

ASOCIACION DE FARMACOLOGIA

Sesión del día 25 de marzo de 1966

ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DE UN NUEVO AGENTE GANGLIOPLÉJICO DE ACCIÓN PROLONGADA (HyJ-233)

E. CUENCA,* L. RODRÍGUEZ,** P. RIVERA, F. G. VALDECASAS

INTRODUCCIÓN. — En trabajos anteriores (VALDECASAS, CUENCA, LORA TAMAYO, MADROÑERO, 1964; VALDECASAS, CUENCA, RODRÍGUEZ, 1965) hemos estudiado los aspectos farmacológicos de una serie de derivados de la terc-butilamina, sintetizados por el Instituto de Química "Alonso Barba" del Patronato "Juan de la Cierva" del C.S.I.C. Todos ellos estaban dotados en mayor o menor proporción de una cierta actividad gangliopléjica. Ello nos impulsó a proseguir nuestras investigaciones con nuevos derivados químicamente emparentados. Entre estos últimos merece destacarse por su manifiesta actividad gangliopléjica, el derivado conocido con el nombre de HyJ-233 según nomenclatura del Departamento de Química antes mencionado. Este producto pertenece químicamente a la serie de las N,N'-bis-(terc-butil)-polimetilendiaminas, siendo seis el número de eslabones carbonados que separan los dos restos de terc-butilamina.

En este trabajo se describen los resultados farmacológicos obtenidos con este producto.

MATERIAL Y MÉTODOS. EXPERIENCIAS "IN VITRO". *Ileon aislado de cobaya*. — En todas las experiencias utilizamos cobayas (250-300 g) de ambos sexos, procedentes de nuestro estabulario. Los animales, en ayunas desde 12-24 horas antes de la experiencia, se sacrificaron de un golpe en la nuca y se desangraron. Se separaron trozos de ileon de 2 a 4 cm de longitud, lavándose su interior con solución de Tyrode. Se despreció la porción más próxima a la válvula ileocecal. El preparado se dispuso en un baño de órgano aislado de 20 cc de capacidad. Como líquido nutricio empleamos la solución de Tyrode (ClNa, 8 g; ClK, 0,2 g; Cl₂Ca, 0,2 g; Co₃HNa 1 g; Cl₂Mg, 0,01 g; PO₄H₂Na, 0,05 g; glucosa 1 g por litro de

* Colaborador del C.S.I.C.

** Becario del P.I.O.

disolución) a través de la cual se hizo pasar una corriente de oxígeno durante toda la experiencia. La temperatura permaneció constante a 35 °C. El tejido se sometió a una tensión de 0,65 g y se mantuvo en el baño durante una hora antes de iniciar la experiencia. Las contracciones se registraron sobre papel ahumado por medio de una palanca isotónica de inscripción frontal. La ampliación de la respuesta fue de 20:1. Se utilizaron los siguientes agonistas: acetilcolina, histamina y nicotina a una concentración standard. Ésta ha sido de $3,38 \cdot 10^{-9}$ g/ml para la acetilcolina; $1,37 \cdot 10^{-7}$ g/ml para la histamina y $1,4 \cdot 10^{-6}$ g/ml para la nicotina. Estas concentraciones son aquellas que producen una respuesta que equivale a un 50 % de la contracción maximal. Los agonistas mencionados permanecieron en contacto con el tejido hasta que se consiguió la respuesta máxima para la dosis empleada. Un lavado fue suficiente para conseguir la relajación completa del tejido. Se dejó un intervalo variable, según el agonista, entre las dosis consecutivas. Este intervalo fue de 2 minutos para la histamina y acetilcolina y de 10 minutos para la nicotina. Para evaluar la influencia del HyJ-233 sobre las respuestas producidas por los agonistas mencionados, adoptamos el siguiente procedimiento. Una vez conseguidas respuestas constantes con el agonista, añadimos la droga motivo de estudio a concentraciones variables y observamos la modificación en la respuesta ulterior del agonista. La droga permanece en contacto con el tejido durante 90 segundos. Se ha calculado por interpolación gráfica la concentración del producto que inhibe en un 50 % la respuesta obtenida con la dosis standard del agonista utilizado (CI50).

Útero aislado de rata en estro. — Utilizamos ratas Wistar de 150-200 g, procedentes de nuestro criadero. El estro se provocó por la inyección subcutánea de 0,0125 mg por cada 100 g de peso de animal, de dipropionato de dietildioxiestilbeno, 12 o 24 horas antes de sacrificar el animal. La dosis standard de serotonina utilizada fue de $4,8 \cdot 10^{-8}$ g/ml en forma de sulfato doble de creatinina y serotonina. Esta dosis equivale a la DE 50 en nuestras condiciones experimentales. Como líquido nutricio se utilizó la solución de Broom y Clark hipocálcica (Cl_2Ca : 0,05 g/litro). La temperatura fue de 30 °C. El intervalo de reposo entre dos dosis sucesivas del agonista fue de 4 minutos. En términos generales el resto de las condiciones experimentales y la evaluación de la influencia del producto, fueron análogas a las descritas anteriormente para el íleon aislado de cobaya.

Conducto deferente aislado de rata. — Para el montaje del preparado seguimos en líneas generales la técnica descrita por Leach (1956). Como líquido nutricio empleamos la solución bicarbonatada de Krebs. La temperatura se mantuvo constante a 31 °C. Una mezcla de 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 , se mantuvo constantemente burbujeando en el baño. Como agonista utilizamos, noradrenalina a la concentración standard de $1 \cdot 10^{-6}$ g/ml.

EXPERIENCIAS "IN VIVO". *Toxicidad aguda.* — Se determinó la DL 50 por vía intravenosa, oral e intraperitoneal en el ratón siguiendo el método de Red y Muench.

Actividad antinicotínica. — Se evaluó determinando la disminución del tiempo de convulsión y la abolición total de las convulsiones producidas por una dosis standard de nicotina en el ratón (0,8 mg/kg i.v. de nicotina base). Esta dosis del alcaloide, produce convulsiones en el 100% de los animales controles.

Presión arterial. — Se utilizaron gatos cloralosados (100 mg/kg de cloralosa i.p.) de un peso comprendido entre 2 y 4 kg y sometidos a respiración artificial. La tensión arterial se midió en una de las carótidas por medio de un manómetro de mercurio. Para el registro tensional se utilizó un quimógrafo de velocidad lenta (1 cm/s o 0,5 cm/s). La inscripción se hizo sobre papel ahumado. La inyección de sustancias se efectuó a través de una cánula metálica introducida en una de las venas de la pata. Después de la administración de cada sustancia se inyectó 1 cc de solución salina. Los cambios tensionales se expresan en porcentaje de aumento o de disminución con respecto al nivel inicial.

Membrana nictitante. — Se utilizaron gatos cloralosados sometidos a respiración artificial registrándose las contracciones de la membrana nictitante consecuentes a la estimulación eléctrica periódica pre y postganglionar del simpático cervical. La estimulación fue por pulsos rectangulares de frecuencia comprendida entre 10 y 70 Hertz, con una duración de 1-10 milisegundos y un voltaje de 4 a 6 V. La respuesta obtenida con estos parámetros fue inframaximal.

Drogas utilizadas. — Se han utilizado las siguientes sustancias: difosfato de histamina (Fluka); cloruro de acetilcolina (Roche); sulfato doble de creatinina y serotonina (Vister); hidrotartrato de nicotina (BDH); hidrotartrato de noradrenalina (Fluka); PEAC: yoduro de 1-fenil, 1-etil-acetilcolina (Fides); HyJ-233: cloruro de hexametilén N,N'-bis-(terc-butil)-amina (Instituto de Química "Alonso Barba"); bromuro de hexametonio (Fides). Todas las dosis mencionadas se refieren a las sales, a no ser que se especifique.

RESULTADOS. EXPERIENCIAS "IN VITRO". *Acción del HyJ-233 sobre las respuestas que determinan la histamina, acetilcolina y nicotina, en el león aislado de cobaya.* *Histamina.* — La adición al líquido nutricio del HyJ-233, a concentraciones que oscilan entre 1.10^{-6} y 1.10^{-5} g/ml, no modificó prácticamente la respuesta a la dosis standard del agonista utilizada. La CI 50 es superior a 1.10^{-4} g/ml.

Acetilcolina. — El HyJ-233 se comportó frente a este agonista de forma similar a la descrita anteriormente para la histamina. La CI 50 es asimismo superior a 1.10^{-4} g/ml.

Nicotina. — Concentraciones del HyJ-233 del orden de $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml inhibieron en un 100 % la respuesta a la dosis standard del agonista empleada. El 50 % de reducción de la respuesta (CI 50) se consiguió a concentraciones del orden de $1 \cdot 10^{-6}$ g/ml. Estos resultados son equiparables a los que se obtienen utilizando el hexametonio en las mismas condiciones experimentales.

Acción del HyJ-233 sobre las respuestas que determina la serotonina (5 HT) en el útero de rata en estro. — En las condiciones reseñadas la CI 50 ha sido superior a $1 \cdot 10^{-4}$ g/ml. A concentraciones inferiores ($1 \cdot 10^{-5}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ g/ml) el HyJ-233 no modifica prácticamente la respuesta de la 5 HT.

Acción del HyJ-233 sobre las respuestas que determina la noradrenalina en el conducto deferente aislado de la rata. — La adición al líquido nutricio del HyJ-233 a concentraciones de $1 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ g/ml, no modifica en absoluto las respuestas ulteriores a la concentración standard del agonista utilizado. No obstante, a concentraciones más elevadas, del orden de $5 \cdot 10^{-4}$ g/ml se observó una potenciación manifiesta (60 % de aumento) de dichas respuestas. La sensibilización se hizo evidente (15 % de aumento) a concentraciones de $1 \cdot 10^{-4}$ g/ml. El efecto descrito no desapareció completamente tras el primer lavado, disminuyendo progresivamente las respuestas hasta alcanzar su altura inicial. El interés de estos resultados estriba en el hecho de que los compuestos dotados de actividad gangliopléjica, potencian a dosis elevadas, la respuesta presora de la adrenalina (CORNE y EDGE, 1958). No se consideró necesario el estudio más profundo de la acción descrita.

EXPERIENCIAS "IN VIVO". *Efectos tensionales.* — La administración al gato cloralosado de 0,5 mg/kg de HyJ-233 por vía intravenosa, determinó en todos los ensayos realizados una caída tensional intensa, de aparición inmediata, que alcanzó su máximo efecto a los tres o cinco minutos después de la inyección. De forma similar a como ocurre con otros hipotensores, el descenso fue proporcional al nivel tensional inicial. En general osciló para las dosis indicadas alrededor de los 60 mm de hg. El efecto hipotensor se mantuvo durante todo el período de observación el cual osciló en general entre 60 y 90 minutos. En algunas experiencias se observó una cierta tendencia a la recuperación, pero nunca se alcanzaron los niveles tensionales iniciales, durante el período de observación (fig. 1). La administración de una segunda dosis, no modificó el nivel tensional de partida, observándose incluso en algunos casos una ligera hipertensión. En las mismas condiciones experimentales con dosis inferiores del orden de 0,2 (2 gatos) y 0,3 mg/kg (3 gatos) se observó un efecto hipotensor de menor intensidad y duración. En dosis más elevadas (1 mg/kg i.v.) abolió la respuesta presora del PEAC (estimulante ganglionar), pero no la hipertensión pro-

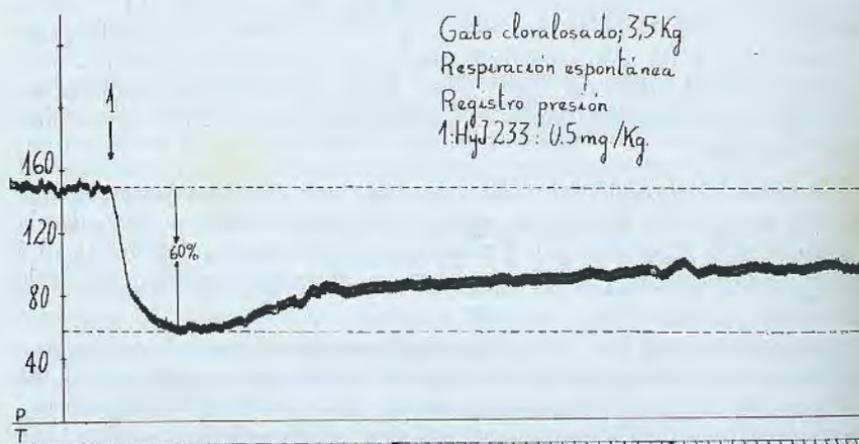


FIG. 1. — Efectos tensionales del HyJ-233. Gato cloralosado. Respiración espontánea. Registro de presión carotídea en mm/Hg. 1: HyJ-233, 0,5 mg/kg i.v. Tiempo, 30 segundos.

ducida por la adrenalina. No se investigó la duración de la reducción de la respuesta al PEAC. Los resultados obtenidos en una de las experiencias realizadas pueden observarse en la fig. 2.

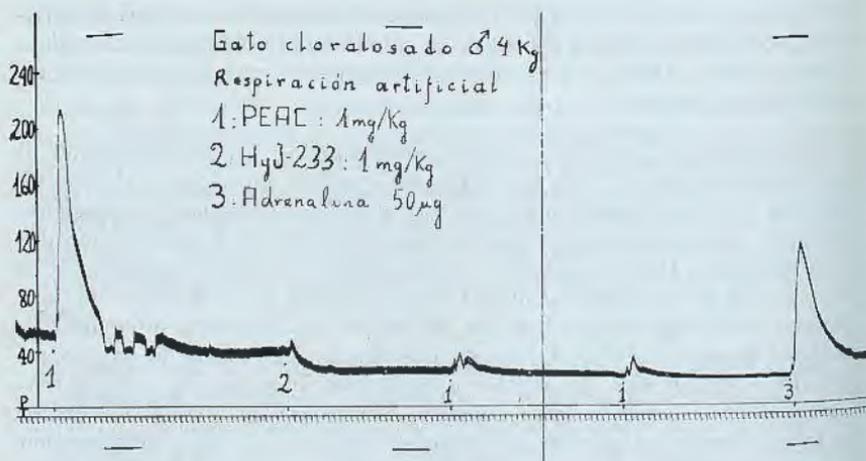


FIG. 2. — Inhibición por HyJ-233 de la respuesta presora al PEAC. Gato cloralosado. Respiración artificial. Registro presión carotídea en mm/Hg. 1: PEAC, 1 mg/kg i.v.; 2: HyJ-233, 1 mg/kg i.v.; 3: adrenalina, 50 microgramos. Tiempo, 30 segundos.

La inyección de anfetamina (1 mg/kg i.v.) antes de HyJ-233 (1 mg/kg i.v.) antagoniza el efecto hipotensor descrito para esta sustancia. En lugar de la hipotensión característica, se observa una ligera hipertensión (fig. 3).

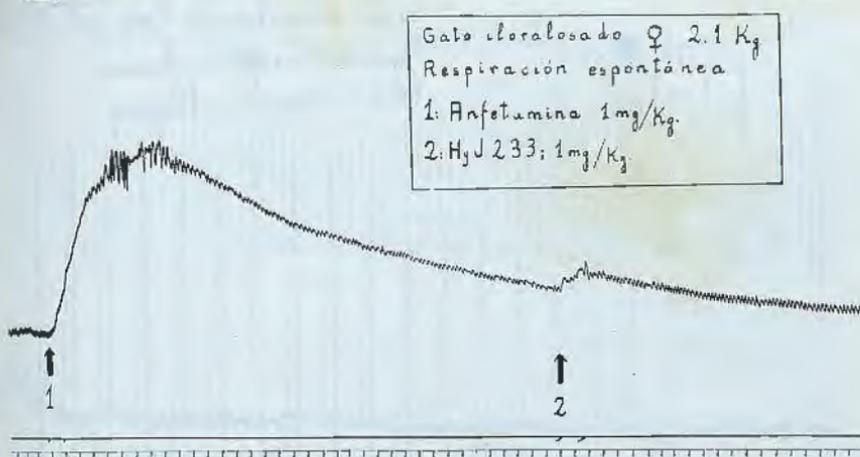


Fig. 3.—Inversión por la anfetamina de los efectos tensionales del HyJ-233. Gato cloralosado. Respiración espontánea. Registro de presión en carótida. 1: anfetamina, 1 mg/kg i.v.; 2: HyJ-233, 1 mg/kg i.v. Tiempo, 30 segundos.

Acción sobre la membrana nictitante.—La inyección endovenosa al gato cloralosado, a dosis inferiores a 1 mg/kg, redujo la respuesta de la membrana nictitante producida por estimulación preganglionar del simpático cervical. Por el contrario, la respuesta consecuente a la estimulación postganglionar no se modificó (fig. 4). Del estudio comparativo llevado a cabo con el hexametonio, puede concluirse que el HyJ-233 es dos veces más activo. Para producir con el hexametonio un efecto análogo al del producto se precisa una cantidad en miligramos de C_6 doble que la necesaria para el HyJ-233. La duración de los efectos es prácticamente similar para ambas sustancias en las condiciones reseñadas (fig. 5).

Efectos sobre las convulsiones producidas por la nicotina en el ratón.—La inyección intraperitoneal del HyJ-233 a una dosis de 150 mg/kg 20 minutos antes de la administración intravenosa de nicotina, inhibió en la totalidad de los animales utilizados, el efecto convulsivante del alcaloide. A dosis inferiores (100 y 50 mg/kg) no se consiguió la protección total; pero se observó una disminución evidente del tiempo de convulsión.

Toxicidad.—La determinación de la DL 50 por vía intravenosa, oral e intraperitoneal en el ratón ha dado los siguientes valores:

Vía de administración	DL 50
i.v.	28,7 ± 1,4° mg/kg
i.p.	270,4 ± 30,5° "
oral	2.000 "

° Error standard.

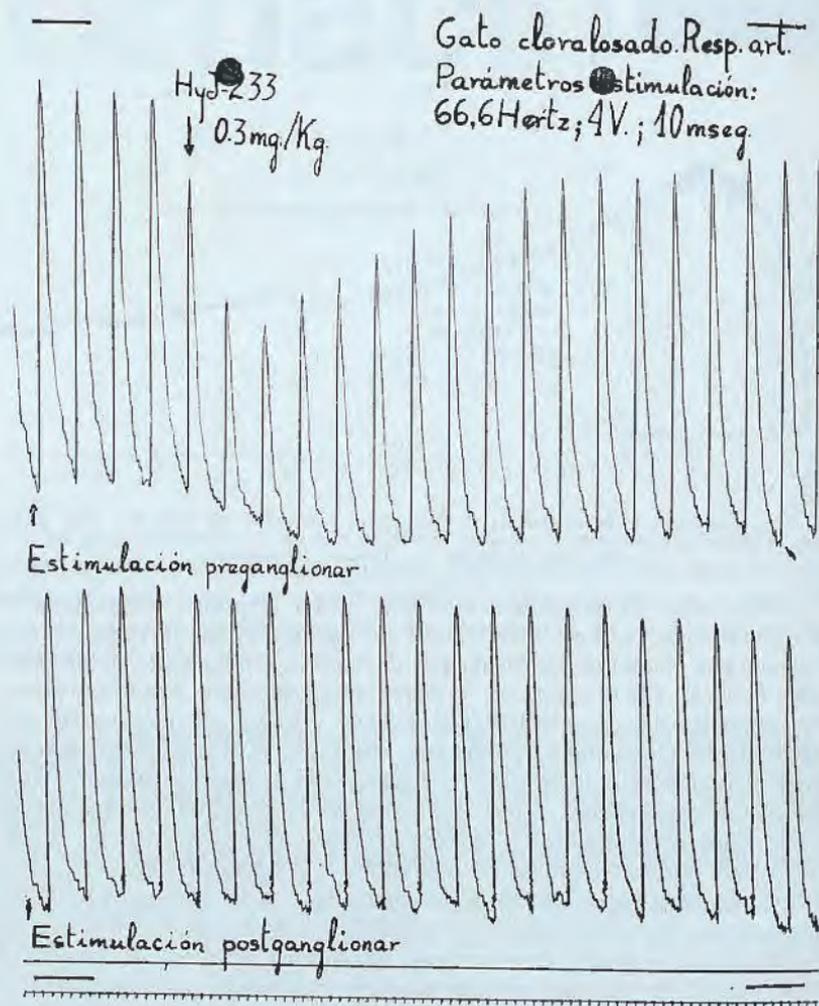


FIG. 4.— Acción del HyJ-233 sobre las contracciones de la membrana nictitante del gato, determinadas por estimulación periódica preganglionar (trazado superior) y postganglionar (trazado inferior) del simpático cervical. Gato cloralosado. Respiración artificial. Parámetros de estimulación: 66,6 Hertz; 4 voltios; 10 mseg. HyJ-233, 0,3 mg/kg i.v. Tiempo, 30 segundos.

DISCUSIÓN.— Los resultados hasta ahora descritos hablan en favor de una actividad bloqueante ganglionar intensa y de tipo selectivo. Esta selectividad se hace manifiesta en los diversos reactivos biológicos utilizados. La droga no modifica “in vitro” la respuesta de la acetilcolina, serotonina e histamina. Por el contrario, inhiben marcadamente la acción

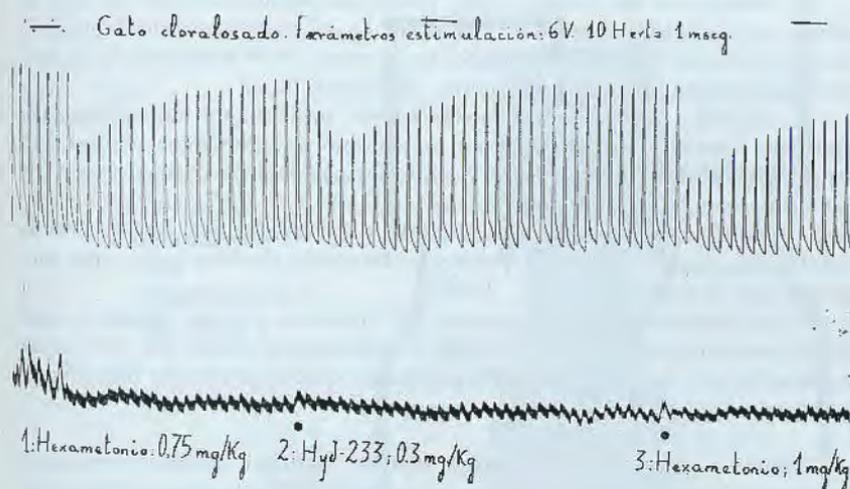


Fig. 5.— Acción del HyJ-233 y del hexametonio, sobre las contracciones de la membrana nictitante del gato determinadas por estimulación periódica preganglionar del simpático cervical. Trazado inferior, registro tensional en carótida. Gato cloralosado. Respiración artificial. Parámetros de estimulación: 10 Hertz; 6 voltios; 1 mseg. 1: hexametonio, 0,75 mg/kg i.v.; 2. HyJ-233, 0,3 mg/kg i.v.; 3: hexametonio, 1 mg/kg i.v. Tiempo, 30 segundos.

de la nicotina a concentraciones muy pequeñas. En las mismas condiciones experimentales no se ha observado ninguna acción directa incluso a concentraciones mil veces superiores a las que producen una acción antinicotínica manifiesta, lo que hace pensar que el producto carece de acciones muscarínicas y nicotínicas.

El antagonismo frente a la nicotina se ha observado asimismo en las experiencias llevadas a cabo "in vivo". El producto reduce o anula en relación con la dosis empleada el efecto convulsivante de la nicotina administrada por vía venosa en el ratón. No hemos investigado la influencia del producto sobre las convulsiones producidas por pentametilentetrazol y estrirenina.

El efecto hipotensor observado nos hizo pensar en la posible acción gangliopléjica del producto. Sin embargo, no descartamos inicialmente la posibilidad de que dicha hipotensión fuera consecuente a una acción adrenolítica o simpaticolítica. La adrenolisis quedó descartada al observar que el HyJ-233 potenciaba la respuesta del conducto deferente de rata a la noradrenalina, no modificaba la acción presora de esta catecolamina en el gato cloralosado y no reducía la respuesta de la membrana nictitante a la estimulación postganglionar del simpático cervical.

El mecanismo de simpaticolisis queda asimismo excluido ya que la droga reduce selectivamente la respuesta de la membrana nictitante producida por estimulación preganglionar, pero no la consecuente a la estimulación postganglionar como antes señalamos.

El conjunto de estas experiencias parece indicar que las acciones del producto reseñadas se deben a un mecanismo gangliopléjico. Corroboran estas conclusiones una serie de hechos farmacológicos característicos de los fármacos bloqueantes ganglionares. El HyJ-233 inhibe la acción presora de estimulantes ganglionares selectivos (PEAC). Por otra parte la amfetamina invierte su acción presora, interacción descrita para otros gangliopléjicos (LESPAGNOL y col., 1965).

No se ha investigado la absorción del producto por vía digestiva, pero de los resultados obtenidos al comparar la toxicidad aguda por vía venosa en relación con la vía oral, puede concluirse que su absorción digestiva es escasa.

RESUMEN. — Se estudian algunos aspectos farmacológicos de una nueva sustancia químicamente derivada de la serie N,N'-bis-(terc-butil)-polimetilén diamina. Esta sustancia conocida con el nombre de HyJ-233, exhibe propiedades gangliopléjicas muy manifiestas. Inhibe selectivamente la acción de la nicotina tanto "in vivo" como "in vitro". Produce hipotensión intensa y duradera a dosis pequeñas y reduce marcadamente la respuesta de la membrana nictitante producida por estimulación preganglionar, pero no la provocada por estimulación postganglionar del simpático cervical. En comparación con el hexametonio resulta ser dos veces más activa y su toxicidad es menor.

BIBLIOGRAFÍA

- CORNE, S. J., y EDGE, N. D.: Pharmacological properties of pempidine (1:2:2:6:16-pentamethylpiperidine), a new ganglion blocking compound. *Brit. J. Pharmacol.*, 13:339, 1958.
- LEACH, G. D. H.: Estimation of drug antagonism on the isolated guinea pig vas deferens. *J. Pharm. Pharmacol.*, 8:501, 1956.
- LESPAGNOL, A., HAZARD, R., MOUILLE, P., y DEBAERT, M.: Interactions tensionnelles entre dérivés de l'amphétamine et gangliopléjiques. *Presse Medical.*, 73:2699, 1965.
- REED y MUENCH: En "Métodos biológicos de valoración de medicamentos". Ruiz Gijón, J. e Ibáñez, R. Ed. Alhambra, S. A. Madrid, pág. 525, 1955.
- VALDECASAS, F. G., CUENCA, E., LORA TAMAYO, M., y MADROÑERO, R.: Aspectos farmacológicos de un nuevo tipo de fármaco hipotensor, el L5RHy. *Actas VIII Reunión Soc. Esp. Cienc. Fisiol.*, 127, 1964.
- VALDECASAS, F. G., CUENCA, E., y RODRÍGUEZ, L.: Estudio de una nueva serie de sustancias gangliopléjicas. *Actas IX Reunión Soc. Esp. Cienc. Fisiol.*, 369, 1965.

Sección de Farmacología de Barcelona del Instituto de Farmacología Experimental. Patronato "Santiago Ramón y Cajal" del C.S.I.C. Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina de Barcelona.