, D.H. and SCHALLY, A.V.: Synthesis and biological actions of prosomatostatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6171-6174, 1980.
- MIKHAILIDIS, D.P., MIKHAILIDIS, A.M. and DANDONA, P.: Cimetidine and somatostatin in gastroduodenal haemorrhage. Lancet 1: 274-275, 1981.
- MILLAR, R.P., KLAFF, L.J., BARRON, J.L., LEVITT, N.S. and LING, N.: Somatostatin-28 and somatostatin-14 suppression of arginine-, insulin- and TRH-stimulated GH and PRL secretion in man. Clin. Endocrinol. 18: 277-285, 1983.
- MIROUZE, J.: La somatostatine dans le traitement du diabète sucré. Nouv. Presse Med. 10: 2945-2946, 1981.
- MOREL, G., MESGUICH, P., DUBOIS, M.P. and DUBOIS, M.P.: Ultrastructural evidence for endogenous somatostatin-like immunoreactivity in the pituitary gland. Neuroendocrinology 36: 291-299, 1983.
- MORTIMER, C.H., TUNBRIDGE, W.M.G., CARR, D., YEOMANS, L., LIND, T., COY, D.H., BLOOM, S.R., KASTIN, A., MALLINSON, C.N., BESSER, G.M., SCHALLY, A.V. and HALL, R.: Effects of growth hormone-release inhibiting hormone on circulating glucagon, insulin and growth hormone in normal, diabetic, acromegalic and hypopituitary patients. Lancet 1: 697-701, 1974.
- MOULOPOULOS, S.D., STAMATELOPOULOS, S.F. and VITA, L.: Somatostatin prolongation of the blood pressure lowering effect of diazoxide. Metabolism 27: 1365-1367, 1978.
- NARULA, O.: Disorders of the sinus node function: electrophysiological evaluation. En: NARULA, O. (ed.): His bundle electrocardiography and clinical electrophysiology. F.A. Davis, Philadelphia, 1975; p. 275.
- NEGRO-VILAR, A., OJEDA, S.R., ARIMURA, A. and McCANN, S.M.: Dopamine and norepinephrine stimulate somatostatin release by median eminence fragments in vitro. Life Sci. 23: 1493-1498, 1978.
- NIEDERGERKE, R.: Movements of Ca in beating ventricles of the frog's heart. J. Physiol., London 167: 551-580, 1963.

- NOBLE, D.: The initiation of the heartbeat, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, 1979.
- NOBLE, D. and TSIEN, R.W.: The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol., London 195: 185-214, 1968.
- NOE, B., SPIESS, J., RIVIER, J. and VALE, W.: Isolation and characterization of somatostatin from anglerfish pancreatic islets. Endocrinology 105: 1410-1415, 1979.
- OGAWA, N., THOMPSON, T., FRIESEN, H., MARTIN, J. and BRAZEAU, P.: Properties of soluble somatostatin-binding protein. Biochem. J. 165: 269-277, 1977.
- OLIVER, J.R.: Inhibition of calcium uptake by somatostatin in isolated rat islets of Langerhans. Endocrinology 99: 910-913, 1976.
- ORCI, L., BAETENS, D., DUBOIS, M.P. and RUFENER, C.: Evidence for the D-cell of the pancreas secreting somatostatin. Horm. Metab. Res. 7: 400-402, 1975.
- OYAMA, H., O'CONNELL, K. and PERMUTT, A.: Cell-free synthesis of somatostatin. Endocrinology 107: 845-847, 1980.
- PACE, C.S. and TARVIN, J.T.: Somatostatin: mechanism of action in pancreatic islet beta-cells. Diabetes 30: 836-842, 1981.
- PAPPANO, A.J.: Calcium dependent action potentials produced by catecholamines in guinea-pig atrial muscles fibers depolarized by potassium. Cir. Res. 27: 379-390, 1970.
- PARKER, D.C., ROSSMAN, L.G., SILER, T.M., RIVIER, J., YEN, S. and GUILLEMIN, R.: Inhibition of the sleep-related peak in physiologic human growth hormone release by somatostatin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38: 496-499, 1974.
- PATEL, Y.C., AMHERDT, M. and ORCI, L.: Quantitative electron microscopic autoradiography of insulin, glucagon and somatostatin binding sites on islets. Science 217: 1155-1156, 1982.
- PATEL, Y.C., GANDA, O.P. and BENOIT, R.: Pancreatic somatostatinoma: abundance of somatostatin-28(1-12)-like immunoreactivity in tumor and plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 57: 1048-1053, 1983.

- PATEL, Y.C., RAO, K. and REICHLIN, S.: Somatostatin in human cerebrospinal fluid. N. Engl. J. Med. 296: 529-533, 1977.
- PATEL, Y.C., ZINGG, H.H. and DREIFUSS, J.J.: Somatostatin from the rat neurohypophysis and stalk median eminence (SME) in vitro: calcium-dependent release by high potassium and electrical stimulation. Metabolism 27: 1243-1245, 1978.
- PEARSE, A.G.E., POLAK, J.M. and BLOOM, S.R.: The newer gut hormones: cellular sources, physiology, pathology and clinical aspects. Gastroenterology 72: 746-761, 1977.
- PELLETIER, G.: Immunohistochemical localization of somatostatin. Prog. Histochem. Cytochem. 12: 1-41, 1980.
- PELZER, D., TRAUTWEIN, W. and McDONALD, T.: Calcium channel block and recovery from block in mammalian ventricular muscle treated with organic channel inhibitors. Pflügers Arch. 394: 97-105, 1982.
- PENMAN, E., LOWRY, P.J., WASS, J.A.M., MARKS, V., DAWSON, A.M., BESSER, G.M. and REES, L.H.: Molecular forms of somatostatin in normal subjects and in patients with pancreatic somatostatinoma. Clin. Endocrinol. 12: 611-620, 1980a.
- PENMAN, E., WASS, J.A.H., BESSER, G.M. and REES, L.H.: Somatostatin secretion by lung and thymic tumours. Clin. Endocrinol. 13: 613-620, 1980b.
- PERACCHI, M., RESCHINI, E., CANTALAMESSA, L., CATANIA, A. and GUISTINA, G.: Inhibitory effect of somatostatin on dibutyryl cyclic AMP-induced insulin and growth hormone release in human subjects. Metabolism 25: 321-328, 1976.
- PIMSTONE, B.L., BECKER, D. and KRONHEIM, S.: Disappearance of plasma growth hormone in acromegaly and protein-calorie malnutrition after somatostatin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40: 168-171, 1975.
- PIMSTONE, B.L., SHEPPARD, M., SHAPIRO, B., KRONHEIM, S., HUDSON, A., HENDRICKS, S. and WALIGORA, K.: Localization in and release of somatostatin from brain and gut. Fed. Proc. 38: 2330-2332, 1979.

- PIPELEERS, D., COUTURIER, E., GEPTS, W., REYNDERS, J. and SOMERS, G.: Five cases of somatostatinoma: clinical heterogeneity and diagnostic usefulness of basal and tolbutamide-induced hypersomatostatinemia. J. Clin. Endocrinol Metab. 56: 1236-1242, 1983.
- PIPELEERS, D., SOMERS, G., GEPTS, W., DE NUTTE, N., DE VROEDE, M.: Plasma pancreatic hormone levels in a case of somatostatinoma: diagnostic and therapeutic implications. J. Clin Endocrinol. Metab. 49: 572-579, 1979.
- POLAK, J., PEARSE, A.G.E., GRIMELIUS, L., BLOOM, S. and ARIMURA, A.: Growth-hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. Lancet 1: 1220-1222, 1975.
- PORTE, D., Jr. and HALTER, J.B.: The endocrine pancreas and diabetes mellitus. En: WILLIAMS, R.H. (ed.): Textbook of Endocrinology, 6th ed. Saunders, Philadelphia, 1981; pp. 716-843.
- PRADAYROL, L., JOURNVALL, H., MUTI, V. and RIBET, A.: N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. FEBS Letters 109: 55-58, 1980
- PRANGE-HANSEN, A., ORSKOV, H., SEYER-HANSEN, K. and LUNDBAEK, K.: Some actions of growth hormone-release inhibiting factor. Br. Med. J. 3: 522-524, 1973.
- QUIRION, R., REGOLI, D., RIOUX, F. and ST-PIERRE, S.: An analysis of the negative inotropic action of somatostatin. Br. J. Pharmacol. 66: 251-257, 1979.
- RASOOL, C.G., SCHWARTZ, A.L., BOLLINGER, J.A., REICHLIN, S. and BRADLEY, W.G.: Immunoreactive somatostatin distribution and axoplasmic transport in rat peripheral nerve. Endocrinology 108: 996-1001, 1981.
- REED, J.D., HIRST, H., GOMEZ-PAN, A., COY, D.H., SCHALLY, A.V. and MEYERS, C.: Inhibition of gastric acid secretion by stereoisomers of somatostatin. Metabolism 27: 1411-1413, 1978.
- REICHLIN, S.: Neuroendocrinology. En: WILLIAMS, R.H. (ed.): Textbook of Endocrinology, 6th ed. Saunders, Philadelphia, 1981a; pp. 589-645.

- REICHLIN, S.: System for the study of regulation of neuropeptide secretion. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 28: 573-597, 1981b.
- REICHLIN, S.: Somatostatin. En: KRIEGER, D.T., BROWNSTEIN, M. and MARTIN, J.B. (eds.): Brain peptides. John Wiley, New York, 1982; pp. 712-752.
- REICHLIN, S.: Somatostatin. N. Engl. J. Med. 309: 1495-1501, 1556-1563, 1983.
- REID, I.A. and ROSE, J.C.: An intrarenal effect of somatostatin on water excretion. Endocrinology 100: 782-785, 1977.
- RENAUD, L.P.: Electrophysiology of brain peptides. En: GOTTO, A.M., Jr., PECK, E.J., Jr. and BOYD, A.E., III (eds.): Brain peptides: a new endocrinology. Elsevier/North Holland, Amsterdam, Elsevier/North Holland, 1979; pp. 119-138.
- RENE, E., REYL, F. and BONFILS, M.: Intérêt thérapeutique de la somatostatine en gastroentérologie. Gastroenterol. Clin. Biol. 4: 700-706, 1980.
- REUBI, J.C., PERRIN, M, RIVIER, J. and VALE, W.: Pituitary somatostatin receptors: dissociation at the pituitary level of receptor affinity and biological activity for selective somatostatin analogs. Regul. Peptides 4: 141-146, 1982.
- REUTER, H.: The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. J. Physiol., London 192: 479-492, 1967.
- REUTER, H.: Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. Prog. Biophys. Molec. Biol. 26: 1-43, 1973.
- REUTER, H.: Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle. J. Physiol., London 242: 429-451, 1974.
- REUTER, H. and SCHOLTZ, H.: The regulation of Ca conductance of cardiac muscle by adrenaline. J. Physiol., London 264: 49-62, 1977.
- REUTER, H. and SEITZ, N.: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J. Physiol., London 195: 451-470, 1968.

- REYL, F. and LEWIN, M.J.M.: Somatostatin is a potent activator of phosphoprotein phosphatases in the digestive tract. Biochim. Biophys. Acta (G) 675: 297-300, 1981.
- REYL, F.J. and LEWIN, M.J.M.: Intracellular receptors for somatostatin in gastric mucosal cells: Descomposition and reconstitution of somatostatin-stimulated phosphoprotein phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 978-982, 1982.
- RICHARDSON, S.B., HOLLANDER, C.S., D'ELETTO, R., GREENLEAF, P.W. and THAW, C.: Acetylcholine inhibits the release of somatostatin from rat hypothalamus in vitro. Endocrinology 107: 122-129, 1980.
- RICHARDSON, S.B. and TWENTE, S.: Stimulated somatostatin release from dispersed mouse hypothalamic cells: possible role of calmodulin. Program of the 65th Annual Meeting of the Endocrine Society, 1983; p. 84 (Abstract 15).
- RICHARDSON, V.I. and SCHONBRUNN, A.: Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture. Endocrinology 108: 281-290, 1981.
- RIVIER, J., BRAZEAU, P., VALE, W. and GUILLEMIN, R.: Somatostatin analogs. Relative importance of the disulfide bridge and of the Ala-Gly side chain for biological activity. J. Med. Chem. 18: 123-126, 1975.
- ROBBINS, R.J., SUTTON, R.E. and REICHLIN, S.: Sodium- and calcium-dependent somatostatin release from dissociated cerebral cortical cells in culture. Endocrinology 110: 496-499, 1982.
- RODRIGUEZ, S. and TAMARGO, J.: Electrophysiological effects of imipramine on bovine ventricular muscle and Purkinje fibres. Br. J. Pharmacol. 70: 15-23, 1980.
- RODRIGUEZ-ARNAO, M.D., GOMEZ-PAN, A., RAINBOW, S.J., WOODHEAD, S., COMARU-SCHALLY, A.M., SCHALLY, A.V., MEYERS, C.A. and COY, D.H.: Effects of prosomatostatin on growth hormone and prolactin response to arginine in man. Lancet 1: 353-356, 1981.
- RORSTAD, O.P., BROWNSTEN, M.J. and MARTIN, J.B.: Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in rat retina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3019-3023, 1979.

- RORSTAD, O.P., EPELBAUM, J., BRAZEAU, P., MARTIN, J.B.: Chromatographic and biological properties of immunoreactive somatostatin in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions of the rat. Endocrinology 105: 1083-1092, 1979.
- ROSENTHAL, J. ESCOBAR-JIMENEZ, F. and RAPTIS, S.: Prevention by somatostatin of rise in blood pressure and plasma renin mediated by beta-receptors stimulation. Clin. Endocrinol. 6: 455-462, 1977.
- ROSENTHAL, J. RAPTIS, S., ESCOBAR-JIMENEZ, F. and PFEIFFER, E.F.: Inhibition of frusemide-induced hyperreninaemia by growth-hormone releasing-inhibiting hormone in man. Lancet 1: 772-774, 1976.
- ROSENTHAL, J., RAPTIS, S., ZOUPAS, C. and ESCOBAR-JIMENEZ, F.: Hemodynamic and renin responses to somatostatin in essential hypertension. Metabolism 27: 1361-1363, 1978a.
- ROSENTHAL, J., RAPTIS, S., ZOUPAS, C. and ESCOBAR-JIMENEZ, F.: Inhibition by somatostatin of renin, blood pressure, and cardiac and stroke index in essential hypertension. Cir. Res. 43 (suppl. I): I-69-I-76, 1978b.
- ROTI, E., GHINELLI, C., BANDINI, P., DEL ROSSI, C., EMANUELE, R., ROBUSCHI, G. and GNUDI, A.: Effects of somatostatin in a case of severe hypoglycemia due to nesidioblastosis. J. Endocrinol. Invest. 4: 209-212, 1981.
- RUBIES-PRAT, J.: Futuras posibilidades terapéuticas de la somatostatina. Med. Clin. (Barc.) 80: 142-143, 1983.
- RUBINOW, D.R., GOLD, P.W., POST, R.M., BALLENGER, J.C., COWDRY, R., BOLLINGER, J. and REICHLIN, S.: CSF somatostatin in affective illness. Arch. Gen. Psychiatry 40: 409-412, 1983.
- SAID, S.I.: Vasoactive peptides. State-of-the-Art Review. Hypertension 5 (suppl. I): I-17-I-26, 1983.
- SAITO, H. and SAITO, S.: Effects of substance P and neurotensin on somatostatin levels in rat portal plasma. Endocrinology 107: 1600-1605, 1980.
- SAUNDERS, S.L., REIFEL, C.W. and SHIN, S.H.: Ultrastructural changes rapidly induced by somatostatin may inhibit prolactin release in estrogen-primed rat adenohypophysis. Cell Tissue Res. 232: 21-34, 1983.

- SAWANO, S., BABA, Y., KOKUBU, T. and ISHIZUKA, Y.: Effect of synthetic growth-hormone-release inhibiting factor on the secretion of growth hormone and prolactin in rats. Endocrinol. Jap. 21: 333-405, 1974.
- SAWYNOK, J., KATO, N., HAVLICEK, V. and BELLA, F.S.: Lack of effect of baclofen on substance P and somatostatin release from the spinal cord in vitro. Arch. Pharmacol. 319: 78-81, 1982.
- SCHALLY, A.V., DUPONT, A., ARIMURA, A., REDDING, T.W., NISHI, N., LINTHICUM, G.L. and SCHLESINGER, D.R.: Isolation and structure of somatostatin from porcine hypothalamus. Biochemistry 15: 509-514, 1976.
- SCHALLY, A.V., HUANG, W.Y., CHANG, R.R.C., ARIMURA, A., REDDING, T.W., MILLAR, R.P., HUNKAPILLER, M.W. and HOOD, L.E.: Isolation and structure of prosomatostatin: a putative somatostatin precursor from pig hypothalamus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4489-4493, 1980.
- SCHAUDER, P., McINTOSH, C. and ARENDS, J.: Somatostatin and insulin release from isolated rat pancreatic islets in response to D-glucose, L-leucine, alpha-ketoisocaproic acid or D-glyceraldehyde -evidence for a regulatory role of adenosine-3'5'-cyclic monophosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75: 360, 1977.
- SCHOFIELD, J.G. and BICKNELL, R.J.: Effects of somatostatin and verapamil on growth hormone release and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  fluxes. Molec. Cell. Endocrinol. 9: 255-260, 1978.
- SCHOFIELD, J.G., MIRA, F. and ORCI, L.: Somatostatin and growth hormone secretion in vitro: a biochemical and morphological study. Diabetologia 10: 385-386, 1974.
- SCHONBRUNN, A. and TASHJIAN, A.H.: Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. J. Biol. Chem. 253: 6473-6483, 1978.
- SCHUBERT, M.L. and MAKHLOUF, G.M.: Regulation of gastrin and somatostatin secretion by intramural neurons: effect of nicotinic receptor stimulation with dimethyl-phenylpiperazinium. Gastroenterology 83: 626-632, 1982.

- SCHUSDZIARRA, V., IPP, E., HARRIS, V., DOBBS, R.E., RASKIN, P., ORCI, L. and UNGER, R.M.: Studies of physiology and pathophysiology of pancreatic-D cell. Metabolism 27: 1227-1232, 1978.
- SCHUSDZIARRA, V., ROUILLER, D. and UNGER, R.H.: Oral administration of somatostatin reduces postprandial plasma triglycerides, gastrin and gut glucagon-like immunoreactivity. Life Sci. 24: 1595-1600, 1979.
- SCHUSDZIARRA, V., ZYZNAR, E., ROUILLER, D., HARRIS, V. and UNGER, R.H.: Free somatostatin in the circulation: amounts and molecular sizes of somatostatin-like immunoreactivity in portal, aortic, and vena caval plasma of fasting and meal-stimulated dogs. Endocrinology 107: 1572-1576, 1980.
- SEKIYA, A. and VAUGHAN WILLIAMS, E.M.: A comparison of the antifibrillatory actions and effects on intracellular cardiac potentials of pronethalol, disopyramide and quinidine. Br. J. Pharmacol. 21: 473-478, 1963.
- SERRANO, J.S., LASTRA, L.A. y GARCIA DE JALON, P.: Independencia del efecto antiarrítmico y el efecto bloqueante beta adrenérgico en estructuras cardíacas aisladas. XII Reunión Nacional S.E.C.F., Santiago, 1970.
- SHEN, L.-P., PICTET, R.L. and RUTTER, W.J.: Human somatostatin I: sequence of the cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4575-4579, 1982.
- SHEPPARD, M.C., KRONHEIM, S. and PIMSTONE, B.L.: Stimulation by growth hormone of somatostatin release from the rat hypothalamus in vitro. Clin. Endocrinol. 9: 583-586, 1979a.
- SHEPPARD, M., SHAPIRO, B., PIMSTONE, B., KRONHEIM, S., BERELOWITZ, M. and GREGORY, M.: Metabolic clearance and plasma half-disappearance time of exogenous somatostatin in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 50-53, 1979b.
- SHEPPARD, M.S., SPENCE, J.W. and KRAICER, J.: Release of growth hormone from purified somatotrophs: role of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate. Endocrinology 105: 261-268, 1979c.

- SHIELDS, D., WARREN, T.G., GREEN, R.F., ROTH, S.E. and BRENNER, M.J.: The primary events in the biosynthesis and post-translational processing of different precursors to somatostatin. En: RICH, D.H. and GROSS, E. (eds.): Peptides: synthesis-structure-function: proceedings of the seventh American Peptide Symposium. Rockford, Ill. Pierce Chemical Company, 1981; pp. 471-479.
- SILER, T.M., VANDERBERG, G., YEN, S.S.C., BRAZEAU, P., VALE, W. and GUILLEMIN, R.: Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 632-634, 1973.
- SILER, T.M., YEN, S.S.C., VALE, W. and GUILLEMIN, R.: Inhibition by somatostatin of the release of TSH induced in man by thyrotropin-releasing factor. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38: 742-745, 1974.
- SØRENSEN, K.V., CHRISTENSEN, S.E., DUPONT, E., HANSEN, A.P., PEDERSEN, E. and ØRSKOV, H.: Low somatostatin content in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: an indicator of disease activity? Acta Neurol. Scand. 61: 186-191, 1980.
- SPIEGEL, M.R.: Statistics. McGraw-Hill Book Co., 1961.
- SPIESS, J., RIVIER, J., RODKEY, J., BENNETT, C.D. and VALE, W.: Isolation and characterization of somatostatin from pigeon pancreas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2974-2978, 1979.
- SPIESS, J. and VALE, W.: Investigation of larger forms of somatostatin in pigeon pancreas and rat brain. Metabolism 27: 1175-1178, 1978.
- SPIESS, J. and VALE, W.: Multiple forms of somatostatin-like activity in rat hypothalamus. Biochemistry 19: 2861-2866, 1980.
- SRIKANT, C.B. and PATEL, Y.C.: Receptor binding of somatostatin-28 is tissue specific. Nature 294: 259-260, 1981a.
- SRIKANT, C.B. and PATEL, Y.C.: Somatostatin receptors: identification and characterization in rat brain membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3930-3934, 1981b.

- SRIKANT, C.B. and PATEL, Y.C.: Characterization of pituitary membrane receptors for somatostatin in the rat. Endocrinology 110: 2138-2144, 1982.
- STACHURA, M.E.: Interaction of somatostatin inhibition and dibutyryl cyclic AMP or potassium stimulation of growth hormone release from perfused rat pituitaries. Endocrinology 101: 1044-1053, 1977.
- STACHURA, M.E.: Potassium modification of the somatostatin effect on stimulated rat growth hormone release. Endocrinology 108: 1027-1034, 1981.
- STEWART, G.A.: The actions of digitalis leaf preparations and of cardiac glycosides on the isolated right ventricle of the guinea-pig. J. Pharm. Pharmacol. 10: 741-748, 1958.
- SUNDLER, F., HAKANSON, R. and LEANDER, S.: Peptidergic nervous systems in the gut. Clin. Gastroenterol. 9: 517-543, 1980.
- SZABO, M. and FROHMAN, L.A.: Effects of porcine stalk median eminence and prostaglandin E<sub>2</sub> on rat growth hormone secretion in vivo and their inhibition by somatostatin. Endocrinology 96: 955-961, 1975.
- SZABO, S. and USADEL, K.H.: Cytoprotection-organoprotection by somatostatin: gastric and hepatic lesions. Experientia 38: 254-256, 1982.
- SZECOWKA, J., SANDBERG, E. and EFENDIC, S.: The interaction of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), glucose and arginine on the secretion of insulin, glucagon and somatostatin in the perfused rat pancreas. Diabetologia 19: 137-142, 1980.
- TAKAHARA, J., YUNOKI, S., HOSOGI, H., YAKUSHIJI, W., KAGEYAMA, J. and OFUJI, T.: Concomitant increases in serum growth hormone and hypothalamic somatostatin in rats after injection of gamma-aminobutyric acid, aminoxyacetic acid or gamma-hydroxybutyric acid. Endocrinology 106: 343-347, 1980.
- TAMARGO, J.: Electrophysiological effects of bunaphtine on isolated rat atria. Eur. J. Pharmacol. 62: 81-88, 1980a.
- TAMARGO, J.: Electrophysiological effects of bunaphtine in guinea-pig ventricular fibres. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 246: 224-236, 1980b.

- TAMARGO, J., DE MIGUEL, B. and TEJERINA, M.T.: A comparison of josamycin with macrolides and related antibiotics on isolated rat atria. Eur. J. Pharmacol. 80: 285-293, 1982.
- TAMARGO, J., RODRIGUEZ, S. and GARCIA DE JALON, P.: Electrophysiological effects of desipramine on guinea-pig papillary muscles. Eur. J. Pharmacol. 55: 171-179, 1979.
- TAMINATO, T., SEINO, Y., GOTO, Y. and IMURA, H.: Interaction of somatostatin and calcium in regulating insulin release from isolated pancreatic islets of rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 928-934, 1975.
- TEJERINA, T., BARRIGON, S. and TAMARGO, J.: Comparison of three beta-aminoanilides: IQB-M-81, lidocaine and tocainide, on isolated rat atria. Eur. J. Pharmacol. 95: 93-99, 1983.
- TEJERINA, M.T., DELGADO, C., DIEZ, J. and TAMARGO, J.: Inotropic and electrophysiological effects of PY 108-068 on isolated cardiac preparations. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 271: 64-80, 1984.
- THEOHARIDES, T.C., BETCHAKU, T. and DOUGLAS, W.W.: Somatostatin-induced histamine secretion in mast cells. Characterization of the effect. Eur. J. Pharmacol. 69: 127-137, 1981.
- THOMAS, W.E.G.: Somatostatin - the long lost antral chalone. Med. Hypotheses 6: 919-927, 1980.
- TRAUTWEIN, W.: Membrane currents in cardiac muscle fibers. Physiol. Rev. 53: 793-835, 1973.
- TRITTHART, K., VOLKMER, R., WEISS, R. and FLECKENSTEIN, A.: Calcium-mediated action potentials in mammalian myocardium. Alteration of membrane response as induced by changes of  $Ca_e$  or by promoters and inhibitors of transmembrane Ca inflow. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 280: 239-252, 1973.
- TUNG, L. and MORAD, M.: Voltage- and frequency- dependent block of diltiazem on the slow inward current and generation of tension in frog ventricular muscle. Pflügers Arch. 398: 189-198, 1983.
- TYDEN, G., SAMNEGARD, H., THULIN, L., MUHRBECK, D. and EFENDIC, S.: Circulatory effects of somatostatin in anesthetized man. Acta Chir. Scand. 145: 443-446, 1979.

- TYRREL, J.B., LORENZI, M., GERICH, J.E. and FORSHAM, P.A.: Inhibition by somatostatin of ACTH secretion in Nelson's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40: 1125-1127, 1975.
- USADEL, K.-H., LEUSCHNER, V. and UBERLA, K.K.: Treatment of acute pancreatitis with somatostatin: a multicenter double-blind trial. N. Engl. J. Med. 303: 999-1000, 1980.
- UVNAS-WALLENSTEN, K.: Luminal secretion of gut peptides. Clin. Gastroenterol. 9: 545-553, 1980.
- VALE, W., BRAZEAU, P., RIVIER, C., BROWN, M., BOSS, B., RIVIER, J., BURGUS, R., LING, N. and GUILLEMIN, R.: Somatostatin. Rec. Prog. Horm. Res. 31: 365-397, 1975.
- VALE, W., RIVIER, C., BRAZEAU, P. and GUILLEMIN, R.: Effect of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. Endocrinology 95: 968-977, 1974.
- VAN NOORDEN, S., POLAK, J.M. and PEARSE, A.G.E.: Single cellular origin of somatostatin and calcitonin in the rat thyroid gland. Histochemistry 53: 243-247, 1977.
- VARAS-LORENZO, M.J.: Síndrome del somatostatinoma. Med. Clin. (Barc.) 78: 246-249, 1982.
- VARA-THORBECK, R., GARCIA-BLANQUE, C. and VILLEN, A.: Prevention of stress ulcer by cimetidine and somatostatin in rats. Langenbecks Arch. Chir. 351: 215-218, 1980.
- VEBER, D.F., FREIDINGER, R.M., PERLOW, D.S., PALEVEDA, W.J., Jr., HOLLY, F.W., STRACHAN, R.G., NUTT, R.F., ARISON, B.H., HOMNICK, C., RANDALL, W.C., GLITZER, M.S., SAPERSTEIN, R. and HIRSCHMANN, R.: A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin. Nature 292: 55-58, 1981.
- VESELY, D.L.: The interrelationship of somatostatin and guanylate cyclase activity. Molec. Cell. Biochem. 32: 131-134, 1980.
- WAKABAYASHI, I., MIYAZAWA, Y., KANDA, M., MIKI, N., DEMURA, R., DEMURA, H. and SHIZUME, K.: Stimulation of immunoreactive somatostatin release from hypothalamic synaptosomes by high  $K^+$  and dopamine. Endocrinol. Jap. 25: 601-604, 1977.

- WARD, F.R., LEBLANC, H. and YEN, S.S.C.: The inhibitory effect of somatostatin on growth hormone, insulin and glucagon secretion in diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 527-532, 1975.
- WASS, J.A.H., PENMAN, E., MEDBAK, S., DAWSON, A.M., TSIULAKIS, D., MARKS, V., BESSER, G.M. and REES, L.H.: Immunoreactive somatostatin changes during insulin-induced hypoglycaemia and operative stress in man. Clin. Endocrinol. 12: 269-275, 1980.
- WASS, J.A.H., PENMAN, E., MEDBAK, S., REES, L.H. and BESSER, G.M.: CSF and plasma somatostatin levels in acromegaly. Clin. Endocrinol. 13: 235-241, 1980.
- WEEKE, J., HANSEN, A.P. and LUNDAEK, K.: Inhibition by somatostatin of basal levels of serum thyrotropin in normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 168-171, 1975.
- WEHRENBURG, W.B., LING, N., BOHLEN, P., ESCH, F., BRAZEAU, P. and GUILLEMIN, R.: Physiological roles of somatocrinin and somatostatin in the regulation of growth hormone secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 109: 562-567, 1982.
- WEIDMANN, S.: The effect of cardiac membrane potential on the rapid availability of the Na-carrying system. J. Physiol., London 127: 213-224, 1955.
- WEITZMAN, R.E., FIREMARCK, H., RIVICZKY, A., NELSON, J.C.: Hypotension following intraventricular somatostatin (SRIF) is mediated by lowering of plasma catecholamines. Endocrinology 104: 292-297, 1979.
- WILDBRANDT, W. und KOLLER, H.: Die Calcium-Wirkung am Forscherzen als Funktion des Ionengleichgewichts Zwischen Zellmembran und Umgebung. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 6: 208-221, 1948.
- WILLIAMS, R.H.: Gastrointestinal hormones. En WILLIAMS, R.H. (ed.): Textbook of Endocrinology, 6th ed. Saunders, Philadelphia, 1981; pp. 685-715.
- WRIGHT, J., ABOLFATHI, A., PENMAN, E. and MARKS, V.: Pancreatic somatostatinoma presenting with hypoglycaemia. Clin. Endocrinol. 12: 603-609, 1980.

- YAMASHIRO, D. and LI, C.H.: Synthesis of a peptide with full somatostatin activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 882-888, 1973.
- ZINGG, H.H. and PATEL, Y.C.: Somatostatin precursors: evidence for presence in and release from rat median eminence and neurohypophysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 466-472, 1979.
- ZINGG, H.H. and PATEL, Y.C.: Biosynthesis of immunoreactive somatostatin by hypothalamic neurons in culture. J. Clin. Invest. 70: 1101-1109, 1982.
- ZIPES, D., BAILEY, J. and ELHARRAR, V. (eds.): The slow inward current and cardiac arrhythmias. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 1982.
- ZYZNAR, E., CONLON, J.M., SCHUSDZIARRA, V. and UNGER, R.: Properties of somatostatin-like immunoreactivity polypeptides in canine extrahypothalamic brain and stomach. Endocrinology 105: 1426-1431, 1979.

...oooOooo...

