

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Acciones presinápticas de los bloqueantes de los receptores B
adrenérgicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María López de Ceballos Lafarga

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5306073123

T 615.222

LOP

acc

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

«ACCIONES PRESINÁPTICAS DE LOS BLOQUEANTES
DE LOS RECEPTORES β ADRENERGICOS»

MEMORIA

que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
presenta

María López de Ceballos Lafarga



R. 23 .179

Madrid, junio de 1978



A Manuel, mi marido, que ha jugado un importante papel en este trabajo alentándome en todo momento, también agradezco la ayuda tanto moral como material que me ha prestado.

Esta Tesis ha sido realizada en la Sección de Farmacología del Instituto de Química Médica (C.S.I.C.) bajo la dirección del Prof. Joaquín Del Río Zambrana.

Deseo expresar aquí mi más sincero agradecimiento :

Al Prof. J. Del Río, Jefe de la Sección de Farmacología por su dirección y constante apoyo y al Prof. R. Madroño, Director del Instituto de Química Médica por su amable acogida. Así mismo agradezco al Prof. Arsenio Fraile Ovejero, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, al haberse dignado aceptar la ponencia de esta Tesis.

Deseo agradecer finalmente a mis compañeros de laboratorio la ayuda que en todo momento me han prestado, en especial a Carmen Urdín Camino.

INDICE

página

RESUMEN

2

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. LA NEUROTRANSMISION ADRENERGICA EN EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO 5

1.1. Biosíntesis y almacenamiento de la noradrenalina en las neuronas adrenérgicas 5

1.2. Mecanismo de recaptación de Noradrenalina 6

1.3. Liberación de Noradrenalina 9

1.4. Metabolismo de la Noradrenalina 12

1.5. Receptores localizados en las neuronas adrenérgicas 15

1.5.1. Receptores postsinápticos 16

1.5.2. Receptores presinápticos 17

2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS 22

2.1. Propiedades farmacológicas más importantes de los β -bloqueantes 22

2.2. Aplicaciones terapéuticas de los β -bloqueantes 24

2.3. Las acciones presinápticas sobre neuronas adrenérgicas de los β -bloqueantes como mecanismo posible de

su actividad antihipertensora	28
2.3.1. Bloqueo de las contracciones inducidas por <u>es</u> estimulación eléctrica	29
2.3.2. Acciones sobre la liberación de Noradrenalina inducida por estimulación eléctrica	33
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO Y JUSTIFICACION DE LOS MISMOS	37
3.1. Fármacos seleccionados	37
3.2. Modificación por los bloqueantes β -adrenérgicos de las respuestas a la estimulación eléctrica	39
3.2.1. Conducto deferente de rata aislado	39
3.2.2. Membrana nictitante de gato	40
3.3. Acción de los bloqueantes β -adrenérgicos sobre la liberación de ^3H -Noradrenalina inducida por la <u>estimula</u> ción eléctrica	41
3.3.1. Conducto deferente de rata	41
3.3.2. Aurícula izquierda de cobaya	43
3.4. Acción de los bloqueantes β sobre la incorporación de ^3H -Noradrenalina	44
3.5. Acción del propranolol sobre la actividad de la <u>mo</u> noamino-oxidasa de cerebro y tejido cardiovascular de rata	45

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION, FARMACOS Y PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS	47
2. ESTUDIOS SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO	48
2.1. Técnica general utilizada	48
2.2. Preparación con estimulación eléctrica	49
2.2.1. Tipos de estimulación	49
2.2.2. Parámetros de la estimulación	50
2.2.3. Técnicas operatorias	51
2.3. Preparación estimulada con Noradrenalina (NA) exógena	52
2.3.1. Dosis aisladas de NA	52
2.3.2. Dosis acumuladas de NA	53
2.4. Estudio de la liberación de ^3H -NA en conducto deferente	53
2.5. Estudio de la captación de ^3H -NA en conducto deferente	55
3. ESTUDIOS SOBRE AURICULA DE COBAYA AISLADA	56
4. ESTUDIOS SOBRE MEMBRANA NICTITANTE DE GATO ANESTESIADO	58
5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MONOAMINO-OXIDASA	58

CAPITULO III

RESULTADOS

1.EFECTOS DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS SOBRE LA RESPUESTA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO A LA ESTIMULACION ELECTRICA Y A LA NORADRENALINA EXOGENA	63
1.1.Contracciones inducidas por estimulación eléctrica	63
1.1.1.Efecto de los β -bloqueantes a concentración baja	64
a) Bloqueo máximo obtenido y tiempo que tardó en instaurarse	64
b) Efecto del lavado de la preparación sobre el bloqueo previamente establecido	68
c) Modificación por d-anfetamina del bloqueo	68
1.1.2.Efecto de los β bloqueantes a concentración alta	69
a) Bloqueo máximo obtenido y tiempo que tardó en instaurarse	69
b) Efecto del lavado de la preparación sobre el bloqueo previamente establecido	73
c) Modificación por d-anfetamina del bloqueo	74
1.2.Contracciones inducidas por Noradrenalina exógena	79
1.2.1.Dosis aisladas de Noradrenalina	79
1.2.2.Dosis acumuladas de Noradrenalina	86

1.3. Modificación por desipramina de la respuesta a la estimulación eléctrica	91
2. EFECTOS DEL PROPRANOLOL SOBRE LA RESPUESTA DE LA MEMBRANA NICTITANTE DEL GATO ANESTESIADO A LA ESTIMULACION ELECTRICA	94
3. EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS SOBRE LA LIBERACION DE 3 H-NORADRENALINA EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO	99
3.1. Liberación de 3 H-NA inducida por estimulación eléctrica	99
3.1.1. Experiencias preliminares	99
3.1.2. Estimulación intramural de baja frecuencia con electrodos de aguja	102
3.1.3. Estimulación de campo de baja frecuencia	108
3.2. Respuesta contráctil	114
3.2.1. Estimulación intramural	114
3.2.2. Estimulación de campo	117
4. EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS SOBRE LA LIBERACION DE 3 H-NORADRENALINA EN AURICULA DE COBAYA AISLADA	121
4.1. Liberación de 3 H-NA inducida por estimulación eléctrica	121
4.2. Efecto inotrópico positivo	124

5.EFECTOS DE LOS β -BLOQUEANTES Y DE OTROS FARMACOS SOBRE LA INCORPORACION DE 3 H-NORADRENALINA	131
5.1.Conducto deferente de rata	131
5.2.Aurícula de cobaya	133
6.EFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MONOAMINOXIDASA	135
 <u>CAPITULO IV</u> 	
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	
1.ESTUDIOS SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO	140
1.1.Respuesta contráctil	140
1.2.Liberación de 3 H-Noradrenalina	145
2.ESTUDIOS SOBRE MEMBRANA NICTITANTE DE GATO ANESTESIADO	150
3.ESTUDIOS SOBRE AURICULA DE COBAYA AISLADA	153
3.1.Efecto inotrópico positivo	153
3.2.Liberación de 3 H-Noradrenalina	154

4. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA MONOAMINO - OXIDASA (MAO)	160
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFIA	168

ABREVIATURAS MAS EMPLEADAS :

- ACh : acetilcolina
ADH : aldehído dehidrogenasa
AMPc : adenosín monofosfato cíclico
ATP : adenosín trifosfato
AR : aldehído reductasa
COMT : catecol-O-metiltransferasa
DBH : dopamina- β -hidroxilasa
DMI : desipramina
DOMA : ac. 3,4-dihidroximandélico
DOPA : dihidroxifenilalanina
DOPAL : aldehído 3,4-dihidroxifenilglicólico
DOPEG : 3,4-dihidroxifenilglicol
i.p. : intraperitoneal
MAO : monoamino-oxidasa
MOPEG : 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
NA : noradrenalina
NAD : nicotinamida adenina dinucleótido
NADP : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMN : normetanefrina
OMDA : metabolitos desaminados y O-metilados
p.o. : vía oral
TH : tirosinahidroxilasa
VMA : ac. 3-metoxi-4-hidroximandélico

RESUMEN

Este trabajo fue proyectado para estudiar distintos aspectos del mecanismo de acción de los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos que pueden contribuir a explicar la utilidad de estos fármacos en el tratamiento de la hipertensión arterial. Se estudió así su posible acción bloqueante de neuronas adrenérgicas de tipo guanetidina, su acción sobre los receptores β pre-sinápticos que regulan la liberación de noradrenalina y su acción sobre la enzima monoamino-oxidasa.

En la preparación de conducto deferente de rata aislado estimulado intramuralmente, el propranolol mostró acciones cualitativamente muy similares a las de la guanetidina. Esta analogía fue mucho menos marcada en el caso del alprenolol mientras que el INPEA, un antagonista β desprovisto de actividad anestésica local, no bloqueó en absoluto la respuesta contráctil del conducto deferente inducida por estimulación eléctrica. Por otra parte, los estudios realizados con el anestésico local procaína, así como con quinidina, sirvieron para demostrar que los efectos obtenidos con concentraciones bajas, del orden de 10^{-7} M, de propranolol no pueden ser atribuidos a la propiedad estabilizadora de membrana de esta sustancia sino más bien a una acción de tipo guanetidina. Sin embargo, en una preparación "in vivo" como es la membrana nictitante del gato anestesiado, no se pudieron poner de manifiesto de forma satisfactoria las acciones bloqueantes de neuronas adrenérgicas del propranolol.

Tras incubación del conducto deferente con ^3H -Noradrenalina, solamente la guanetidina fue capaz a concentraciones bajas de reducir el "overflow" del neurotransmisor marcado inducido por estimulación eléctrica. La ausencia de efecto de los anta-

gonistas β parece excluir la presencia de receptores β presinápticos en el conducto deferente de rata. Al subir cien veces, hasta 3×10^{-5} M, la concentración de los fármacos en estudio tanto la guanetidina como los antagonistas β redujeron el "overflow". No obstante, el hecho de que esta alta concentración de los antagonistas β prevenga ya la reincorporación de ^3H -noradrenalina no permite adscribir rigurosamente los efectos anteriores a un bloqueo de neuronas adrenérgicas.

En la aurícula izquierda de cobaya estimulada eléctricamente, los efectos obtenidos con bajas concentraciones de bloqueantes β adrenérgicos sí parecen compatibles con una regulación presináptica β de la liberación del neurotransmisor marcado. Este efecto no es dependiente de la concentración de los antagonistas β pues disminuye al elevar ésta, debido posiblemente a que el bloqueo de la reincorporación de noradrenalina puede determinar una estimulación de los receptores β presinápticos.

La actividad bloqueante de neuronas adrenérgicas del propranolol y el bloqueo de los receptores β presinápticos por propranolol o alprenolol puede pues servir para interpretar, al menos parcialmente, la actividad antihipertensora de estos compuestos. No parece, en cambio, que tenga ningún papel la inhibición de la monoamino-oxidasa de tejido cardiovascular o cerebral, que sólo se observa "in vitro" con altas concentraciones de propranolol y nunca "in vivo", incluso tras tratamientos prolongados.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. LA NEUROTRANSMISION ADRENERGICA EN EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO

1.1. Biosíntesis y almacenamiento de la noradrenalina en las neuronas adrenérgicas

La hidroxilación de la tirosina a DOPA, catalizada por la enzima tirosina-hidroxilasa constituye el paso limitante en la velocidad de la reacción de biosíntesis de catecolaminas. Esta hidroxilación, así como la decarboxilación de DOPA a dopamina ocurre en el citoplasma. La dopamina penetra seguidamente en los gránulos de almacenamiento en los que se convierte en noradrenalina (NA) (Fig. I). Estos gránulos contienen una alta concentración de catecolaminas, 21 % aproximadamente del peso seco, así como ATP en una relación molecular de 4: 1. Los gránulos también contienen unas proteínas específicas, las cromograninas, y la enzima dopamina hidroxilasa (DBH). El complejo catecolamina-nucleótido-proteína constituye el depósito de reserva, y en la médula adrenal es el mayor depósito de adrenalina, pero es dudoso que sea la principal reserva de NA en los terminales adrenérgicos. Dentro de las vesículas también existe un depósito móvil que se encuentra en equilibrio con el depósito móvil del citoplasma.

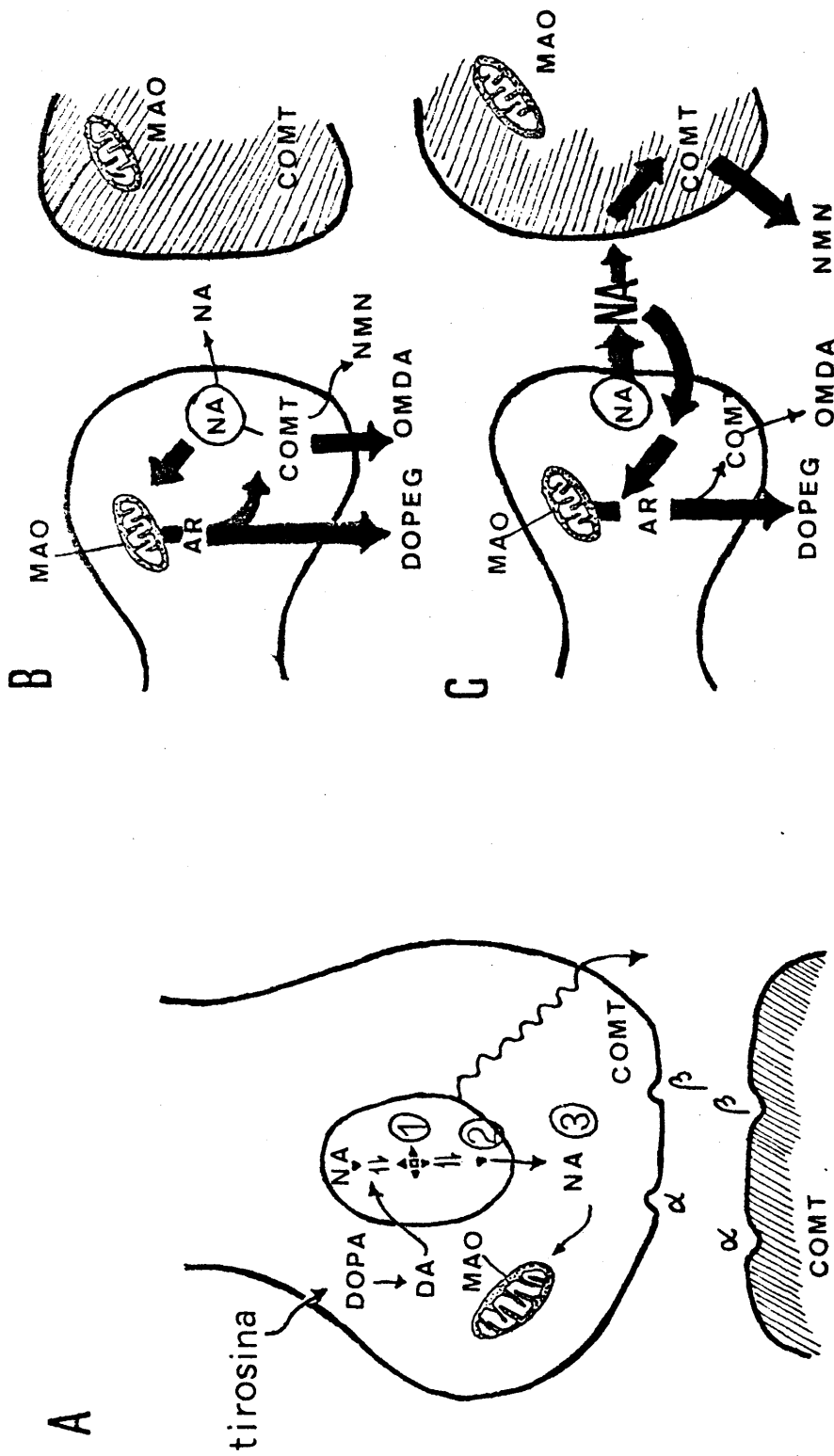


Fig. 1.-A. Esquema de la biosíntesis y almacenamiento de la noradrenalina (NA) en una neurona adrenergica. DA: dopamina, DOPA: dihidroxifenilalanina, MAO: monoamino-oxidasa, COMT: catecol-O-metiltransferasa. 1: depósito de reserva de NA, 2: depósito móvil vesicular, 3: depósito móvil citoplásmico. B. Representación esquemática del metabolismo de la NA en el "outflow" espontáneo. C. Metabolismo de la NA liberada por estimulación eléctrica. AR: aldehído reductasa, DOPEG: 3,4-dihidroxifenilglicol, NMN: normetanefrina, OMDA: metabolitos O-metilados y desaminados. La explicación de todo el proceso metabólico que tiene lugar en ambos casos está descrito en el texto (págs. 12 y siguientes).

1.2. Mecanismo de recaptación de Noradrenalina

El proceso de recaptación ó "uptake" se condidera una de las formas de conservar constante la cantidad de NA dentro de la neurona, pero se ha observado que realmente es importante como proceso de inactivación. Las neuronas poseen un sistema de transporte específico para el neurotransmisor que sintetizan y liberan, que en el caso de las neuronas adrenérgicas es la NA. Dentro del citoplasma neuronal existen otros tipos de captación para transferir las aminos del citoplasma al interior de las vesículas sinápticas, que actúan como almacenes de reserva.

El transporte de noradrenalina al interior de la neurona es un proceso muy activo: utilizando $^3\text{H-NA}$ se ha podido comprobar que la capacidad de concentración de la amina en corazón de rata, en 30 minutos, puede llegar a ser 60: 1, y considerando que el proceso de "uptake" está restringido casi por completo a los terminales nerviosos se deducen unos valores de 1000: 1 (Iversen, 1963). Como en otros sistemas de transporte, la proporción de NA captada es dependiente de la temperatura, lo que contrasta con la difusión pasiva. Diversos estudios han mostrado que la proporción de NA captada es insensible a inhibidores metabólicos, aunque una larga exposición en estas condiciones (anoxia, omisión de energía, etc) ó la combinación de inhibidores del metabolismo aerobio y de la glicolísis sí puede anularlo (Wakade y Furchgott, 1968). Existe una clara dependencia en la incorporación de NA de la pre

sencia de ión Na^+ en el medio externo: si éste se elimina se bloquea la captación, y por eso este sistema de transporte se puede bloquear con ouabaína, que inhibe la bomba de sodio (Na^+ / K^+ -ATPasa) (Bogdansky y Brodie, 1969). Debe indicarse, por otra parte, que al estudiar la captación de los isómeros ópticos de la NA y aminas similares, se ha observado que el proceso es más activo para las formas levógiras que para las dextrógiras, es decir, es estereoespecífico.

Se piensa que el papel más importante del "uptake" de la NA en la transmisión adrenérgica es terminar las acciones de la NA liberada por los terminales nerviosos. En efecto, la inhibición de las enzimas MAO y COMT tienen poco efecto en cuanto a potenciar ó prolongar las acciones de la NA exógena (Iversen, 1967), y sin embargo, la inhibición del "uptake" por cocaína ó desipramina sí lo tiene.

Una vez que la noradrenalina ha sido transportada a través de la membrana neuronal, una cantidad pasa al interior de las vesículas (Potter, 1966, 1967) lo que la protege de la pérdida por ligamiento ó por metabolismo. Las vesículas sinápticas juegan un papel muy importante en la biosíntesis, almacenamiento y liberación de la NA, ellas también son capaces de acumular mediante transporte activo el neurotransmisor. De distinto modo que el "uptake" neuronal ya descrito, el "uptake" de las vesículas tiene relativamente poca afinidad por las catecolaminas, y no depende de la presencia de Na^+ ó K^+ en el medio, y es insensible a bastantes inhibidores de la

captación neuronal, en las vesículas adrenales parece que es tá implicada en este proceso la ATPasa dependiente de Mg^{2+} , en este caso, sin embargo, este hecho no está claramente es tablecido. El inhibidor más potente del "uptake" vesicular es la reserpina, en tejidos tratados con este compuesto la NA acumulada se destruye rápidamente por actividad de la MAO intraneuronal (Lindmar y Muscholl, 1964; Iversen y col, 1965).

Aunque existe una considerable evidencia a favor de que la 3H -NA exógena sea tomada y almacenada en los nervios simpáticos, sin embargo, hay alguna duda de que ésta se mez cle homogéneamente con el depósito endógeno de NA. El almacenamiento de la NA marcada se produce en las vesículas cercanas a la membrana neuronal, puesto que esta zona es donde se ha encontrado la mayor concentración (Budd y Salpeter, 1969).

Además de la captación por los nervios adrenérgicos las catecolaminas exógenas pueden ser captadas por algunos tejidos no neuronales, por un sistema de transporte distinto del anterior. Esto se observó al perfundir tejidos con concentraciones altas de NA: el proceso se bloqueaba con normetanefrina y no por desipramina. La acumulación se lleva ba a cabo hasta alcanzar una proporción tejido: medio de 4: 1, y para diferenciarlo de la captación neuronal ó "uptake₁" se le denominó "uptake₂". El proceso es así mismo saturable, aunque demostró tener menos afinidad por las catecolaminas. Cuando el "uptake₁" está bloqueado, el "uptake₂" pasa a representar el papel más importante para la inactivación

de la NA (Langer, 1970; Hughes, 1972).

1.3. Liberación de la Noradrenalina

El impulso que viaja por el axon al llegar al terminal nervioso, en concreto a la varicosidad que se halla en su extremo, provoca una despolarización en la membrana por la que la NA se libera en la brecha sináptica. Podría sin embargo ocurrir que la descarga en espiga no fuera el estímulo necesario para esa liberación, como lo sugiere la observación de que los agentes despolarizantes de membrana, tales como K^+ ó la acetilcolina pueden inducir la liberación de la NA incluso en presencia de tetrodotoxina, que previene la propagación de los potenciales en espiga al bloquear selectivamente la permeabilidad al Na^+ . Es más, la tetracaína, un anestésico local, puede bloquear preferencialmente la entrada del Ca^{2+} , más que la del Na^+ y prevenir la liberación de la NA inducida por K^+ ó por ACh, aunque se produzcan las descargas (Haefely, 1972). Parece, pues, que el estímulo crucial para la liberación de la NA es la entrada del Ca^{2+} y no la despolarización del axon "per se".

Se sabe que la eficiencia en la liberación de NA puede variar con la frecuencia de la estimulación, la amplitud y la duración del potencial de acción (Haefely, 1972). A bajas frecuencias (0,5-2 Hz) el incremento de dicha liberación se pue

de deber a un aumento de la amplitud y duración del potencial de acción, pero a altas frecuencias (10 Hz en adelante) también existe un aumento en la eficiencia de la liberación debido a que disminuyen los mecanismos de inactivación (por ej. el "reuptake"). Sin embargo, llega un momento en que la liberación disminuye, sobre todo cuando los trenes de estímulos son muy largos, y aun no estando los depósitos de NA apreciablemente deprimidos, debido a un mecanismo de "feedback" negativo mediado por los receptores α presinápticos (aspecto sobre el que se insistirá más adelante), así como al agotamiento del potencial de acción (Kao y McCullough, 1973).

El mecanismo más apoyado es el de una pinocitosis invertida, es decir una "exocitosis". Este proceso incluye acercamiento y fusión de la membrana vesicular con la de la neurona, seguida de apertura y vaciamiento del contenido vesicular al espacio sináptico. Este proceso no está del todo esclarecido en las neuronas adrenérgicas aunque sí lo está en glándulas exocrinas e incluso, últimamente, en la glándula adrenal.

Hoy en día parece aceptado que la NA liberada por estimulación nerviosa tiene su origen en las vesículas de almacenamiento más que en la NA presente en el citoplasma, como se ha visto en tejidos reserpinizados en los que la MAO se había inhibido, cuya estimulación no aumenta la liberación de NA (Potter, 1967; Farnebo, 1971). Cuando se produce la estimulación se libera no sólo NA sino también

otra serie de compuestos presentes en la vesícula como son el ATP, la DBH ó la cromogranina, mientras que las enzimas citoplasmáticas no son liberadas en absoluto (Kirshner y Viveros, 1972; Smith y Winkler, 1972). Así mismo existe evidencia de la exocitosis como mecanismo de liberación de la NA gracias a los datos obtenidos por microscopía electrónica.

Las aminas simpaticomiméticas indirectas causan sus efectos por liberación de la NA y no por interacción con los receptores, hecho comprobado al utilizar cocaína que abole su efecto, (por ej. de tiramina), mientras que potencia la respuesta a la NA exógena (Burn y Tainter, 1931; Iversen, 1966). Por otro lado la denervación previene esta acción simpaticomimética, por lo que se sugirió que actuaban sobre la neurona presináptica (Burn, 1932). La teoría resultó apoyada por la observación de que al vaciar los depósitos de almacenamiento de NA con reserpina se abole el efecto de la tiramina, restaurándose sus acciones después de infusión con NA (Burn y Rand, 1958). El proceso para la liberación de NA por la tiramina parece, en efecto, que no es similar al proceso fisiológico: en la liberación de NA no se halla involucrado el mecanismo exocitótico, ni se trata de un proceso Ca^{2+} -dependiente.

Es un hecho conocido el que un tejido incubado con noradrenalina marcada, la libera posteriormente al estimular eléctricamente dicho tejido. Sin embargo parece existir una liberación preferencial de la 3H -NA cuando la cantidad utiliza-

da para la incubación es pequeña (menor de 10 ng / ml), mientras que al aumentar la concentración hasta 100 ng / ml, la amina marcada se mezcla homogéneamente con el neurotransmisor almacenado en el tejido (Hughes, 1973). Del mismo modo, parece ser que la NA recién sintetizada tiende a eliminarse más rápidamente que la NA almacenada (Hughes y Roth, 1974).

1.4. Metabolismo de la Noradrenalina

El metabolismo del neurotransmisor adrenérgico, la noradrenalina (NA), se lleva a cabo principalmente por dos enzimas, la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Diversos autores han demostrado que la MAO se halla tanto en los terminales nerviosos como extraneuronamente. La mayor parte de la COMT parece encontrarse en tejido extraneuronal, aunque recientemente se ha encontrado también localizada en los terminales adrenérgicos (Jarrott, 1971; Jarrott y Langer, 1971).

Existen además dos enzimas relacionadas con la reducción ó la oxidación del aldehído 3,4-dihidroxifenilglicólico (DOPAL), formado a partir de la NA por actividad de la MAO, y son la aldehído reductasa (AR) que es una enzima NADPH-dependiente y la aldehído dehidrogenasa (ADH) que es NAD-dependiente.

De los cinco metabolitos obtenidos como resultado de la

actividad de esas enzimas sobre la NA uno es O-metilado: la normetanefrina (NMN) y existen dos desaminados: 3,4-dihidroxifenilglicol (DOPEG) y el ácido 3,4-dihidroximandélico (DOMA). Los dos restantes son desaminados y O-metilados: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MOPEG) y el ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA).

En la mayoría de los tejidos inervados adrenérgicamente, previamente marcados con ^3H -NA, la liberación de radiactividad se debe a los metabolitos de la NA, y en general la ^3H -NA supone menos del 10 % del total de la radiactividad, siendo el DOPEG el metabolito que representa la mayor proporción del tritio recuperado en estado de reposo. Normalmente la siguiente fracción en importancia corresponde a los metabolitos O-metilados y desaminados (OMDA). La NMN representa un porcentaje bajo del total de metabolitos, pero como han demostrado Tarlov y Langer (1971) si se inhibe la MAO por pretratamiento con pargilina la NMN llega a representar el 25 % de la liberación espontánea de radiactividad en aurícula de cobaya aislada.

El DOPEG parece formarse exclusivamente dentro de los terminales nerviosos gracias a la actividad de la MAO intraneuronal y la AR (Adler-Graschinsky y col., 1972). En efecto el bloqueo selectivo de la MAO intraneuronal con bretilio aboló la liberación espontánea de ^3H -DOPEG sin afectar la cantidad de ^3H -DOMA que se obtiene en aurícula de cobaya, pues éste se forma mediante la actividad de la MAO extraneuronal y la ADH.

En experimentos en que la liberación del neurotransmisor es inducida por estimulación eléctrica, una importante fracción de la NA se recoge en forma de metabolitos, y de ellos el que se encuentra en mayor proporción es el ^3H -DOPEG, que en membrana nictitante de gato representa hasta el 50 % del "overflow" de ^3H (Langer y Enero, 1974). El ^3H -DOPEG resulta de la recaptación de ^3H -NA y de su posterior metabolismo a través de la MAO intraneuronal y la AR. Esta secuencia metabólica ha podido deducirse de observaciones en tejidos tratados con cocaína en los que queda impedida la formación de DOPEG por bloqueo de la reincorporación de la NA liberada tras la estimulación eléctrica. El origen de los metabolitos desaminados y O-metilados es similar al del DOPEG, recaptación y posterior metabolismo, pues se inhibe también su formación por cocaína, bloqueante de la recaptación. Sin embargo la ^3H -NMN se obtiene después de su captación extraneuronal y la actividad de la COMT, efectivamente cuando existe estimulación nerviosa, fenoxibenzamina (inhibidor del "uptake₁" y del "uptake₂") disminuye la aparición de la NMN en tejidos estimulados eléctricamente pero no en el "outflow" espontáneo. Como consecuencia de todos estos hechos el "reuptake" de la NA aparece como un mecanismo de inactivación más que como proceso para economizar el neurotransmisor que se podría volver a usar.

El ^3H -DOPEG representa, pues, el metabolito más importante obtenido a partir de la ^3H -NA en condiciones de reposo y durante la liberación inducida por agentes tipo reser

5306073-123

pina, por el ión K^+ y por estimulación nerviosa. El DOPEG no es retenido en la neurona ni acumulado en vesículas, por lo que se ha pensado que pudiera ejercer efectos propios y, efectivamente, Rubio y Langer (1973) han observado que el DOPEG es equipotente con la NA en cuanto a la inhibición de la tirosina hidroxilasa (TH) en aurícula de cobaya. El producto resultante de la O-metilación del DOPEG por la COMT es el MOPEG, que carece de efecto sobre la TH. La catecol-O-metiltransferasa puede, en consecuencia, regular la biosíntesis y liberación de NA. Los dos metabolitos desaminados (DOPEG y DOMA) y los dos O-metilados (MOPEG y VMA) son totalmente inactivos tanto como agonistas como antagonistas sobre los receptores adrenérgicos, la NMN, sin embargo, muestra efectos muy similares cualitativamente a los de la NA, por lo que tiene un especial interés la ruta metabólica del DOPEG en cuanto supone una terminación de los efectos de la NA.

1.5. Receptores localizados en las neuronas adrenérgicas

Por lo menos tres grupos de receptores son esenciales en la neurotransmisión. Los receptores sobre el soma y las dendritas de las neuronas, que determinan la frecuencia de los impulsos que llevan hasta el terminal del axon. Los receptores postsinápticos, por otra parte, reconocen el neurotransmisor y median la respuesta de la célula inervada. Aun

que estos son los receptores clásicos, y bastan para que el sistema opere, existe evidencia de que hay otra serie de receptores localizados en los terminales nerviosos y que sirven para controlar la liberación y en algunos casos la biosíntesis del neurotransmisor.

1.5.1. Receptores postsinápticos:

Una vez liberado el neurotransmisor interacciona con los receptores situados en la célula efectora obteniéndose como resultado una respuesta. Ahlquist (1948) clasificó estos receptores como α y β , basándose en el tipo de respuesta obtenida. En general la respuesta mediada por los receptores α en músculo liso es una contracción, mientras que al actuar la NA sobre los receptores β se obtiene una relajación. Sin embargo, no siempre ocurre así, pues por ej. la contracción del músculo cardíaco ocurre vía β adrenoceptores, y la activación de los receptores α y β del músculo liso intestinal provoca inhibición de su movimiento.

Un determinado tipo de tejido puede poseer receptores α , β ó de los dos tipos al mismo tiempo, como ocurre en el caso de los vasos sanguíneos que riegan los músculos esqueléticos, en los que bajas concentraciones de adrenalina al activar los receptores β provocan vasodilatación, pero si la concentración es mayor los α producen vasoconstricción. En general no existen compuestos que posean una acción exclusi

vamente sobre los receptores de uno u otro tipo, pero al predominar uno de los dos efectos se puede predecir su acción. Así la isoprenalina, que posee propiedades agonistas β , pero poca acción sobre los receptores α , aumenta el ritmo cardíaco y la fuerza de la contracción, dilata los vasos de los músculos esqueléticos disminuyendo la presión sanguínea y relaja el músculo liso bronquial, mientras que fenilefrina, cuyos principales efectos están mediados por receptores α , carece de efecto sobre el músculo cardíaco ó bronquial, pero produce vasoconstricción aumentando la presión sanguínea.

Gracias al descubrimiento de los bloqueantes de los receptores β selectivos se han podido clasificar éstos en dos grupos: β_1 situados en corazón e intestino y β_2 sobre músculo bronquial, lecho vascular y útero (Lands y col., 1967). Existen agonistas β selectivos, por ej. el salbutamol que relaja el músculo bronquial al estimular los receptores β_2 sin poseer efectos cardioestimulantes. Del mismo modo existen antagonistas β selectivos, el practolol, por ejemplo, bloquea preferencialmente los receptores β_1 cardíacos, mientras que con butoxamina los receptores β_2 del lecho vascular son los bloqueados de forma selectiva.

1.5.2. Receptores presinápticos:

Hasta hace relativamente poco tiempo no existían indicios de la existencia de unos receptores en la superficie ex

terna de la membrana de los terminales nerviosos. En 1957, Brown y Gillespie observaron que fenoxibenzamina, un α -drenolítico, aumentaba el "overflow" de NA, inducido por estimulación eléctrica en bazo perfundido de gato, aunque estos autores lo achacaron al bloqueo de los receptores α postsinápticos, con los cuales no se podría combinar el neurotransmisor quedando libre.

Más recientemente se ha constatado que el efecto contrario se obtiene con agonistas de α -adrenocceptores, y desde entonces se han encontrado las mismas acciones en todos los tejidos estudiados, independientemente de que la respuesta es té mediada por receptores α ó β . Aunque los antagonistas poseen a altas concentraciones otras propiedades, (por ej. fenoxibenzamina inhibe el "uptake" neuronal y extraneuronal), su acción sobre los receptores α presinápticos se observa ya a bajas concentraciones. Por lo que se refiere a los agonistas, la NA liberada activa esos receptores inhibiendo su propia liberación, es decir se trata de un sistema de "feedback" negativo, (Kirpekar y Puig, 1971; Farnebo y Hamberger, 1971).

Para que se ponga en marcha este mecanismo el neurotransmisor debe alcanzar una concentración umbral en la brecha sináptica. Así, en tejidos en que se han vaciado los depósitos de NA con reserpina ó por la inhibición de su síntesis con α -metil-p-tirosina, este mecanismo no actúa (Enero y Langer, 1973; Cubeddu y Weiner, 1975). Las condiciones de estimulación eléctrica influyen considerablemente en la modulación presináptica de la liberación de NA. Por ejemplo, Rand

y col. (1975) encontraron que la fenoxibenzamina no aumenta el "overflow" de ^3H -NA inducido por un sólo pulso en aurícula de cobaya, pero el "overflow" sí aumentó 4,5 veces cuando el tren utilizado fue de 16 pulsos. Por otro lado este sistema de regulación presináptica va perdiendo eficiencia según aumenta la frecuencia de estimulación (Starke y col, 1975a).

El "feedback" negativo presináptico que regula la liberación de la NA es operativo cuando la liberación se induce por estimulación eléctrica o por K^+ , sin embargo no actúa en absoluto en la liberación de NA por tiramina (Starke y Montel, 1973). Puede por consiguiente pensarse que la modulación presináptica consiste en una modificación de la cantidad de iones Ca^{2+} asequibles para el proceso de la liberación.

Aunque los receptores presinápticos y los postsinápticos sean estimulados por agonistas de α adrenoceptores y bloqueados por los α adrenolíticos, parece que los receptores postsinápticos, que median la respuesta del órgano efector, no son idénticos a los receptores presinápticos, que regulan la liberación de NA durante la estimulación nerviosa. Starke (1972) comprobó estas diferencias entre las potencias relativas de algunos agonistas α en corazón de conejo: mientras que metoxamina y fenilefrina activan preferentemente los receptores postsinápticos, noradrenalina, adrenalina y nafazolina poseen aproximadamente la misma potencia sobre los receptores presinápticos y los postsinápticos, y por último, oximetazolina, clonidina y tramazolina actúan, predominantemente, sobre receptores α -presinápticos. Estos últimos compuestos, debido a su efec

to inhibidor de la liberación de NA, a concentraciones que todavía no provocan una respuesta contráctil, reducen la respuesta a estimulación eléctrica. Así mismo existen diferencias en la potencia relativa de los α -adrenolíticos: fenoxibenzamina es más potente en bloquear los receptores postsinápticos, la fentolamina posee, en cambio, una potencia similar sobre los receptores presinápticos y los postsinápticos, sin embargo la yohimbina a concentraciones muy bajas (3×10^{-8} M) bloquea preferencialmente los receptores presinápticos produciendo un aumento en la liberación de NA y de la respuesta contráctil, en contra de lo que se podía esperar (Starke y col, 1975b).

Recientemente se ha postulado la existencia de un mecanismo de "feedback", aparte del ya citado, que estaría mediado por receptores β presinápticos y que actuaría de forma inversa: los agonistas β (isoprenalina) aumentarían la liberación de NA (Langer y col, 1974; Stjärne y Brundin, 1975). El incremento en la NA liberada al activar los receptores presinápticos es más acusado a bajas frecuencias de estimulación nerviosa (Langer y col, 1975), por eso el propio neurotransmisor facilitará su liberación a bajas frecuencias a través de dichos receptores. En cuanto a su naturaleza se sabe que Dahlöf y col. (1975) observaron bloqueo de dichos receptores con metoprolol, que es un bloqueante selectivo β_1 , pero en una publicación reciente Stjärne y Brundin (1976) sugieren que los β adrenoceptores presinápticos involucrados serían β_2 pues terbutalina y salbutamol aumentan la liberación

de NA, mientras que el agonista β_1 H110/38 carecía de efecto.

La facilitación de la liberación de NA por activación de los receptores β presinápticos podría estar mediada por un aumento en los niveles de AMPc en los terminales adrenérgicos. Se ha encontrado, que algunos inhibidores de la fosfodiesterasa aumentan la liberación de NA inducida por estimulación eléctrica (Langer y col, 1975; Cubeddu y col, 1975), y en bazo perfundido de rató algunos análogos de nucleótidos cíclicos aumentan la liberación tanto de NA como de DBH durante la estimulación nerviosa.

2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS

2.1. Propiedades farmacológicas más importantes de los β -bloqueantes

Estos compuestos antagonizan los efectos de las aminas simpaticomiméticas sobre los receptores β , reduciendo así los efectos cronotrópicos e inotrópicos cardíacos debidos a las catecolaminas circulantes. Los β -bloqueantes inhiben también los efectos vasodilatadores de las catecolaminas y aumentan por tanto el efecto presor de la adrenalina. Aparte de sus acciones sobre el miocardio y sobre la vasculatura, los bloqueantes β modifican igualmente otras acciones mediadas por estos receptores. Así, estos compuestos antagonizan la relajación de los músculos uterino y bronquiales inducida por las catecolaminas, y bloquean los efectos metabólicos mediados por los receptores β (lipolisis, glicolisis, glicogenolisis).

Dentro de los receptores β -adrenérgicos se ha distinguido tradicionalmente (ver por ej. Arnold y McAuliff, 1969) entre receptores β_1 y β_2 . Entre los primeros figurarían los que median el incremento de ritmo y fuerza cardíaca, la inhibición del músculo liso intestinal, la lipolisis, etc., mientras que los segundos serían los responsables de la broncodilatación, de la vasodilatación, de la glicogenolisis, etc. Esta división de los receptores β en dos tipos viene derivada del hecho de que

se conocen compuestos que antagonizan selectivamente algunas de las acciones antes citadas sin modificar otras, Existen por ej. bloqueantes selectivos de los receptores β_1 , tales como el practolol, que bloquea los efectos cardíacos de la isoprenalina sin modificar apenas la vasodilatación e hipotensión que aparece, y careciendo igualmente de efectos sobre el músculo liso bronquial. La butoxamina, en cambio, bloquea selectivamente los receptores β_2 y antagoniza las acciones vasodilatadoras de la isoprenalina, pero no sus efectos cardíacos. El propranolol, por último, es el prototipo de bloqueante no selectivo en cuanto que antagoniza en igual grado los efectos mediados por estimulación de receptores β_1 o β_2 . Algunos bloqueantes β , por ej. el alprenolol (Ablad, 1967) tienen en realidad un carácter de agonista parcial frente a los receptores β -adrenérgicos; es decir, tienen una cierta actividad agonista intrínseca que se pone sobre todo de manifiesto en preparaciones supersensibilizadas (Darias y col, 1974) pero se comportan como antagonistas en presencia del agonista puro.

Muchos de los bloqueantes de receptores β -adrenérgicos poseen, por otra parte, propiedades anestésicas locales (Howe y Shanks, 1966; Barrett y Cullum, 1968), y una consecuencia inmediata de estas acciones estabilizadoras de membrana es el aumento que inducen en el período refractario efectivo del músculo miocárdico (Darias y Del Río, 1974). Según varios autores (por ej. Lucchesi, 1964; Lucchesi y col, 1966; Somani y Lum, 1965) estas propiedades son las que de

terminan las acciones antiarrítmicas de los bloqueantes mientras que para otros (por ej. Barrett y Cullum, 1968; Dohadwalla y col, 1969; Flórez y Arconada, 1971) es primordial el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos.

Por lo que se refiere a sus efectos presinápticos sobre neuronas adrenérgicas, se ha descrito una acción tipo guanetidina (Mylecharane y Raper, 1970), que quizá pudiera condicionar las propiedades antihipertensoras encontradas en Clínica (Prichard y Gillam, 1964 y 1969), acción que más adelante se comenta de una forma más amplia. Se ha descrito, igualmente, que algunos bloqueantes β son capaces de inhibir la liberación de noradrenalina en los terminales nerviosos (Adler-Graschinsky y Langer, 1975) y de prevenir su reincorporación (Foo y col, 1968).

2.2. Aplicaciones terapéuticas de los β -bloqueantes

Los fármacos que bloquean los receptores β -adrenérgicos han sido utilizados en Medicina para controlar los efectos, especialmente cardíacos, de una actividad simpática excesiva. Se han obtenido resultados beneficiosos en el tratamiento del síndrome cardíaco hiperkinético (Warkentin y Valenca, 1965), en el feocromocitoma (Dornhorst y Laurence, 1963) y en el control de la taquicardia asociada a la tirotoxicosis (Shanks y Dunlop, 1969).

La indicación más clásica de los bloqueantes β es posiblemente el tratamiento de la angina de pecho (Epstein y Braunwald, 1968). Los bloqueantes β -adrenérgicos reducen el trabajo cardíaco y por tanto la demanda de oxígeno mediante el antagonismo que ejercen frente a los efectos inotrópicos positivos y cronotrópicos positivos de las catecolaminas. La eficacia de estos compuestos frente al efecto desperfarrador de oxígeno de las catecolaminas ha sido puesta de manifiesto en diversos trabajos (ver Karow, Riley, Ahlquist, 1971, para su revisión). Aparte de esto, los bloqueantes β pueden aliviar el dolor de la angina, bien por reducción de los requerimientos metabólicos del miocardio (al reducir el ritmo, la fuerza contráctil cardíaca, etc.) bien a través de una interferencia con la percepción sensorial del dolor anginoso (como consecuencia de su acción anestésica local antes mencionada).

Otra aplicación muy extendida de distintos β bloqueantes, fundamentalmente del propranolol, es el tratamiento de algunos tipos de arritmias cardíacas. Así, se han empleado en el tratamiento de las arritmias cardíacas debidas a una intoxicación digitalica (Stock y Dale, 1963) y en las arritmias ventriculares que surgen durante la anestesia por ciclopropano y halotano (Hess y Hamptons, 1964). Las arritmias de otra etiología responden menos satisfactoriamente a los antagonistas de β receptores, si bien el propranolol reduce el ritmo ventricular en el flutter y fibrilación auricular (Rowlands y col, 1965).

Varios β bloqueantes se han utilizado en el tratamiento de ciertos casos de hipertensión arterial, por ej. el propranolol (Prichard, 1969), el alprenolol (Furberg y Michaelson, 1969), el practolol y el sotalol (Sundquist y col, 1974), y el oxprenolol (Materson y col, 1976; Pearson y col, 1976), habiéndose obtenido con todos ellos resultados favorables.

Con respecto al mecanismo de la acción antihipertensora de los antagonistas β se ha postulado que se debe a un reajuste gradual de los barorreceptores, que entonces regulan la presión sanguínea a un nivel más bajo (Prichard y Gillam, 1969). Otros investigadores han sugerido que el efecto antihipertensor resulta del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en corazón, lo que causaría una disminución del gasto cardíaco (Frolich y col, 1968; Dorph y Binder, 1969). Se ha propuesto también que la inhibición de la secreción de la renina puede ser un mecanismo mediante el cual los β bloqueantes disminuyen la presión sanguínea (Bühler y col, 1972; Laragh, 1975), hecho que indudablemente es cierto pero que sólo puede ser aplicado a un reducido número de pacientes, precisamente aquéllos con un alto nivel plasmático de renina. También se ha sugerido como explicación para el efecto antihipertensor un lugar de acción central de los β -adrenolíticos (Day y Roach, 1974; Reid y col, 1974). Otra posibilidad, por fin, que ha recibido mucha atención estos últimos años es el hecho de que el propranolol deba su acción antihipertensora a una acción presináptica sobre neuronas adrenérgicas. Esta acción podría ser, según algunos autores (Mylecharane y Raper, 1970 y 1973; Eliash y Weinstock, 1971) de tipo guanetidina, o

bien podría venir mediada por el bloqueo de posibles receptores β presinápticos que controlaran la liberación de noradrenalina (Adler-Graschinsky y Langer, 1975).

Deben finalmente citarse las posibles aplicaciones psiquiátricas de los bloqueantes β . En algunos casos de ansiedad hay, a veces, síntomas de marcado componente somático (por ej. taquicardia, palpitaciones, temblor...), que contribuyen a acentuar el estado de ansiedad, que a su vez hace más acusados esos síntomas. En estos casos los β bloqueantes parecen poseer propiedades ansiolíticas similares a las de las benzodiazepinas como demuestran los trabajos de Mc Millin (1975) y de Krishnan (1976), en que el oxprenolol poseía la misma actividad ansiolítica que el diazepam en el tratamiento de individuos bajo una situación de "stress" agudo. No fueron tan concluyentes, sin embargo, los estudios realizados por Tyrer y Lader (1974) utilizando sotalol, y que achacaron a la falta de selección de los pacientes, ni los de Johnson y col (1976), que compararon el oxprenolol con el diazepam en el tratamiento de casos de ansiedad, encontrando que el diazepam poseía mayor efecto al cabo de una semana de tratamiento que el β bloqueante, aunque estas diferencias no eran notorias al cabo de tres semanas.

Es tentador atribuir al bloqueo periférico del propranolol sus efectos ansiolíticos. Sin embargo, hay cada vez más evidencia de que juegan algún papel sus efectos centrales, puesto que algunos β -bloqueantes cruzan la barrera hematoencefálica, como lo demuestran los efectos colaterales media

dos por el sistema nervioso central (insomnio, alucinaciones), que aparecen en el tratamiento con propranolol algunas veces. Uno de los posibles efectos centrales del propranolol puede ser su propiedad anticonvulsivante, compartida con alguno de sus metabolitos (Saelens y col, 1974; Saelens y col, 1977 a).

2.3. Las acciones presinápticas sobre neuronas adrenérgicas de los β -bloqueantes como mecanismo posible de su actividad antihipertensora

Según se comentó en el apartado anterior, los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos son hoy en día utilizados ampliamente en Clínica debido, fundamentalmente, a su actividad antihipertensora. De hecho estos fármacos, sobre todo el propranolol, figuran ya entre los antihipertensores más utilizados (ver por ej. Andersson y col, 1976) y son así mismo muy comunmente empleadas las asociaciones de β -bloqueantes con diuréticos o con vasodilatadores (cf. Materson y col, 1976).

También fueron comentadas anteriormente las hipótesis en torno a los mecanismos implicados en la actividad antihipertensora de los β -bloqueantes. De entre ellas, queremos comentar de una forma más amplia la referente a sus posibles acciones bloqueantes de neuronas adrenérgicas, de tipo guanetidina, así como la que sugiere una acción específica

de estos compuestos sobre receptores β presinápticos que regulan la liberación de noradrenalina. Estas hipótesis en torno a la importancia de las acciones presinápticas de los bloqueantes β en la mediación de su actividad antihipertensora resultan, en nuestra opinión, particularmente atractivas y son las que han motivado la realización del presente trabajo.

2.3.1. Bloqueo de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica

La característica farmacológica fundamental de los bloqueantes de neuronas adrenérgicas es su capacidad para antagonizar tanto "in vitro" como "in vivo" los efectos derivados de la estimulación eléctrica de los nervios adrenérgicos, potenciando en cambio la acción de las catecolaminas exógenas (Boura y Green, 1965).

Day y col (1968), estudiando comparativamente la guanetidina y el propranolol sobre conducto deferente de rata aislado estimulado eléctricamente, fueron los primeros que describieron que la actividad bloqueante en ambos casos era muy similar en cuanto a estabilidad del bloqueo y tiempo que tardaba en instaurarse, observando, sin embargo, que el efecto bloqueante de la guanetidina revertía mediante la adición de anfetamina mientras que no ocurría igual en el bloqueo producido por el propranolol.

Posteriormente, Mylecharane y Raper (1970) estudiando sobre conducto deferente de cobaya estimulado intramuralmente la acción del propranolol, junto con la de otros bloqueantes β adrenérgicos, encontraron varias acciones muy similares a las de la guanetidina: el bloqueo era más pronunciado a bajas (5-20 Hz) que a altas (50 Hz) frecuencias de estimulación, el bloqueo producido con concentraciones de 0,05 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tardaba en establecerse y una vez establecido no se modificaba por lavado de la preparación, y la anfetamina y la cocaína hacían revertir el bloqueo, concluyendo, pues, que estas acciones presinápticas de los bloqueantes no podían correlacionarse con sus acciones como antagonistas β o como depresores no específicos tipo quinidina. También en trabajos realizados "in vivo", Eliash y Weinstosk (1971) encontraron que el propranolol a muy bajas concentraciones (25-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) era capaz de bloquear las contracciones de la membrana nictitante de gato estimulada postgangliónicamente, resultando igualmente eficaz el isómero dextrógiro en cuanto al bloqueo de las contracciones, que mostró características similares en ambos casos al de la guanetidina.

Sin embargo, Barrett y Nunn (1970) estudiando conjuntamente el d-propranolol y la forma racémica sobre la arteria de oreja de conejo aislada y conducto deferente de rata encontraron bloqueo a concentraciones de 4,6 y 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con ambos compuestos. A concentraciones bajas los efectos fueron variables y frecuentemente se observó potenciación en las respuestas, considerando estos autores la importancia de los efectos anestésicos locales de esta clase de compuestos a los

que se deberían los efectos observados más que a una acción de tipo guanetidina. No obstante, Bourne (1974) no encontró correlación alguna entre actividad bloqueante de neuronas adrenérgicas y actividad anestésica local. En las experiencias realizadas por él, la potencia inhibidora de las contracciones en conducto deferente de rata de la guanetidina fue mucho mayor que la del propranolol, mientras que con la actividad anestésica local ocurrió exactamente lo contrario.

Mylecharane y Raper (1973) propusieron un mecanismo de acción dual de los β bloqueantes sobre el conducto deferente de rata estimulado intramuralmente, que armonizaba en cierto modo su trabajo previo (1970) con el antes citado de Barrett y Nunn (1970). A bajas concentraciones (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) todos los fármacos producían una reducción lenta en las respuestas a la estimulación simpática mientras que las respuestas a la NA exógena no se modificaban y el bloqueo, que era parecido con todos los compuestos, revertía con d-anfetamina pero no con el lavado. Con altas concentraciones (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de d-propranolol, de dl-propranolol y de guanetidina el bloqueo se establecía rápidamente, las respuestas a la NA exógena se potenciaban y el bloqueo revertía por lavado pero no se modificaba con d-anfetamina. A partir de estos datos sugirieron que a bajas concentraciones la acción de los antagonistas β era de tipo guanetidina mientras que a altas la actividad anestésica local era la responsable del bloqueo.

Dawes y Faulkner (1975) pretendiendo clarificar el papel del bloqueo de neuronas adrenérgicas en la acción anti-

hipertensora del propranolol, estudiaron su efecto sobre las respuestas a la estimulación simpática lumbar en pata perfundida de perro, no encontrando ningún bloqueo con concentraciones de 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sino, en general, una potenciación tanto en las respuestas inducidas por estimulación eléctrica como en las de la NA exógena, concluyendo por tanto que el propranolol carecía "in vivo" de acciones tipo guanetidina, datos absolutamente contrapuestos a los descritos previamente por Eliash y Weinstock.

Simultáneamente con la realización de este trabajo, otros autores (Hughes y Kneen, 1976) han investigado el efecto del propranolol sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de cobaya aislado. Utilizando electrodos paralelos, encontraron que concentraciones de 1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ redujeron la respuesta y el bloqueo fue fácilmente revertido por el lavado pero no por d-anfetamina, resultados distintos de los obtenidos con la guanetidina (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que indujo un bloqueo de instauración lenta y que fue totalmente revertido por d-anfetamina. Cuando la respuesta se obtuvo por estimulación mediante electrodos concéntricos, bajas concentraciones de propranolol redujeron apreciablemente la respuesta, efecto que fue achacado a su conocida acción anestésica local, no encontrando estos autores evidencia de un verdadero bloqueo de neuronas adrenergicas.

Debe citarse finalmente el reciente trabajo de Saelens y col (1977b) quienes encontraron un bloqueo por propranolol de

las contracciones inducidas por estimulación de campo en el conducto deferente de cobaya, proponiendo para esta acción un mecanismo independiente de las acciones β -bloqueantes o anestésicas locales de este fármaco, datos que, como puede verse más adelante, se aproximan a las conclusiones establecidas en nuestro estudio.

2.3.2. Acciones sobre la liberación de noradrenalina inducida por estimulación eléctrica.

La inhibición de la respuesta a la estimulación eléctrica que producen los bloqueantes de neuronas adrenérgicas, tales como la guanetidina, es debido a una disminución en la NA liberada. Otras sustancias, tales como los anestésicos locales, pueden reducir la conducción del impulso e inhibir de este modo también la liberación de noradrenalina (por ej. Starke y col, 1972). Se ha sugerido, de hecho, que el mecanismo de acción de la guanetidina puede implicar una acumulación selectiva del fármaco en el interior de la terminal adrenérgica en donde ejercería una acción similar a la de los anestésicos locales (Boura y Green, 1959). Un tercer mecanismo que puede jugar un papel fisiológico importante en la liberación de la noradrenalina es el mediado por los receptores α -adrenérgicos presinápticos, cuya activación disminuye la liberación de noradrenalina, mientras que su bloqueo aumenta la noradrenalina liberada durante la estimu-

lación nerviosa (Farnebo y Hamberger, 1971; Langer y col, 1977; ver así mismo la revisión de Starke y col, 1977).

Recientemente se ha postulado, que además de los receptores α presinápticos, que regulan la liberación de la noradrenalina inducida por estimulación nerviosa mediante un mecanismo de "feedback" negativo, existen otros receptores β presinápticos en los terminales adrenérgicos, y cuyo mecanismo sería de "feedback" positivo (Adler-Graschinsky y Langer, 1975).

Stjärne (1975), en un estudio realizado sobre conducto deferente de cobaya incubado previamente con $^3\text{H-NA}$, observó que la NA exógena disminuía la cantidad de $^3\text{H-NA}$ liberada por estimulación eléctrica de forma dosis dependiente, mientras que la isoprenalina, agonista β , no sólo no redujo el "overflow" de $^3\text{H-NA}$ sino que tendió a aumentarlo. Así mismo la isoprenalina ($1,2 \times 10^{-8}\text{M}$) aumentó la liberación del neurotransmisor marcado en los experimentos realizados en aurícula de cobaya por Adler-Graschinsky y Langer (1975), mientras que el propranolol (10^{-7}M) disminuyó la liberación de $^3\text{H-NA}$ inducida por estimulación nerviosa.

Resultados similares han sido obtenidos por diversos autores en varios tipos de tejidos (membrana nictitante, oviducto, bazo...). El aumento de la noradrenalina liberada en presencia de la isoprenalina es independiente de que la respuesta del órgano efector esté mediada através de receptores α o β (Langer y col, 1975). Sin embargo, la exposición a propranolol $0,1 \mu\text{M}$ no siempre reduce significativa-

mente la liberación de la NA, pues Stjärne y Brundin (1975) no observaron ninguna disminución cuando utilizaron vasos sanguíneos humanos. Por otra parte, en el trabajo exhaustivo realizado por Endo y col (1977) en busca de sistemas pre sinápticos para la modulación de la liberación de distintos neurotransmisores en nervios adrenérgicos de la arteria pulmonar, la isoprenalina en un intervalo de dosis muy amplio (10^{-9} - 10^{-6} M) no varió el "overflow" de NA inducido por es timulación eléctrica, y el propranolol, así mismo, careció de efecto.

Recientemente Yamaguchi y col (1977) demostraron que en perro anestesiado la infusión de isoprenalina aumentó la liberación de NA provocada por estimulación del nervio car dioacelerador a bajas frecuencias, y la administración del β bloqueante sotalol redujo significativamente la liberación de noradrenalina utilizando frecuencias de estimulación entre 1 y 5 Hz, lo que muestra, en consecuencia, el papel fisiológico representado por los receptores β presinápticos "in vivo".

Finalmente, al comparar los efectos del dl-propranolol y de sus estereoisómeros, Saelens y col (1977b), en su traba jo previamente comentado (ver apartado anterior), observaron inhibición de las respuestas a estimulación de campo en conducto deferente de cobaya, y dicha inhibición, que fue dosis dependiente, resultó algo más pronunciada en el caso del l-propranolol. Sin embargo, al investigar el efecto del d- y del l-propranolol sobre la inhibición de la liberación del neu rotransmisor inducida por la estimulación simpática observa

ron que eran equipotentes, encontrando un descenso significativo a una concentración tan baja como 6×10^{-7} M. Un resultado adicional de mucho interés fue que mientras el propranolol sólo inhibió el "overflow" de NA, la lidocaína produjo además una reducción paralela de la liberación de la enzima dopamina- β -hidroxilasa. Estos resultados llevaron a los autores a concluir que el bloqueo de neuronas adrenérgicas del propranolol está desligado de sus propiedades β -adrenolíticas o estabilizadoras de membrana.

3. OBJETIVOS DEL TRABAJO Y JUSTIFICACION DE LOS MIS- MOS

El presente trabajo fue planeado para estudiar la posibilidad de que las acciones presinápticas sobre neuronas adrenérgicas de los fármacos con actividad bloqueante de los receptores β -adrenérgicos fuesen responsables de su actividad antihipertensora. Con este fin se analizaron las analogías y las diferencias entre los β -bloqueantes y un bloqueante típico de neuronas adrenérgicas como es la guanetidina. Así mismo se consideró la acción de los β -bloqueantes sobre los receptores β -presinápticos que regulan la liberación del neurotransmisor. Se estudió, finalmente, la inhibición de la enzima monoamino-oxidasa tras el tratamiento crónico con β -bloqueantes en un intento adicional de encontrar factores que pudiesen contribuir a explicar la actividad antihipertensora de esta clase de fármacos.

3. 1. Fármacos seleccionados

Para llevar a cabo este estudio se eligieron tres bloqueantes β -adrenérgicos representativos: propranolol, alprenolol e INPEA. El propranolol es, sin duda, el prototipo de los bloqueantes β , es el más utilizado en Clínica de entre los fármacos de su clase, y fue así mismo el primer bloqueante

β utilizado para el tratamiento de la hipertensión (Prichard, 1969). El alprenolol es utilizado también como antihipertensor (Furberg y Michaelson, 1969) y sus propiedades farmacológicas generales son similares a las del propranolol, con la única excepción de que el alprenolol tiene además una cierta actividad agonista parcial a nivel de receptores β (Ablad, 1967). El INPEA, por último, fue seleccionado para poder incluir en este estudio un antagonista β sin actividad anestésica local (Murmman y col, 1966), propiedad que es muy común en esta clase de fármacos (Barrett y Cullum, 1968).

Los tres compuestos anteriores fueron siempre estudiados comparativamente con la guanetidina, fármaco bloqueante de neuronas adrenérgicas cuya aplicación clínica fundamental es el tratamiento de la hipertensión arterial. Por otra parte, y teniendo en cuenta las antes comentadas propiedades anestésicas locales de varios β -bloqueantes, se introdujo en este estudio un anestésico local típico como es la procaína. Finalmente se incluyó también en el estudio comparativo un fármaco antiarrítmico, la quinidina, cuyas propiedades estabilizadoras de membrana le asemejan a los anestésicos locales. De hecho, varias de las acciones antiarrítmicas que muestran algunos β -bloqueantes se explican por un mecanismo de acción tipo quinidina.

3.2. Modificación por los bloqueantes β -adrenérgicos de las respuestas a la estimulación eléctrica

3.2.1. Conducto deferente de rata aislado

En la primera parte del trabajo se estudió la acción de los β -bloqueantes sobre la preparación de conducto deferente de rata aislado, que posee una inervación predominantemente adrenérgica, que fue estimulada bien mediante trenes de pulsos cuadrados bien mediante noradrenalina exógena.

Teniendo en cuenta los datos conflictivos señalados anteriormente (Barrett y Nunn, 1970; Mylecharane y Raper, 1973) en torno al mecanismo por el cual los bloqueantes β antagonizan las respuestas a la estimulación eléctrica, estos fármacos fueron utilizados a dos concentraciones distintas, una baja de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (aproximadamente $3 \times 10^{-7} \text{M}$), a la cual el propranolol y el alprenolol ya inducen un claro bloqueo de los receptores β postsinápticos en otras preparaciones (Ablad, 1967; Darias y col, 1974) y otra concentración cien veces mayor a la que se pueden poner ya de manifiesto las acciones estabilizadoras de membrana de estos fármacos (Mylecharane y Raper, 1973).

Puesto que la anfetamina es capaz de desplazar a la guanetidina de sus lugares de acoplamiento intraneuronales (ver por ej. Gerkens y col, 1969) y de revertir en conse-

cuencia el bloqueo neuronal establecido, se estudió en todos los casos esta posible acción de la anfetamina tras el bloqueo inducido por los antagonistas β . Así mismo, y dado que el bloqueo de la conducción nerviosa inducido por los anestésicos locales es fácilmente reversible por lavado de la preparación, pero no así el inducido por la guanetidina (Day y col, 1968), se estudió este aspecto en otra serie de experimentos. También se consideró de interés analizar el efecto de los fármacos en estudio sobre las contracciones del conducto deferente inducidas por noradrenalina exógena, teniendo en cuenta que varias de las sustancias empleadas son capaces de prevenir el proceso de reincorporación del neurotransmisor (Iversen, 1967). Finalmente, y dado que la desipramina impide la captación de guanetidina por los terminales adrenérgicos (Brodie y col, 1965) se investigó la posibilidad de que la desipramina impidiese, del mismo modo, la captación de los β -bloqueantes, lo que evidentemente supondría un mecanismo de transporte común con el que opera en el caso de la noradrenalina y la guanetidina.

3.2.2. Membrana nictitante de gato

Teniendo en cuenta, de una parte, que en los experimentos anteriores los β -bloqueantes fueron capaces de antagonizar la respuesta a la estimulación eléctrica, y de otra los trabajos de Eliash y Weinstock (1971 y 1972) en torno a

la acción bloqueante de neuronas adrenérgicas "in vivo" del propranolol, pareció de interés estudiar la acción de los antagonistas β sobre las contracciones de la membrana nictitante del gato anestesiado inducidas por estimulación eléctrica del tronco simpático cervical. Esta aproximación tenía el interés evidente de poder demostrar una acción específica de bloqueo de neuronas adrenérgicas, excluyendo las posibles acciones de tipo anestésico local que únicamente interfieren en las preparaciones aisladas.

3.3. Acción de los bloqueantes β adrenérgicos sobre la liberación de ^3H -Noradrenalina inducida por la estimulación eléctrica

3.3.1. Conducto deferente de rata

El objetivo siguiente del trabajo fue el estudio en la posible correlación entre la actividad bloqueante de neuronas adrenérgicas de los antagonistas β (apartado 3.2.) y la disminución del "overflow" de noradrenalina inducida por estimulación eléctrica. Si los datos obtenidos en el estudio previo reflejaban de alguna forma un mecanismo de acción tipo guanetidina para los β -adrenolíticos, era lógico pensar que, al igual que la guanetidina, redujeran la liberación del neurotransmisor producida por estímulo eléctrico.

Para llevar a cabo este estudio, se incubaron previamente los conductos deferentes con ^3H -noradrenalina, midiéndose seguidamente el "overflow" de radiactividad tanto en condiciones basales como tras estímulo eléctrico, y en presencia o ausencia de fármacos. Con objeto de que el tritio liberado reflejase más fielmente la cantidad de neuro transmisor que pasaba al líquido de perfusión, se trabajó siempre en presencia del inhibidor de MAO pargilina. De esta forma, el tritio recogido correspondió casiexclusivamente a la mezcla de noradrenalina + normetanefrina, no afectándose por otra parte la cantidad total de radiactividad liberada por estimulación eléctrica (Langer, 1970).

En esta parte del trabajo se trató inicialmente de re producir lo más exactamente posible las condiciones experimentales utilizadas en el estudio previo (apartado 3.2.1.). Fue necesario, no obstante, modificar estas condiciones con objeto de poder precisar más claramente la acción de los fármacos sobre la liberación de tritio en reposo y durante la estimulación eléctrica, para lo cual se utilizó un único tren prolongado de estímulos en ausencia y en presencia de fármacos, expresándose siempre la cantidad de radiactividad liberada por estimulación eléctrica en relación con la radiacti vidad liberada espontáneamente.

Considerando, por otra parte, las diferencias que habían sido señaladas en un trabajo previo (Hughes y Kneen, 1976) en la acción antagónica de los β bloqueantes a los efectos de la estimulación eléctrica dependiendo del tipo de electrodos utilizados, pareció interesante ver si existía al-

guna diferencia al estimular el conducto deferente bien mediante electrodos de aguja insertados en la preparación, bien mediante estimulación de campo, midiéndose en todos los casos las modificaciones en la liberación basal de tritio, en el aumento relativo de la liberación de tritio provocado por estimulación eléctrica y en la amplitud de la respuesta contráctil.

3.3.2. Aurícula izquierda de cobaya

La sugerencia hecha por Adler-Graschinsky y Lanøer (1975) respecto a la presencia de receptores β presinápticos en la aurícula de cobaya, capaces de regular la liberación del neurotransmisor, nos movió a extender las experiencias anteriores sobre conducto deferente de rata a la aurícula izquierda de cobaya.

El planteamiento y desarrollo de estas experiencias fue prácticamente idéntico al utilizado en el apartado anterior por lo que se refiere a la presencia de pargilina en el líquido de perfusión, a los tiempos de incubación con ^3H -noradrenalina, fueron utilizados los mismos fármacos y la duración del tren de estímulos fue la misma. Se midió, así mismo, en todos los casos, la liberación de radiactividad espontánea o provocada por estimulación eléctrica, así como el efecto inotrópico máximo alcanzado.

Debemos indicar, finalmente, que en todos los casos en

que se midió la liberación de ^3H -NA se utilizó una frecuencia de 5 Hz, ya que la función moduladora de los receptores presinápticos se manifiesta de forma más clara cuando se utilizan bajas frecuencias de estimulación (Lanøer, 1970).

3.4. Acción de los bloqueantes β sobre la incorporación de ^3H -Noradrenalina

Es sabido que tanto la guanetidina como los bloqueantes β -adrenérgicos son capaces de prevenir la incorporación de noradrenalina a los terminales noradrenérgicos (Foo y col, 1968; Iversen, 1967). Este efecto podía, lógicamente, modificar la interpretación de los resultados obtenidos en los anteriores estudios de liberación puesto que un incremento de la concentración de ^3H -noradrenalina en el líquido de perfusión podía igualmente ser debido a un incremento en la liberación o a una disminución en la recaptación. Es por esto que se estudió la acción de los β -bloqueantes y demás fármacos sobre la incorporación de ^3H -noradrenalina por el conducto deferente de rata y por la aurícula de cobaya, utilizando concentraciones del neurotransmisor marcado y tiempos de incubación iguales que en las experiencias de liberación, con objeto de poder disponer de un índice relativo de potencia bloqueante de la captación de noradrenalina en la interpretación de los resultados anteriores.

3.5. Acción del propranolol sobre la actividad de la monoamino-oxidasa de cerebro y tejido cardiovascular de rata

El propranolol es capaz de inhibir la MAO de cerebro de rata, con una IC_{50} de $260 \mu M$ (Milmore y Taylor, 1975). Si bien esta concentración es demasiado alta, se pensó en la posibilidad de que un tratamiento crónico en la rata con propranolol pudiese llegar a inhibir la MAO, lo que podría contribuir a explicar la actividad antihipertensora de este bloqueante β . Para ello, tras un estudio previo de la actividad inhibidora de la MAO por el propranolol "in vitro", se hicieron tratamientos agudos y crónicos (hasta de 20 días de duración) con propranolol en la rata, midiéndose posteriormente la actividad enzimática en cerebro, corazón y arteria mesentérica.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACION, FARMACOS Y PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS

Se utilizaron en las experiencias ratas macho , de una raza derivada de la Wistar, de peso comprendido entre 250 y 350 g, y cobayas albinos, machos ó hembras indistintamente, cuyo peso varió de 400 a 600 g. Tanto las ratas como los cobayas procedieron de un criadero existente en este Instituto. Los gatos tuvieron un peso entre 3 y 5 kg, y se utilizó también machos ó hembras indistintamente.

La procedencia de los fármacos y productos químicos utilizados fue la siguiente:

Hidrocloruro de DL-noradrenalina (Sigma), sulfato de guanetidina (Ismelin^R, Ciba), hidrocloruro de propranolol (Sumial^R, ICI Farma), hidrocloruro de alprenolol (Aptina^R, Made), sulfato de D-anfetamina (Barcia), hidrocloruro de quinidina (Sigma), hidrocloruro de INPEA (Liade), hidrocloruro de procaína (Barcia), sulfato de atropina (barcia), hidrocloruro de pargilina (Abbott), hidrocloruro de desipramina (Pertofran^R, Geigy), y las aminos marcasas DL-³H-noradrenalina, hidrocloruro (actividad específica 15 Ci/mmol, Amersham) y ¹⁴C-tiramina, hidrocloruro (actividad específica 55 mCi/mmol, Amersham). Como líquido de centelleo se utilizó PCS (Amersham), adecuado para la medida de radiactividad de muestras en medio acuoso. Todas las sales inorgánicas utilizadas fueron de la casa Merck.

En los experimentos "in vitro", los fármacos fueron disuel

tos inmediatamente antes de su utilización en el líquido específico utilizado para la perfusión del órgano aislado. En los experimentos "in vivo" los fármacos se disolvieron en suero salino (ClNa 9%), siendo inyectados intravenosamente.

2. ESTUDIOS SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO

2.1. Técnica general utilizada

Una vez sacrificado el animal, se le extrajo mediante una incisión en la región escrotal uno de los conductos deferentes (que va del epidídimo a la próstata), que se introdujo en una placa Petri llena de líquido de Krebs, cuya composición era la siguiente :

Cloruro sódico	112,9 mM
Cloruro potásico	4,6 mM
Cloruro cálcico	1,9 mM
Sulfato magnésico	11,9 mM
Fosfato monopotásico	11,9 mM
Bicarbonato sódico	25,0 mM
Glucosa	11,3 mM

Al líquido de Krebs se le adicionó siempre EDTA (0,1 mM) y ácido ascórbico (1,1 mM). En los experimentos con ^3H -noradrenalina el líquido de perfusión contuvo además pargilina, en una concentración de $1,24 \times 10^{-4}$ M, para evitar en lo

posible el metabolismo de la noradrenalina.

Una vez limpio el conducto deferente de adherencias por su parte externa, procurando no lesionar la fibra muscular, se llevó a un baño de órgano aislado, lleno de líquido de Krebs y a una temperatura constante de 37° C. Uno de los extremos del conducto se conectó a un oxigenador por el que borboteaba continuamente gas carbógeno (95 % O₂, 5 % CO₂). A continuación, en una serie de experiencias, el conducto deferente se colocó en un baño de 30 ml de capacidad, y el otro extremo se conectó a una palanca isotónica cargada con 0,35 g, que amplificaba sobre un quimógrafo las contracciones del deferente. En otras experiencias, el baño utilizado fue de 5 ml de capacidad, y las contracciones se midieron en condiciones isométricas mediante untransductor de fuerza Grass FT-03, conectado a un polígrafo Grass Modelo 7.

2.2. Preparación con estimulación eléctrica

La estimulación se llevó a cabo mediante un generador de pulsos cuadrados (Stimulator II, B. Braun Elektronik).

2.2.1. Tipos de estimulación

En unos casos antes de montar el conducto deferente en

el baño, se introdujeron dos electrodos de aguja de platino, en forma de gancho en los extremos del tejido (estimulación intramural mediante electrodos de aguja).

En otros casos los electrodos de platino se colocaron paralelos al conducto deferente, evitando que lo rozaran, para producir estimulación de campo.

2.2.2. Parámetros de la estimulación

Para la estimulación eléctrica del conducto deferente los parámetros utilizados fueron los siguientes:

Cuando se emplearon condiciones isotónicas, los pulsos cuadrados fueron de 2 mseg de duración y una frecuencia de 20 Hz. Como voltaje se utilizó aquel que produjera contracciones supramaximales en el conducto deferente (en nuestro caso se trató en general de 90 V excepto en algunas experiencias que fue 75 V). El deferente fue estimulado cada 6 min durante 18 seg.

En otras experiencias, en que se emplearon condiciones isométricas, se utilizaron pulsos cuadrados de 1 mseg de duración, 5 Hz de frecuencia y también voltaje supramaximal, como en las experiencias anteriores. Se estimuló el conducto deferente durante dos períodos de 1 min de duración espaciados 40 min.

2.2.3. Técnicas operatorias

En las experiencias con estimulaciones repetidas cada 6 min, y contracciones medidas en condiciones isotónicas, una vez obtenidas varias contracciones iguales se añadió al baño el fármaco en estudio a distintas concentraciones inmediatamente después de una contracción, permaneciendo en contacto con la preparación hasta que se observó un bloqueo máximo estable. Posteriormente, en algunos casos se efectuaron lavados abundantes de la preparación, prosiguiéndose la estimulación eléctrica hasta comprobar el efecto del lavado. En otros casos, sin lavar, se estudió el efecto de la adición al baño de distintas concentraciones de d-anfetamina y se prosiguió la estimulación eléctrica el tiempo necesario para comprobar la modificación establecida. Finalmente, en algunas experiencias se interrumpió la estimulación eléctrica antes de la adición del fármaco y se comprobó el efecto de algunas dosis standard submaximales de noradrenalina (NA) (relación dosis-efecto), lavándose después de cada adición de NA y prosiguiéndose a continuación la experiencia con estimulación eléctrica. Cuando se tuvieron nuevamente varias contracciones iguales se añadió el fármaco, y una vez establecido el bloqueo se volvió a interrumpir la estimulación eléctrica para añadir al baño una de las dosis de NA antes ensayadas, lavándose a continuación y prosiguiendo la experiencia con estimulación eléctrica, en las mismas condiciones que antes. To

das las modificaciones obtenidas se expresaron como porcentaje de la respuesta inicial.

2.3. Preparación estimulada con Noradrenalina (NA) exógena

2.3.1. Dosis aisladas de NA

Una vez conectado el conducto deferente al oxigenador y a la palanca, se dejó reposar la preparación 10-15 min después de los cuales se adicionó la NA (estimulante α adrenérgico), que se dejó actuar durante 90 seg, a continuación se lavó y se dejó 2 min como tiempo de recuperación del deferente hasta la siguiente adición de agonista.

En cada experiencia se hizo inicialmente una curva dosis-efecto con objeto de fijar la DE_{50} aproximada de agonista (dosis que produce el 50 % del efecto máximo). Esta dosis se repitió un número suficiente de veces para tener seguridad de la constancia de la respuesta antes de añadir el fármaco en estudio.

Los compuestos en estudio se dejaron actuar durante 2 min y sin cambiar el líquido del baño se añadió la dosis standard de NA registrándose en la gráfica los efectos obtenidos. Una vez pasados los dos minutos de actuación de la NA se lavó la preparación y se continuó, de igual forma, adicionando NA a los

mismos intervalos hasta la estabilización de la respuesta.

Al igual que en el caso anterior, todas las modificaciones obtenidas se expresaron como porcentaje de la respuesta inicial.

2.3.2. Dosis acumuladas de NA

Se utilizó como agonista la noradrenalina, que fue adicionada al baño cada 90 seg en dosis semilogarítmicas crecientes, hasta alcanzar la máxima contracción del conducto deferente. Las concentraciones fueron ascendiendo desde un mínimo de 10^{-7} M a un máximo de 10^{-3} M. La curva acumulativa se repitió una ó dos veces más para tener constancia de la regularidad de la respuesta. En estas condiciones, en los casos de antagonismo competitivo, se consigue alcanzar la misma contracción máxima forzando adecuadamente la concentración de agonista.

2.4. Estudio de la liberación de ^3H -NA en conducto deferente

En estas experiencias, realizadas en baño de órgano aislado de 5 ml de capacidad, las contracciones se midieron en condiciones isométricas.

Una vez montado el conducto deferente en el baño y conectado al transductor, se le dió una tensión de 1 g, y se dejó estabilizar durante 10 min. Se hicieron seguidamente una serie de estimulaciones para dejar establecido el voltaje supramaximal necesario. A continuación se añadió al baño hidrocloreto de DL-³H-NA, en la cantidad necesaria para alcanzar una concentración de 0,5 μ M, cantidad que es lo suficientemente pequeña como para que sólo se produzca captación específica. Se incubó durante 30 min la preparación, y al cabo de este tiempo se hicieron una serie de lavados (8), espaciados 1 min. A partir de este momento se obtuvieron muestras del líquido de perfusión de 200 μ l cada 5 min, renovándose cada vez la cantidad sustraída de líquido. Una vez que el flujo de tritio fue constante (85 min) se procedió a la primera estimulación eléctrica, S₁, durante 1 min, y se recogió una muestra, como medida de la liberación* de NA. Durante los 40 min siguientes se prosiguieron los lavados, en iguales condiciones que antes, realizándose seguidamente la segunda estimulación, S₂, y recogiendo otra muestra. Las muestras del líquido de perfusión recogidas, de 200 μ l cada una, se llevaron a 2 ml de líquido

*) Debe precisarse aquí que, en general, el término liberación se utiliza para el paso de la NA del interior de los terminales nerviosos al fluido extracelular. Dado que la liberación no se puede medir directamente, sólo se puede determinar la fracción que escapa al ligamiento y al metabolismo y que difunde al medio de perfusión, fracción que se designa con el término "overflow". No obstante, y puesto que no existe una palabra precisa en castellano para, designar el "overflow", se han utilizado indistintamente los términos liberación y "overflow" para indicar siempre la ³H-NA recogida en el líquido de perfusión.

de centelleo PCS para la medida de radiactividad en un contador de centelleo de líquidos Packard, modelo 2425.

El conducto deferente fue seguidamente extraído del baño, secado y pesado. La radiactividad fue expresada como cpm/ mg de tejido/ min.

Cuando se estudió el efecto de los fármacos sobre la liberación de ^3H -NA inducida por estimulación eléctrica, éstos se añadieron inmediatamente después de la primera estimulación.

Se calculó en todos los casos la cantidad de tritio liberado espontáneamente por mg de tejido en ausencia y en presencia de fármaco (E_1 y E_2 respectivamente) así como la cantidad de tritio liberada por estimulación eléctrica (S_1 y S_2). Igualmente se midió la respuesta contráctil en ausencia y en presencia de fármaco (R_1 y R_2).

2.5. Estudio de la captación de ^3H -NA en conducto deferente

Una vez disecado y limpio el conducto deferente se llevó a un vaso de incubación con 5 ml de líquido de Krebs a 37°C y oxigenado con carbógeno. Los fármacos ensayados se añadieron a la solución a distintas concentraciones, efectuándose una preincubación durante 60 min. A continuación se añadió $10\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -NA (concentración final de $0,5\mu\text{M}$) y la incubación se continuó durante 30 min más. Una vez terminada la incubación se efectuaron 8 lavados de 2 min cada uno del tejido en vasos con

líquido de Krebs frío. Seguidamente, los conductos, se seccionaron, pesaron y homogenizaron en 6 ml de ClH 0,01 N, se añadió 15 ml de butanol y 4 g de ClNa, se agitó durante 20 min, y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Del anterior sobrenadante se recogió una muestra de 200 μ l que se llevó a un tubo con 2ml de líquido de centelleo para su contaje.

En todas las experiencias se procesó en paralelo un standard interno (tejido + cantidad conocida de $^3\text{H-NA}$) con objeto de calcular la recuperación. El valor medio obtenido para la recuperación fue el $45,3 \pm 3,9\%$ (media \pm s.e. de 20 experimentos). Los resultados se expresaron como el tanto por ciento de ^3H captado por los conductos deferentes tratados respecto a las experiencias de control, en que no se añadió fármaco alguno.

3. ESTUDIOS SOBRE AURICULA DE COBAYA AISLADA

Una vez sacrificado el animal, se le extrajo mediante una incisión en el tórax el corazón, del cual se separó la aurícula izquierda, que se introdujo en una placa Petri llena de líquido de Locke de la siguiente composición:

Cloruro sódico	154,0 mM
Cloruro potásico	55,6 mM
Cloruro cálcico	2,2 mM
Bicarbonato sódico	6,0 mM
Glucosa	11,1 mM

El líquido contuvo siempre, además, EDTA (0,04 mM), ac. ascórbico (0,11 mM), atropina (1,4 μ M) y pargilina $1,25 \times 10^{-4}$ M.

La aurícula fue dispuesta en un baño de órgano aislado de 5 ml de capacidad, a 37° C, haciendo borbotear carbógeno através de la solución y sometiendo a la aurícula a una tensión de 1 g a lo largo de toda la experiencia.

El tejido fue estimulado mediante un fino hilo de cobre cosido a la parte superior -electrodo activador- y en la parte inferior del baño de órgano se dispuso un segundo electrodo indiferente. La contracción fue registrada mediante un transductor de fuerza Grass FT 03 en un polígrafo de la misma marca. Para su estimulación, mediante el Stimulator II antes citado, se emplearon pulsos cuadrados de 1 mseg de duración, 4 Hz de frecuencia y voltaje supramaximal (en general 90 V).

La técnica utilizada para el estudio de la liberación de ^3H -NA, espontánea ó producida por estimulación eléctrica, fue la misma expuesta en el apartado 2.4. para el conducto deferente de rata. Se evaluó igualmente el efecto inotrópico máximo obtenido con cada tren de estímulos, en presencia y en ausencia de fármaco.

Para los estudios de captación se empleó, así mismo, la técnica utilizada en el caso del conducto deferente de rata (ver apartado 2.5.)

4. ESTUDIOS SOBRE MEMBRANA NICTITANTE DE GATO ANESTESIADO

Se utilizaron gatos anestesiados con 80 mg/kg de cloraloza y 5 mg/kg de pentobarbital. Los animales estuvieron ventilados artificialmente durante el experimento. La membrana nictitante, sometida a una tensión de 3 g, se conectó a través de una polea a un transductor de fuerza Grass FT 03, registrándose las contracciones en un polígrafo de la misma marca. Los fármacos se inyectaron mediante una cánula en la vena femoral. Se localizó la cadena simpática pregangliónica derecha, junto a la tráquea, a la que se fijaron unos electrodos de platino, que se conectaron a un estimulador eléctrico, (Stimulator II B. Braun Electronik). Para la estimulación eléctrica se utilizaron pulsos cuadrados de 1 mseg de duración, voltaje supramaximal, y frecuencias de 1, 2, 4, 10, 20 y 50 Hz, aplicados durante 15 seg. Una vez obtenidas dos series de respuestas control se inyectó el fármaco por vía intravenosa, repitiéndose la serie de estímulos eléctricos. En algunos casos, cuando el bloqueo se hubo instaurado, se administró d-anfetamina para ver si revertía dicho bloqueo.

5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MONOAMINOXIDASA

Para llevar a cabo la medida de la actividad de la mono

aminoxidasa (MAO) se utilizó un método radiométrico, basado fundamentalmente en la utilización de un substrato marcado isotópicamente con ^{14}C en una posición que permanece inalterada en la molécula tras la reacción de oxidación de la amina por el oxígeno del aire en presencia del catalizador enzimático:



En los ensayos "in vitro", concentraciones crecientes del posible inhibidor se preincubaron a temperatura ambiente con la fuente de enzima durante 15 min. En las experiencias "in vivo", el fármaco se administró a las ratas por vía intraperitoneal, ó por vía oral, disuelto en el agua de la bebida. Una vez terminado el tratamiento, agudo ó crónico, los animales se decapitaron, se les extrajo el cerebro, que se homogenizó a una temperatura de 0° a 4° C en 20 volúmenes de tampón fosfato 0,067 M (pH 7,2). El homogenizado así obtenido se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min y se separó el sobrenadante que fue la fuente de enzima.

El substrato* utilizado en este ensayo fue tiramina marcada isotópicamente. De la fuente enzimática se tomaron 25 μl y se le añadieron 50 μl de tampón fosfato 0,067 M (pH 7,2), y 100 μl de substrato (concentración final de tiramina 2,1 mM). La

*) La cantidad óptima de substrato fue ajustada previamente teniendo en cuenta que cumpliera las condiciones para una cinética de orden cero, que fuese lineal la cantidad transformada de substrato en función del tiempo y que hubiese también linealidad en la relación entre cantidad de proteína de la fuente enzimática y cantidad de producto de reacción formado.

mezcla se incubó a 37° C durante 30 min, pasados los cuales se interrumpió la reacción con 50 µl de ClO_4H al 60 %. Paralelamente al homogenizado problema, se procesó un control que no llevaba fármaco, así como el blanco de reacción que era idéntico al control, pero en el que había sido desnaturalizada la proteína mediante ebullición durante 2 min.

A continuación se prepararon las columnas de cromatografía, colocando en cada una de ellas 1,5 ml de resina Dowex 50 W-X8, cambiadora de catión. Antes de que se secase la resina se añadieron las muestras y a continuación se eluyó haciendo pasar 6 ml de agua desionizada que se recogieron en viales de contaje con PCS para proceder a cuantificar la radiactividad correspondiente en un contador de centelleo de líquidos.

Con el fin de expresar la actividad enzimática de la MAO por unidad de proteína, se procedió a determinar el contenido proteínico de cada homogenizado por el método de Lowry (Lowry y col.; 1951), basado en la formación de un complejo cobre-proteína en un medio alcalino que reduce el reactivo fosfomolibdico-fosfotungsténico (reactivo de Folin) formando un compuesto coloreado que se mide fotométricamente. Para disponer de una curva de calibrado, se prepararon unas soluciones de concentración conocida a partir de una solución acuosa de albúmina bovina a la concentración de 0,5 mg/ml. Se tomó un volumen de 200 µl del homogenizado problema ó de las soluciones conocidas, y se les añadió a cada uno 200 µl de NaOH 1 N, 200 µl de un reactivo compuesto por una parte de

tartrato sódico al 2 %, una parte de SO_4Cu al 1 % y 100 partes de CO_3Na_2 al 2 %, se agitó y se esperó 10 min, luego se añadieron 200 μl del reactivo de Folin 0,5 N y se midió la absorción a 750 $\text{m}\mu$ de cada muestra en un espectrofotómetro una vez transcurridos 30 min.

La actividad de la MAO se determinó también en corazón de rata, siendo la única diferencia con respecto al proceso antes descrito que el homogenizado se realizó tomando por cada gramo de tejido 5 ml de tampón fosfato 0,067 M (pH 7,2).

Finalmente, cuando la actividad de la MAO se valoró en arteria mesentérica de rata, se homogenizaron 10 mg de tejido (peso aproximado de dos arterias) en 400 μl de tampón fosfato 0,067 M (pH 7,2), tomando, sin centrifugación previa, 90 μl del homogenizado para el proceso. La concentración final de tiramina fue 6,3 mM, pues la actividad enzimática en arteria mesentérica es menor que en cerebro ó en corazón.

CAPITULO III
RESULTADOS

1. EFECTOS DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS SOBRE LA RESPUESTA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO A LA ESTIMULACION ELECTRICA Y A LA NORADRENALINA EXOGENA

1.1. Contracciones inducidas por estimulación eléctrica

En esta serie inicial de experimentos se utilizó la técnica descrita en el apartado 2.2. de Métodos, utilizando electrodos de aguja para la estimulación intramural del conducto deferente, con los siguientes parámetros: pulsos cuadrados de 2 mseg de duración, 20 Hz de frecuencia y voltaje supra-maximal. Los trenes de estímulos, que duraron 18 seg, se repitieron cada 6 min.

Se utilizaron dos concentraciones de fármacos, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ * (equivalente aproximadamente a $3 \times 10^{-7}\text{M}$), concentración a la cual guanetidina tiene actividad bloqueante de neuronas adrenergicas, y los antagonistas β ya bloquean los receptores β -

*) Al expresar las concentraciones en P/V en vez de en molaridades se encuentra una pequeña diferencia entre la concentración molar de las distintas sustancias. Las concentraciones molares correspondientes a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ son propranolol 0,33 μM , alprenolol 0,35 μM , INPEA 0,38 μM , guanetidina 0,34 μM , quinidina 0,27 μM . La procaína se utilizó a una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ equivalente a 220 μM . Puede observarse que la diferencia que se encuentra entre las distintas concentraciones molares es insignificante, cuando se comparan los β -bloqueantes utilizados y la guanetidina.

adrenérgicos sin poseer propiedades anestésicas locales, y otra cien veces mayor, $10 \mu\text{g/ml}$, concentración a la que varios de los fármacos utilizados muestran, además de la actividad ya descrita, otras acciones farmacológicas tales como propiedades estabilizadoras de membrana, actividad bloqueante de la captación de noradrenalina, etc.

1.1.1. Efecto de los β -bloqueantes a concentración baja

a) Bloqueo máximo obtenido y tiempo que tardó en instaurarse

Con guanetidina a la concentración de $0,1 \mu\text{g/ml}$ ($3,4 \times 10^{-7} \text{M}$), se observó una reducción gradual de la respuesta hasta un 35,6% de la respuesta inicial (media de 12 experiencias). Dicho bloqueo tardó en instaurarse un tiempo muy largo: 134 min (Fig 1). El propranolol redujo la respuesta a un 61,9% en un tiempo más corto, pues el bloqueo ya estaba establecido a los 95 min (Fig. 2). Muy similar al anterior fue el efecto del alprenolol a una concentración $0,1 \mu\text{g/ml}$, pues redujo la contracción del deferente a un 56,0% de la inicial en un tiempo de 88 min (Fig. 3). Cuando fue INPEA el β -bloqueante utilizado se observó que carecía de efecto sobre las contracciones, obteniéndose una media para 11 experiencias de 101,6%. La quinidina, finalmente, redujo en un tiempo de 38 min la contracción a un 83,9% del valor inicial, cifra significativamente diferente de la res-

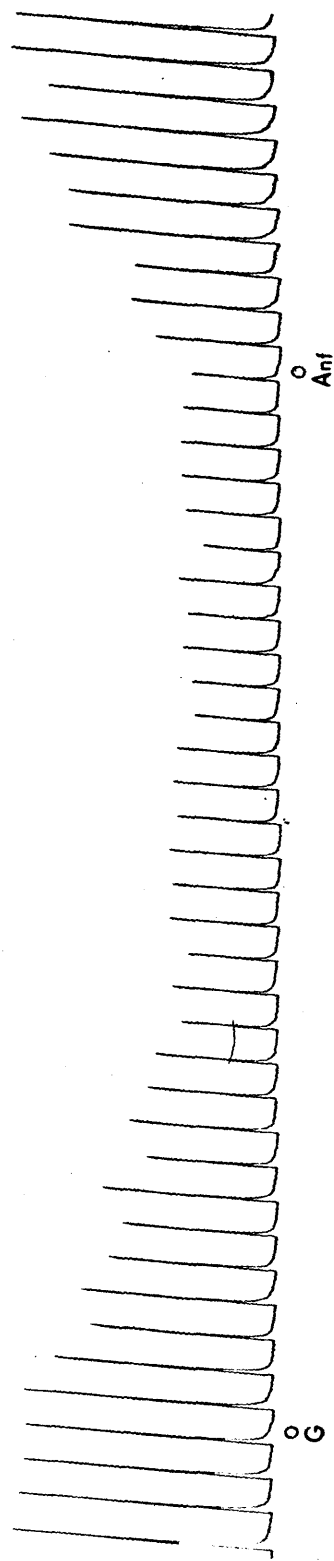


Fig. 1.-Efecto de la guanetidina (G, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre el conducto deferente de rata aislado estimulado eléctricamente y reversión del bloqueo mediante d-anfetamina (Anf, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las terminaciones nerviosas intramurales del conducto deferente fueron estimuladas con electrodos de aguja, utilizando pulsos cuadrados de 2 mseg de duración, 20 Hz de frecuencia y voltaje supramaximal. El músculo fue estimulado durante 18 seg cada 6 min. El registro se hizo en condiciones isotónicas.

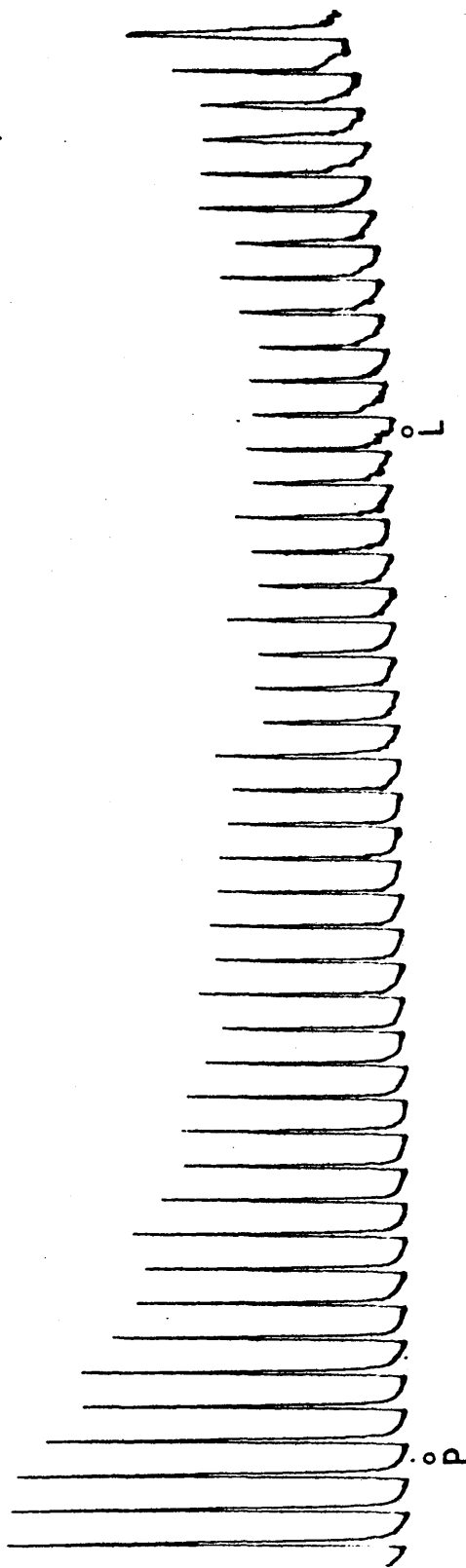


Fig. 2.-Efecto del propranolol (P, 0, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre conducto deferente de rata aislado es-timulado eléctricamente y reversión parcial del bloqueo mediante lavado de la preparación (L). Las condiciones experimentales utilizadas fueron las mismas indicadas en la Fig. 1.

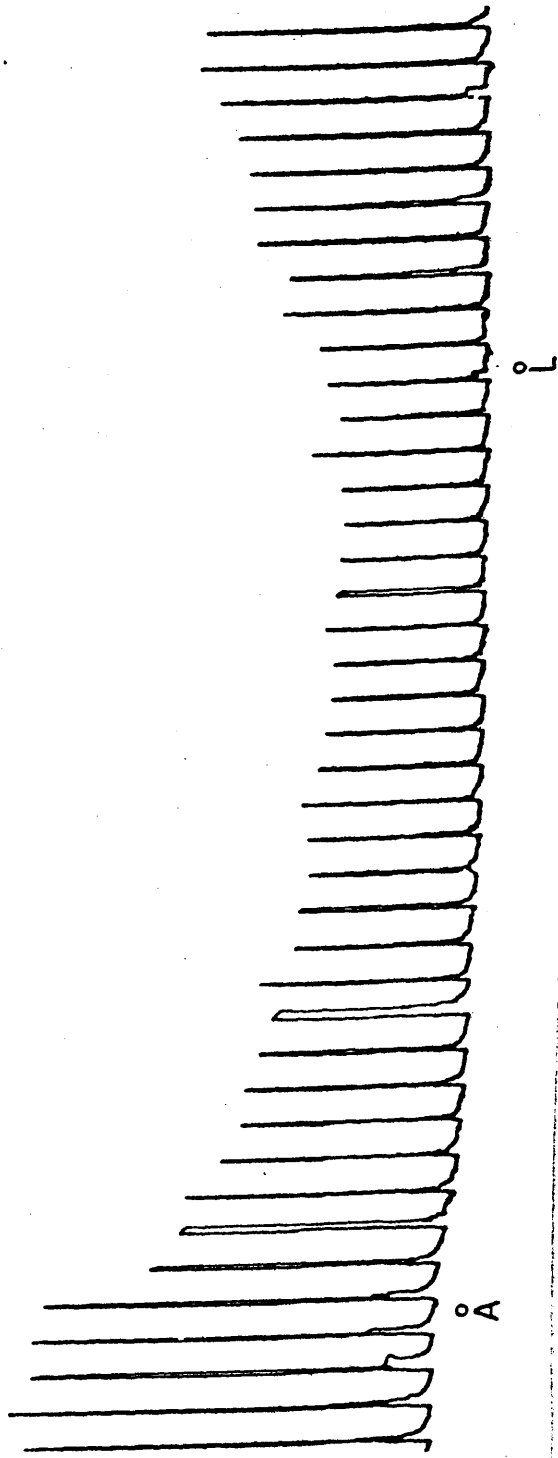


Fig 3. -Efecto del alprenolol (A, 0,1 μg /ml) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en el conducto deferente de rata aislado y reversión parcial del bloqueo mediante lavado de la preparación (L). Las condiciones experimentales utilizadas fueron las mismas indicadas en la Fig. 1.

puesta control. En las Figs. 5 y 6 se resumen los resultados obtenidos y se indica su significación estadística.

b) Efecto del lavado de la preparación sobre el bloqueo previamente establecido

Una vez instaurado totalmente el bloqueo se procedió a lavar repetidamente la preparación. En las experiencias en que se utilizó guanetidina a la concentración baja no hubo reversión del bloqueo, y la respuesta se mantuvo en un valor de 45,9 % (n=5), valor que no es significativamente distinto del previamente obtenido en el punto máximo de bloqueo (35,6 %). El lavado tampoco afectó el bloqueo producido por propranolol ó quinidina, pero sí hizo revertir significativamente la inhibición obtenida con alprenolol, pasando la respuesta desde un 56 % hasta un 78 % del valor inicial. En las Figs. 2 y 3 se incluyen algunos trazados representativos, y la Fig. 5 resume los resultados obtenidos.

c) Modificación por d-anfetamina del bloqueo

En las experiencias en que una vez establecido el bloqueo por guanetidina, sin lavado previo, se añadió anfetamina a una concentración de 0,1 µg/ml, se revirtió totalmente el efecto de la guanetidina obteniéndose un valor medio de 94,8 % ; esto es, la altura de la contracción volvió a sus valores iniciales (fig. 1). En las experiencias en que se estudió el efecto del propranolol, la anfetamina produjo también

reversión, alcanzándose un valor de 97,5 % (Fig. 4), e igual ocurrió, si bien en menor grado, en el caso del alprenolol. En la preparación pretratada con INPEA a concentración 0,1 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvo al añadir anfetamina una respuesta media de 114,3 %, es decir una leve potenciación, la misma que se observa en este tipo de preparación al utilizar solamente anfetamina a igual concentración. En el caso de la inhibición producida por quinidina hubo también reversión total del bloqueo. La Fig. 6 resume las modificaciones producidas por d-anfetamina sobre el bloqueo previamente establecido.

1.1.2. Efecto de los β -bloqueantes a concentración alta

Los distintos fármacos fueron estudiados, en iguales condiciones que antes, utilizando una concentración cien veces mayor : 10 $\mu\text{g/ml}$ (aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{M}$).

a) Bloqueo máximo obtenido y tiempo que tardó en instaurarse

Con guanetidina se alcanzó un bloqueo máximo considerable que llegó hasta un $16,4 \% \pm 3,0$ de la respuesta inicial, bloqueo obtenido además en corto tiempo : 21 min ($n=12$). En las 11 experiencias realizadas con propranolol se obtuvo un valor medio de $8,6 \% \pm 1,8$ (siempre en relación con la respuesta inicial), alcanzado en 50 min, tiempo más largo que en el

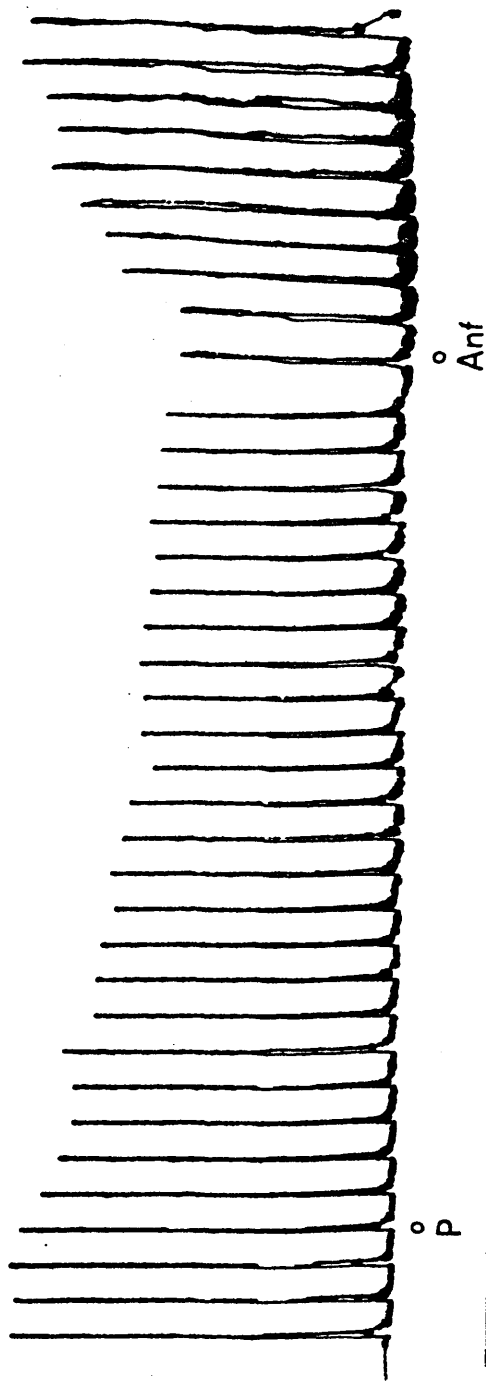


Fig. 4. -Efecto del propranolol (P, 0, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre el conducto deferente de rata estimulado eléctricamente y reversión del bloqueo mediante la d-anfetamina (Anf, 0, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La técnica operatoria fue la misma indicada en la Fig. 1.

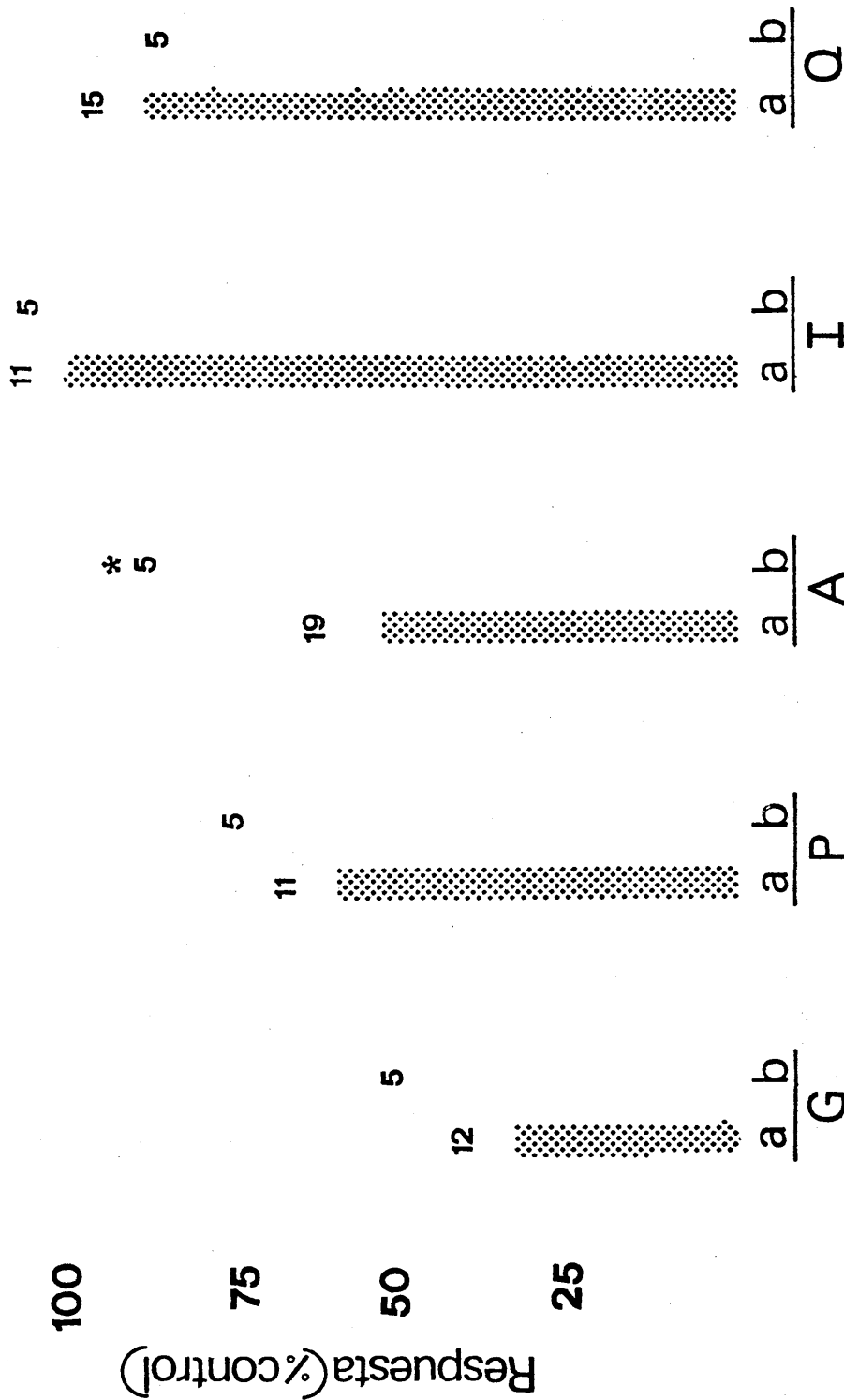


Fig. 5.-Efecto de las concentraciones bajas (0, 1 µg / ml) de guanetidina (G), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I) y quinidina (Q) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en el conducto deferente de rata. Los resultados se expresan como variación media ± s. e. en tanto por ciento. La columna a: variación máxima obtenida; la columna b: efecto del lavado de la preparación sobre el bloqueo obtenido. Encima de las columnas se indica el número de experiencias realizadas. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student) vs. los valores correspondientes de la columna a. Por otra parte, todos los valores de la columna a, excepto en el caso de INPEA, son significativamente distintos del valor de control ($p < 0,05$).

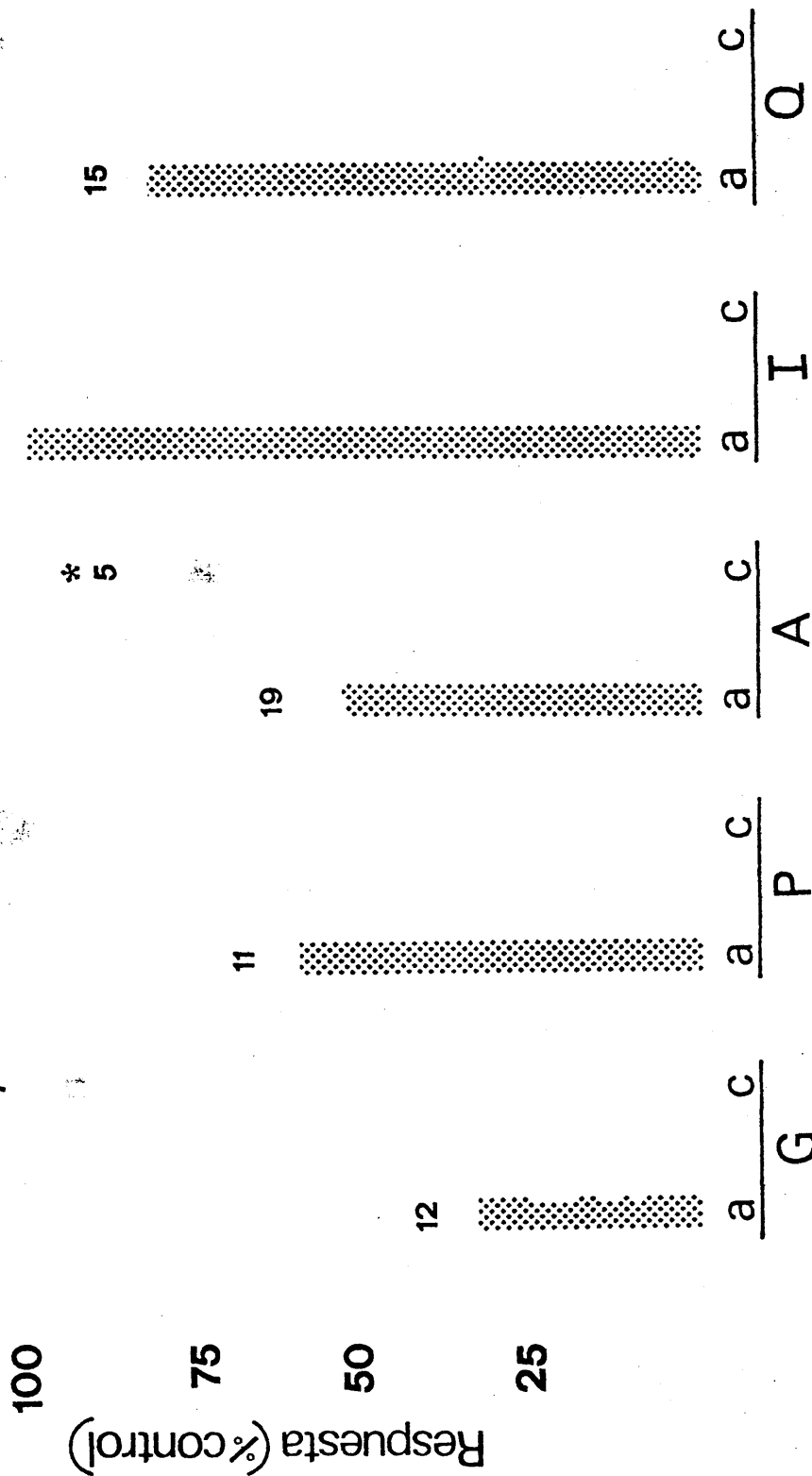


Fig. 6.-Efecto de las concentraciones bajas (0,1 µg / ml) de guanetidina (G), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I) y quinidina (Q) sobre el conducto deferente de rata estimulado eléctricamente. Los resultados se expresan como variación $\text{media} \pm \text{s.e.}$ en tanto por ciento. La columna a: varia ción máxima obtenida; la columna c: efecto de la d-anfetamina sobre el bloqueo establecido. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student) vs. los valores correspondientes de la columna a. Por otra parte, todos los valores de la columna a, excepto en el caso de INPEA, son significativamente distintos del valor de control ($p < 0,05$).

caso de guanetidina. Cuando se utilizó alprenolol el bloqueo fue similar : 8,4 % de la respuesta inicial (24 experiencias), en un tiempo de 54 min. El INPEA produjo potenciación de la respuesta, siendo la contracción obtenida ($120,4 \% \pm 4,5$; $n=5$), significativamente superior al control. La quinidina, a esta concentración alta, redujo la respuesta contráctil del deferente a $38,3 \% \pm 3,7$ del valor inicial, en un tiempo de 34 min. También se estudió el efecto de la procaína sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica, a una concentración de $60 \mu\sigma/ml$ observándose que la respuesta se redujo a un valor de 53,0 %, significativamente distinto del inicial, en sólo 6 min de exposición al fármaco. Las Figs. 7 y 8 reúnen algún trazado representativo y en la Fig. 9 se presenta el conjunto de resultados obtenidos.

b) Efecto del lavado de la preparación sobre el bloqueo previamente establecido

El lavado no afectó tampoco la preparación tratada con una concentración alta de guanetidina. Sin embargo el lavado revirtió el bloqueo tanto del propranolol como del alprenolol hasta un 44,8 % y 43,7 % del valor inicial respectivamente. La reversión fue pues sólo parcial, pero resultó significativa (Fig. 9). En las 5 experiencias en que se utilizó el INPEA se obtuvo una variación después del lavado de $89,6 \% \pm 5,7$, es decir la potenciación producida por el fármaco desapareció. El lavado hizo también revertir el bloqueo producido por quinidina a un $62,8 \% \pm 5,0$, valor distinto del bloqueo

máximo de 38,3 % obtenido. En el caso de la procaína también se observó igualmente reversión total por el lavado, (ver la Fig. 9).

c) Modificación por d-anfetamina del bloqueo

La d-anfetamina (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) adicionada a las preparaciones en que se había producido el bloqueo con guanetidina, no dió lugar a ningún cambio, pero sí se observó una leve reversión ($30,3\% \pm 5,5$) cuando la concentración de d-anfetamina fue incrementada hasta 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El bloqueo producido por propranolol no se modificó tampoco significativamente con la concentración baja de anfetamina, y el resultado obtenido al aumentar la concentración de éste fármaco no fue posible valorarlo dada la gran motilidad espontánea que apareció (Fig. 7). En los experimentos en que se usó alprenolol se observó, paradójicamente, que el bloqueo no sólo no revirtió con d-anfetamina sino que se acentuó de forma significativa (Fig. 8). Al añadir d-anfetamina al conducto deferente tratado con la concentración alta de INPEA se observó, igual que al emplear la concentración baja, una ligera potenciación. En el caso de la quinidina se obtuvo un valor medio de $32,7\% \pm 3,7$ con la primera adición de anfetamina, y al incrementar la concentración de ésta, este valor subió sólo a 35,7 %, no resultando significativamente distinto del valor medio de bloqueo previamente establecido. Cuando se estudió la modificación por d-anfetamina del bloqueo producido por procaína observamos que ninguna de las concentraciones produjo cam-

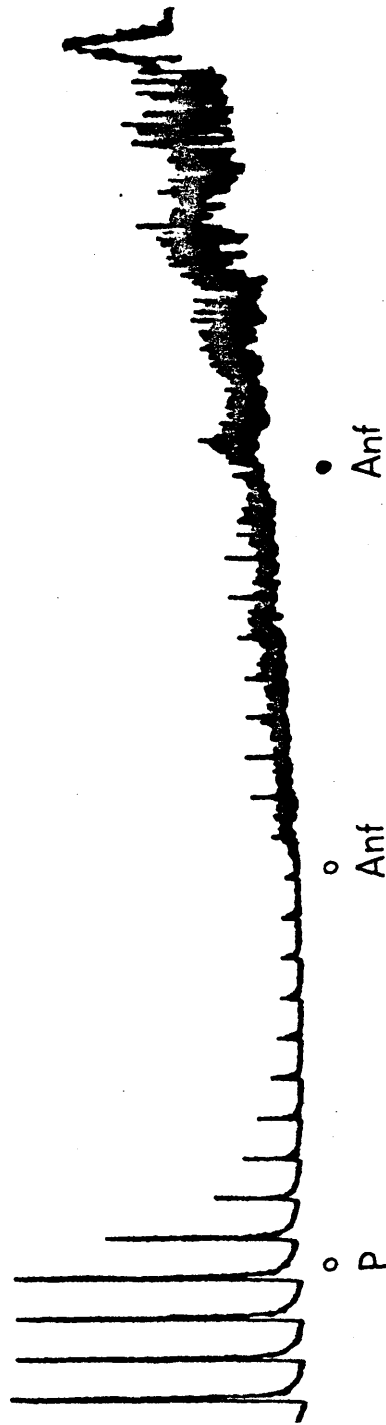


Fig 7. -Efecto del propranolol (P, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata aislado. Efecto de la d-anfetamina (Anf, 0,1 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre el bloqueo establecido. El conducto deferente fue estimulado intramuralmente mediante electrodos de aguja, utilizando pulsos cuadrados de 2 mseg de duración, 20 Hz de frecuencia y voltaje supramaximal. El músculo fue estimulado durante 18 seg cada 6 min. El registro se hizo en condiciones isotónicas.

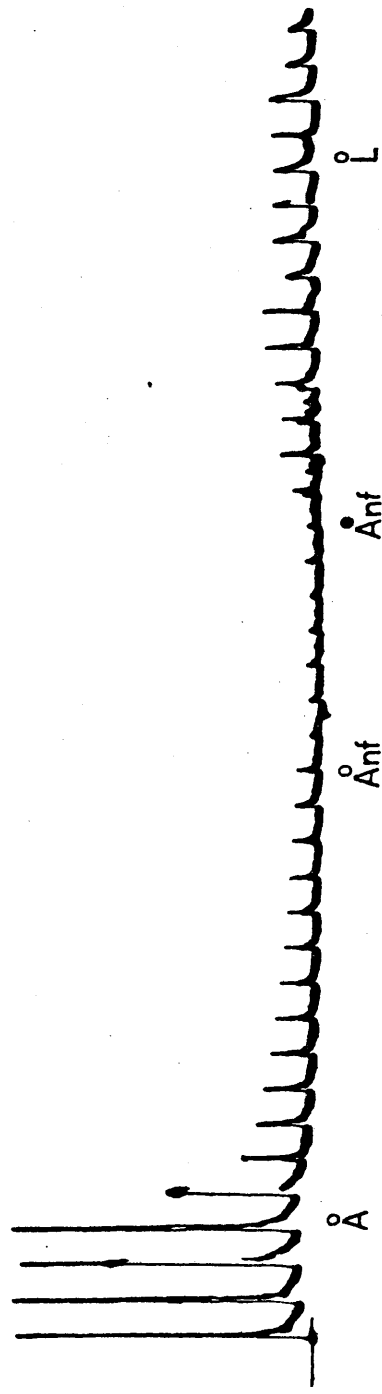


Fig. 8.-Efecto del alprenolol (A, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre el conducto deferente de rata estimulado eléctricamente y modificación del bloqueo por d-anfetamina (Anf, o 0, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, • 0, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las condiciones experimentales utilizadas fueron las mismas indicadas en la Fig. 7.

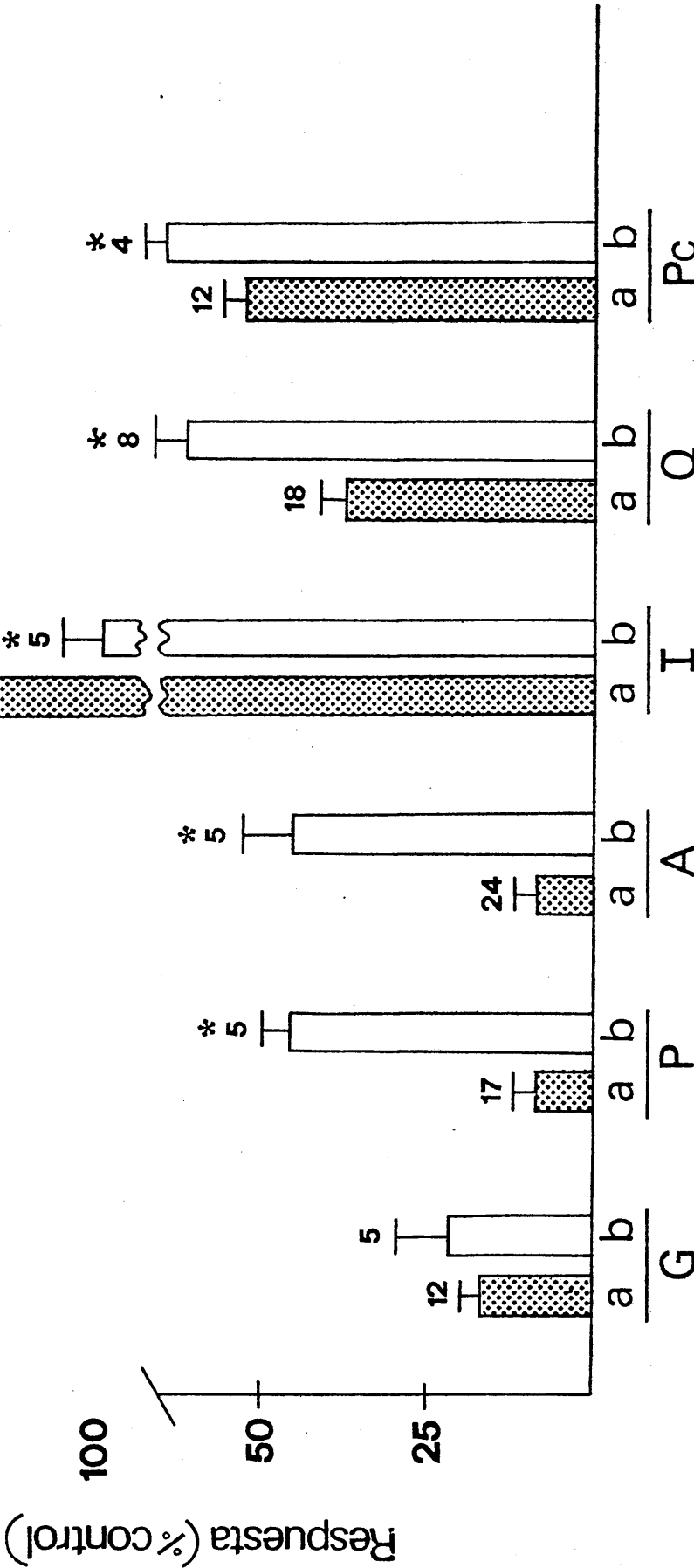


Fig. 9.-Efecto de las concentraciones altas (10 µg / ml) de guanetidina (G), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), quinidina (Q) y procaína (Pc, 60 µg / ml) sobre el conducto deferente de rata estimulado eléctricamente. Los resultados se expresan como variación media ± s.e. en tanto por ciento. La columna a: variación máxima obtenida; la columna b: efecto del lavado de la preparación sobre el bloqueo establecido. Encima de las columnas se indica el número de experiencias realizadas. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student) vs. los valores correspondientes de la columna a. Por otra parte, todos los valores de la columna a son significativamente distintos del valor de control ($p < 0,05$).

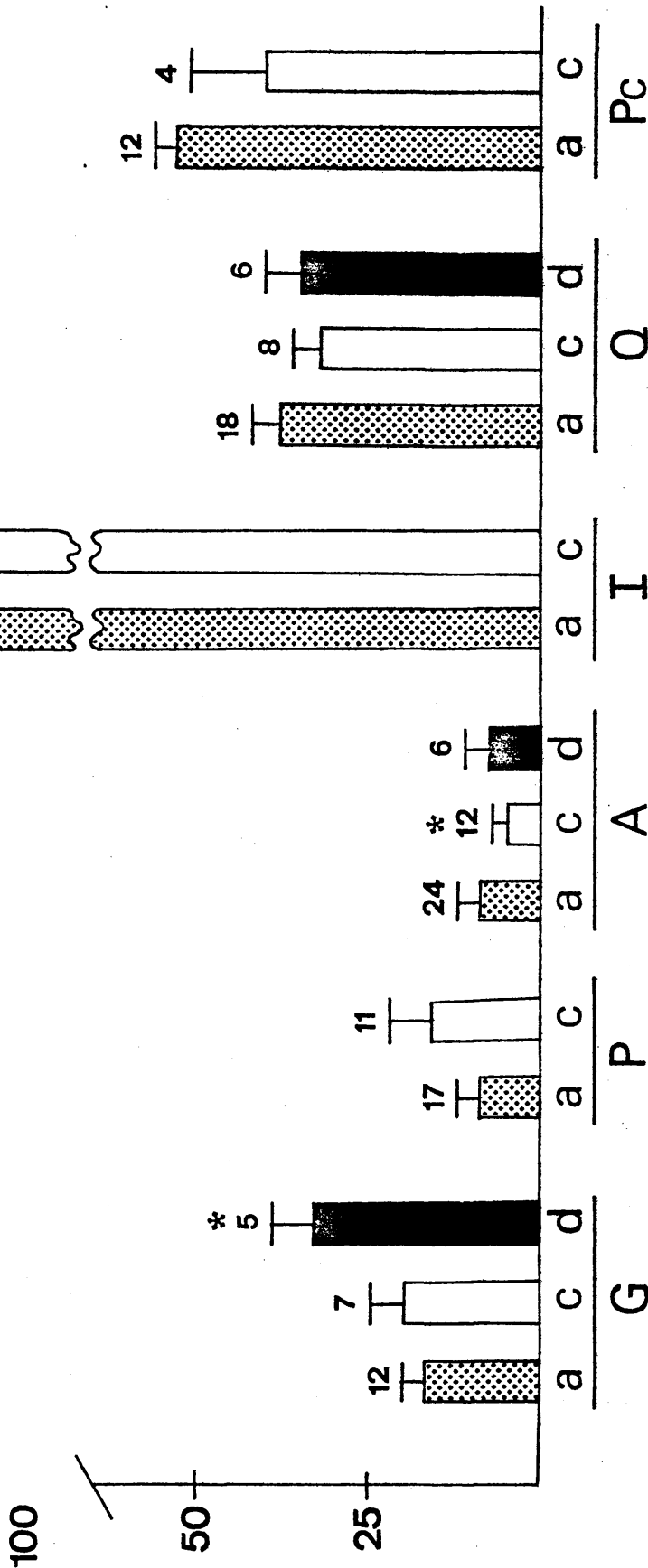


Fig. 10.-Efecto de las concentraciones altas (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de guanetidina (G), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), quinidina (Q) y procaína (Pc, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata. Los resultados se expresan como variación media \pm s. e. en tanto por ciento. La columna a: variación máxima obtenida; la columna c: efecto de la d-anfetamina (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre el bloqueo establecido; la columna d: efecto de la d-anfetamina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student) vs. los valores correspondientes de la columna a. Por otra parte todos los valores de la columna a son significativamente distintos del valor de control ($p < 0,05$).

bios significativos. La Fig. 10 reúne los datos obtenidos con concentraciones altas de los β -bloqueantes y otros fármacos.

1.2. Contracciones inducidas por Noradrenalina exógena

1.2.1. Dosis aisladas de Noradrenalina (NA)

En algunas experiencias con estimulación eléctrica, ésta se interrumpió antes de añadir el fármaco en estudio, para hacer una pequeña curva dosis-efecto con NA, prosiguiéndose luego la estimulación. Una vez observado el efecto máximo del bloqueante se volvió a interrumpir la estimulación para comprobar el efecto de alguna de las mismas dosis de NA antes ensayadas.

En las experiencias en que se estudió conjuntamente el efecto de la guanetidina a concentración 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sobre la estimulación eléctrica y sobre la NA exógena, se encontró que la respuesta inducida por NA se potenció hasta un 331,8 % ($\pm 43,0$) del valor inicial (Fig. 11). La respuesta a NA exógena, cuando se utilizó propranolol, resultó potenciada a un 231,0 %. En el caso del alprenolol, a la misma concentración, hubo una ligera reducción de la respuesta, aunque no fue significativa, obteniéndose un resultado de 70,4 % $\pm 20,4$ (n=4). Al añadir NA exógena a la preparación tratada con el INPEA no se observó variación en la respuesta contráctil.

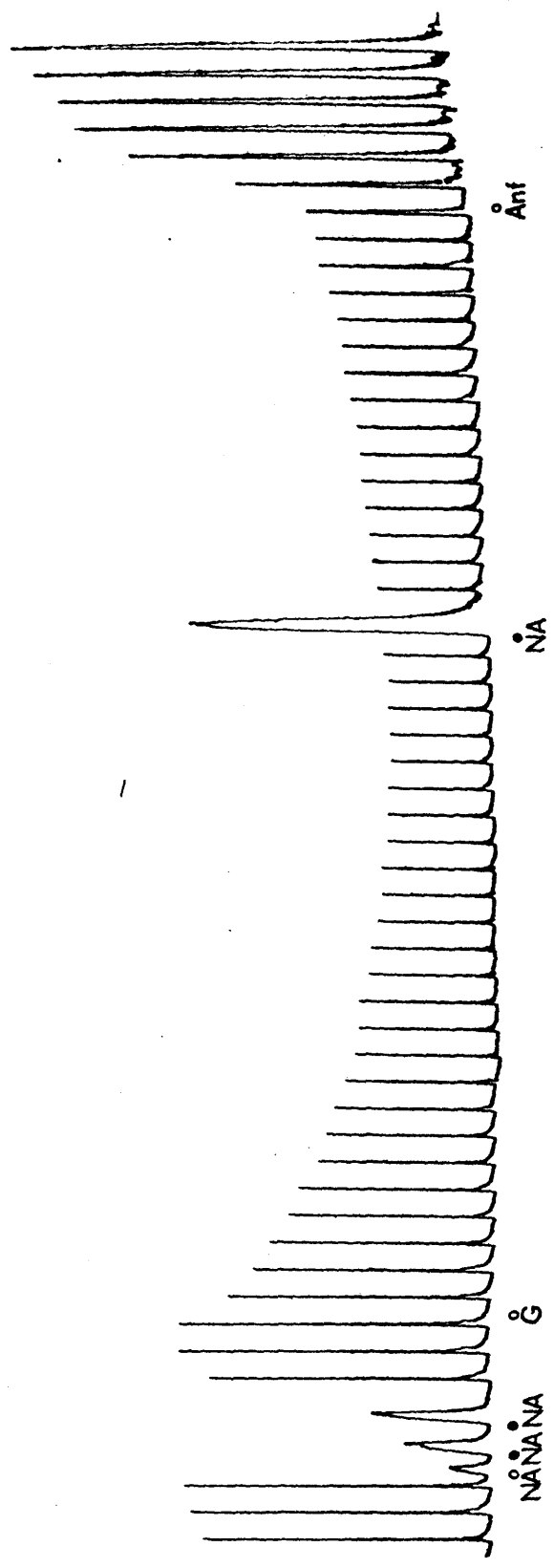


Fig. 11.-Efecto de la guanetidina (G, 0,1 µg/ml) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica y por noradrenalina exógena (NA, 1, 2 y 4 µg/ml) en conducto deferente de rata aislado. Reversión total del bloqueo inducido por guanetidina mediante d-anfetamina (Anf, 0, 1 µg/ml).

La quinidina tampoco modificó la respuesta inducida por NA (ver Fig. 15).

Cuando los fármacos se añadieron a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó que la respuesta a NA exógena resultó potenciada tanto por la guanetidina como por el propranolol, hallándose valores de 445,0 % y 206,5 % respectivamente (Figs. 12 y 13). El INPEA también produjo potenciación, aunque mucho más ligera: $142,7\% \pm 9,2$ ($n=4$). Nuevamente se observó que la quinidina no mostraba efecto sobre la contracción inducida por NA. La procaína sin embargo produjo un aumento muy acusado de la respuesta contráctil, pues se obtuvo un valor medio de $282,9\% \pm 53,0$ ($n=4$). En el caso del alprenolol, finalmente, lo que se observó fue una inhibición clarísima de la respuesta (14,9 % de la respuesta inicial, Fig. 14). Ver Fig. 15 en que se reúnen los resultados obtenidos.

En otra serie de experiencias, el conducto deferente fue estimulado únicamente mediante NA exógena. En estas condiciones, la guanetidina (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aumentó la contracción inicial hasta un valor de 161,4 % del inicial. El propranolol y el INPEA a la misma concentración no variaron la respuesta obtenida con NA, mientras que el alprenolol inhibió ligeramente la contracción obteniéndose como media de 4 experimentos un 82,5 %. En las experiencias en que se ensayó la quinidina tampoco se observó ningún efecto. (En la Fig. 17 se encuentran reunidos los resultados obtenidos).

En los experimentos en que se utilizó la dosis alta de los

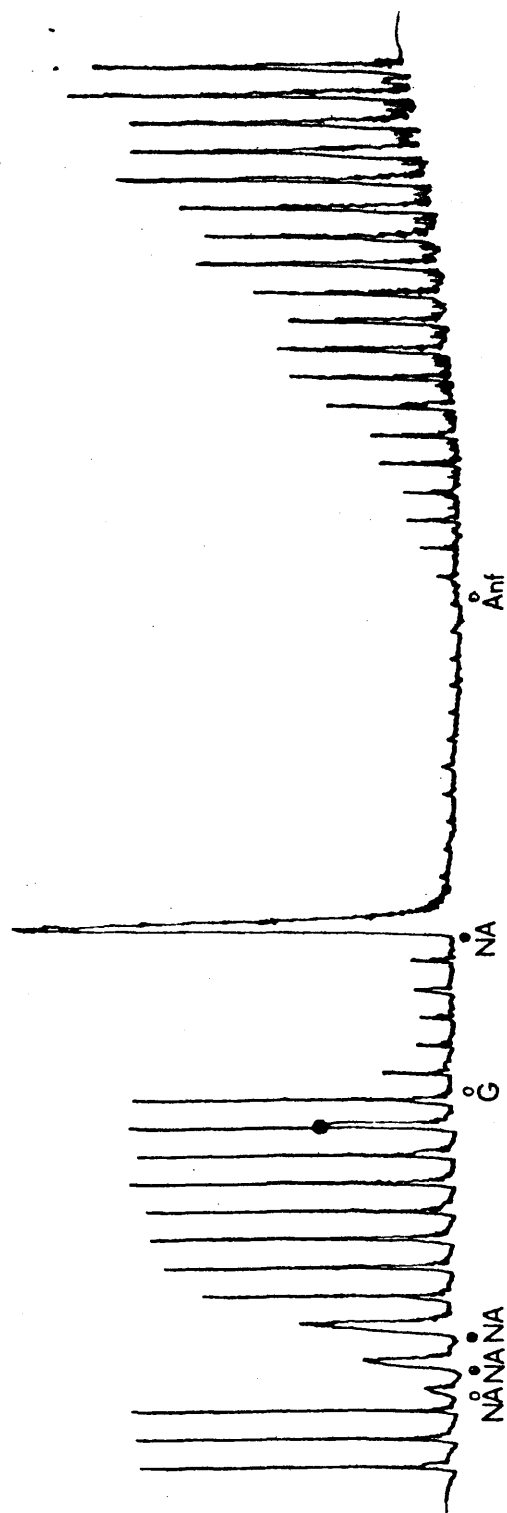


Fig. 12. -Efecto de la guanetidina (G, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica y por noradrenalina exógena (NA, 1, 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en el conducto deferente de rata aislado. Reversión total del bloqueo inducido por guanetidina mediante d-anfetamina (Anf, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

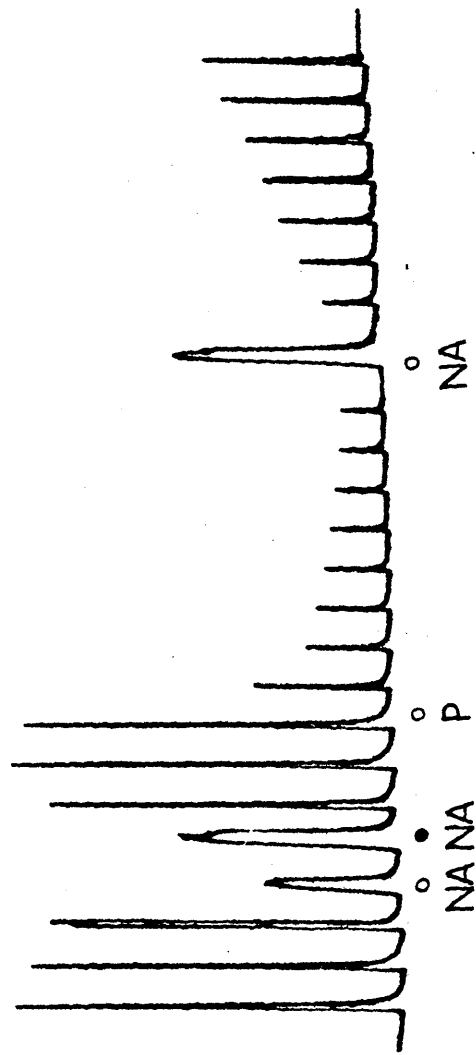


Fig. 13.-Efecto del propranolol (P, 10 μg / ml) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica y Noradrenalina exógena (NA, 1, 1,5 μg / ml) en conducto deferente de rata aislado.

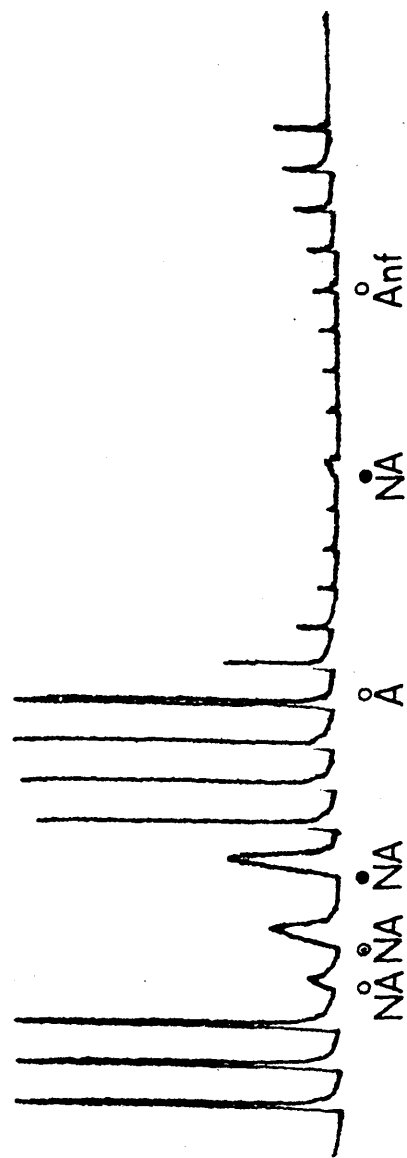


Fig. 14.-Efecto del alprenolol (A, 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica y Noradrenalina exógena (NA, 1, 2, 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$) en conducto deferente de rata aislado. La adición de d-anfetamina (Anf, 0, 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) no revirtió el bloqueo inducido por alprenolol.

fármacos, los resultados fueron los siguientes: La guanetidina potenció a un 261,9% la respuesta inicial producida por la NA exógena (Fig. 17). El propranolol también aumentó significativamente la contracción ($156,3\% \pm 10,2$; $n=4$) e igualmente el INPEA ($163,8\% \pm 5,9$; $n=5$). Sin embargo, cuando fue el alprenolol el fármaco ensayado se obtuvo una inhibición total de la respuesta a NA exógena (Fig. 16). Con la quinidina, en estas experiencias sin estimulación eléctrica y a concentración $10 \mu\text{g/ml}$, se observó también un cierto antagonismo a la NA: $42,6\% \pm 4,9$ ($n=4$). En las experiencias en que se estudió el efecto de la procaína hubo una potenciación significativa de la contracción, siendo $125,7\% \pm 4,5$ el valor medio hallado.

1.2.2. Dosis acumuladas de NA

En vista de los datos obtenidos al ensayar el alprenolol, tanto a la concentración baja como a la alta, frente a la respuesta del conducto deferente a la NA exógena, pareció de interés estudiar más detenidamente este antagonismo, para lo cual se llevaron a cabo otros experimentos con dosis acumuladas de NA, comparándose los resultados con los obtenidos utilizando el α -adrenolítico tolazolina. Se cuantificó dicho antagonismo mediante el cálculo del pA_x (Arunlakshana y Schild, 1959). Para ello se representó en una gráfica el logaritmo negativo de la concentración molar de antagonista en abscisas frente al logaritmo de la relación de dosis de NA menos uno (RD-1) en ordenadas y se calculó la recta de regresión por

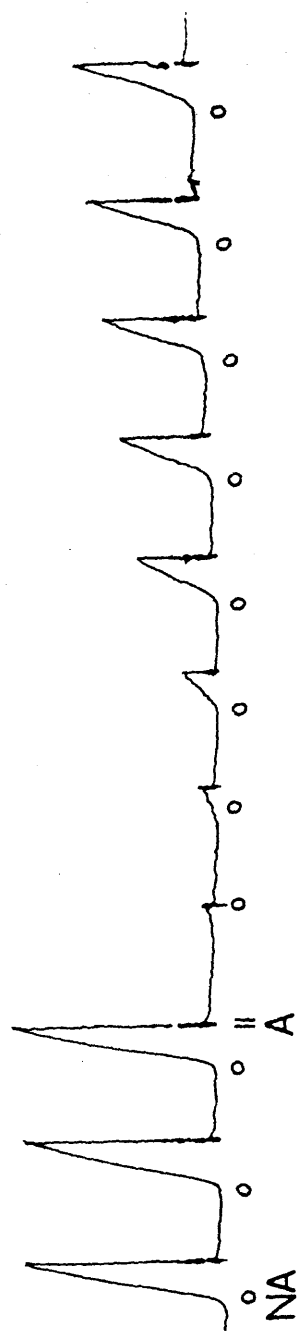


Fig. 16.-Efecto del alprenolol (A, 10 μg / ml) sobre las contracciones inducidas por noradrenalina exógena (NA, 35 μg / ml) en conducto deferente de rata aislado.

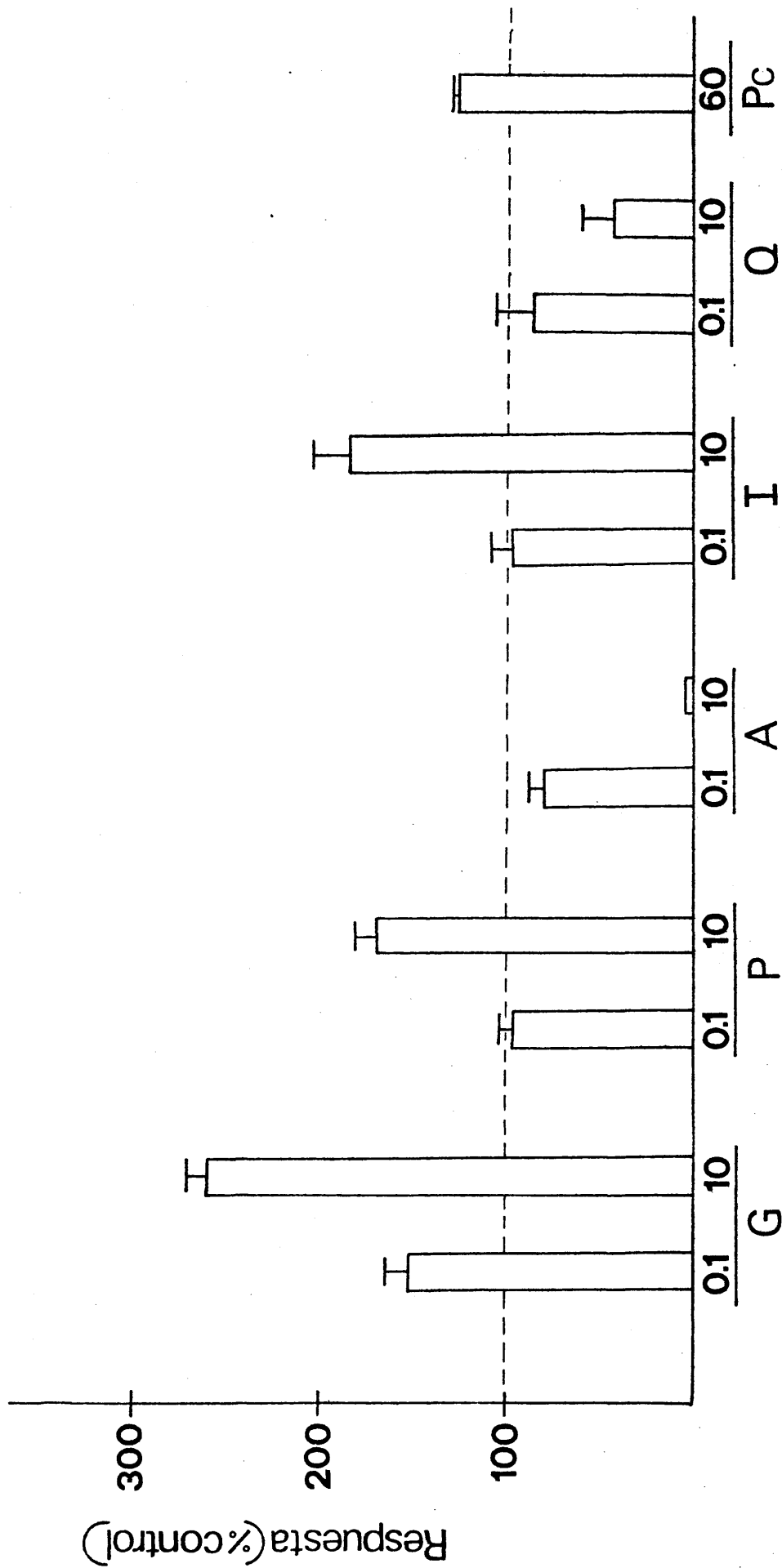


Fig. 17.-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre la respuesta a noradrenalina exógena en conducto deferente de rata aislado. Los fármacos se añadieron a dos concentraciones de 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$, excepto la procaína, cuya concentración fue de 60 $\mu\text{g/ml}$. Guanetidina (G), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), quinidina (Q) y procaína (Pc). Las columnas expresan variación de la respuesta respecto de la inicial, en tanto por ciento, media \pm s.e. de 4 experimentos. La línea de trazos indica el valor inicial. Todos los valores obtenidos, excepto los correspondientes a propranolol, INPEA y quinidina (0,1 $\mu\text{g/ml}$), son significativamente distintos ($p < 0,05$, test de Student) de los valores de control.

el método de los mínimos cuadrados. El punto en que la recta corta el eje de abscisas es, evidentemente, el pA_2 (RD 2 ; $\log (2-1)=0$), que indica el logaritmo negativo de la dosis de antagonista que hace necesario duplicar la dosis de agonista para obtener la misma respuesta del conducto deferente. El pA_{10} , a su vez, expresa el logaritmo negativo de la dosis de antagonista que hace necesario multiplicar por diez la dosis de agonista para alcanzar la misma respuesta. El valor se obtiene igualmente de la recta de regresión y es el de la abscisa correspondiente a la ordenada de valor $0,95=\log (10-1)$ (Fig. 18). Los resultados obtenidos para alprenolol y tolazolina fueron los siguientes

	pA_2	pA_{10}
Alprenolol	5,11	3,25
Tolazolina	4,22	3,13

Puede observarse que en el caso del alprenolol la diferencia $pA_2 - pA_{10}$ 1,86 está muy alejada del valor teórico para un antagonista competitivo.

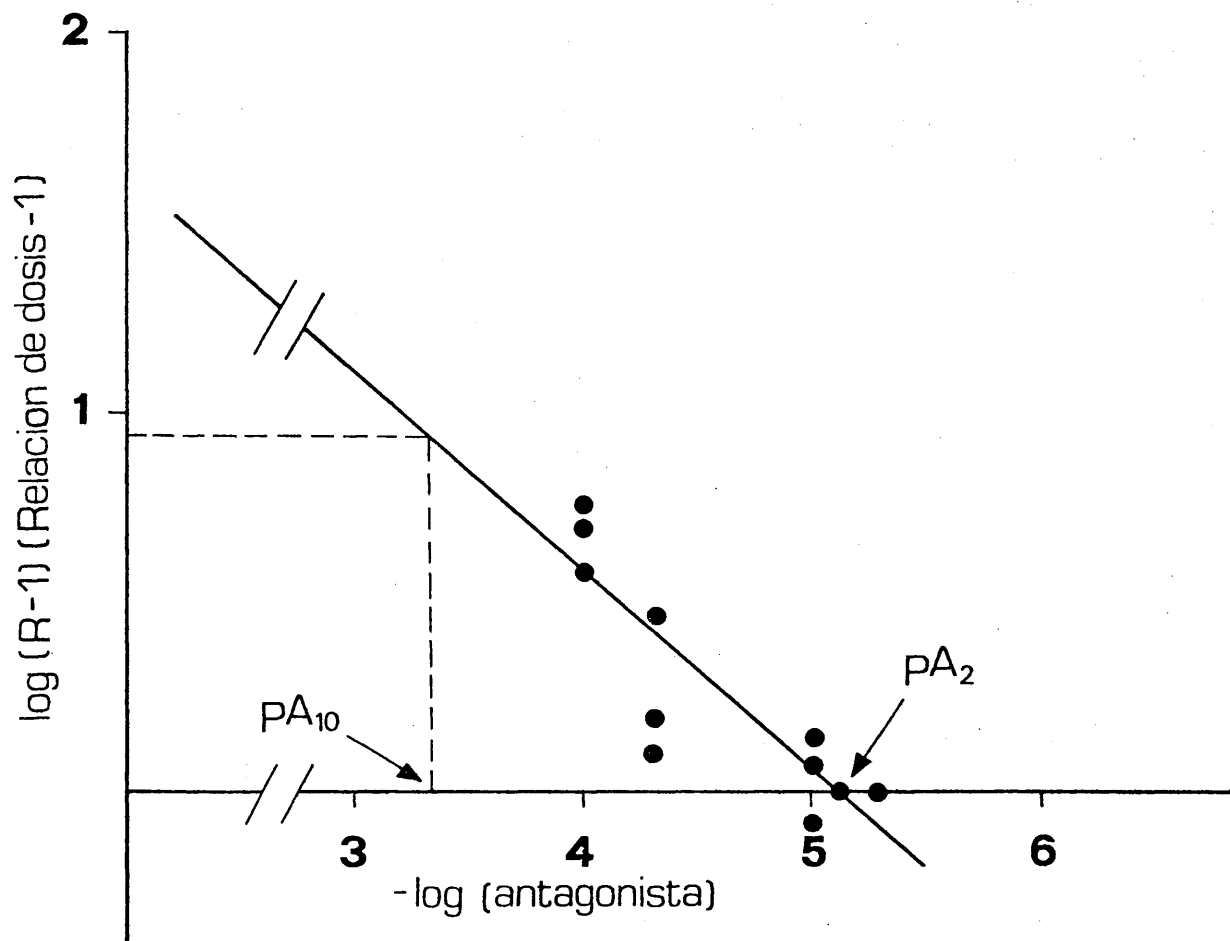


Fig. 18. -Método utilizado para el cálculo de los valores de pA_2 y pA_{10} del alprenolol, frente a la respuesta a noradrenalina del conducto deferente de rata aislado. Abcisas: logaritmo negativo de la concentración molar de antagonista; ordenadas: logaritmo de la relación de dosis de NA menos uno (RD-1).

1.3. Modificación por desipramina de la respuesta a la estimulación eléctrica

Se realizaron una serie de experimentos preliminares para elegir la concentración de desipramina (DMI) idónea, que careciera de efecto intrínseco sobre las contracciones del conducto deferente inducidas por estimulación eléctrica, ya que es sabido que este compuesto a partir de ciertas concentraciones posee propiedades estabilizadoras de membrana (Iversen, 1975). Se eligieron dos concentraciones 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que en algunos casos mostró efecto intrínseco, reduciendo la respuesta, y 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que nunca tuvo efecto alguno sobre la contracción del conducto deferente.

En la Tabla I se reúnen los resultados obtenidos al añadir el β -bloqueante o la guanetidina a las preparaciones pretratadas con el DMI. Puede observarse que la guanetidina a la concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibió la respuesta del conducto deferente de rata a un 35,6 % del valor inicial, pero el tratamiento previo con DMI previno casi totalmente su efecto. Cuando se utilizó el propranolol se observaron resultados similares. Mientras que el propranolol "per se" redujo la respuesta contráctil a un 61,9 % de la inicial, el tratamiento previo con DMI hizo que la modificación inducida por propranolol dejase de ser significativa. Los resultados obtenidos con alprenolol difirieron, en cambio, de los obtenidos con las dos sustancias anteriores pues si bien el tratamiento previo con la concentración baja de DMI (0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Tabla I

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO PREVIO CON DESIPRAMINA (DMI) SOBRE EL BLOQUEO INDUCIDO POR ANTAGONISTAS β O GUANETIDINA EN LA RESPUESTA CONTRACTIL DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO

Concentración de DMI, $\mu\text{g} / \text{ml}$	Bloqueante (0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$)	Contracción (% valor inicial)
—	Guanetidina	35,6 \pm 4,0
0,01	"	91,5 \pm 8,9
0,1	"	89,6 \pm 7,8
—	Propranolol	61,9 \pm 4,5
0,01	"	96,6 \pm 6,6
0,1	"	86,3 \pm 7,7
—	Alprenolol	56,0 \pm 5,8
0,01	"	82,5 \pm 7,4
0,1	"	67,4 \pm 7,1

El conducto deferente fue estimulado intramuralmente mediante electrodos de aguja. El intervalo de tiempo entre el DMI y los distintos bloqueantes fue 60 min. Los porcentajes indicados en la tercera columna representan la media \pm s.e. correspondientes a un mínimo de 4 experimentos y a un máximo de 19.

previno el efecto bloqueante del alprenolol, no ocurrió igual cuando se utilizó la concentración superior de desipramina.

2. EFECTOS DEL PROPRANOLOL SOBRE LA RESPUESTA DE LA MEMBRANA NICTITANTE DEL GATO ANESTESIADO A LA ESTIMULACION ELECTRICA

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, pareció de interés estudiar si los bloqueantes β podrían afectar los efectos derivados de la estimulación de nervios adrenérgicos "in vivo". La preparación elegida fue la membrana nictitante del gato anestesiado, que se estimuló eléctricamente mediante electrodos de platino aplicados pregangliónicamente al tronco simpático cervical, con el protocolo ya explicado en los Métodos. El voltaje utilizado fue supramaximal, variándose la frecuencia entre 1-50 Hz, y repitiendo la serie de estimulaciones cada cierto tiempo después de la inyección i.v. del fármaco. Además de las características del bloqueo, en algunos casos también se estudió su posible reversión por la d-anfetamina.

En la Tabla II se recogen los resultados obtenidos con la guanetidina y el propranolol. En el caso de la guanetidina se obtuvo un bloqueo más ó menos pronunciado cuando la dosis fue 0,5 mg/kg, que tardó en establecerse un tiempo bastante largo, entre 70 y 130 min, observándose cierta reversión por la d-anfetamina (0,5 mg/kg). Cuando se aumentó la dosis de guanetidina a 5 mg/kg el bloqueo fue claro, tanto administrando el fármaco a una única dosis como a dosis acumulada, siendo a bajas frecuencias más acusada la inhibi-

Tabla II

BLOQUEO POR GUANETIDINA Y PROPRANOLOL DE LA CONTRACCION DE LA MEMBRANA NIC-TITANTE DEL GATO ANESTESIADO INDUCIDA POR ESTIMULACION ELECTRICA

Compuesto	Dosis mg/kg i.v.	% Bloqueo	Observaciones
Guanetidina	0,05	0	
	0,5	70	Leve reversión por d-anfetamina (0,05 mg/kg)
	0,5	50	Reversión parcial por d-anfetamina (0,5 mg/kg)
	0,5	75	Reversión parcial por d-anfetamina (0,5 mg/kg)
	0,5 ^a	35	
	5	100	Reversión parcial por d-anfetamina (0,5 mg/kg)
Propranolol	5 ^a	100	El bloqueo es total sólo a bajas frecuencias
	0,05	0	
	0,05	50	A bajas frecuencias, reversión total por d-anfetamina (0,05 mg/kg)
	0,05	100	No hay reversión por d-anfetamina (0,05 mg/kg)
	0,10 ^a	50	Bloqueo sólo a 50 Hz

Tabla II (cont.)

Compuesto	Dosis mg/kg i. v.	% Bloqueo	Observaciones
Propranolol	0,5	50	
	0,5 ^a	35	A 0,5 mg/kg bloqueo inferior al obtenido con 0,1
	5 ^a	35	Bloqueo a altas frecuencias : se mantiene el blo- queo obtenido con la dosis de 0,5 mg/kg
	0,01 ^b	100	Bloqueo a bajos voltajes
	0,05 ^{a, b}	0	El bloqueo producido por 0,01 mg/kg es reverti- do totalmente al subir la dosis a 0,05 mg/kg
	0,01 ^b	50	
	0,05 ^{a, b}	30	Bloqueo inferior al establecido con la dosis de 0,01 mg/kg

Las condiciones de la estimulación eléctrica preangliónica del simpático cervical fueron 5 V, 1 msec y frecuencia variable de 1-50 Hz.

a) Dosis total acumulada

b) Estimulación eléctrica con frecuencia fija de 20 Hz y voltaje variable de 1-6 V

ción de la respuesta. Con esta dosis de guanetidina el efecto bloqueante apareció ya a los 15 min de la inyección del fármaco.

Con el propranolol se ensayaron dosis menores ya que ciertos autores (Eliash y Weinstock, 1971) han insistido sobre el hecho de que dosis muy pequeñas de propranolol producen un efecto bloqueante que, en cambio, no se observa a dosis mayores. Con 0,05 mg/kg se observó un leve bloqueo, si bien éste fue muy variable. El propranolol a 0,5 mg/kg produjo una cierta inhibición de la respuesta, que se instauró en un tiempo medio de 80 min, y cuando se utilizaron dosis acumuladas hasta 5 mg/kg el bloqueo máximo obtenido fue del 35 %. Sin embargo, al ensayar una dosis muy baja, 0,01 mg/kg, variando en este caso los voltajes y manteniendo una frecuencia de 20 Hz, se obtuvo bloqueo total a bajos voltajes en un caso y del 50 % en el otro, revirtiendo parcialmente este bloqueo en ambas experiencias al suministrar al rató una dosis adicional de propranolol de 0,04 mg/kg (ver Fig. 19). Este bloqueo fue apreciable a partir de las dos horas de la inyección del fármaco.

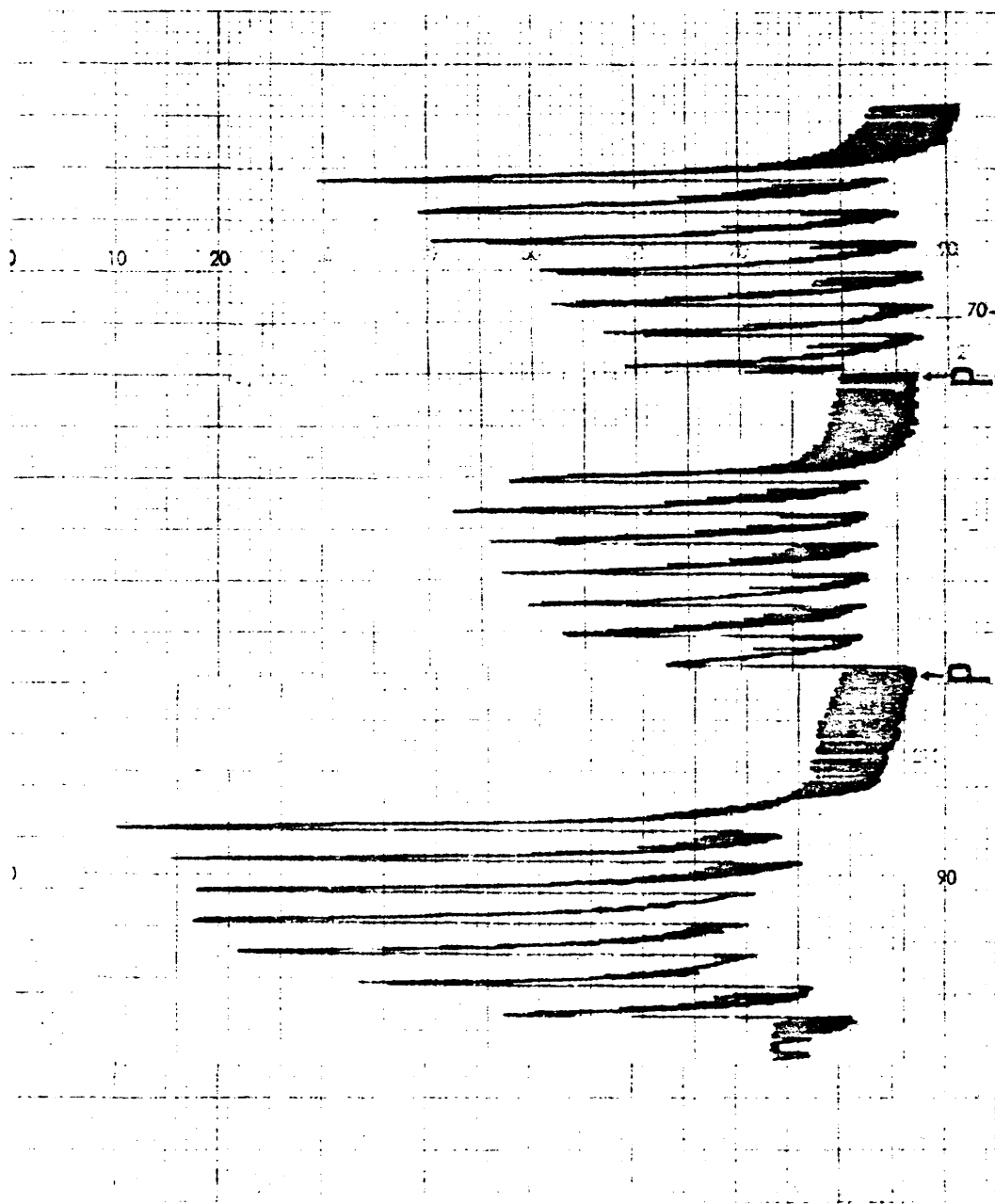


Fig. 19.-Efecto del propranolol (P, 0,01 y 0,05 mg/kg, i.v.) sobre las contracciones de la membrana nictitante del gato anestesiado inducidas por estimulación eléctrica preangliónica del simpático cervical. Las condiciones de la estimulación eléctrica fueron: 20 Hz de frecuencia y voltaje variable de 1-6 V.

3. EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS SOBRE LA LIBERACION DE ^3H -NORADRENALINA EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO

3.1. Liberación de ^3H -NA inducida por estimulación eléctrica

3.1.1. Experiencias preliminares

Se trató inicialmente de estudiar el "overflow"* de ^3H -NA utilizando unas condiciones de estimulación eléctrica lo más similares posibles a las empleadas en la primera fase del trabajo (ver apartado 1.1.). Tras la incubación previa del conducto deferente con ^3H -NA, a una concentración de $1,66 \mu\text{M}$ durante 40 min, la preparación fue lavada dos veces y tras un período de reposo de 30 min, se hizo un nuevo lavado. Seguidamente el tejido fue estimulado durante dos períodos de tiempo consecutivos de 30 seg, separados 4,5 min de los períodos siguientes de estimulación. Los trenes de estimulación fueron de 20 Hz, 2 mseg y voltaje supramaximal (usualmente 90 V). Se recogió una muestra de 200 μl del líquido de perfusión al final de los períodos de reposo e inmediatamente después de los

*) A lo largo del presente trabajo, se denomina con el término "liberación" no al paso de noradrenalina al espacio extracelular sino a la difusión de NA desde el tejido hasta el líquido de perfusión. Es en realidad mucho más correcto el término inglés "overflow", que se ha utilizado también indistintamente.

períodos de estimulación, midiéndose la radiactividad en las condiciones usuales. La experiencia duró en total 90 min. En estas condiciones, la cantidad recogida de radiactividad va de de creciendo continuamente en las sucesivas tomas, siendo siempre mayor, lógicamente, la radiactividad presente en una muestra recogida después del período de estimulación que la correspondiente al inmediato período de reposo. Esta técnica ha sido utilizada por otros autores (Cf. p.ej. Graham y col, 1974) y podría brindar, en principio, una idea de la cinética de liberación de $^3\text{H-NA}$ en presencia y en ausencia de fármacos.

En las experiencias control, en que no se añadió ningún fármaco, se observó, como era de esperar, que el "overflow" de $^3\text{H-NA}$ era mayor después de la estimulación eléctrica que después de los períodos de reposo, siendo la relación de dichos parámetros entre 1,5 y 2. (Ver ejemplo representativo en la Fig.20)

Sin embargo, en las experiencias en que se estudió el efecto de la guanetidina ó del propranolol, a concentración 0,1 ó 10 $\mu\text{g/ml}$, no se observó ninguna diferencia respecto a los controles (ver Fig.20), siendo los resultados muy variables.

En nuestra opinión, la dispersión tan grande obtenida en los resultados fue debida a que las condiciones experimentales elegidas no hicieron posible en ningún caso una liberación acusada de $^3\text{H-NA}$ por lo cual las posibles diferencias producidas por los tratamientos quedaron enmascaradas por los errores inherentes al método. De otra parte, si la preparación hubiese sido lavada de forma exhaustiva antes de iniciar la estimulación

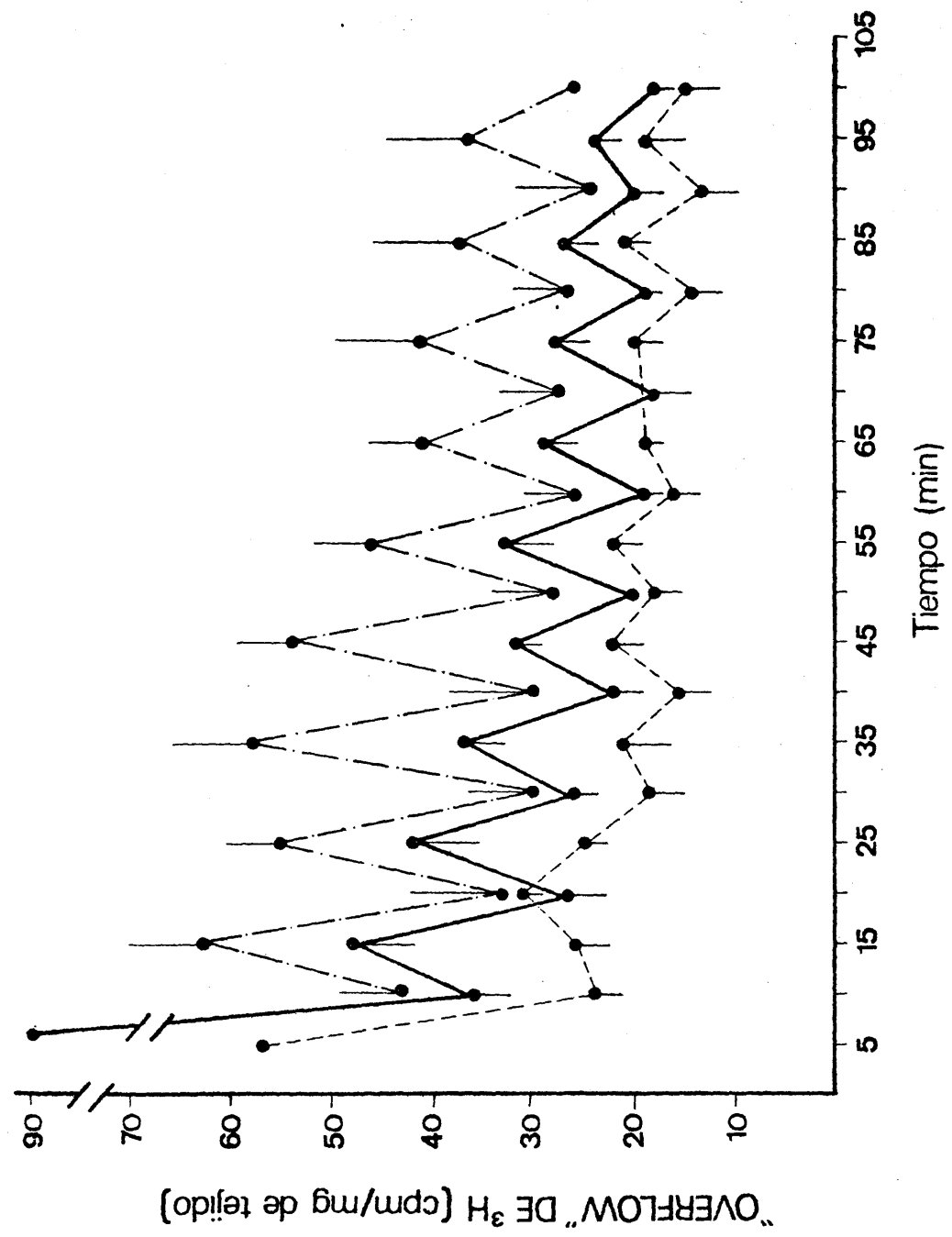


Fig. 20 . -Efecto del propranolol y de guanetidina sobre el "overflow" de tritio (cpm/ mg de tej.) liberado espontaneamente (tiempos pares) o provocado por estimulación intramural (tiempos impares) en el conducto deferente de rata. — Control, - - - propranolol (0, 1 µg/ ml), - . - . guanetidina (0, 1 µg/ ml). Para detalles en la metodología vease el texto (pag. 99)

eléctrica, se hubiese obtenido un contaje aún más bajo.

3.1.2. Estimulación intramural de baja frecuencia con electrodos de aguja.

En vista de los resultados tan variables obtenidos en las experiencias anteriores, se decidió emplear la técnica seguida por Adler-Graschinsky y Langer (1975), con ligeras modificaciones, técnica descrita en el apartado 2.4. del capítulo de Métodos. Se utilizaron electrodos de aguja, igual que en las experiencias antes descritas, pero, en cambio, los trenes de estímulo duraron 1 min, y la frecuencia de la estimulación fue 5 Hz, pues en caso de que existieran receptores presinápticos que modularan la liberación de NA, su acción reguladora se observaría a frecuencias bajas de estimulación (Langer y col, 1975)

Se midió en todos los casos la cantidad de tritio* liberada espontáneamente por unidad de tiempo y mg de tejido (E_1) una vez estabilizado el proceso de liberación de radiactividad tras los lavados sucesivos de la preparación, así como la cantidad

*₃) La cantidad de tritio liberada corresponde en gran parte a ³H-NA, puesto que la monoaminoxidasa se hallaba inhibida por la pargilina ($1,25 \times 10^{-4}$ M) existente en líquido de perfusión. Sin embargo también corresponde, en igual ó mayor proporción, al metabolito de la noradrenalina normetanefrina (Langer, 1970). No obstante, en ocasiones se habla en el texto de liberación de ³H-NA en vez de liberación de tritio.

de tritio liberada durante el primer período de estimulación eléctrica (S_1). Una vez transcurrido el período de 40 min de incubación con el fármaco, se midió igualmente la cantidad de tritio liberada, bien espontáneamente, bien inducida por estimulación eléctrica (E_2 y S_2 respectivamente). Los resultados obtenidos vienen reunidos en la Tabla III.

De los datos de la Tabla III puede deducirse que, en ausencia de fármacos, la estimulación eléctrica produjo una liberación de tritio que, en general, fue más de tres veces mayor que la obtenida en condiciones basales. Cuando se utilizaron concentraciones bajas de fármacos ($0,1 \mu\text{g/ml}$), éstos no afectaron la liberación espontánea de radiactividad (E_2), y sólo la guanetidina produjo a esta concentración una reducción sensible en la cantidad de tritio liberada por estimulación eléctrica (S_2). Las concentraciones altas de fármacos ($10 \mu\text{g/ml}$) sí afectaron en varios casos bien la liberación espontánea de radiactividad, bien la inducida por estimulación eléctrica. Para evaluar los resultados obtenidos se utilizó la relación $S_2 : E_2 / S_1 : E_1$. Dicha relación en las experiencias control, en que no hubo fármaco, fue $0,86 \pm 0,08$ (Fig. 21). Cuando se utilizó la concentración baja de propranolol, $0,1 \mu\text{g/ml}$, aproximadamente $3 \times 10^{-7} \text{ M}$, se obtuvo un valor de $0,85 \pm 0,07$, prácticamente idéntico al control. Igual ocurrió (Fig. 21) con los valores obtenidos con el alprenolol ($0,83 \pm 0,09$) y el INPEA ($0,89 \pm 0,08$). Sin embargo, la guanetidina disminuyó significativamente el "overflow" de tritio a un valor de $0,56 \pm 0,02$.

Utilizando una concentración 100 veces mayor, $10 \mu\text{g/ml}$, aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ M}$, (Fig. 22) se observó una disminu

Tabla III

EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS Y DE OTROS FARMACOS SOBRE LA LIBERACION DE TRITIO, ESPONTANEA O INDUCIDA POR ESTIMULACION INTRAMURAL, EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO

Compuesto	Concentración	Tritio liberado: cpm / mg / min			
		E ₁	S ₁	E ₂	S ₂
—	—	77,5 ± 4,2	251,7 ± 21,7	65,7 ± 9,0	177,2 ± 13,2
Propranolol	3 x 10 ⁻⁷ M	80,2 ± 8,3	244,3 ± 25,7	70,7 ± 3,7	182,1 ± 16,2
Alprenolol	"	66,7 ± 6,9	213,4 ± 10,1	58,0 ± 7,5	152,0 ± 14,2
INPEA	"	67,8 ± 7,2	242,3 ± 23,2	54,0 ± 4,0	164,0 ± 16,1
Guanetidina	"	74,2 ± 5,4	259,1 ± 13,8	68,8 ± 5,4	135,3 ± 9,5
Quinidina	"	71,1 ± 7,9	208,3 ± 13,0	55,1 ± 7,1	148,5 ± 4,2
Propranolol	3 x 10 ⁻⁵ M	65,7 ± 10,5	239,3 ± 22,8	102,7 ± 8,3	213,5 ± 16,0
Alprenolol	"	67,4 ± 6,6	265,9 ± 32,4	115,3 ± 12,0	221,2 ± 10,5
INPEA	"	68,4 ± 2,2	257,1 ± 27,7	71,8 ± 5,5	197,1 ± 18,0
Guanetidina	"	87,5 ± 9,6	258,4 ± 20,2	162,6 ± 15,2	229,6 ± 19,4

Tabla III (cont.)

Compuesto	Concentración	Tritio liberado: cpm / mg / min			
		E ₁	S ₁	E ₂	S ₂
Quinidina	$3 \times 10^{-5} \text{M}$	77,5 ± 4,2	251,7 ± 21,7	65,7 ± 9,0	177,2 ± 13,2
Procaína	$2,2 \times 10^{-4} \text{M}$	56,7 ± 4,5	236,7 ± 27,5	123,7 ± 12,8	277,4 ± 23,2
Procaína	10^{-3}M	61,3 ± 6,0	185,1 ± 22,4	80,1 ± 7,7	208,6 ± 16,6
Procaína	10^{-3}M	52,4 ± 2,9	161,3 ± 10,1	121,4 ± 8,6	211,8 ± 11,0

Los conductos deferentes se estimularon intramuralmente mediante electrodos de aguja. Se midió la cantidad de tritio liberada espontáneamente, tanto en presencia del fármaco (E₂) como en ausencia de él (E₁), del mismo modo se midió la cantidad de tritio liberada por la estimulación eléctrica, tanto en presencia como en ausencia del fármaco (S₂ y S₁ respectivamente). El tritio liberado corresponde en gran parte a ³H-NA, ya que se encontraba inhibida la MAO por la pargilina ($1,25 \times 10^{-4} \text{M}$) presente en el líquido de perfusión. Media ± s.e. de 4-6 experiencias realizadas.

OVERFLOW - $^3 H (S^2/S_1)$

1.0

0.75

0.5

0.25



$3 \times 10^{-7} M$

Fig. 21.-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el "overflow" de tritio provocado por estimulación intramural en conducto deferente de rata, mediante electrodos de aguja. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G) y quinidina (Q). Las columnas corresponden al valor medio \pm s.e. de 4-6 experiencias. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pag.103).

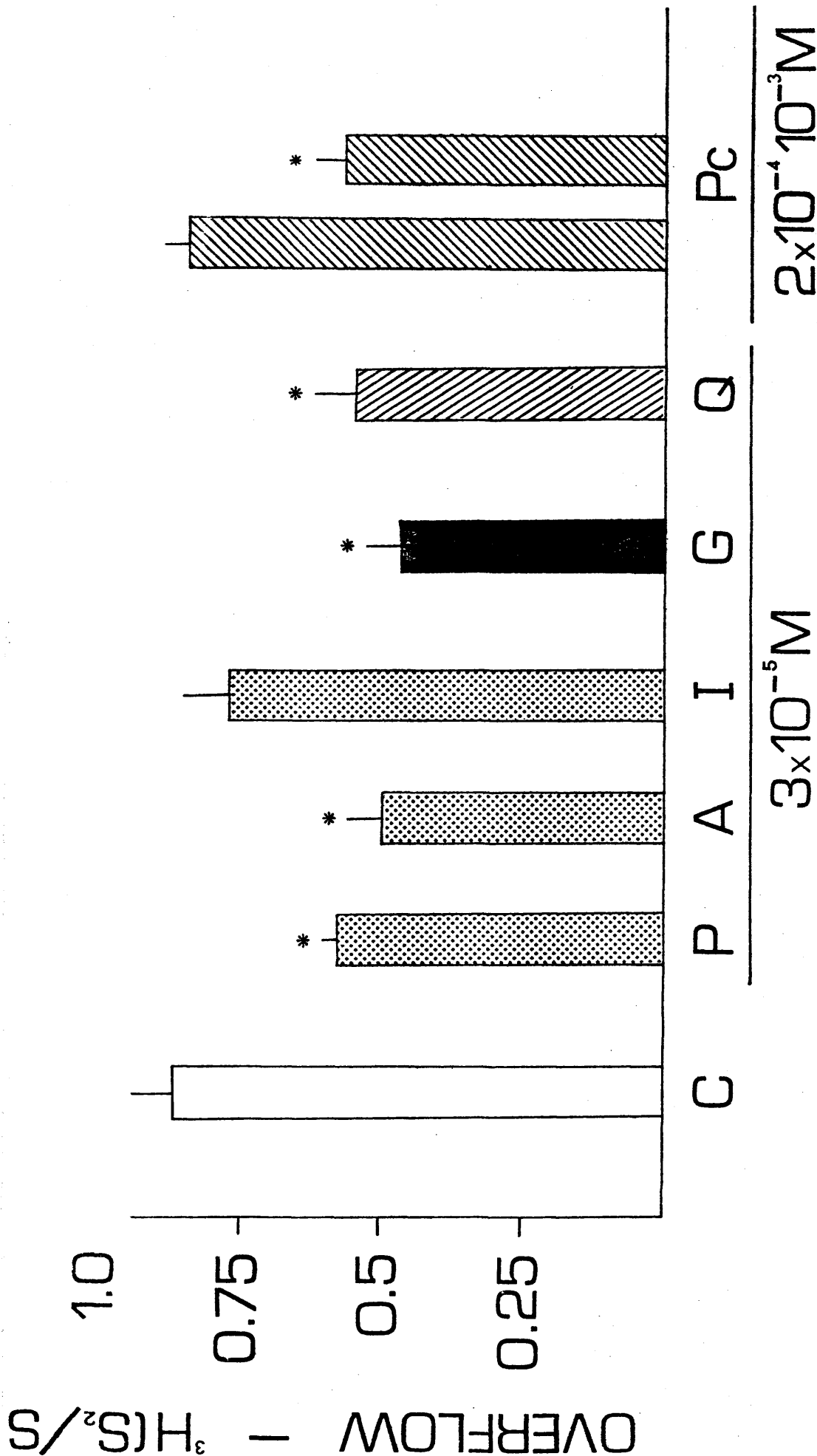


Fig. 22.-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el "overflow" de tritio provocado por estimulación intramural en conducto deferente de rata, mediante electrodos de aguja. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G), quinidina (Q) y procaína (Pc). Las columnas corresponden al valor medio \pm s.e. de 4-6 experiencias. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pag.103).

ción significativa del "overflow" no sólo con la guanetidina, cuya media fue $0,47 \pm 0,06$ ($n=4$) sino también con el propranolol (0,58) y el alprenolol (0,50). Sin embargo, el INPEA no modificó el "overflow", y sí lo redujo, de forma significativa la quinidina. Finalmente con procaína ($2,2 \times 10^{-4}$ M) no se observó ninguna variación apreciable, aunque al aumentar la concentración a 10^{-3} M sí disminuyó significativamente el "overflow", obteniéndose una relación de $0,57 \pm 0,05$.

Resumiendo estos resultados se puede decir que a la concentración baja (aproximadamente 3×10^{-7} M) el único fármaco capaz de disminuir el "overflow" significativamente fue la guanetidina, mientras que a la concentración de 3×10^{-5} M todos los fármacos, excepto el INPEA, redujeron la liberación de ^3H inducida por estimulación eléctrica. El fármaco que produjo un efecto más acusado fue la guanetidina, si bien este efecto no parece ser claramente dependiente de la concentración utilizada.

3.1.3. Estimulación de campo de baja frecuencia.

Con objeto de determinar si el tipo de electrodos utilizado podía afectar de alguna manera el "overflow" de tritio, las experiencias descritas en el apartado anterior se reprodujeron, pero utilizando la técnica de estimulación de campo, en la cual los electrodos fueron dispuestos de forma paralela al tejido, sin tocarlo. Los resultados de "overflow" espontáneo y provocado por estimulación eléctrica vienen reunidos en la Tabla IV. El

Tabla IV

EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENÉRGICOS Y DE OTROS FARMACOS SOBRE LA LIBERACION DE TRITIO, ESPONTÁNEA O INDUCIDA POR ESTIMULACION DE CAMPO, EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO

Compuesto	Concentración	Tritio liberado: cpm / mg / min			
		E ₁	S ₁	E ₂	S ₂
Propranolol	$3 \times 10^{-7} M$	42,4 ± 2,2	196,6 ± 10,6	35,9 ± 3,0	191,9 ± 19,4
Alprenolol	"	47,2 ± 4,3	167,3 ± 14,7	43,9 ± 3,6	122,0 ± 8,8
INPEA	"	40,5 ± 1,9	136,2 ± 11,8	33,9 ± 1,7	108,8 ± 13,3
Guanetidina	"	51,9 ± 1,3	180,1 ± 11,1	47,9 ± 2,3	144,9 ± 16,8
Quinidina	"	50,3 ± 2,0	179,7 ± 2,2	42,3 ± 2,9	105,1 ± 8,9
Propranolol	$3 \times 10^{-5} M$	51,6 ± 1,6	176,6 ± 11,2	48,8 ± 0,9	143,8 ± 9,7
Alprenolol	"	41,4 ± 4,6	167,1 ± 22,5	107,0 ± 11,5	207,0 ± 27,0
INPEA	"	48,1 ± 2,4	222,5 ± 21,8	95,3 ± 7,1	256,4 ± 26,9
	"	45,2 ± 2,0	153,6 ± 9,0	51,3 ± 4,8	157,1 ± 11,3

Tabla IV (cont.)

Compuesto	Concentración	Tritio liberado: cpm / mg / min			
		E ₁	S ₁	E ₂	S ₂
—	—	42, 4 ± 2, 2	196, 6 ± 10, 6	35, 9 ± 3, 0	191, 9 ± 19, 4
Guanetidina	3 × 10 ⁻⁵ M	46, 3 ± 3, 2	143, 5 ± 15, 5	73, 3 ± 7, 8	134, 0 ± 8, 5
Quinidina	"	47, 8 ± 2, 7	195, 4 ± 12, 5	101, 3 ± 2, 6	198, 9 ± 4, 4
Procaína	2, 2 × 10 ⁻⁴ M	53, 5 ± 1, 5	157, 2 ± 9, 2	56, 5 ± 5, 4	153, 0 ± 7, 5

Los conductos deferentes se estimularon mediante electrodos paralelos, estimulación de campo. Se midió la cantidad de tritio liberada espontáneamente, en ausencia y en presencia del fármaco (E₁ y E₂), también se midió la liberación de tritio provocada por la estimulación de campo, tanto en presencia del fármaco (S₂) como en ausencia de él (S₁). Media ± s.e. de 4-5 experimentos realizados. El tritio liberado corresponde en gran parte a ³H-NA, ya que la MAO se hallaba inhibida por la parxilina (1,25 × 10⁻⁴M) presente en el líquido de perfusión.

efecto de los fármacos en estudio fue igualmente evaluado mediante la utilización del cociente $S_2 : E_2 / S_1 : E_1$, viniendo reunidos los resultados obtenidos en las Figs. 23 y 24

En las experiencias control esta relación tuvo un valor de $1,06 \pm 0,15$. Al utilizar la concentración baja de fármacos (aproximadamente $3 \times 10^{-7} M$) se observó nuevamente que sólo la guanetidina disminuyó de forma significativa la relación hasta un valor de $0,69 \pm 0,04$ ($n=4$). El resto de los fármacos carecieron de efecto, como se observa en la Fig. 23. Cuando se utilizó la concentración alta de fármacos (Fig. 24), los β bloqueantes propranolol y alprenolol, junto con la guanetidina y la quinidina redujeron el "overflow" de tritio de forma significativa, el INPEA y la procaína ($2,2 \times 10^{-4} M$) no modificaron, tampoco en este caso el "overflow".

Si se comparan estos resultados con los obtenidos utilizando electrodos de aguja se observa que los efectos que se obtuvieron con estimulación de campo cuantitativamente fueron más acusados, aunque fueron los mismos fármacos los que redujeron la cantidad de tritio liberada por estimulación eléctrica en ambos casos.

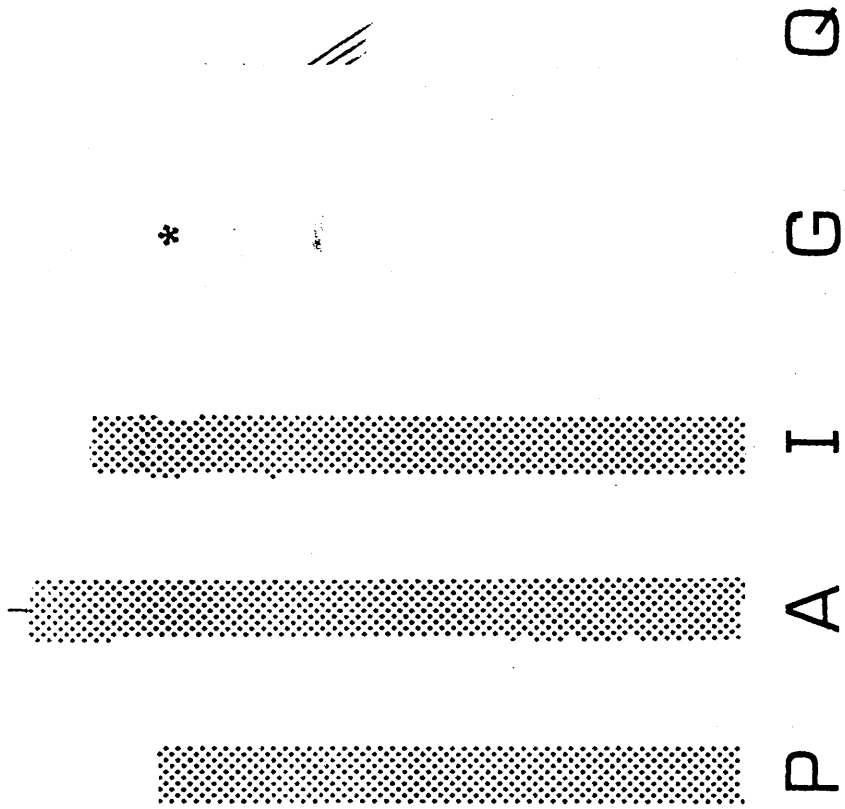
OVERFLOW — $^3 H(S^2/S_1)$

1.0

0.75

0.5

0.25



$3 \times 10^{-7} M$

Fig. 23. -Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el "overflow" de tritio provocado por estimulación de campo en conducto deferente de rata, mediante electrodos paralelos. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G) y quinidina (Q). Las columnas corresponden al valor medio \pm s.e. de 4-6 experiencias. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pag. 111).

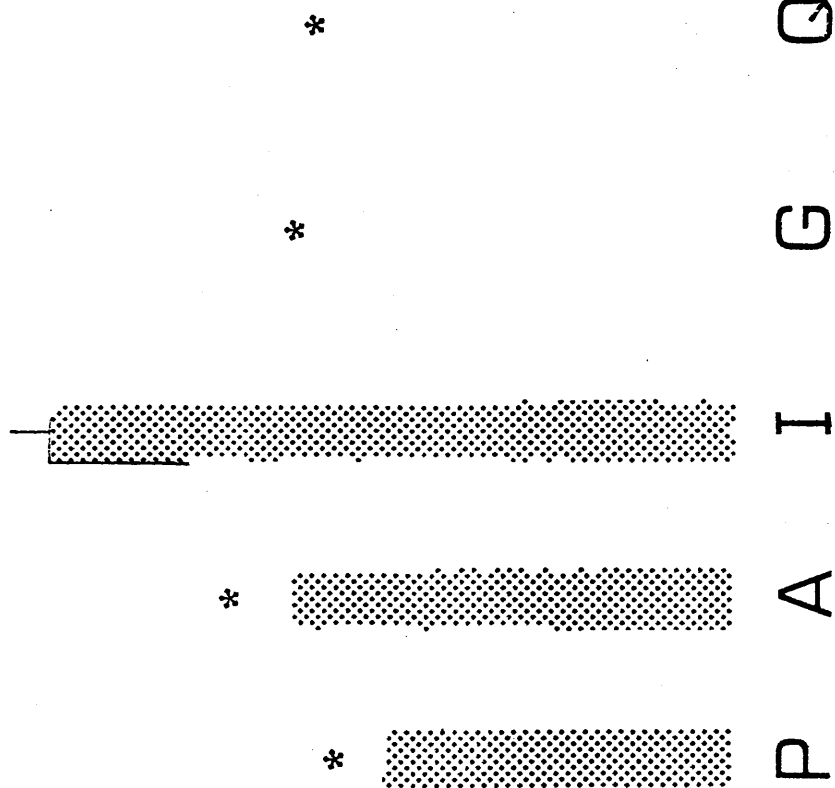
OVERFLOW — $^3\text{H}(\text{S}^2/\text{S}^1)$

1.0

0.75

0.5

0.25



$3 \times 10^{-5} \text{M}$ $2 \times 10^{-4} \text{M}$

Fig. 24 . -Efecto de los β bloqueantes y de otros fármacos sobre el "overflow" de tritio provocado por estimulación de campo en conducto deferente de rata, mediante electrodos paralelos. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G), quinidina (Q) y procaína (Pc). Las columnas corresponden al valor medio \pm s. e. de 4 experiencias. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0, 05$, test de Student).

3.2. Respuesta contráctil

3.2.1. Estimulación intramural

En los experimentos descritos a continuación se emplearon electrodos de aguja para la estimulación intramural del conducto deferente, utilizando las condiciones de estimulación usuales. Las contracciones se midieron en condiciones isométricas mediante un transductor de fuerza. Los fármacos estuvieron en todos los casos en contacto con la preparación durante 40 min, pues se añadieron inmediatamente después de la primera estimulación. La Fig.25 reúne algunos trazados representativos. El conjunto de los resultados se expresaron como la relación en tanto por ciento de la altura de la contracción en presencia del fármaco, R_2 , y la altura obtenida en ausencia de él, R_1 .

Como se puede observar en la Tabla V, en que se recogen los datos de la modificación de la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica, la altura de las dos contracciones fue similar en los controles. Cuando se adicionaron los fármacos a la concentración baja de $0,1 \mu\text{g/ml}$ (aproximadamente $3 \times 10^{-7} \text{M}$), sólo la guanetidina redujo la contracción de forma significativa a un $68,4 \pm 7,2$ de la inicial. Cuando la concentración fue $3 \times 10^{-5} \text{M}$, la guanetidina, el propranolol y el alprenolol abolieron totalmente la respuesta contráctil, observándose además mucha movilidad espontánea. El INPEA potenció

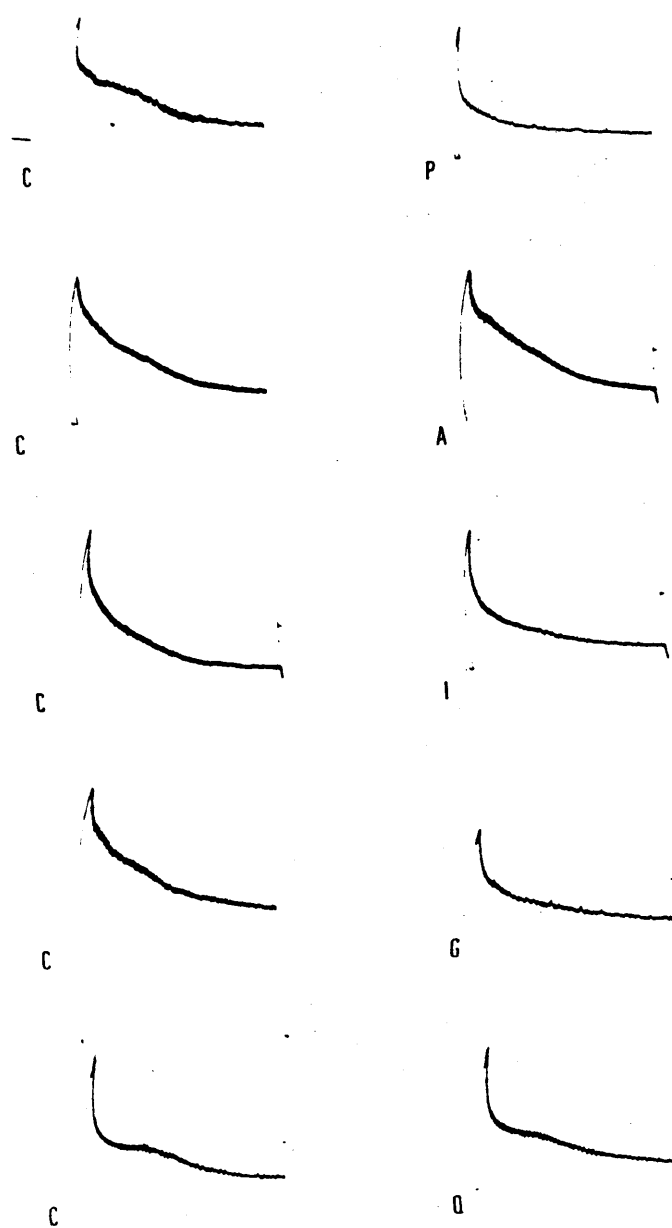


Fig. 25 .-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre la contracción inducida por estimulación intramural en conducto deferente de rata aislado. Los fármacos se añadieron a la concentración de 3×10^{-7} M. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G) y quinidina (Q). Para detalles en la metodología utilizada véase el texto (pag. 114).

Tabla V

MODIFICACION DE LA CONTRACCION INDUCIDA POR ESTIMULACION ELECTRICA EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO (Estimulación intramural)

Compuesto	Concentración	% R_2 / R_1
		102,4 ± 1,4
Propranolol	3×10^{-7} M	94,2 ± 6,7
Alprenolol	"	103,0 ± 3,4
INPEA	"	115,2 ± 12,5
Guanetidina	"	68,4 ± 7,2 ^a
Quinidina	"	119,0 ± 14,3
Propranolol	3×10^{-5} M	0,0 ^a
Alprenolol	"	0,0 ^a
INPEA	"	126,2 ± 8,2 ^a
Guanetidina	"	0,0 ^a
Quinidina	"	75,8 ± 5,0 ^a
Procaína	$2,2 \times 10^{-4}$ M	96,7 ± 6,5
Procaína	10^{-3} M	0,0 ^a

Los conductos deferentes se estimularon intramuralmente mediante electrodos de aguja. Se expresa la relación, porcentual, de la contracción máxima obtenida en presencia del fármaco (R_2) respecto de la contracción alcanzada en ausencia de él (R_1); media ± s.e. de 4-6 experimentos realizados. a: indica diferencia significativa para $p < 0,05$ (test de Student).

significativamente la contracción, probablemente debido a su actividad simpaticomimética. La quinidina, a la misma concentración, inhibió la respuesta a un $75\% \pm 5,0$ de la inicial. Finalmente la procaína, a la concentración de $2,2 \times 10^{-4}$ M, no modificó la contracción, pero cuando se ensayó a la de 10^{-3} M la abolió totalmente (Tabla V), apareciendo una acusada motilidad espontánea a lo largo de la experiencia.

Dado que en experiencias anteriores (apartado 1.1.) en que se utilizaron trenes de estímulos de 20 Hz, 18 seg de duración repetidos cada 6 min se había observado bloqueo con la concentración baja de propranolol y no en las condiciones actuales de estimulación se hicieron otra serie de experiencias adicionales y se observó que al utilizar trenes únicos de 1 min de duración y con una frecuencia de 20 Hz la respuesta contráctil no resultó modificada por el propranolol a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En cambio, esta misma concentración de propranolol antagonizó la respuesta contráctil en un 42 % (media de 4 experimentos) cuando los trenes fueron cortos y repetidos, independientemente de que la frecuencia utilizada fuera 5 o 20 Hz.

3.2.2. Estimulación de campo

Esta serie adicional de experimentos fue realizada, igual que antes, con objeto de comprobar la importancia del tipo de estimulación. La Tabla VI recoge los resultados del efecto de los fármacos sobre la contracción del conducto deferente, a las

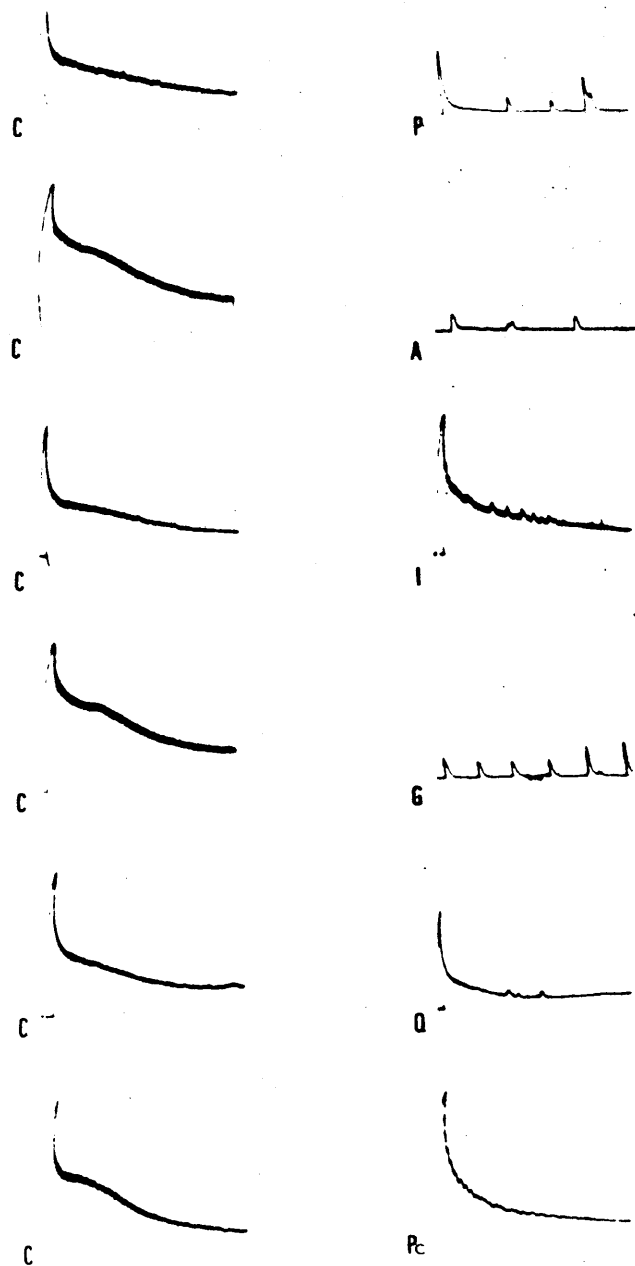


Fig. 26.-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica en el conducto deferente de rata aislado. Los fármacos se añadieron a la concentración de $3 \times 10^{-5}M$, excepto la procaína cuya concentración fue $2,2 \times 10^{-4}M$. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G), quinidina (Q) y procaína (Pc). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pag. 114).

Tabla VI

MODIFICACION DE LA CONTRACCION INDUCIDA POR ESTIMULACION ELECTRICA EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO (Estimulación de campo)

Compuesto	Concentración	% R_2 / R_1
		87,2 ± 2,7
Propranolol	$3 \times 10^{-7} M$	94,3 ± 5,7
Alprenolol	"	88,7 ± 5,3
INPEA	"	76,1 ± 8,2
Guanetidina	"	65,5 ± 6,3 ^a
Quinidina	"	73,3 ± 10,4
Propranolol	$3 \times 10^{-5} M$	0,0 ^a
Alprenolol	"	0,0 ^a
INPEA	"	122,9 ± 7,4 ^a
Guanetidina	"	0,0 ^a
Quinidina	"	89,7 ± 9,2
Procaína	$2,2 \times 10^{-4} M$	78,0 ± 7,7

Los conductos deferentes se estimularon mediante electrodos paralelos, estimulación de campo. Se expresa la relación, porcentual, de la contracción máxima alcanzada en presencia del fármaco (R_2) respecto de la contracción obtenida en ausencia de él (R_1); media ± s.e. de 4-5 experiencias realizadas. a: indica diferencia significativa para $p < 0,05$ (test de Student).

concentraciones habitualmente utilizadas.

En los experimentos en que no se añadió ningún fármaco la segunda contracción fue ligeramente menor que la primera, pues la relación R_2 / R_1 fue $87,2 \% \pm 2,7$. La concentración baja (aproximadamente $3 \times 10^{-7} M$) de guanetidina redujo la contracción al $65,6 \% (n=5)$, valor significativamente distinto del de los experimentos control. El resto de los compuestos no variaron la respuesta contráctil del conducto deferente. Al aumentar la concentración de los fármacos a $3 \times 10^{-5} M$ se observó, en cambio, que la guanetidina, el propranolol y el alprenolol, inhibían totalmente la respuesta contráctil. El INPEA produjo, igual que en otras experiencias previas, un aumento significativo de la contracción, obteniéndose un $22,9 \%$ de incremento medio de la contracción con respecto al valor control. Por último, la quinidina y la procaína, adicionada ésta última a la concentración de $2,2 \times 10^{-4} M$, no modificaron la altura de la respuesta contráctil.

4. EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENERGICOS SOBRE LA LIBERACION DE ^3H -NORADRENALINA EN AURICULA DE COBAYA AISLADA

4.1. Liberación de ^3H -NA inducida por estimulación eléctrica

En las experiencias realizadas en aurícula de cobaya aislada, se midió en todos los casos la cantidad de tritio liberada espontáneamente por unidad de tiempo y de mg de tejido (E_1) así como la cantidad de tritio liberada durante el primer período de estimulación eléctrica (S_1). Una vez transcurrido el tiempo de contacto con el fármaco (40 min), se midió igualmente la cantidad de tritio liberada bien espontáneamente, bien provocada por estimulación eléctrica (E_2 y S_2 respectivamente). Los resultados obtenidos se hallan reunidos en la Tabla VII.

Los resultados se expresaron, al igual que en el caso del conducto deferente de rata (apartado 3.1.2.) por la relación $S_2 : E_2 / S_1 : E_1$ antes comentada.

Cuando no existió fármaco alguno, dicha relación fue muy próxima a la unidad. El propranolol a la concentración 3×10^{-7} M redujo significativamente el "overflow" de tritio a un valor de $0,63 \pm 0,04$ ($n=4$). El alprenolol, del mismo modo, disminuyó el "overflow" a 0,74. Sin embargo al utilizar el INPEA a esa misma concentración, no se observó efecto alguno. La guanetidina produjo una acusada disminución del "overflow",

Tabla VII

EFECTO DE LOS BLOQUEANTES β -ADRENÉRGICOS Y DE OTROS FÁRMACOS SOBRE LA LIBERACIÓN DE TRITIO, ESPONTÁNEA O INDUCIDA POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EN AURÍCULA DE COBAYA AISLADA

Compuesto	Concentración	Tritio liberado: cpm / mg / min			
		E ₁	S ₁	E ₂	S ₂
Propranolol	$3 \times 10^{-7} M$	84,7 ± 3,7	196,3 ± 20,4	60,9 ± 4,8	129,6 ± 14,0
Alprenolol	"	82,2 ± 12,3	223,4 ± 21,8	64,7 ± 5,9	108,5 ± 15,3
INPEA	"	80,7 ± 4,9	267,9 ± 30,8	68,0 ± 4,1	176,3 ± 20,7
Guanetidina	"	75,9 ± 9,6	233,0 ± 13,3	70,4 ± 5,1	194,0 ± 19,0
Alprenolol	$3 \times 10^{-6} M$	84,0 ± 10,7	237,2 ± 41,2	90,3 ± 11,3	168,0 ± 15,3
Propranolol	$3 \times 10^{-5} M$	80,4 ± 6,3	320,8 ± 17,9	65,6 ± 3,9	221,0 ± 6,9
Alprenolol	"	71,8 ± 8,8	179,3 ± 21,0	69,1 ± 8,5	123,5 ± 11,0
INPEA	"	120,5 ± 11,9	243,4 ± 19,4	108,7 ± 8,3	216,6 ± 9,9
	"	85,4 ± 12,0	224,4 ± 27,3	72,5 ± 8,1	170,2 ± 18,6

Tabla VII (cont.)

Compuesto	Concentración	Tritio liberado: cpm / mg / min			
		E ₁	S ₁	E ₂	S ₂
—	—	84,7 ± 3,7	196,3 ± 20,4	60,9 ± 5,8	129,6 ± 14,0
Guanetidina	3 x 10 ⁻⁵ M	85,6 ± 9,6	282,6 ± 27,9	134,3 ± 9,7	248,1 ± 17,1
Procaína	2,2 x 10 ⁻⁴ M	77,8 ± 9,4	178,7 ± 21,7	70,2 ± 5,4	149,7 ± 10,5
Procaína	10 ⁻³ M	80,0 ± 1,8	234,7 ± 20,7	81,5 ± 4,5	129,4 ± 9,0

Se midió la cantidad de tritio liberada espontáneamente, bien en presencia del fármaco en estudio (E₂) bien en ausencia de él (E₁), del mismo modo se midió la cantidad de tritio liberada por estimulación eléctrica, tanto en presencia del fármaco (S₂) como en ausencia de él (S₁). Media ± s.e. de 4-5 experiencias realizadas. El tritio liberado corresponde en gran parte a ³H-NA, ya que la MAO se hallaba inhibida por la pargilina (1,25 x 10⁻⁴M) presente en el líquido de perfusión.

pues el valor medio de las 5 experiencias realizadas fue $0,70 \pm 0,07$. Los resultados obtenidos vienen representados en la Fig. 27.

Al utilizar la concentración de 3×10^{-5} M ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), se observó con guanetidina una disminución del "overflow" de tritio más acusada que al utilizar la concentración cien veces menor. El propranolol, en cambio, redujo también de forma significativa el "overflow", pero en menor grado que al utilizar la concentración inferior. Por otra parte, el alprenolol y el INPEA no modificaron apenas el "overflow" de ^3H . La procaína ($2,2 \times 10^{-4}$ M) tampoco alteró el "overflow", pero sí lo disminuyó de forma significativa cuando la concentración del anestésico local fue elevada hasta 10^{-3} M. Debe indicarse, finalmente, que el alprenolol se utilizó, aparte de a las concentraciones usuales, a una tercera concentración intermedia de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (aproximadamente 3×10^{-6} M), para observar, teniendo en cuenta sus acciones α -adrenolíticas (apartado 1.2.2.), su posible efecto sobre los receptores α -presinápticos, a una concentración a la que los efectos bloqueantes de los receptores β -postsinápticos o anestésicos locales fueran menos aparentes. El resultado obtenido, $0,84 \pm 0,03$, no fue, sin embargo, significativamente diferente de los controles.

4.2. Efecto inotrópico positivo

En las experiencias sobre aurícula de cobaya aislada, es

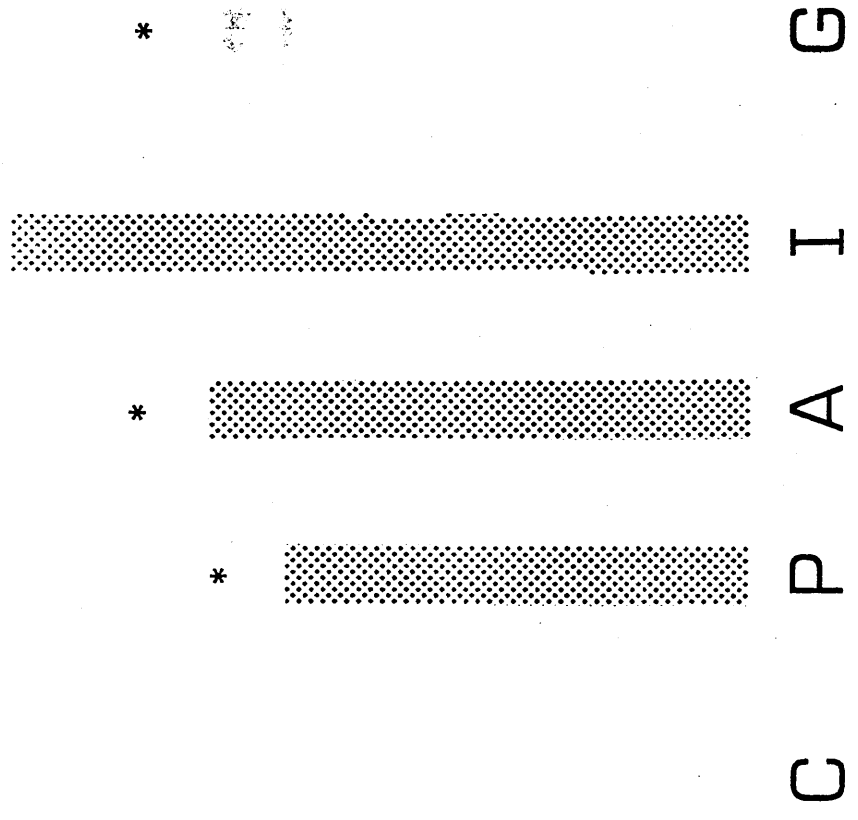
OVERFLOW — $^3 H(S_2/S_1)$

1.0

0.75

0.5

0.25



$3 \times 10^{-7} M$

Fig. 27 . -Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el "overflow" de tritio provocado por estimulación eléctrica en aurícula de cobaya aislada. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), y guanetidina (G). Las columnas corresponden al valor medio \pm s.e. de 4-6 experiencias. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pág.121).

OVERFLOW — $^3 H(S^2/S_1)$

1.0

0.75

0.5

0.25

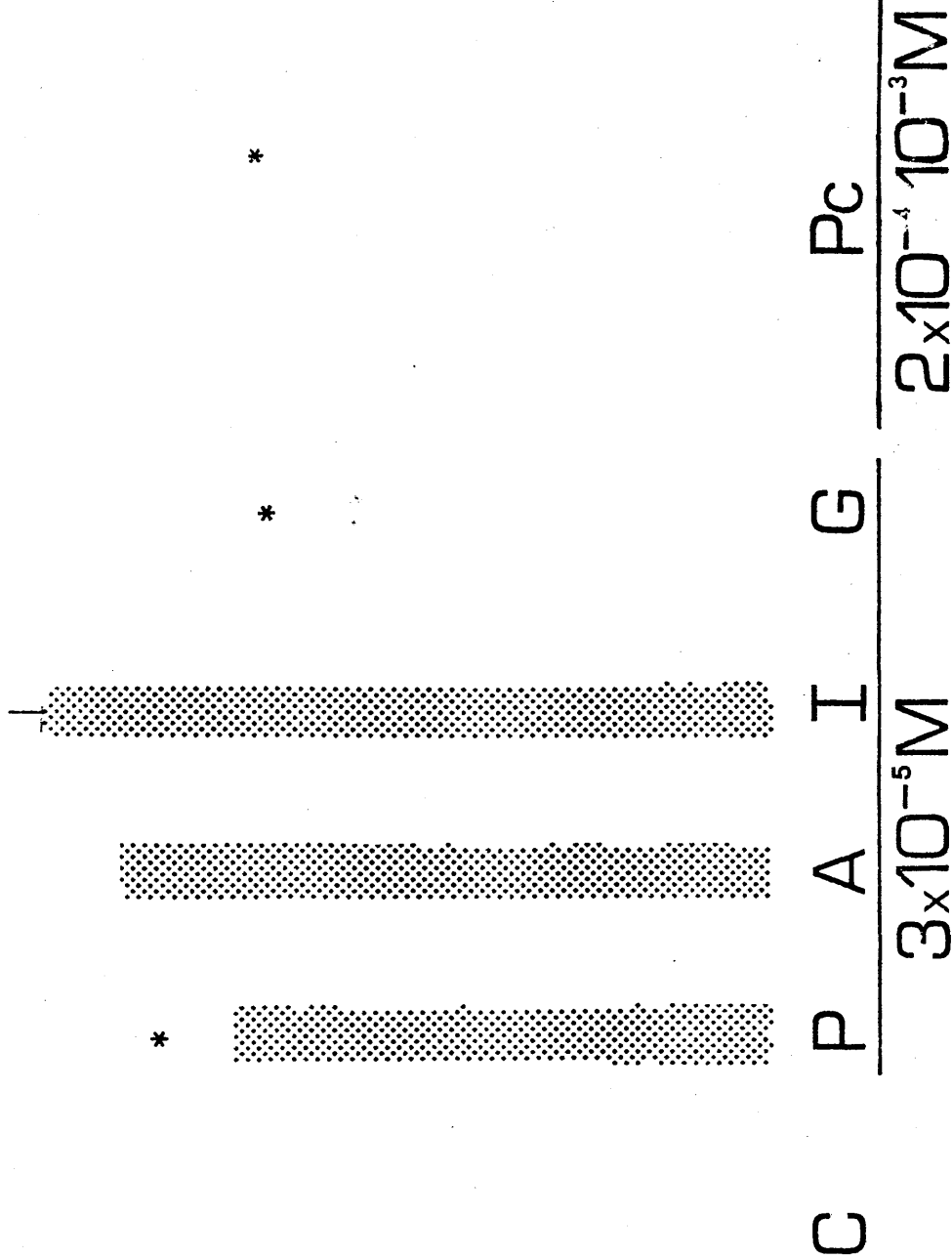


Fig. 28 . -Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el "overflow" de tritio provocado por estimulación eléctrica en aurícula de cobaya aislada. Control (C), propranolol (P), alprenolol (A), INPEA (I), guanetidina (G) y procaína (Pc). Las columnas corresponden al valor medio \pm s.e. de 4-6 experiencias. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Student). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pág.121).

timulada eléctricamente, se midió el efecto inotrópico positivo inducido por dicha estimulación en condiciones isométricas. Se halló, para todos los casos, la relación R_2/R_1 , de la máxima contracción obtenida en presencia del fármaco R_2 y en ausencia de él, R_1 , expresada en tanto por ciento. La Fig. 29 reúne algunos trazados representativos del efecto de los fármacos a la concentración baja ($0,1 \mu\sigma/\text{ml}$, aproximadamente 3×10^{-7} M).

En los experimentos control se obtuvo un valor porcentual de $91,7 \pm 4,1$ ($n=6$). La concentración baja del propranolol disminuyó acusadamente la respuesta a la estimulación eléctrica (13,8% del valor inicial). La misma concentración de alprenolol también redujo la respuesta aunque en menor proporción (38,6%), mientras que la inhibición inducida por el INPEA fue algo menor, como corresponde a su menor potencia β -bloqueante. La guanetidina, finalmente, inhibió la contracción hasta un 60% aproximadamente del valor inicial. Los resultados obtenidos con la concentración baja de las sustancias en estudio vienen reunidos en la Tabla VIII

A la concentración de $10 \mu\sigma/\text{ml}$ (aproximadamente 3×10^{-5} M), el bloqueo producido por el propranolol fue total, y con el alprenolol casi total (Fig. 30). El INPEA, sin embargo, redujo la respuesta incluso menos que el propranolol a la concentración baja. La procaína ($2,2 \times 10^{-4}$ M) no varió significativamente el efecto inotrópico positivo. La guanetidina, por fin, no sólo no indujo bloqueo, sino que potenció la respuesta a un 160%, resultado altamente significativo (Tabla VIII).

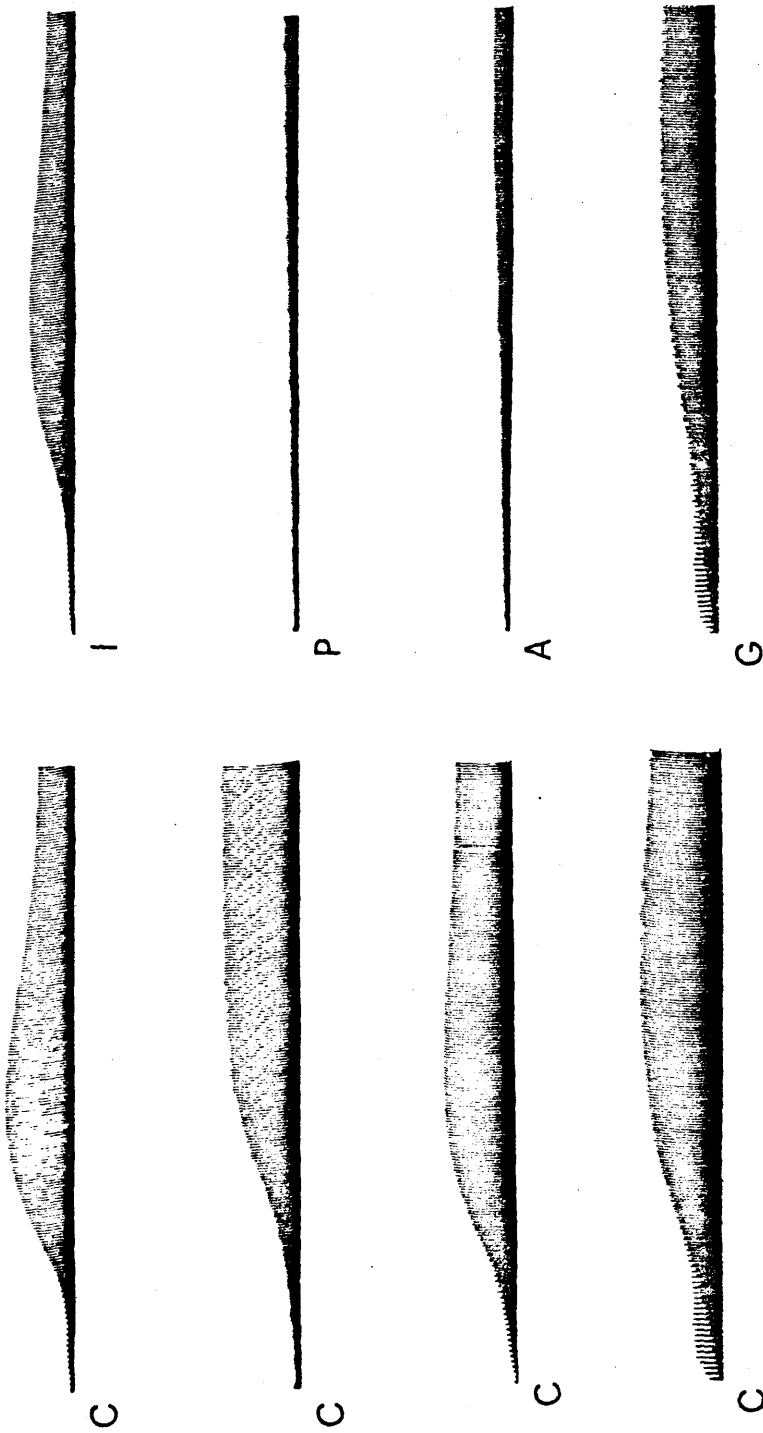


Fig. 29 .-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el efecto inotrópico positivo de la estimulación eléctrica en aurícula aislada de cobaya. Los fármacos se añadieron a la concentración de 3×10^{-7} M. Control (C), INPEA (I), propranolol (P), alprenolol (A) y guanetidina (G). Para detalles de la metodología utilizada mírese en el texto (pag. 121)

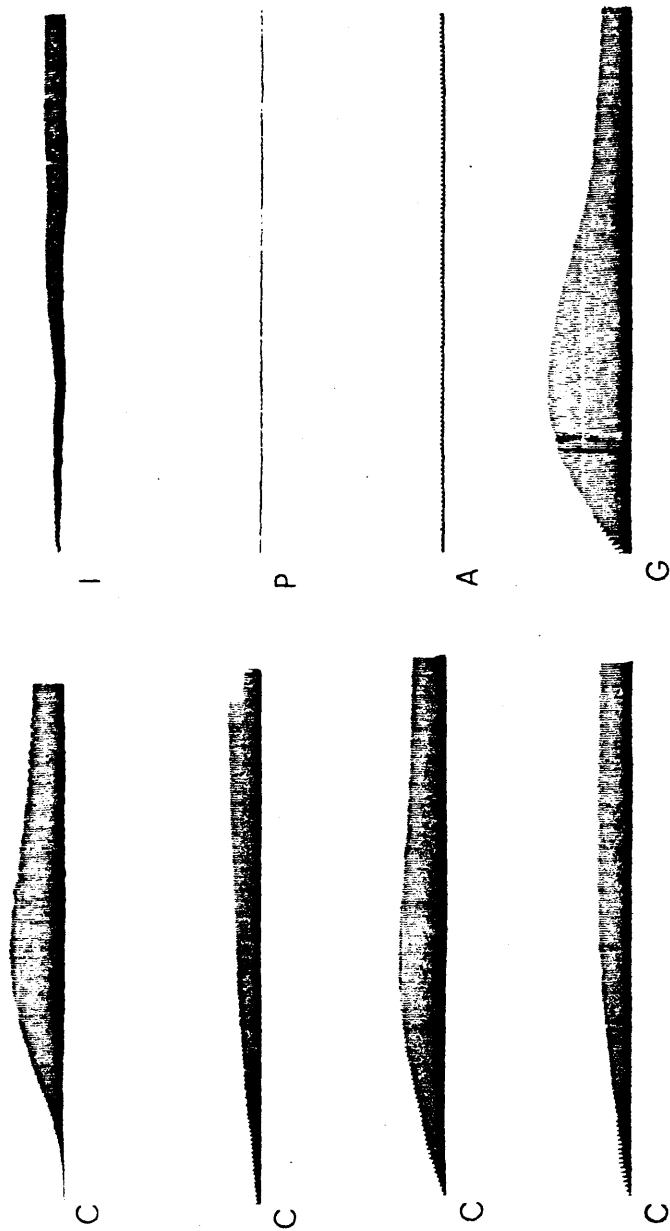


Fig. 30 .-Efecto de los β -bloqueantes y de otros fármacos sobre el efecto inotrópico positivo de la estimulación eléctrica en la aurícula izquierda de cobaya aislada. Los fármacos se añadieron a la concentración de 3×10^{-5} M. Control (C), INPEA (I), propranolol (P), alprenolol (A) y guanetidina (G). La metodología utilizada viene descrita en el texto (pag.121)

Tabla VIII

MODIFICACION DEL EFECTO INOTROPICO POSITIVO INDUCIDO POR LA ESTIMULACION ELECTRICA EN AURICULA DE COBAYA AISLADA

Compuesto	Concentración	% R_2 / R_1
		91,7 ± 4,1
Propranolol	$3 \times 10^{-7} M$	13,8 ± 8,9 ^a
Alprenolol	"	38,6 ± 5,4 ^a
INPEA	"	64,4 ± 7,0 ^a
Guanetidina	"	60,2 ± 10,1 ^a
Propranolol	$3 \times 10^{-5} M$	0,0 ^a
Alprenolol	"	4,2 ± 2,7 ^a
INPEA	"	33,5 ± 0,6 ^a
Guanetidina	"	160,8 ± 22,1 ^a
Procaína	$2,2 \times 10^{-4} M$	87,5 ± 13,0
Procaína	$10^{-3} M$	0,0 ^a

Se expresa la relación, en tanto por ciento, de la contracción máxima alcanzada en presencia del fármaco (R_2) respecto de la contracción obtenida en ausencia de él (R_1); media ± s. e. de 4-6 experiencias realizadas. a: indica diferencia significativa para $p < 0,05$ (test de Student) con respecto a los controles.

5. EFECTOS DE LOS β -BLOQUEANTES Y DE OTROS FÁRMACOS SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -NORADRENALINA

5. 1. Conducto deferente de rata

Para determinar el efecto de los fármacos en estudio sobre la incorporación de ^3H -NA por el conducto deferente de rata, se realizaron una serie de experimentos en los que los fármacos fueron añadidos al medio de incubación a idénticas concentraciones que en los estudios previos de liberación.

Considerando un 100 % de incorporación de ^3H -NA a los conductos deferentes control, tras una incubación de 30 min en un medio con una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ de ^3H -NA, se encontró que a la concentración de $3 \times 10^{-7}\text{M}$ ninguno de los fármacos utilizados modificó la cantidad de ^3H captada por los deferentes (Tabla IX). Sin embargo a $3 \times 10^{-5}\text{M}$ se observó que tanto la guanetidina como el propranolol, el alprenolol y la quinidina inhibieron la incorporación de ^3H -NA, siendo el fármaco más efectivo la guanetidina con un valor porcentual medio de $41,7 \% \pm 3,2$ ($n=10$). El INPEA no alteró la capacidad de captación del conducto deferente, y tampoco varió la incorporación la procaína ($2,2 \times 10^{-4}\text{M}$). Finalmente, al utilizar la concentración de 10^{-3}M de procaína se obtuvo un valor medio de captación de ^3H -NA en los conductos deferentes de $60,3 \%$

Tabla IX

BLOQUEO DE LA INCORPORACION DE ³H-NORADRENALI-
NA EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA

Compuesto	Concentración	% Incorporación
Propranolol	3×10^{-7} M	123,3 ± 10,7
Alprenolol	"	89,5 ± 6,9
INPEA	"	96,4 ± 14,1
Guanetidina	"	90,7 ± 1,8
Propranolol	3×10^{-5} M	83,6 ± 3,8 ^a
Alprenolol	"	62,9 ± 5,8 ^a
INPEA	"	109,8 ± 5,8
Guanetidina	"	41,7 ± 3,2 ^a
Quinidina	"	85,6 ± 5,1 ^a
Procaína	$2,2 \times 10^{-4}$	110,9 ± 6,6
Procaína	10^{-3} M	60,3 ± 4,4 ^a

Los conductos deferentes de rata se preincubaron durante una hora con el fármaco, a continuación se añadió ³H-NA (0,5 μM) prosiguiéndose la incubación durante 30 min más. Después se realizaron 8 lavados, y se valoró el % de radiactividad incorporada por los conductos deferentes tratados respecto a los controles. Se expresa la media ± s.e. de 4-16 experimentos. a: valores significativamente distintos de los controles (p < 0,05 test de Student).

$\pm 4,4$ (n=6) respecto a los controles.

5.2. Aurícula de cobaya

A la concentración baja (aproximadamente 3×10^{-7} M) ninguno de los fármacos modificó de forma significativa la captación de $^3\text{H-NA}$ en aurícula de cobaya, como se puede observar en la Tabla X. Por el contrario a la concentración alta los antagonistas β inhibieron acusadamente la incorporación de $^3\text{H-NA}$, pero el efecto más drástico fue el producido por guanetidina, con la que se encontró un porcentaje de bloqueo superior al 70 %. La procaína ($2,2 \times 10^{-4}$ M) careció de efecto sobre la incorporación de $^3\text{H-NA}$, sin embargo al ensayar la concentración de 10^{-3} M produjo un bloqueo de la captación de $^3\text{H-NA}$ del 42 % (Ver Tabla X).

Tabla X

BLOQUEO DE LA INCORPORACION DE ³H-NORADRENA-
LINA EN AURICULA DE COBAYA

Compuesto	Concentración	% Incorporación
Propranolol	3×10^{-7} M	106,3 ± 6,5
Alprenolol	"	93,4 ± 5,8
INPEA	"	83,0 ± 14,5
Guanetidina	"	117,5 ± 10,3
Propranolol	3×10^{-5} M	59,6 ± 2,0 ^a
Alprenolol	"	44,0 ± 6,2 ^a
INPEA	"	70,9 ± 9,6 ^a
Guanetidina	"	27,4 ± 3,0 ^a
Procaína	$2,2 \times 10^{-4}$ M	85,6 ± 8,7
Procaína	10^{-3} M	58,0 ± 4,5 ^a

Las aurículas de cobaya se preincubaron durante una hora con el fármaco, a continuación se añadió ³H-NA (0,5 μM) prosiguiéndose la incubación durante 30 min más. Después se realizaron 8 lavados, y se valoró el % de ra diactividad incorporada por las aurículas tratadas respec to a los controles, (aurículas a las que no se añadió fármaco alguno). Se expresa la media ± s.e. de 4-9 experimentos. a: valores significativamente distintos de los con troles (p < 0,05 test de Student).

6. EFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MONOAMINOXIDASA

Se realizaron una serie de experimentos para estudiar la posible actividad inhibidora del propranolol sobre la actividad de la monoaminoxidasa (MAO) de distintos tejidos de la rata.

Se realizó un tanteo previo "in vitro" de la actividad de la MAO con concentraciones de propranolol comprendidas entre 10^{-7} y 10^{-3} M, (Fig. 31), tanto en cerebro como en arteria mesentérica de rata, observándose únicamente a la concentración más alta (10^{-3} M) una inhibición acusada en la actividad de la MAO en ambos tejidos.

El tratamiento agudo de las ratas con propranolol (dosis de 1 a 50 mg/kg) i.p. una hora antes de su sacrificio, produjo una inhibición muy ligera, independiente de la dosis, de la actividad de la MAO en cerebro y arteria mesentérica. Los resultados correspondientes vienen reunidos en la Tabla XI.

Se realizó también un tratamiento crónico con propranolol, de 7 días de duración, utilizando dos dosis de 0,1 y 10 mg/kg i.p., observándose con la dosis baja una ligera inducción en la actividad de la MAO en corazón y arteria mesentérica, que no llegó a ser significativa respecto a los controles. Con la dosis alta de 10 mg/kg no se observó en corazón ninguna diferencia en la actividad de la MAO con respecto a los controles, y en arteria mesentérica el propranolol no sólo no produjo inhibición sino que aumentó ligeramente la actividad de la MAO. Se reali

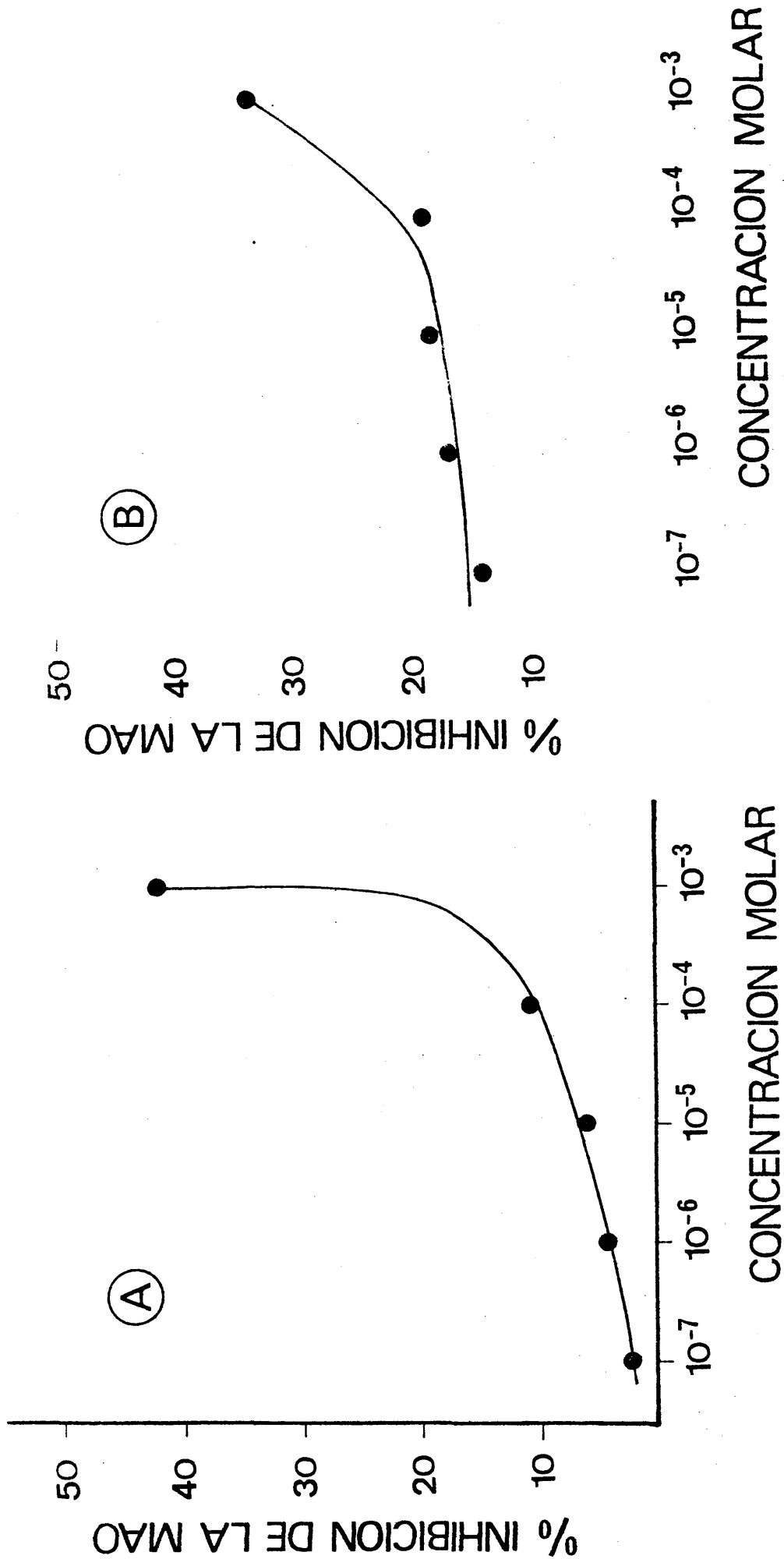


Fig. 31.-Efecto del propranolol sobre la actividad de la monoaminooxidasa (MAO) "in vitro". A: Inhibición de la actividad de la MAO por propranolol en cerebro de rata. B: Inhibición de la actividad de la MAO por propranolol en arteria mesentérica de rata. Cada punto corresponde a un experimento.

zó finalmente otro tratamiento crónico, de 20 días de duración, en el que el fármaco se añadió al agua de bebida de las ratas, de tal modo que la cantidad bebida al día fuera aproximadamente 10 mg/kg. La actividad de la MAO se valoró en arteria mesenterica, observándose una leve disminución en la actividad de la MAO, valor que no llegó a ser estadísticamente distinto de los controles. Los datos correspondientes al tratamiento crónico con propranolol vienen igualmente expuestos en la Tabla XI.

Tabla XI

EFECTO DEL TRATAMIENTO AGUDO O CRONICO CON PROPRANOLOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MONOAMINOXIDASA (MAO)

Tratamiento agudo (Variación en tanto por ciento respecto a los controles)					
Compuesto	Dosis mg / kg i.p.	Tejido ensayado cerebro	Tejido ensayado art mesentérica		
Propranolol	1	81, 1 ± 7, 6	79, 9 ± 8, 8		
	5	90, 3 ± 8, 9	84, 5 ± 9, 0		
	10	85, 9 ± 8, 2	85, 6 ± 8, 5		
	50	88, 9 ± 7, 8	92, 5 ± 9, 6		
Tratamiento crónico (Variación en tanto por ciento respecto a los controles)					
Compuesto	Dosis mg / kg	vía de administración	Duración	Tejido ensayado corazón	Tejido ensayado art. mesentérica
Propranolol	0, 1	i. p.	7 días	109, 6 ± 9, 2	149, 7 ± 17, 5
	10	i. p.	7 días	85, 9 ± 12, 1	135, 0 ± 14, 6
	10	p. o.	20 días		84, 8 ± 10, 0

Se expresa la media ± s.e. de 4-5 experiencias realizadas. Para detalles de metodología vease apartado 5 de Métodos.

CAPITULO IV
DISCUSION DE
LOS RESULTADOS

Este trabajo se planteó para estudiar los efectos presinápticos de los β -bloqueantes sobre las neuronas adrenérgicas, en un intento de precisar la importancia de dichos efectos en el mecanismo de la actividad antihipertensora de estos fármacos.

1. ESTUDIOS SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA AISLADO

1.1. Respuesta contráctil

El conducto deferente de rata aislado de rata o de cobaya ha sido la preparación más constantemente utilizada en trabajos anteriores en los que se ha tratado de poner de manifiesto la actividad bloqueante de neuronas adrenérgicas de los antagonistas β (Day y col, 1968; Barrett y Nunn, 1970; Mylecharane y Raper, 1970).

En la primera parte de este trabajo se estimuló el conducto deferente de rata mediante electrodos de aguja y utilizando trenes de estímulos de 20 Hz de frecuencia durante 18 seg cada 6 min. En estas condiciones los resultados obtenidos con la concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (aproximadamente $3 \times 10^{-7} \text{M}$), fueron similares en el caso de la guanetidina y del propranolol, pues en ambos casos el bloqueo fue resistente al lavado pero revirtió mediante d-anfetamina, resultados si

milares a los de Mylecharane y Raper (1973). No obstante, el bloqueo inducido por guanetidina fue más acusado y más lento en su instauración que cuando se utilizó propranolol. El alprenolol produjo un bloqueo semejante al del propranolol pero fue revertido, en cambio, tanto por d-anfetamina como por lavado, hecho este último que quizá pudiera ser debido a que a esta concentración baja de alprenolol se produzca ya un bloqueo de la conducción nerviosa de tipo anestésico local. En apoyo de esta afirmación podrían citarse los experimentos en que la preparación fue pretratada con desipramina (Tabla I), en los que se encontró que la actividad bloqueante del propranolol o de la guanetidina resultó totalmente prevenida, pero no ocurrió igual con el alprenolol. Estos experimentos permiten afirmar, por otra parte, y en contra de la opinión de Lewis (1977), que el propranolol ejerce sus acciones sobre las neuronas adrenérgicas una vez ha sido incorporado al interior. El INPEA no alteró las contracciones inducidas por estimulación nerviosa en el conducto deferente de rata aislado, y la ligera potenciación que se observó al añadir d-anfetamina se debe, probablemente, al efecto intrínseco que posee este fármaco simpaticomimético cuando se utiliza el solo en este tipo de preparación (Valette y col, 1975). De igual forma la quinidina produjo un suave bloqueo que el lavado no modificó, y que fue revertido en cierto modo mediante d-anfetamina por las razones antes expuestas.

Cuando se aumentó la concentración cien veces, hasta $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{M}$), el bloqueo pro

ducido por el propranolol se diferenci6 del obtenido con guanetidina, en que el primero no fue modificado por d-anfetamina, si bien es verdad que hubo una cierta tendencia a que aumentara la respuesta, lo que no pudo precisarse por la aparici6n de una acusada motilidad espontanea. El lavado, en cambio, que no modific6 el bloqueo obtenido con guanetidina, revirti6 el bloqueo en el caso del propranolol, resultados que difieren de los obtenidos por Mylecharane y Raper (1973), pero que se asemejan, sin embargo, a los descritos por Day y col (1968) para los anest6sicos locales. Adem6s, Barrett y Cullum (1968), hallaron que a la concentraci6n de 10 µg/ml el propranolol posee propiedades estabilizadoras de membrana en otras preparaciones de 6rganos aislados, mientras que la misma concentraci6n de guanetidina no debe poseer actividad anest6sica local, puesto que es mucho menos potente a este respecto que el propranolol (Bourne, 1974). En cuanto a las diferencias observadas en los resultados obtenidos con guanetidina a las dos concentraciones, en el sentido de que el bloqueo inducido por la concentraci6n alta no es totalmente revertido por anfetamina, pueden ser debidas a que a esa concentraci6n, la guanetidina quiz6 se pueda ligar a otros lugares no relacionados espec6ficamente con el almacenamiento de noradrenalina (Chang y col, 1965). El bloqueo inducido por el alprenolol revirti6, as6 mismo, por el lavado de la preparaci6n, pero la danfetamina acentu6 de forma significativa el bloqueo, efecto que se observ6 tambi6n con quinidina y proca6ina, aunque no lleg6 a ser significativo, y que Bentley (1965) ya describi6 para el anest6sico local

procaína, en sus estudios realizados en conducto deferente de cobaya estimulado eléctricamente. El INPEA, finalmente, potenció acusadamente la respuesta contráctil, debido probablemente a su actividad simpaticomimética (Del Tacca y col, 1975), y el lavado eliminó totalmente este efecto.

Los resultados anteriores únicamente sugieren una cierta acción bloqueante de neuronas adrenérgicas para el propranolol a baja concentración, de acuerdo con las características similares del bloqueo obtenido con este compuesto y con guanetidina y considerando, por otra parte, que es necesario para ambas sustancias ganar acceso al interior de la neurona adrenérgica para que se manifiesten sus efectos. Ambas sustancias mostraron, así mismo, un paralelismo en sus efectos potenciadores de las contracciones inducidas por noradrenalina exógena, hecho que debe atribuirse simplemente a sus efectos bloqueantes de la reincorporación del neurotransmisor (Iversen, 1967; Foo y col, 1968; ver más adelante), y que es, en general, más acusado cuanto mayor es el tiempo de contacto del fármaco con la preparación. En esta serie de experiencias es de destacar el hecho un tanto sorprendente de que el alprenolol se reveló como un α -adrenolítico no competitivo y relativamente potente, algo más que la tolazolina, hecho que quizá pudiera tener importancia en la interpretación de algunos de los resultados de este trabajo (ver apartado 3 de la discusión).

Cuando se estudió la acción de propranolol y guanetidina utilizando las condiciones de estimulación eléctrica descritas en el apartado 2.4. de Métodos (un único tren de es

tímulos de 1 min de duración y 5 Hz de frecuencia), se encontró que la concentración baja de guanetidina (3×10^{-7} M) fue la única que redujo la altura de la contracción en un 30 % aproximadamente, mientras que la misma concentración de propranolol no produjo una reducción significativa de la respuesta, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que en las condiciones de estimulación antes utilizadas, el bloqueo inducido por guanetidina fue mucho más acusado. De hecho, en otra serie de experiencias adicionales, en las que manteniendo la frecuencia de 5 Hz se hicieron estimulaciones de 18 seg de duración y repetidas cada 6 min, sí se llevó a observar un bloqueo apreciable, y similar al anteriormente hallado, con la concentración baja de propranolol. Al subirse la concentración de todos los fármacos a aproximadamente 3×10^{-5} M, tanto la guanetidina como el propranolol y el alprenolol bloquearon totalmente la respuesta contráctil mientras que el INPEA la potenció ligeramente como podía esperarse de su actividad simpaticomimética antes comentada, y estos hechos ocurrieron tanto al utilizar estimulación intramural con electrodos de aguja como al utilizar estimulación de campo. Los datos obtenidos en esta segunda serie de experimentos no permiten en realidad establecer ninguna conclusión sobre el mecanismo implicado en el antagonismo por los β -bloqueantes de las contracciones del conducto deferente inducidas por estimulación eléctrica. Cabe quizá únicamente considerar el hecho de que una substancia con una potente acción estabilizadora de membrana como es la quinidina sólo reduce moderadamente la

contracción del deferente a la concentración alta cuando se utilizan electrodos de aguja y no la modifica en absoluto al utilizar estimulación de campo. Por lo que se refiere al anestésico local procaína es necesario utilizar concentraciones casi cien veces mayores que las de propranolol para conseguir un bloqueo total de la respuesta. Todo esto hace pensar que el bloqueo inducido por propranolol y alprenolol no debe depender únicamente de la actividad anestésica local de estos compuestos sino que, de acuerdo con Saelens y col (1977 b) debe haber algún otro mecanismo implicado que, en el caso del propranolol, no puede descartarse que se trate de una acción bloqueante de neuronas adrenérgicas.

1.2. Liberación de ^3H -Noradrenalina

Para estas experiencias se utilizó una frecuencia de estimulación de 5 Hz, dado que si existieran en el conducto deferente receptores β presinápticos que regularan la liberación de NA, su función se hubiera detectado mejor a frecuencias bajas (Lanøer, 1970; Dubocovich y Lanøer, 1974).

Según se comentó anteriormente (apartado 3.1.2. de Resultados), el líquido de perfusión contuvo siempre paroi lina a una concentración suficiente para inhibir la MAO. De esta forma, la radiactividad liberada por estimulación eléctrica estuvo constituida casi exclusivamente por nora-

drenalina y normetanefrina, y dado que la normetanefrina es formada extraneuronamente por la acción de la COMT, la cantidad de tritio medida constituye un índice satisfactorio de la cantidad de $^3\text{H-NA}$ liberada por estímulo eléctrico (Langer y col, 1972).

En las distintas series de experimentos realizados, el tritio liberado en ausencia de fármacos, tanto espontáneamente como tras estimulación eléctrica, fue variable, encontrándose una relación de hasta 1,66 entre la máxima y la mínima liberación en el caso de la estimulación intramural con electrodos de aguja (Tabla III) y una diferencia similar en la estimulación de campo (Tabla IV). Es por esto que pareció más adecuado expresar el "overflow" inducido por la estimulación eléctrica mediante el cociente S/E , para poder así compensar estas diferencias experimentales en vez de emplear la diferencia $S-E$ que es utilizada más habitualmente (Stjärne, 1975; Summers y Tillman, 1977; Celuch y col, 1978).

A la concentración baja ($3 \times 10^{-7}\text{M}$) de los fármacos el único efecto observado fue que la guanetidina redujo la liberación provocada por estimulación eléctrica, lo que se tradujo en una disminución del cociente $S_2 : E_2 / S_1 : E_1$ respecto a los controles, lo que es lógico de acuerdo con su actividad bloqueante de neuronas adrenérgicas (Starke y col, 1972). La concentración de los fármacos de $3 \times 10^{-5}\text{M}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) en el caso del propranolol, el alprenolol, la guanetidina, la quinidina y la procaína, esta última a concentración de 10^{-3}M , aumentaron tanto la liberación espontánea como la liberación provo-

cada por estimulación nerviosa, hecho que se puede explicar sabiendo que estos fármacos a esta concentración inhiben la reincorporación de noradrenalina (ver Tabla IX), y aumentan tanto la liberación basal como la liberación inducida por estimulación. Sin embargo, para estos fármacos disminuyó el cociente con que se valoró el "overflow", pues aunque aumentó la liberación de tritio disminuyó la relación $S_2 : E_2$, es decir la liberación en presencia del fármaco. Es evidente que a las concentraciones relativamente altas utilizadas, el bloqueo de la reincorporación de noradrenalina provoca una mayor concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, y esto puede determinar una acción estimulante sobre los receptores α presinápticos que disminuya la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación eléctrica (Starke y Endo, 1976; Marshall y col, 1977). Esto puede además tener más importancia en el conducto deferente de rata, tejido en el que las sinapsis son estrechas, entre 20 y 50 nm, que en otros tejidos con sinapsis más anchas (Cubeddu y col, 1974; Langer, 1974). Debe tenerse en cuenta, no obstante, que no hay una relación directa entre el bloqueo de la incorporación de la NA (Tabla IX) y la reducción del cociente S_2 / S_1 (Figs. 21 y 22) y hay que pensar otra vez, por consiguiente, para explicar las acciones del propranolol o alprenolol en la alternativa entre acción bloqueante de neuronas adrenérgicas o acción estabilizadora de membrana, haciendo iguales consideraciones que en el apartado anterior.

Al comparar los datos de "overflow" de tritio (Figs. 21 y 22) con los de respuesta contráctil, llama la atención

el hecho de que la reducción de la contracción no se correlaciona muy satisfactoriamente con la reducción de la liberación de $^3\text{H-NA}$. En efecto, la quinidina ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) reduce el "overflow" en un grado aproximadamente igual al del propranolol y, sin embargo, reduce mucho menos la contracción. Con guanetidina ocurre igualmente que la diferencia de acción entre las dos concentraciones utilizadas es mucho más acusada cuando se miden contracciones que cuando se mide "overflow" de $^3\text{H-NA}$. Únicamente cabe invocar para explicar esta falta de correlación la posibilidad de que la noradrenalina no sea el neurotransmisor motor del conducto deferente de rata. Esta idea, que fue propuesta inicialmente por Ambache y Zar (1971) para el deferente de cobaya y más recientemente por Jenkins y col (1977) para el de ratón explicaría, sin duda, de forma razonable los resultados aquí encontrados para el conducto deferente de rata.

Estos experimentos han servido, por otra parte, para excluir la presencia de receptores β presinápticos en el conducto deferente de rata, pues la concentración baja ($3 \times 10^{-7}\text{M}$) de propranolol que ya induce claras acciones pre- y postsinápticas (Adler-Graschinsky y Langer, 1975; Weinstock, 1976) no modifica aquí la liberación de $^3\text{H-noradrenalina}$ provocada por estímulo eléctrico, bien se utilizara estimulación intramural con electrodos de aguja, bien estimulación de campo. De igual forma, el INPEA a la concentración de $3 \times 10^{-5}\text{M}$, a la cual ya son manifiestas sus acciones de bloqueo de receptores β - postsinápticos (Del Tacca y col, 1975) carece de efecto sobre

la liberación de $^3\text{H-NA}$, cualquiera que fuera el medio de estimulación del conducto deferente.

Las diferencias que se observaron al utilizar estimulación de campo en vez de estimulación intramural con electrodos de aguja fueron solamente cuantitativas, pues los compuestos que redujeron el "overflow" de tritio liberado por estimulación intramural en este caso también fueron capaces de reducirlo, si bien es verdad que al ser el valor del "overflow" de los controles mayor, las diferencias obtenidas fueron más acusadas cuando se utilizó estimulación de campo. En nuestra opinión, en las condiciones utilizadas en estas series de experimentos, (único tren de estímulos de 1 min de duración), no parece tener influencia en los resultados el tipo de electrodos utilizados, aunque tenga mucha importancia en el caso de trenes de estímulo cortos y repetidos (Hughes y Kneen, 1976).

2. ESTUDIOS SOBRE MEMBRANA NICTITANTE DE GATO ANESTESIADO

El trabajo de Eliash y Weinstock (1971) sobre el bloqueo por propranolol de las contracciones de la membrana nictitante del gato inducidas por estimulación nerviosa supuso una confirmación "in vivo" de los resultados previamente descritos (Day y col, 1968; Mylecharane y Raper, 1970) en torno a la actividad bloqueante de neuronas adrenérgicas "in vitro" de esta sustancia y pareció por tanto de interés estudiar si los resultados previamente encontrados en el presente trabajo con los antagonistas de los receptores β en conducto deferente de rata aislado podían ser extendidas al animal entero.

Se estudió inicialmente la acción de la guanetidina (0,05 -5 mg/kg i.v.) sobre las contracciones de la membrana nictitante del gato anestesiado inducidas por estímulo eléctrico del simpático cervical, encontrándose al medir el bloqueo de la contracción una relación dosis-efecto bastante satisfactoria así como una reversión de los efectos de la guanetidina mediante d-anfetamina, datos que confirmaron los obtenidos por otros autores en este preparación (Day y Rand, 1963; Fielden y Green, 1967) y que son, por supuesto, paralelos a los resultados previos "in vitro".

Cuando se estudiaron seguidamente los efecto del propranolol, en una gama muy amplia de dosis comprendida entre 0,01 y 5 mg/kg i.v. se obtuvieron resultados tremendamente variables, como puede comprobarse en la Tabla II. En efecto

Eliash y Weinstock (1971, 1972) habían señalado que el bloqueo de la contracción de la membrana se observaba con dosis de propranolol comprendidas entre 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y que el bloqueo se revertía con dosis mayores de este compuesto que quizá produjera una liberación de catecolaminas de la médula de las suprarrenales. Sin embargo, en nuestros experimentos, utilizando una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se encontró desde una ausencia total de efecto hasta un bloqueo total, el cual, por otra parte, no fue revertido por d-anfetamina. Con respecto al hecho de que el bloqueo producido por dosis bajas de propranolol revierte al incrementar la dosis, encontramos igualmente resultados muy variables en el sentido de que a veces, y aun con dosis bajas, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se antagonizó parcialmente el bloqueo obtenido con dosis aun menores, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En cambio, en otras ocasiones, dosis de hasta 5 mg/kg no modificaron el bloqueo obtenido con dosis bastante menores.

Estos resultados se asemejan en cierto modo a los descritos por Dawes y Faulkner (1975), quienes midiendo las respuestas a la estimulación simpática lumbar en perro no encontraron una reducción consistente mediante propranolol administrado a dosis comprendidas entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A diferencia de los autores anteriores no encontramos, en cambio, en ningún caso una potenciación por propranolol de las respuestas producidas por estimulación simpática.

De cualquier forma, teniendo en cuenta la escasa luz que arrojaron estos experimentos sobre el mecanismo de acción del propranolol, no pareció de interés proseguir el estudio en esta preparación con los demás β -bloqueantes seleccionados para este trabajo.

3. ESTUDIOS SOBRE AURICULA DE COBAYA AISLADA

3.1. Efecto inotrópico positivo

Los bloqueantes β -adrenérgicos empleados antagonizaron en función de la concentración el efecto inotrópico obtenido mediante estimulación a 5 Hz de la aurícula izquierda de cobaya aislada. El máximo grado de antagonismo al efecto inotrópico fue el inducido por propranolol y el mínimo el obtenido con INPEA. Este efecto viene lógicamente mediado por la acción de estas sustancias sobre los receptores β_1 postsinápticos y se encuentra el mismo orden de potencia que en otras preparaciones similares (Darias y col, 1974).

El anestésico local procaína también fue capaz de anular totalmente las contracciones de la aurícula una vez que se alcanzan las mismas concentraciones altas que fueron capaces de prevenir la contracción del conducto deferente de rata inducida por estimulación eléctrica. La guanetidina mostró, en cambio, un comportamiento totalmente distinto del anteriormente observado en el conducto deferente de rata cuando éste fue estimulado por una corriente eléctrica de las mismas características que en los presentes experimentos. En efecto, cuando se utilizó la concentración baja (0,1 $\mu\text{g/ml}$) de guanetidina, la reducción de la contracción muscular fue del mismo orden de la previamente observada en el conduc-

to deferente. Sin embargo, la concentración alta (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que había prevenido totalmente la respuesta contráctil del conducto deferente, aquí potenció muy significativamente el efecto inotrópico positivo producido por el estímulo eléctrico (Tabla VIII). Este efecto de una concentración alta de guanetidina, que ya fue descrito por Bhasat y Shideman (1963) y atribuido por estos autores a la liberación de noradrenalina marca las enormes diferencias que pueden producirse en las preparaciones con inervación adrenérgica distinta y obliga a preguntarse nuevamente por la naturaleza de la neurotransmisión motora en el conducto deferente de rata (ver apartado 1.2. de esta discusión). Cabe considerar por otra parte el hecho de que la guanetidina es un bloqueante más potente de la captación de NA en aurícula que en conducto deferente. El efecto bifásico de la guanetidina sobre la respuesta inotrópica de la aurícula se discute, no obstante, de forma más amplia en el apartado siguiente en relación con las acciones de este fármaco sobre el "overflow" de NA inducido por estimulación eléctrica.

3.2. Liberación de ^3H -Noradrenalina

De igual modo que en las experiencias sobre conducto deferente de rata, se utilizó una frecuencia baja de estimulación, 5 Hz, con objeto de poder detectar más satisfactoriamente la posible presencia de receptores β -presinápticos con

función reguladora de la liberación de ^3H -noradrenalina (Dubocovich y Langer, 1974). Debe indicarse, no obstante, que con posterioridad a la realización de este trabajo se ha encontrado que los adrenoceptores β presinápticos ejercen una mejor facilitación de la liberación del neurotransmisor cuando la frecuencia de estimulación es aun más baja, de 1 a 3 Hz, y esto ocurre tanto en experimentos "in vivo" como "in vitro" (Yamaguchi y col, 1977; Celuch y col, 1978). Concretamente, Yamaguchi y col. encontraron que el bloqueante β sotalol disminuye "in vivo" la liberación de noradrenalina en un 80 % cuando el nervio cardioacelerador del perro se estmula a 1 Hz, mientras que si la estimulación se hace a 5 Hz, la disminución es inferior al 50 %. Con respecto a la presencia de paralilina en el líquido de perfusión y al cociente utilizado para expresar el "overflow" de tritio inducido por estimulación eléctrica cabe hacer las mismas consideraciones ya expuestas en el apartado 1.2. de este capítulo a propósito del conducto deferente de rata.

Las concentraciones bajas (aproximadamente 3×10^{-7} M) de los fármacos utilizados en este estudio no modificaron significativamente la liberación espontánea de ^3H -noradrenalina, con la única excepción de la guanetidina, que produjo un aumento. Dado que esta sustancia no redujo la captación de ^3H -noradrenalina por la aurícula (Tabla X), parece claro que el aumento de liberación es debido en este caso a que la guanetidina es capaz de desplazar a la noradrenalina de las vesículas de almacenamiento (Brodie y col, 1965). Cuando se utilizaron concentraciones más altas de fármacos (3×10^{-5} M

para los β -bloqueantes y guanetidina; 10^{-3} M para procaína) tendió a haber una cierta correlación entre aumento de la liberación espontánea y bloqueo de la captación de ^3H -noradrenalina (Tablas VII y X). No obstante, y considerando que en los experimentos de control la liberación espontánea E_2 tras la primera estimulación es bastante inferior a la liberación espontánea E_1 previa a la estimulación, encontramos nuevamente que la guanetidina ocupa una posición especial dentro de esta serie de fármacos puesto que es el único que hace que el valor E_2 , liberación en presencia del fármaco, sea superior al valor E_1 , liberación control, de forma altamente significativa. A este hecho deben contribuir su potente actividad bloqueante del "uptake" de NA (Tabla X) y su acción liberadora del neurotransmisor. Se ha descrito, sin embargo, que inhibidores de MAO tales como la iproniazida previenen "in vivo" el vaciamiento de noradrenalina inducido por guanetidina en corazón de rata (Fielden y Green, 1967) y en los actuales experimentos el líquido de perfusión contenía una alta concentración de pargilina. En cualquier caso parece poco probable pensar que el incremento que induce la guanetidina sobre la liberación espontánea de ^3H -noradrenalina en nuestras condiciones experimentales se deba únicamente a un bloqueo de la reincorporación del neurotransmisor.

Al estudiar la acción de la guanetidina sobre el "overflow" de tritio producido por estimulación eléctrica se encontró una reducción compatible con la acción primordial de bloqueo de neuronas adrenéricas de este compuesto. No hubo sin embargo una clara relación dosis-efecto y, por otra parte, la con-

centración alta, que redujo claramente el "overflow" potenció la respuesta inotrópica de la aurícula. Para explicar esta falta de correlación, hay que tener probablemente en cuenta que la medida de tritio en el líquido de perfusión no revela con exactitud los sucesos que ocurren a nivel del receptor β postsináptico que media el efecto inotrópico de la aurícula. En efecto, aunque en el presente caso la presencia de parovilina en el líquido de perfusión hace que quede inhibida la formación de metabolitos desaminados, el tritio medido en presencia de estimulación eléctrica corresponde íntegramente a ^3H -noradrenalina liberada de la terminal adrenérgica que sólo posteriormente es metabolizada en parte por la COMT, mientras que en situación de reposo no ocurre lo mismo, (Lanøer y col, 1972; Luchelli-Fortis y Lanøer, 1975). Así pues, aunque la guanetidina disminuye la liberación relativa de tritio (Fig. 28) es mayor la cantidad de noradrenalina que alcanza el receptor postsináptico debido al bloqueo considerable de la reincorporación del neurotransmisor y aumenta por lo tanto el efecto inotrópico.

Las concentraciones bajas ($3 \times 10^{-7}\text{M}$) de los β -bloqueantes propranolol y alprenolol redujeron el "overflow" de tritio producido por estimulación eléctrica mientras que el INPEA no lo modificó. Dado que a nivel postsináptico este último compuesto es un β -bloqueante más débil que los dos anteriores, puede pensarse, de acuerdo con las ideas de Lanøer (Adler-Graschinsky y Lanøer, 1975; Celuch y col, 1978), y siempre que a nivel presináptico se mantenga la misma relación de potencia, que la disminución del "overflow" de tritio sea debida al blo-

queo de receptores β presinápticos cuya estimulación facilita la liberación del neurotransmisor. Sería lógico pensar entonces que esta acción presináptica se observaría más claramente al subir cien veces la concentración de estos compuestos. Sin embargo, en estas condiciones el propranolol indujo una disminución menos acusada del "overflow" de tritio mientras que la disminución producida con alprenolol dejó de ser significativamente distinta de la de los controles. En este último caso se pensó en la posibilidad de que las acciones α -adrenolíticas de este compuesto (ver apartado 1.2.2. del capítulo III) determinasen una acción bloqueante de receptores α presinápticos cuyos efectos contrarrestarían los derivados del bloqueo β presináptico (Starke, 1972) pero utilizando una concentración intermedia de alprenolol (aproximadamente 3×10^{-5} M) tampoco se observó una reducción significativa del "overflow".

Considerando pues de forma conjunta los tres β -bloqueantes utilizados, ocurre que las concentraciones altas no disminuyen el "overflow" de tritio producido por estímulo eléctrico, o sólo lo hacen débilmente en el caso del propranolol. Debe quizá tenerse aquí en cuenta que así como los β bloqueantes antagonizan muy eficazmente el aumento en la liberación del neurotransmisor inducido por isoprenalina (Celsius y col, 1978), su efecto antagónico frente a la liberación del neurotransmisor producida por estimulación eléctrica es menos claro (Stjärne y Brundin, 1975; Hedquist y Moawad, 1975; Lanøer y col, 1975), lo que quizá pueda explicarse teniendo en cuenta su acción bloqueante de la incorporación de

noradrenalina a concentración alta que repercute, evidentemente; en un aumento de la liberación del neurotransmisor (Werner y col, 1971; Starke y Schümann, 1972) hecho que, por otra parte, podría también invocarse para explicar la pobre relación dosis-efecto de la guanetidina anteriormente citada. Debe, para acabar, comentarse que en esta preparación de aurícula de cobaya el anestésico local procaína mostró a la concentración más alta empleada (10^{-3} M) una imagen totalmente distinta de la de los β bloqueantes puesto que redujo la liberación por estímulo eléctrico del neurotransmisor a pesar de bloquear eficazmente su incorporación.

4. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA MONOAMINOXIDASA (MAO)

Milmore y Taylor (1975) encontraron que el propranolol era capaz de inhibir la MAO de cerebro de rata, con una CI_{50} de 260 μ M. En los estudios previos "in vitro" que fueron realizados, encontramos una CI_{50} en el mismo tejido algo mayor, del orden de 10^{-3} M. En arteria mesentérica de rata, la CI_{50} obtenida fue todavía más alta y ya resultó francamente superior a 10^{-3} M.

Cuando se hicieron tratamientos agudos con propranolol a dosis i.p. comprendidas entre 1 y 50 mg/kg, únicamente se encontró una cierta disminución de la actividad enzimática a la dosis más baja empleada, disminución que no parece tener relevancia alguna puesto que el efecto observado es menor a dosis más altas. Incluso con la enorme dosis de 50 mg/kg, la disminución de actividad de la MAO no fue estadísticamente significativa, hecho que era de esperar si tenemos en cuenta la concentración tan alta de propranolol a la que hay que llegar para obtener "in vitro" una inhibición de la enzima.

A pesar de los datos anteriores, y teniendo en cuenta que las propiedades antihipertensoras del propranolol en Clínica sólo se manifiestan tras un tratamiento de varios días de duración (Amer, 1977) pareció de interés explorar la posibilidad de que este compuesto inhibiera la MAO en rata tras un tratamiento crónico. Sin embargo, los resultados obtenidos después de administrar i.p. a ratas durante 7 días propranolol a

dos dosis no mostraron que hubiera inhibición de la MAO en corazón o en arteria mesentérica, sino que, al contrario, en este último tejido lo que se observó fue una cierta inducción enzimática, la cual no pudo ser confirmada cuando se prolongó el tratamiento crónico a 20 días, utilizando la vía oral.

Los resultados obtenidos no apoyan pues en absoluto la hipótesis previa de que la actividad antihipertensora del propranolol pudiera ser debida a una inhibición de la MAO de tejido cerebral o cardiovascular de rata.

CONCLUSIONES

1. - En un intento de aclarar el mecanismo por el que los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos son eficaces en el tratamiento de la hipertensión arterial, se estudió la posible acción bloqueante de neuronas adrenérgicas, tipo guanetidina, de estos compuestos así como su acción sobre los receptores β presinápticos que pueden regular la liberación de noradrenalina (NA).
2. - El antagonista β propranolol bloqueó a una concentración baja, del orden de 10^{-7} M, las contracciones inducidas en el conducto deferente de rata aislado mediante estimulación intramural de alta o baja frecuencia repetida cada 6 minutos. El bloqueo obtenido no fue revertido por lavado pero sí por d-anfetamina. El propranolol potenció, en cambio, las contracciones del conducto deferente inducidas por NA exógena. Los efectos obtenidos son cualitativamente muy similares a los de la guanetidina, lo que sugiere la posibilidad de que el propranolol posea propiedades bloqueantes de neuronas adrenérgicas. Estas propiedades, sin embargo, no se pudieron poner de manifiesto en una preparación "in vivo" como es la membrana nictitante del gato anestesiado.
3. - Una concentración baja del antagonista β alprenolol bloqueó así mismo las contracciones del conducto deferente de rata producidas por estimulación eléctrica de alta frecuencia en iguales condiciones que antes. Este bloqueo, sin embargo, revirtió mediante lavado de la preparación y no pudo ser prevenido, a diferencia de lo que ocurrió con propranolol o guanetidina, mediante desipramina, lo que hace suponer que el alprenolol no necesita ser incorporado al interior de la neurona adrenérgica para ejer

cer sus efectos. El alprenolol se reveló, por otra parte, como un α -adrenolítico relativamente potente.

4.- El INPEA, un antagonista β desprovisto de actividad anestésica local, no bloqueó, ni siquiera a una concentración alta, del orden de 10^{-5} M, la respuesta a la estimulación eléctrica del conducto deferente sino que potenció la contracción, hecho atribuible a la actividad simpaticomimética intrínseca de este compuesto.

5.- El anestésico local procaína produjo un bloqueo de la respuesta contráctil del conducto deferente a una concentración muy alta (10^{-3} M). Comparando las acciones de esta substancia y las de la quinidina, compuesto que también posee propiedades estabilizadoras de membrana, con las del propranolol, se deduce que las acciones de este último compuesto a bajas concentraciones no pueden ser atribuidas de ninguna forma a sus propiedades anestésicas locales, cuya importancia relativa quizá sea en cambio mayor en la interpretación de las acciones del alprenolol.

6.- Utilizando concentraciones bajas de los fármacos en estudio, sólo con guanetidina se observó una reducción en el "overflow" de 3 H-noradrenalina producido por estimulación eléctrica del conducto deferente de rata. La ausencia de efecto de los antagonistas β propranolol y alprenolol a bajas concentraciones sobre el "overflow" de 3 H-noradrenalina parece excluir la presencia de receptores β presinápticos en esta preparación.

7.- Tanto la guanetidina como los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos redujeron a una concentración alta, a-

proximadamente 3×10^{-5} M, el "overflow" de $^3\text{H-NA}$ inducido por estimulación eléctrica del conducto deferente aislado. No obstante, la interpretación de los resultados obtenidos con los antagonistas β en el sentido de una acción bloqueante de neuronas adrenérgicas es dudosa pues a esta concentración alta previenen la incorporación de NA, lo que puede determinar una estimulación de los receptores α presinápticos. Además, no se encontró una correlación clara entre la reducción del "overflow" de $^3\text{H-NA}$ y la disminución de la respuesta contráctil.

8.- Concentraciones bajas de propranolol o de alprenolol redujeron el "overflow" de $^3\text{H-NA}$ producido por estimulación eléctrica de baja frecuencia de la aurícula izquierda de cobaya aislada. Dado que el INPEA, un antagonista β más débil, no modificó el "overflow" de $^3\text{H-NA}$, las acciones inducidas por los dos compuestos anteriores parecen ser debidas a un bloqueo de los receptores β presinápticos.

9.- Cuando se ensayaron concentraciones cien veces mayores de los antagonistas β sobre la preparación anterior, no se observó disminución del "overflow" de $^3\text{H-NA}$ o, en todo caso, la disminución fue menos acusada que a concentraciones inferiores. Esta desaparición del efecto al elevar la concentración puede quizá explicarse teniendo en cuenta que las concentraciones altas de antagonistas β previenen el proceso de reincorporación de noradrenalina, lo que puede determinar una acción estimulante del neurotransmisor sobre los receptores β presinápticos. El antagonismo al efecto inotrópico positivo parece ser, por otra parte, de índole puramente postsináptica puesto que es total cuando se utilizan concentraciones altas de los antagonistas β .

10. - Se estudió finalmente en este trabajo la posibilidad de que el tratamiento con propranolol inhibiera la enzima monoamino-oxidasa lo que, evidentemente, hubiese constituido una explicación alternativa de la actividad antihipertensora de este compuesto. Si bien se observó inhibición "in vitro" con altas concentraciones de propranolol, no se encontró, sin embargo, que el tratamiento agudo o crónico con esta sustancia disminuyese la actividad de la monoamino-oxidasa de tejido cardiovascular o cerebral de rata.

BIBLIOGRAFIA

- ABLAD, B. (1967) Acta Pharmacol. Toxicol. 25: 5
- ADLER-GRASCHINSKY, E. y S.Z. LANGER (1975) Brit. J. Pharmacol. 53: 43
- ADLER-GRASCHINSKY, E., S.Z. LANGER y M.C. RUBIO (1972) J. Pharmacol. exp. Ther. 180: 301
- AHLQUIST, R.P. (1948) Amer. J. Physiol. 153: 586
- AMBACHE, N. y M.A. ZAR (1971) J. Physiol., Lond., 216: 359
- AMER, S.M. (1977) Biochem. Pharmacol. 26: 171
- ANDERSSON, O., G. BERGLUND, H. BERGMAN, K. CRAMER, S.-E. FAGERBERG, S.-A. FORSBERG, V. JONHSEN, L. LUNDKVIST, O. RUTLE y R. SJOLYST (1976) Curr. Ther. Res. 19: 43
- ARNOLD, A. y J.P. MC. AULIFF (1969) Arch. int. Pharmacodyn. 179: 381
- ARUNLAKSHANA, O. y H.O. SCHILD (1959) Brit. J. Pharmacol. 14: 48
- BARRETT, A.M. y V.A. CULLUM (1968) Brit. J. Pharmacol. 34: 43
- BARRETT, A.M. y B. NUNN (1970) J. Pharm. Pharmacol. 22: 806

- BENTLEY, G.A. (1965) Brit. J. Pharmacol. 25: 243
- BHAGAT, B. y F.E. SHIDEMAN (1963) Brit. J. Pharmacol.
20: 56
- BOGDANSKI, D.F. y B.B. BRODIE (1969) J. Pharmacol. exp.
Ther. 165: 181
- BOURA, A.L.A. y A.F. GREEN (1959) Brit. J. Pharmacol.
14: 536
- BOURA, A.L.A. y A.F. GREEN (1965) Ann. Rev. Pharmacol.
5: 183
- BOURNE, R.K. (1974) J. Pharm. Pharmacol. 26: 374
- BRODIE, B.B., C.C. CHANG y E. COSTA (1965) Brit. J.
Pharmacol. 25: 171
- BROWN, G.L. y J.S. GILLESPIE (1957) J. Physiol, Lond., 138: 81
- BUDD, G.C. y M.M. SALPETER (1969) J. Cell. Biol. 41: 21
- BÜHLER, F.R., J.H. LARAGH, L. BAER, E.V. DARRACOTT
y H.R. BRUNNER (1972) New Engl. J. Med. 287: 1209
- BURN, J.H. (1932) J. Pharmacol. exp. Ther. 46: 75

BURN, J.H. y M.J. RAND (1958) J. Physiol. 144: 314

BURN, J.H. y M.L. TAINTER (1931) J. Physiol. 71: 169

CELUCH, S.M., M.L. DUBOCOVICH y S.Z. LANGER (1978)
Brit. J. Pharmacol. 63: 97

CHANG, C.C., E. COSTA y B"B" BRODIE (1965) J. Pharmacol.
exp. Ther. 147: 303

CUBEDDU, L.X., E. BARNES y N. WEINER (1975) J. Pharma-
col. exp. Ther. 193: 105

CUBEDDU, L.X., S.Z. LANGER y N. WEINER (1974) J. Pharma-
col. exp. Ther. 188: 368

CUBEDDU, L.X. y N. WEINER (1975) J. Pharmacol. exp. Ther.
192: 1

DAHLÖF, C., B. ABLAD, K.O. BORG, L. EK y B. WALDEK
(1975) Abstr. Symposium on Chemical Tools in Catecho-
lamine Research. Vol II, 201 (O. Almgren, A. Carlsson,
J. Engel, Eds.) Amsterdam. North Holland Press.

DARIAS, V. y J. DEL RIO (1974) Arzneim. -Forsch. (Drug Res)
24: 1756

DARIAS, V., R. MADROÑERO y J. DEL RIO (1974) Arzneim. -

Forsch. (Drug Res.) 24: 1751

DAWES, P.M. y D.C. FAULKNER (1975) Brit. J. Pharmacol.
53: 517

DAY, M.D., D.A.A. OWEN y P.R. WARREN (1968) J. Pharm.
Pharmacol. 20 suppl: 1305

DAY, M.D. y M.J. RAND (1963) Brit. J. Pharmacol. 20: 17

DAY, M.D. y A.G. ROACH (1974) Clin. exp. Pharmacol. Physiol.
1: 333

DEL TACCA, M., A. BERTELLI, L. MAZZANTANI, B. STA-
CCHINI, A. BALSAMO, P. CROTTI, B. MACCHIA y F.
MACCHIA (1975) J. Med. Chem. 18: 836

DOHADWALLA, A.N., A.S. FREEDBERG y E.M. VAUGHAM
WILLIAMS (1969) Brit. J. Pharmacol. 36: 257

DORNHORST, A.C. y D.R. LAURENCE (1963) Brit. Med. J. 2: 1250

DORPH, S. y C. BINDER (1969) Acta. Med. Scand. 185: 443

DUBOCOVICH, M.L. y S.Z. LANGER (1974) J. Physiol., Lond.,
237: 505

ELIASH, S. y M. WEINSTOCK (1971) Brit. J. Pharmacol. 43: 287

- ELIASH, S. y M. WEINSTOCK (1972) Brit. J. Pharmacol.
45: 630
- ENDO, T., K. STARKE, A. BANGERTER y H.D. TAUBE (1977)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296: 229
- ENERO, M.A. y S.Z. LANGER (1973) Brit. J. Pharmacol.
49: 214
- EPSTEIN, S.E. y E. BRAUNWALD (1968) N. Engl. J. Med.
17: 1106
- FARNEBO, L.O. (1971) Biochem. Pharmacol. 20: 2715
- FARNEBO, L.O. y B. HAMBERGER (1971) Brit. J. Pharmacol.
43: 97
- FIELDEN, R. y A.L. GREEN (1967) Brit. J. Pharmacol. 30: 155
- FLOREZ, J. y J.A. ARCONADA (1971) Arch. Int. Pharmacodyn.
190: 199
- FOO, J.W., A. JOWETT y A. STAFFORD (1968) Brit. J.
Pharmacol. 34: 141
- FROLICH, E.D., R.C. TARAZI , H.P. DUSTAN y I.H. PAGE
(1968) Circulation 37: 417
- FÜRBERG, C. y G. MICHAELSON (1969) Acta. Med. Scand. 186: 447

- GERKENS, J.F., M.W. MC. CULLOCH y V. WILSON (1969)
Brit. J. Pharmacol. 35: 563
- GRAHAM, J.D.P., M.J. LEWIS y D.M.F. LI (1974) Brit. J. Pharmacol. 52: 233
- HAEFELY, W. (1972) Electrophysiology of the adrenergic neuron, en: Catecholamines (H. Blaschko y E. Muscholl, Eds.) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 33, 661. Springer, Berlin.
- HEDQUIST, P. y A. MOAWAD (1975) Acta Physiol. Scand. 95: 494
- HESS, J.M. y L.J. HAMPTONS (1964) Anesthesiology 25: 101
- HOWE, R. y R.G. SHANKS (1966) Nature 210: 1336
- HUGHES, J. (1972) Brit. J. Pharmacol. 44: 472
- HUGHES, J. (1973) Brit. J. Pharmacol. 47: 428
- HUGHES, I.E. y B. KNEEN (1976) J. Pharm. Pharmacol. 28: 200
- HUGHES, J. y R.H. ROTH (1974) Brit. J. Pharmacol. 51: 373
- IVERSEN, L.L. (1963) Brit. J. Pharmacol. 21: 523
- IVERSEN, L.L. (1966) J. Pharm. Pharmacol. 18: 481

- IVERSEN, L.L. (1967) The uptake and storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves, Cambridge University Press, London.
- IVERSEN, L.L. (1975) Uptake of Biogenic amines, en: Handbook of Psychopharmacology (L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder, Eds.) Vol. 3, 401. Plenum Press, New York.
- IVERSEN, L.L., J. GLOWINSKI y J. AXELROD (1965) J. Pharmacol. exp. Ther. 150: 173
- JARROTT, B. (1971) J. Neurochem. 18: 7
- JARROTT, B. y S.Z. LANGER (1971) J. Physiol, Lond., 212: 549
- JENKINS, D.A., I. MRASHALL y P.A. NASMIYTH (1977) Brit. J. Pharmacol. 61: 649
- JONHSON, G., B. SINGH y M. LEEMAN (1976) Med. J. Aust. 1: 909
- KAO, C.Y. y J.R. MC. CULLOCH (1973) J. Pharmacol. exp. Ther. 185: 49
- KAROW, A.M., M.N. RILEY y R.P. AHLQUIST (1971) Pharmacology of Clinically useful β -adrenergic blocking drugs, en: Progress in Drug Research (E. Jucker, Ed.) Vol. 15, 103.
- KIRPEKAR, S.M. y N. PUIG (1971) Brit. J. Pharmacol. 43: 359

- KIRSHNER, N. y O.H. VIVEROS (1972) Pharmacol. Rev. 24: 385
- KRISHNAN, G. (1976) Curr. Med. Res. Opin 4: 241
- LANDS, A.M., A. ARNOLD, J.P. MC. AULIFF, F.P. LUDUENA,
y T.G. BROWN (1967) Nature, London. 214: 597
- LANGER, S.Z. (1970) J. Physiol. 208: 516
- LANGER, S.Z. (1974) Biochem. Pharmacol. 23: 1793
- LANGER, S.Z., E. ADLER-GRASCHINSKY y M.A. ENERO (1974)
Abstr. de Jerusalem Satellite Symposia. XXVI International
Congress of Physiological Sciences, p. 81.
- LANGER, S.Z., E. ADLER-GRASCHINSKY y O. GIORGI (1977)
Nature 265: 648
- LANGER, S.Z. y M.A. ENERO (1974) J. Pharmacol. exp. Ther.
191: 431
- LANGER, S.Z., M.A. ENERO, E. ADLER-GRASCHINSKY, M.L.
DUBOCOVICH y S.M. CELUCH (1975) Proc. Symposium on
Central Action of Drugs in the Regulation of Blood Pres -
sure (D.S. Davies y J.L. Reid, Eds.) p. 133. London Pitman
Medical
- LANGER, S.Z., F.J. STEFANO y M.A. ENERO (1972) J. Phar -

macol. exp. Ther. 183: 90

LARAGH, J.H. (1975) N. Engl. J. Med. 292: 695

LEWIS, M.J. (1977) Brit. J. Pharmacol. 60: 595

LINDMAR, R. y E. MUSCHOLL (1964) Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 247: 469

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGHT, A.L. FARR y R.J. RANDALL (1951) J. Biol. Chem. 193: 265

LUCCHESI, B.R. (1964) J. Pharmacol. exp. Ther. 145: 286

LUCCHESI, B.R., L.S. WHITSITT y N.L. BROWN (1966) Can. J. Physiol. Pharmacol. 44: 543

LUCHELLI-FORTIS, y S.Z. LANGER (1975) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287: 261

MARSHALL, I., P.A. NASMYTH y N.B. SHEPPERSON (1977) Brit. J. Pharmacol. Proc. 60 : 511 P

MATERSON, B.J., U.F. MICHAEL, J.R. OSTER y E.C. PEREZ-STABLE (1976) Clin. Pharmacol. Ther. 20: 142

MC. MILLIN, W.P. (1975) Amer. J. Psychiatry 132: 965

MILMORE, J.E. y K.M. TAYLOR (1975) Life Sciences 17: 1843

- MURMANN, W. . M. SACCANI-GUELFY y A. GAMBA (1966) Ann. N. Y. Acad. Sci. 139: 940
- MYLECHARANE, E. J. y C. RAPER (1970) Brit. J. Pharmacol. 39: 128
- MYLECHARANE, E. J. y C. RAPER (1973) J. Pharm. Pharmacol. 25: 213
- PEARSON, R. M., M. R. BENDING, C. J. BULPITT, C. F. GEORGE, D. R. HOLE, F. M. WILLIAMS y A. M. BRECKENRIDGE (1976) Brit. Med. J. 1: 933
- POTTER, L. T. (1966) Pharmacol. Rev. 18: 439
- POTTER, L. T. (1967) Circ. Res. 21: 13 (Suppl. 3)
- PRICHARD, B. N. C. (1969) Brit. Med. J. 1: 7
- PRICHARD, B. N. C. y P. M. S. GILLAM (1964) Brit. Med. J. 2: 725
- PRICHARD, B. N. C. y P. M. S. GILLAM (1969) Brit. Med. J. 1: 7
- RAND, M. J., M. W. MC. CULLOCH y D. F. STORY (1975) en : Central Action of Drugs in Blood Pressure Regulation (D. S. Davies y J. L. Reid, Eds.) p. 94. London, Pitman Medical.
- REID, J. L., P. J. LEWIS, M. G. MYERS y C. T. DOLLERY (1974)

J. Pharmacol. exp. Ther. 188: 394

ROWLANDS, D.J., G. HOWITT y P. MARKMAN (1965) Brit. Med. J. 1: 891

RUBIO, M.C. y S.Z. LANGER (1973) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 280: 330

SAELENS, D.A., H. B. DANIELL y J.G. WEBB (1977 b) J. Pharmacol. exp. Ther. 202: 635

SAELENS, D.A., T. WALLE, T.E. GAFFNEY y P.J. PRIVITERA (1977 a) Eur. J. Pharmacol. 42: 39

SAELENS, D.A., T. WALLE, P.J. PRIVITERA, D.R. KNAPP y T. GAFFNEY (1974) J. Pharmacol. exp. Ther. 188: 86

SHANKS, R.G. y D. DUNLOP (1969) Brit. J. Pharmacol. 36:132

SMITH, A. y H. WINKLER (1972) Fundamental mechanisms in the release of catecholamines, en: Catecholamines (H. Blaschko y E. Muscholl, Eds.) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 33, p. 538, Springer, Berlin.

SOMANI, P. y B.K.B. LUM (1965) J. Pharmacol. exp. Ther. 147: 194

STARKE, K. (1972) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274:18

- STARKE, K., E. BOROWSKI y T. ENDO (1975 b) Eur. J. Pharmacol. 34: 385
- STARKE, K. y T. ENDO (1976) Gen. Pharmacol. 7: 307
- STARKE, K., T. ENDO y T. TAUBE (1975 a) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 291: 55
- STARKE, K. y H. MONTEL (1973) Proc. Second Meeting on Adrenergic Mechanisms. Oporto, p. 53
- STARKE, K. y H.J. SCHÜMANN (1972) Eur. J. Pharmacol. 18: 27
- STARKE, K., H.D. TAUBE y E. BOROWSKI (1977) Biochem. Pharmacol. 26: 259
- STARKE, K., J. WAGNER y H.J. SCHÜMANN (1972) Arch. int. Pharmacodyn. 195: 291
- STJÄRNE, L (1975) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 296
- STJÄRNE, L. y J. BRUNDIN (1975) Acta Physiol. Scand. 94: 139
- STJÄRNE, L. y J. BRUNDIN (1976) Acta Physiol. Scand. 97: 88
- STOCK, J.P. y N. DALE (1963) Brit. Med. J. 2: 1230
- SUMMERS, R.J. y J. TILLMAN (1977) Biochem. Pharmacol 26: 2137

- SUNDQUIST, H., M. ANTTILA y M. ARSTILA (1974) Clin. Pharmacol. Ther. 16: 465
- TARLOV, S. y S.Z. LANGER (1971) J. Pharmacol. exp. Ther. 179: 186
- TYRER, P.J. y M.H. LADER (1974) Brit. Med. J. 2: 14
- VALETTE, G., C. JACQUOT y J. RAPIN (1975) J. Pharmacol., Paris 6: 41
- WAKADE, A. y R.F. FURCHGOTT (1968) J. Pharmacol. exp. Ther. 163: 123
- WARKENTIN, D.L. y M.R. VALENCA (1965) Clin. Res. 13: 404
- WEINSTOCK, M. (1976) Life Sciences 19: 1453
- WERNER, U., J. WAGNER y H.J. SCHÜMANN (1971) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268: 102
- YAMAGUCHI, N., J. DE CHAMPLAIN y R.A. NADEAU (1977) Circ. Res. 41: 108