

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio comparativo de los mecanismos de acción de los  
Adenin-ribonucleotidos y los neurotransmisores del sistema  
nervioso autonómico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Llupía Más**

Madrid, 2015

TP  
1984  
-----  
016.

José Lupiá Más



\* 5 3 0 9 8 6 2 8 0 5 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-111015-9

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MECANISMOS DE ACCION  
DE LOS ADENIN-RIBONUCLEOTIDOS Y LOS NEUROTRANSMISORES DEL SISTEMA  
NERVIOSO AUTONOMICO

Departamento de Fisiología  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

16/84

© José Lupiá Más

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-1615-1984

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MECANISMOS DE ACCION  
DE LOS ADENIN-RIBONUCLEOTIDOS Y LOS NEUROTRANS-  
MISORES DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMICO.



ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MECANISMOS DE ACCION DE  
LOS ADENIN-RIBONUCLEOTIDOS Y LOS NEUROTRANSMISORES  
DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMICO.

MEMORIA presentada para aspirar al  
grado de Doctor en Veteri-  
naria por el Licenciado  
D. José Llupíá Más.

Director: Prof. Dr. Albino García  
Sacristán.

Licenciado D. José Llupíá Más,  
aspirante al grado de Doctor  
en Veterinaria.

Madrid, Marzo de 1982



A mi esposa Consuelo.





Expreso mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, Director del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por su comprensión y apoyo para encauzar esta investigación.

Al Prof. Dr. D. Albino García Sacristán, Director de esta tesis; a él debo el ánimo y el diálogo. Fué quien me alentó en la búsqueda y desarrollo de este trabajo.

A los Laboratorios Almirall, así como a la Cátedra de Fisiología por la ayuda prestada a lo largo de toda la parte experimental de esta tesis.

Un entrañable recuerdo a mis padres.



## SUMARIO

	<u>Página</u>
1.- JUSTIFICACION .....	1
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA .....	4
Actividades de las nucleoproteínas .....	5
3.- MATERIAL Y METODOS .....	13
3.1. Material .....	14
3.2. Métodos .....	19
4.- RESULTADOS .....	44
5.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS .....	65
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	76
7.- BIBLIOGRAFIA .....	80



1.- JUSTIFICACION.

Al ATP, clásicamente se le ha otorgado la función de suministrador energético para las diferentes transformaciones metabólicas celulares. Actualmente son bastantes los autores que además, lo proponen como posible transmisor humoral. Holton (1959) lo considera neurotransmisor de las fibras sensitivas primarias. Burnstock (1972), aportó pruebas importantes, afirmando que el ATP y sus derivados, podrían actuar como neurotransmisores inhibitorios en el aparato gastrointestinal, donde supone que es liberado en algunas fibras postganglionares que nacen en el plexo de Auerbach. Silinsky y Hubbar (1973), consideran que también se liberan en los sinaptosomas de fibras nerviosas somáticas. Siguiendo estos autores, son muchos los que todavía dan por válida esta función de los adenín-ribonucleótidos, también denominados derivados adenílicos o adenín-fosfatos (García-Díez y Morales Olivas, 1978) (Tomas, 1981).

Paralelamente a esta hipótesis, se considera a los adenín-ribonucleótidos sólo como mediadores y moduladores intracitoplasmáticos, cuya acción sería aportar energía para los procesos celulares, tales como: Fosforilización oxidativa, trabajo mecánico, síntesis de compuestos químicos en toda la célula, cambios a corto plazo en la permeabilidad iónica de la membrana (Webb Johnson, 1977; Greengard, 1978), y explican el comportamiento - a veces contradictorio - de los neurotransmisores clásicos en el sistema autonómico, no por la acción directa a nivel de la

membrana celular del ATP, sino por una interacción entre varios neurotransmisores ( Garatini y Valzelli, 1965 ), ( Roberts, 1979).

Partiendo pues de estas dos teorías, se han recopilado bibliográficamente los conceptos básicos de cómo actúan los neurotransmisores; la regulación genética y enzimática, junto con la interacción fármaco-receptor, para delimitar las funciones y lugares de acción de los adenín-ribonucleótidos, así como sus posibles aplicaciones derivadas de sus efectos funcionales.

Realizando a continuación un estudio experimental comparativo de los mecanismos de acción de los adenín-ribonucleótidos y los neurotransmisores del sistema nervioso vegetativo, así como sus posibles aplicaciones al ser modificados.



4

2.- REVISION BIBLIOGRAFICA.

#### ACTIVIDADES DE LAS NUCLEOPROTEINAS.

Uno de los grupos que constituyen los proteídos son las nucleoproteínas; están formadas por un componente proteínico y un grupo no proteínico o grupo prostético. Se denominan nucleoproteínas porque forman una gran parte del material nuclear de las células, aunque también existen en su citoplasma, especialmente asociadas a los ribosomas.

Su actividad está íntimamente relacionada con la síntesis protéica, con la división celular y con la transmisión de factores hereditarios.

Los sistemas de control tanto genéticos como enzimáticos, tienen una especial importancia para regir las concentraciones intracelulares de este grupo; sus niveles de concentración serán los que regularán su intensidad de síntesis (Jacob y Monod, 1961).

Las nucleoproteínas han sido extraídas de muchas variedades de tejidos vegetales y animales. Entre los agentes extractores están el agua, álcalis diluídos, soluciones de cloruro sódico y soluciones amortiguadoras de pH entre 4 y 11. Una vez extraída se puede precipitar con soluciones saturadas de sulfato de amoníaco o con cloruro de calcio diluído.

Cuando la nucleoproteína purificada se hidroliza por ácido, o por la acción de las enzimas, se desdobra en varios constituyentes: En un primer paso en los ácidos nucleicos (polinucleótidos), y el grupo protéico, formado principalmente por histonas y protaminas. Siguiendo cuidadosamente con la hidrólisis ácida los polinucleótidos se desglosan en mononucleótidos; si a éstos se les sustrae el ácido fosfórico queda el nucleósido. Estos nucleósidos están formados por una base nitrogenada (púrica o pirimídica) y un azúcar (ribosa o desoxirribosa).

Las principales bases púricas son: Adenina, guanina, hipoxantina y xantina, y, las pirimidínicas: Citosina, timina y uracilo.

La nomenclatura de estos nucleósidos dependerá de la base nitrogenada y del azúcar al que se une.

En la tesis que desarrollamos, el estudio lo centramos en los nucleótidos derivados de la adenina, principalmente ATP (adenosín-trifosfato), AMP cíclico (3', 5'-adenosín-monofosfato: AMPc) y 5'AMP (5'-adenosín-monofosfato). Todos ellos se derivan de la adenina + ribosa + ácido fosfórico. Recordamos que la adenina puede combinarse tanto con la ribosa (adenosina, A), o con la desoxirribosa (desoxiadenosina, dA); los nucleótidos derivados de la adenina y que anteriormente citamos, tienen varias denominaciones tales como adenosín-fosfatos, derivados adenílicos y adenín-ribonucleótidos. En nuestro trabajo utilizamos las tres pero con preferencia por la última.

Los adenín-ribonucleótidos además de ser unos componentes de las nucleoproteínas, tienen identidad propia en los diferentes procesos energéticos celulares, participan en la fosforilización oxidativa; en el caso del ATP es fuente de energía, como fosfato macroérgico, para diferentes reacciones celulares, tales como: Trabajo mecánico, metabolismo basal, transporte iónico, activación de ácidos grasos libres y síntesis protéica.

El AMPc deriva del ATP en una reacción catalizada por la enzima adenilciclase. El AMPc es destruido en los tejidos por conversión en 5'AMP o ácido adenílico, en una reacción catalizada por la fosfodiesterasa.

La adenilciclase está unida a las membranas celulares; de este modo muchas células de tejidos animales, como también bacterias y otros microorganismos pueden sintetizar AMPc. Es interesante resaltar que este compuesto no se encuentra en las plantas.

El AMPc desempeña un papel tanto en la liberación de algunas hormonas como en la acción de otras. En este último caso una hormona puede activar a la adenilciclase en las células del tejido que le sirve de blanco, lo que conduce a la producción de AMPc dentro de ellas, siendo este el que lleva a cabo el efecto atribuido a las hormonas. En otros casos el AMPc puede efectuar la síntesis de una hormona.

La relación entre las hormonas y la síntesis de proteí-

nas se puede explicar por el descubrimiento de que el AMPc activa a una proteínkinasa que cataliza la fosforilación, y de este modo la activación de un ARN polimerasa. La polimerasa activada, a su vez, estimula la producción de ARN, el cual funciona como mensajero para la síntesis de proteínas. Una hormona, al iniciar la producción de AMPc por la activación de la adenilciclase, influirá de este modo, sobre la síntesis de proteínas.

La hipótesis más aceptada sobre la actividad del AMPc radica en su capacidad para activar las proteínkinasas. Estas enzimas son las encargadas de fosforilar a otras proteínas mediante el ATP. Por ello, la especificidad de acción del AMPc, dependerá en última instancia, de la selectividad de dichas proteínkinasas y de las proteínas fosforiladas, efectores finales de su acción. El AMPc participa en las siguientes secuencias de la neurotransmisión (Greengard, 1978):

1.- Mediador postsináptico.

En este caso la proteína fosforilada membranaria es una enzima que mediante la variación de la permeabilidad iónica puede cambiar el potencial de membrana de ciertos tipos de sinapsis. Según sea el sentido de la variación del potencial de membrana, conseguirá hiperpolarizarlo, con lo que será más difícil excitarla, o bien depolarizarlo, con lo que facilitará el alcanzar el umbral que desencadenará el potencial de acción.

2.- Estimulación presináptica de la síntesis de neurotransmisores.

Se demostró que el AMPc activa la tirosina (enzima que controla la velocidad de síntesis de adrenalina y dopamina). Esta activación la logra a través de una proteíncinasa específica.

3.- Acción sobre el sistema de microtúbulos.

El cuerpo celular de la neurona sintetiza muchos de los materiales esenciales para mantener la vida y la funcionalidad de la célula. Entre ellos destacan los materiales que formarán la membrana celular y las membranas de las vesículas sinápticas. Es obvio que una vez formados en el cuerpo celular se tienen que trasladar a los lugares donde son requeridos. Este flujo axónico parece depender del sistema de microtúbulos. La velocidad mediante la que el sistema microtubular transporta el material depende de una proteína que debe ser fosforilada por una proteíncinasa, a su vez estimulada por el AMPc.

Otros autores, principalmente el grupo de Burnstock, consideran que el ATP y también los otros derivados adenílicos pueden desempeñar un papel como neurotransmisores, sugiriendo la denominación para estas transmisiones neuronales de: Nervios purinérgicos, con actuación primordialmente en la pared del tubo gastrointestinal, en la vejiga, pulmón, tráquea y ojo.

Ante estas dos hipótesis ha surgido el motivo para que

rer distinguir entre el comportamiento de los neurotransmisores, que son los mensajeros químicos que relacionan a dos neuronas o neurona-célula en general, para transmitir el impulso nervioso, produciendo diversos efectos funcionales, diferenciándolos con los neuromoduladores, los cuales sólo modifican en cantidad o calidad la actividad neuronal.

El criterio que seguimos para que una substancia se considere como un neurotransmisor es el siguiente:

- a). Dicho compuesto, y los enzimas necesarios para su formación, deben estar presentes en la neurona.
- b). Se debe liberar desde el terminal axónico tras la estimulación de éste.
- c). Su aplicación exógena, en dosis fisiológicas, debe mimetizar los efectos de la estimulación nerviosa.
- d). Deben existir mecanismos que lo inactiven rápidamente, bien por degradación, bien por recaptación, o por ambas formas.
- e). Los fármacos que interactúan específicamente con su metabolismo, deben ejercer los efectos esperados sobre la respuesta neuronal según el sentido de dicha interacción.

Por el contrario, las características propuestas para los neuromoduladores, son las que siguen:

- a). Duración muy prolongada de su efecto.
- b). Almacenamiento y liberación preferente por células de la glía.
- c). Ausencia de mecanismos rápidos para su inactivación.
- d). Liberación inespecífica en respuesta a estímulos muy variados.

De este modo distinguimos los neurotransmisores de los neuromoduladores.

Hay que resaltar el hallazgo histoquímico de De Robertis y Whittaker que consiguieron aislar los sinaptosomas o botones sinápticos, conservando sus mecanismos de síntesis, almacenamiento, liberación e inactivación de los neurotransmisores específicos de la neurona originaria. Otro hecho importante, es la posibilidad de teñir selectivamente las neuronas que poseen un determinado transmisor, proporcionando información sobre la distribución anatómica de distintos neurotransmisores. En nuestro trabajo hemos hecho un estudio de los diversos efectos funcionales entre algunos neurotransmisores típicos del sistema nervioso autónomo, comparándolos con los adenosín-fosfatos.



Nuestro objetivo a desarrollar en la parte experimental ha sido el siguiente:

- 1º.- Comparar la actuación a nivel de la membrana celular entre neurotransmisores y adenosín-fosfatos.
- 2º.- Observar la actuación intracelular de los derivados adenílicos.
- 3º.- Diferenciar el lugar de acción o tipo de receptor entre un neurotransmisor y una molécula de anillo púrico.
- 4º.- Diseñar un experimento para diferenciar los mecanismos de acción entre neurotransmisores y neuromoduladores.
- 5º.- Ver sus posibles aplicaciones al aumentar los niveles de adenín-ribonucleótidos.

Con este planteamiento, pretendemos poder aportar mayor información y claridad ante estas dos hipótesis, en las que unos autores consideran a los adenín-ribonucleótidos como neurotransmisores y otros no, viendo además las actividades que desempeñan al ser modificados.

13

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1. MATERIAL.

3.1.1. Aparatos y utillaje.

- Espectrofotofluorímetro Aminco Bowman (American Instrument Company).
- Espectrofotómetro Coleman 6/20.
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer 550.
- Polígrafo Ugo Basile 7050.
- Registrador Perkin-Elmer 56.
- Transductor isométrico sensibilidad 1, Ugo Basile.
- Transductor isotónico 7006 Ugo Basile.
- Tubos de vidrio Vitrolab de 10 ml.

3.1.2. Animales de experimentación.

- Cobayos DunKin-Hartley machos de diversos pesos según experimento.
- Cobayos tricolores machos de 350 a 500 grs.
- Ratas Wistar machos de 150 a 170 grs.

3.1.3. Compuestos químicos y soluciones.

a). Compuestos químicos:

- Acetilcolina clorhidrato. Sigma. A.6625, Em.181.7.
- Acido cítrico cristalizado purísimo. Panreac.  
P.m.210.14.
- Acido tricloroacético (TCA). Merck. A.810, y  
P.m:163.39.
- Adenosín desaminasa (ADA) de Boehringer Mannheim.  
A.102105, Intestino de ternero.
- Adrenaline bitartrato. Boehringer Ingelheim.  
A.7261, P.m.333.
- Adyuvante incompleto. Freund, Difco Laboratories.
- Albúmina de huevo. Merck. A.967.
- AMPc. Boehringer Mannheim. A.102296, P.m.347.2.
- 5'AMP. Boehringer Mannheim. A.102199, P.m.499.2.
- ATP 3H<sub>2</sub>O disódico de músculo de caballo, bajo con-  
tenido en calcio. Sigma. A.5394, P.m.551.2.
- Azul de Evans. Merck. A.3169, P.m.960.82.
- Cloruro magnésico. LE& FA. P.m.203.3.

- Fosfatasa alcalina (FA). Boehringer Mannheim.  
A.108162 de intestino de ternero.
- Fosfodiesterasa (FDE). Boehringer Mannheim.  
A.108243 de corazón de buey.
- Histamina diclorhidrato. Merck. A.4370,  
P.m.184.07.
- Mepiramina maleato. Rhone-Poulenc. P.m.401.4.
- Metanol purísimo. Panreac. P.m.32.04.
- Molibdato y Vanadato Amónico; reactivos preparados  
por Boehringer Mannheim. A.124974.
- O-Phthaldehyde. BDH Chemical Ltd. n<sup>o</sup>.29537,  
P.m.134.14.
- Sodio hidróxido (tritisol) 1N. Merck, A.9956,  
P.m.40.0.
- Teofilina hidratada. Knoll A.G.Ludwigshafen.  
P.m.198.17.
- TRIS-ClH. Merck. A.8382, P.m.121.14.

b). Soluciones. Compuestos para los líquidos nutricios Tyrode, Krebs y Locke:(Tabla 4.)

- Cloruro sódico. Panreac. P.m.58.44 .
- Glucosa anhidra purísima. Panreac. P.m.180.16.
- Bicarbonato sódico purísimo. Panreac. P.m.84.01.
- Fosfato monosódico purísimo. LE & FA. P.m.156.01.
- Cloruro magnésico purísimo. LE & FA. P.m.203.30.
- Cloruro potásico. J.T. Baker. P.m.74.55.
- Cloruro cálcico purísimo. LE & FA. P.m.110.99.

	Tyrode(1910) en milimoles	Krebs (1950) en milimoles	Locke (1900) en milimoles
Cl Na	136	118	154
CO <sub>3</sub> HNa	12	25	24
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5.6	10	5
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.H <sub>2</sub> O	0.4	1.3	--
Cl <sub>2</sub> Mg.6H <sub>2</sub> O	0.9	0.8	--
ClK	2.6	4.7	5.4
Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	1.8	2.5	2.5

Tabla 4. Esquema de los compuestos para líquidos nutricios de las soluciones.

### 3.2. METODOS.

#### 3.2.1. Propiedades in vitro del ATP y AMPc. Disimilitud con neurotransmisores.

##### a). Ileon de cobayo.

Se siguió la técnica de Magnus (1904), utilizándose cobayos Dunkin-Hartley machos de 400 a 500 grs., de peso; el sacrificio de los animales fué por sangría mediante corte de carótidas previa anestesia por éter. El líquido nutricio fué Tyrode con suave burbugeo de aire; se cortaban 3 cm., de ileon situados a 20 cm., del píloro, dejándolo reposar en el baño 15 minutos; la temperatura era de 37 °C y la tensión del transductor isotónico de 0.75 gramos.

Cada fármaco se administraba de forma individual. El ciclo completo que se seguía era de dos minutos; la exposición del fármaco 20 segundos; se lavaba y se esperaba otra vez a los dos minutos, duplicándose la dosis, para lograr la curva dosis-respuesta. La sensibilidad del polígrafo: 2 y la velocidad del carro puesto en marcha de 5 mm/min.



b). Cadena traqueal de cobayo.

Castillo y De Beer (1947) detallaron esta técnica. Las peculiaridades de nuestra propia preparación son las siguientes: cobayos Dunkin-Hartley machos de 500 a 700 grs. de peso; líquido nutricio Krebs a 33°C y levísimo burbugeo con oxígeno. Se separaban cinco anillos traqueales, se ataban por la parte cartilaginosa, cortándose después por el extremo opuesto a la musculatura lisa traqueal, dejándose reposar un mínimo de 30 minutos en el baño. La tensión del transductor isotónico era de 0.4 gramos y la sensibilidad del polígrafo: 5; la exposición del fármaco con la cadena traqueal de cinco minutos de duración. Seguidamente se lavaba y se dejaba recuperar (generalmente este periodo estaba comprendido entre cinco y diez minutos). La velocidad de arrastre del carro: 6 mm.

c). Aurículas de cobayo.

La puesta a punto de este método la llevó a cabo Clark (1926).

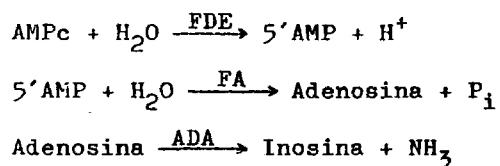
Se usaron cobayos Dunkin-Hartley machos de 500 a 700 gramos de peso, anestesiados con éter y desangrados por la aorta abdominal; se diseccionaban con gran cuidado las aurículas, se ataban sus dos extremos: uno al baño y el otro al transductor isométrico. El líquido nutricio fué el Locke y la temperatura de

30°C; un fino burbujeo de oxígeno mantenía en equilibrio la preparación; la sensibilidad del polígrafo: 2. El ciclo completo era de 6 a 10 minutos; la exposición del fármaco de 1 a 2 minutos esperando su máxima respuesta. Se variaba la velocidad del carro para poder comparar los efectos anterior y posterior del fármaco. Se lavaba y se esperaba a que se recuperara otra vez la preparación. (Velocidad del carro en espera: 6 mm/min; velocidad del carro para comparación: 380 mm/min).

3.2.2. Teofilina como inhibidor de la fosfodiesterasa y de la fosfatasa alcalina.

a). Método enzimático:

Se siguió el método de Polidoro (1970) en que la fosfodiesterasa (FDE) transforma el AMPc a 5'AMP. Este substrato es conducido a adenosina + fósforo inorgánico al actuar sobre él la fosfatasa alcalina (FA); la adenosín-desaminasa (ADA), al actuar sobre la adenosina la convierte en inosina + amoníaco. En esquema, la reacción es la siguiente:



El curso de esta reacción enzimática se sigue debido a que el máximo de absorción del AMPc es de 265 nm., y el de la inosina de 250 nm; al transformarse el uno en la otra, descien de la lectura óptica como consecuencia de las diferentes absorbancias.

La fosfatasa alcalina y la adenosín-desaminasa se dan en exceso, para que-este sistema acoplado (S.A.) no dificulte

te la reacción, y que sea la fosfodiesterasa quien imprima la velocidad a este sistema multienzimático.

En la cubeta patrón hay las siguientes sustancias:

<u>Contenido</u>	<u>Disolución</u>	<u>Volúmen ml</u>
Tris-Clh(pH:7.5)	20 mM	1.6
AMPc	$3 \times 10^{-4}$ M	0.8
Cl <sub>2</sub> Mg.6H <sub>2</sub> O	25 mM	0.2
S.A.	0.4 mg ADA + 0.25 mg FA en 5 ml. de TRIS	0.2
FDE	7.5 mg FDE en 5 ml. de TRIS	0.2

La temperatura del ensayo fué de 25°C. En la Fig.25 se representa el barrido espectrofotométrico antes de empezar la reacción y una vez terminada. En la Fig. 26, se representa el descenso en la lectura óptica frente al tiempo de reacción, durante la transformación enzimática.

Una vez comprobada la actividad fosfodiesterásica, intentamos la inhibición con teofilina.

Debido a la sobreposición e interferencias entre las ondas del AMPc, inosina y teofilina, no dan posibilidad para hacer una exacta medida de inhibiciones; hay una sumación en

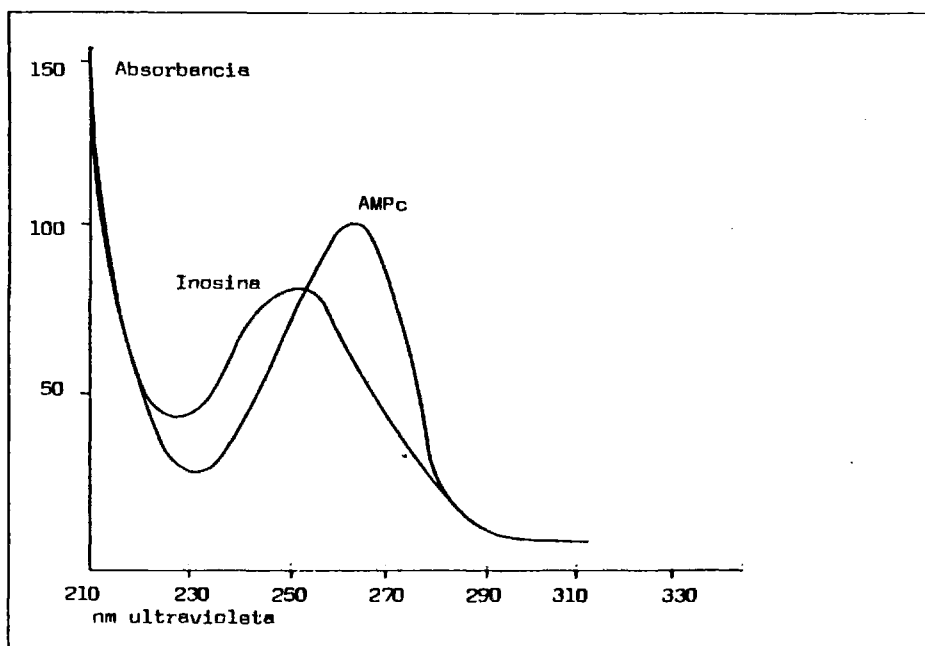


Fig. 25. Barrido espectrofotométrico de la reacción enzimática con las máximas absorbancias del AMPc e inosina a sus diferentes longitudes de onda.

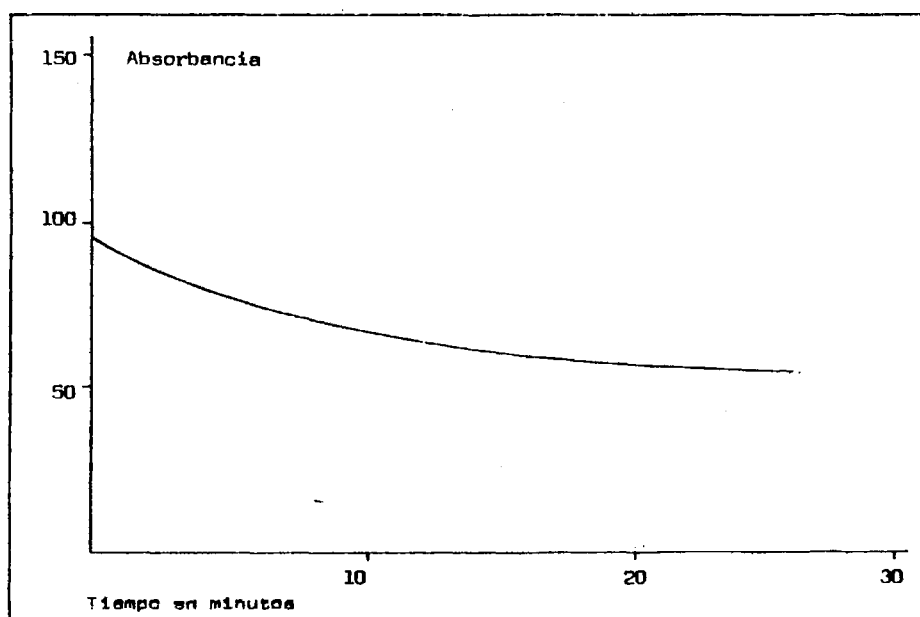


Fig. 26. Reacción enzimática leída a 265 nm durante 25 minutos, representa la transformación de AMPc a inosina.

la absorbancia alejándonos de la proporcionalidad entre la concentración y la lectura óptica (Ley de Lambert o de Beer)(Lynch, 1972).

En la Fig.27, se relacionan diferentes concentraciones de AMPc con su absorbancia. Se tomaron los coeficientes de correlación de las diferentes rectas que se obtenían; a partir de la concentración  $210 \mu\text{g/ml.}$ , de AMPc el coeficiente de correlación baja; por tanto pierde la proporcionalidad. En la tabla nº: 5, detallamos los valores obtenidos.

En la Fig.28, se representa la concentración de  $3 \times 10^{-4}\text{M}$  de AMPc y  $10^{-5}\text{M}$  de Teofilina con sus lecturas ópticas en el límite de la proporcionalidad entre concentración-absorbancia

Concentración AMPc Ag/ml	Absorbancia a 265 nm	Coefficiente correlación
10	0.125	
50	0.630	
90	1.167	0.999
130	1.591	0.998
170	2.010	0.998
210	2.241	0.993
250	2.460	0.987
290	2.608	0.980

Tabla 5

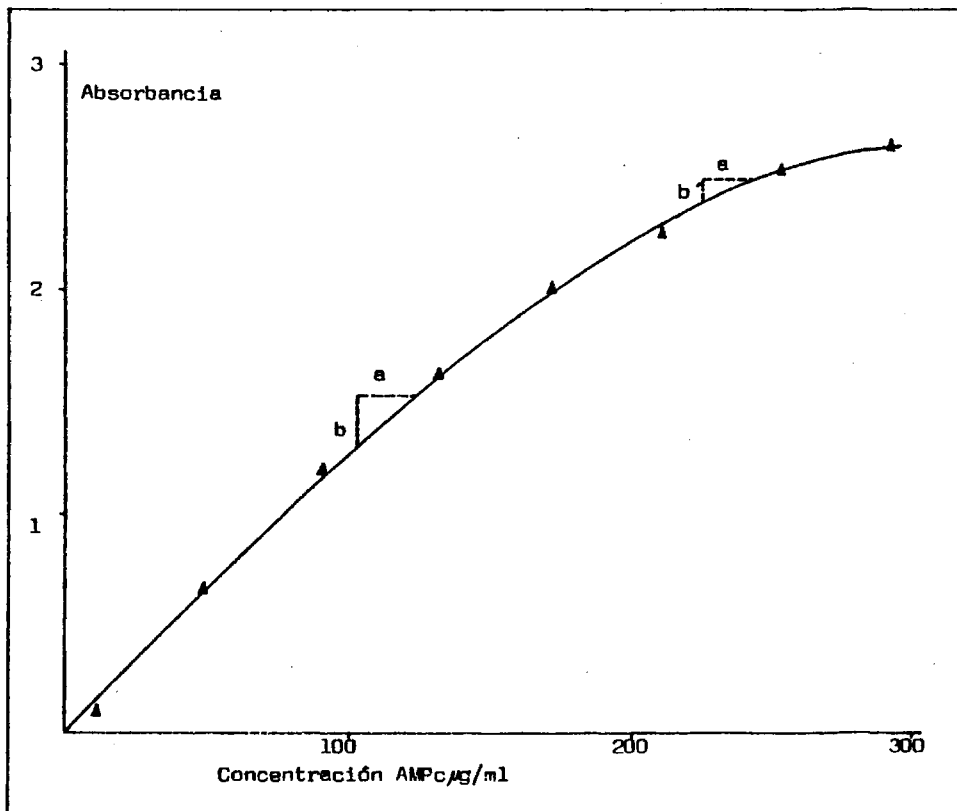


Fig. 27. Se expresa la curva entre concentración de AMPc y su absorbancia

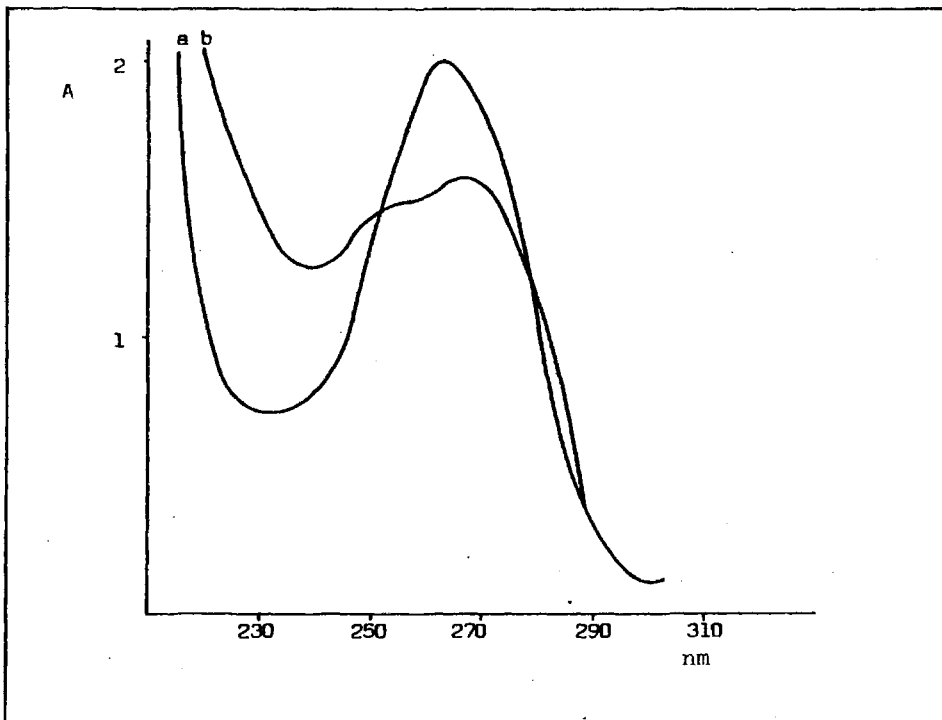


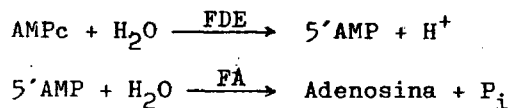
Fig. 28. En (a) se representa el barrido espectrofotométrico de la reacción enzimática base, más  $10^{-5}M$  de teofilina y en (b) el barrido espectrofotométrico una vez concluida la reacción enzimática.



b). Método enzimático-colorimétrico:

Se hicieron dos comprobaciones partiendo de la reacción enzimática anterior; la primera fué la siguiente:

1ª:



Se valoran los niveles de fósforo inorgánico, según la técnica de Zilversmit (1950) en que se colora el ( $\text{P}_i$ ) al reaccionar con el molibdato y vanadato amónico; midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 405 nm, si la teofilina inhibe el proceso enzimático, descenderá la cantidad de fósforo hallado.

Programación del experimento: Tablas 6 y 7.

- Precipitación y determinación colorimétrica.
- Agitar y extraer 1 ml por duplicado de cada tubo.
- Agitar, esperar 10 minutos y centrifugar durante 5 minutos a 2.000 r.p.m.
- Extraer 1 ml de sobrenadante al que se le añade 1 ml de reactivo 1 (vanadato amónico) y otro mililitro de reac-

Numeración del tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Contenido y disolución									
AMPc 20 mM	-	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
FA(0.25 mg en 5 ml de Tris)	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tris ClH (20 mM)	3	1.8	1.6	1.79	1.59	1.7	1.5	0.8	0.6
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Teofilina (3x10 <sup>-3</sup> M)	-	-	-	0.01	0.01	0.1	0.1	1	1
PDE (7.5 mg en 5 ml de Tris)	-	-	0.2	-	0.2	-	0.2	-	0.2
Lectura absorbancia a 405nm	0.000	0.000	0.080	0.010	0.060	0.015	0.040	0.010	0.030
	0.000	0.000	0.080	0.010	0.060	0.010	0.040	0.015	0.025

Tabla 6. Tubos problema

Numeración del tubo	10	11	12
µg ml <sup>-1</sup> de fósforo	5	25	50
TRIS-ClHml	2	2	2
Lectura absorbancia a 405nm	0.030	0.090	0.170
	0.030	0.090	0.170

Tabla 7. Tubos patrón

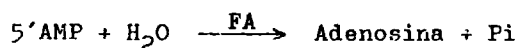
tivo 2 (molibdato amónico).

- Se lee en el espectrofotómetro al cabo de 10 minutos a 405 nm.

- Finalmente se valora la cantidad en  $\text{g ml}^{-1}$  de fósforo encontrados relacionando la lectura óptica hallada con su curva patrón, sustrayendo su homólogo sin fosfodiesterasa para eliminar interferencias (ejemplos anteriores).

Una vez halladas las absorbancias, se procede a determinar la cantidad de fósforo inorgánico detectado una vez sustraído el tubo homólogo con posibles interferencias. La recta patrón es determinada mediante la recta de regresión de los puntos que relacionan absorbancia-concentración de fósforo inorgánico. Fig. 29.

2ª Reacción enzimática:



También se valoró por coloración el fósforo orgánico mediante el método de Zilversmit (1950), para comprobar si la teofilina inhibía también a la fosfatasa alcalina y en qué grado.

Programación del experimento: Tablas 8 y 9.

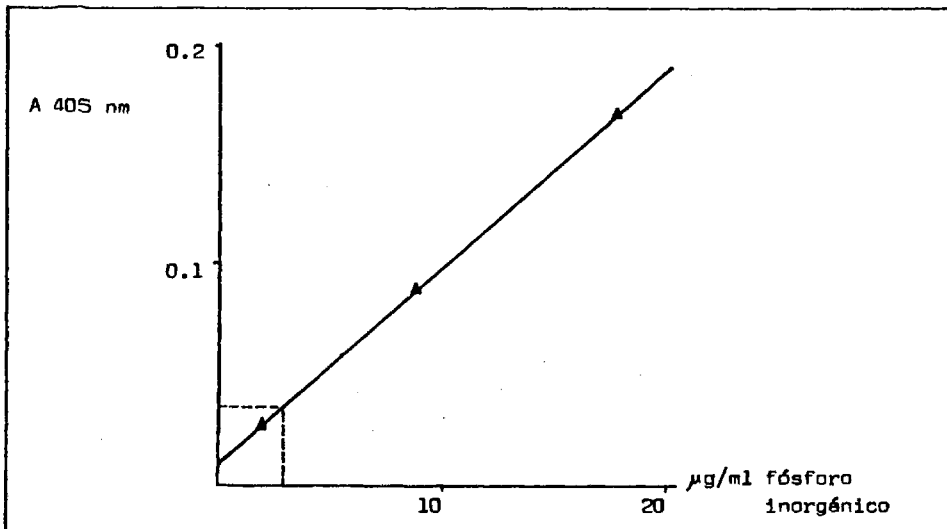


Fig. 29. Con la recta patrón obtenida en cada experimento se valora la cantidad de fósforo encontrado en los tubos problema.

Numeración del tubo	1	2	3	4	5
<b>Contenido y disolución</b>					
5'AMP ( $3 \times 10^{-4}M$ )	-	0.8	0.8	0.8	0.8
Tris-ClH (20mM)	3	2	1.8	0.8	1
Cl <sub>2</sub> Mg (25mM)	-	0.2	0.2	0.2	0.2
Teofilina ( $3 \times 10^{-3}M$ )	-	-	-	1	1
F.A. (0.25mg en ml de Tris)	-	-	0.2	0.2	-

Tabla 8. Tubos problema

Numeración del tubo	6	7	8
µg ml <sup>-1</sup> de fósforo	5	25	50
TRIS-ClH	2	2	2

Tabla 9. Tubos patrón. Volúmen final: 3 ml.

La precipitación y lectura espectrofotométrica, se hace igual que en ejemplos anteriores. Como base para desarrollar este experimento, debo citar a Sutherland (1958), Butcher (1962), Veda (1971) y Chasin (1972).

3.2.3. Interacción entre histamina y teofilina en cadena traqueal de cobayo.

Animal de experimentación:

Se utilizaron cobayos Dunkin-Hartley machos de 500 a 700 gramos de peso.

Programación del experimento:

El montaje de la preparación de la cadena traqueal de cobayo fué (Castillo, 1947) ya descrita en el apartado experimental: 3.2.1-b, y la cinética de la combinación fármaco-receptor según Schild (1947). El agonista en este caso es la histamina, y el antagonista la teofilina. Primeramente se hace una curva dosis-efecto con el agonista; seguidamente se añade el antagonista en el baño y en presencia de este antagonista se repite la curva dosis-efecto con el agonista; este proceso se repite en presencia de diferentes concentraciones de antagonista, en nuestro caso de  $2 \times 10^{-5}$  M,  $4 \times 10^{-5}$  M y  $8 \times 10^{-5}$  M, de teofilina; se miden las diferentes contracciones halladas en presencia y en ausencia de antagonista, dibujando la gráfica y hallando el valor pAx ó pDx según sea la misma. Fig. 30.

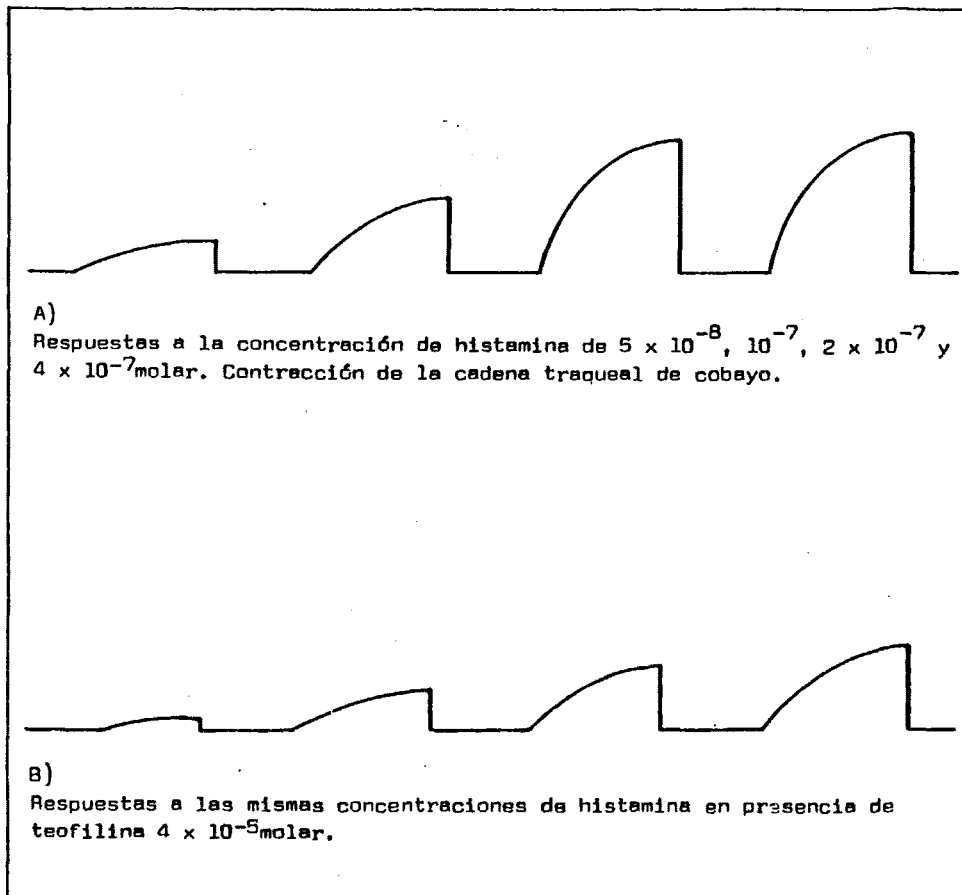


Fig. 30

3.2.4. Diferencia entre un bloqueo de receptor a nivel de la membrana sináptica (mepiramina), con un inhibidor intracitoplasmático (teofilina) en el antagonismo de la reacción de Schultz-Dale, con medida de la liberación de histamina.

Animal de experimentación.

Se utilizaron cobayos tricolores machos de 350 a 500 gramos sin considerar una cepa definida.

Descripción del método.

- Sensibilización.

Los animales se sensibilizaron con albúmina de huevo a 20 mg. K<sup>-1</sup>, disueltos en 1 ml., de suero fisiológico, el cual contenía 5% de adyuvante incompleto de Freund; se inyectaban 0.5 ml intraperitoneal y 0.5 ml subcutánea el primer y tercer días. A los 20 días se volvían a administrar 10 mg/kg de ovoalbúmina con las mismas condiciones, pudiéndose utilizar estos animales para la experimentación a partir de 10 días de esta última administración. La sensibilización es persistente.

- Reacción de Schultz-Dale.



Una vez sensibilizado el cobayo, se extrae el íleon y se lava con Tyrode (el montaje está descrito en el apartado experimental 3.2.1-a), con la peculiaridad de que se le añaden al baño 10 cm más de íleo para obtener una mayor cantidad de histamina liberada. El proceso es el siguiente:

Dejar reposar 5 minutos y lavar la preparación. A un minuto recoger el líquido nutricio control; una vez fuera del baño se le añade la ovoalbúmina:  $10 \mu\text{g/ml}$ . Rellenar y esperar un minuto; añadir  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ovoalbúmina; esperar el registro de la contracción y a los dos minutos de añadir el antígeno se recoge el líquido nutricio problema. Como consecuencia, tenemos dos líquidos nutricios con idénticos ingredientes; la única diferencia es que, uno de ellos ha estado presente durante el shock anafiláctico y el otro no. Cuando valoramos los fármacos, el ciclo sólo se modifica en que éstos se añaden un minuto antes del antígeno -en el caso del líquido nutricio problema- o una vez recogido, en el caso del líquido nutricio control. Fig. 31.

-Medición espectrofluorimétrica.

Se siguió el método simplificado de Shore (1959). Entendemos por solución inicial, el líquido nutricio control o problema (Tyrode), y también, la solución madre de la histamina disuelta en agua destilada.

a). Procedimiento:

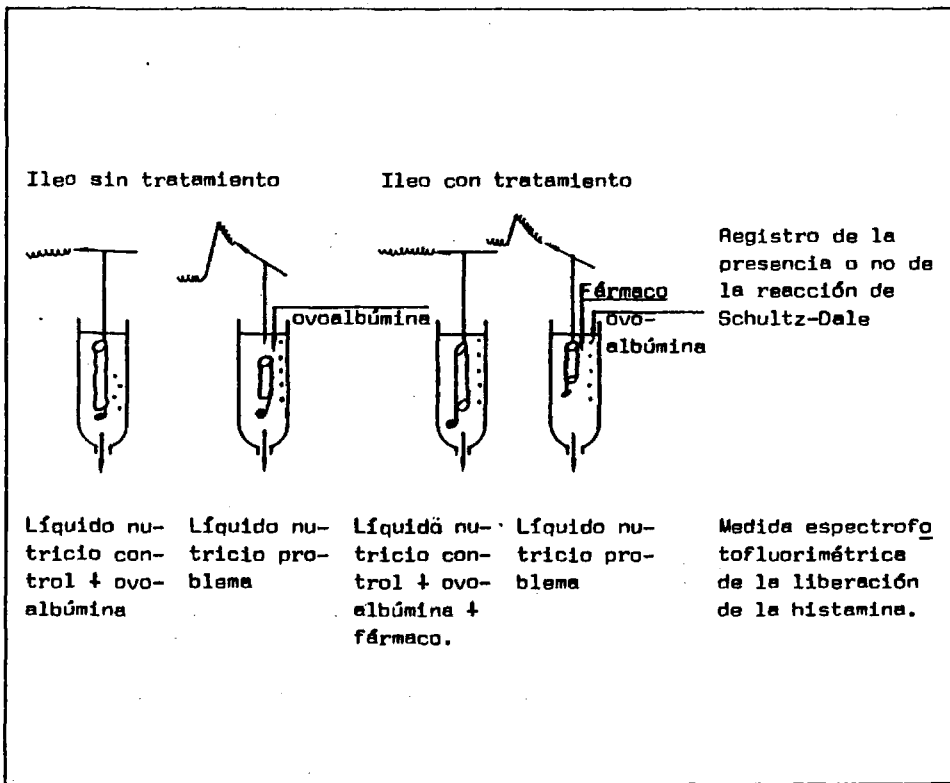


Fig. 31. Esquema del proceso; registro de la reacción de Schultz-Dale y medida espectrofluorimétrica de la histamina liberada del ileo, en el líquido nutritivo.

- 6 ml de solución inicial + 1.2 ml de TCA al 30%; de jar congelar 30 minutos.
- Agitar y centrifugar durante 10 minutos a 2000 r.p.m.
- Tomar 0.5 ml.
- Añadir y agitar sucesivamente:
  - ... 0.5 ml de H<sub>2</sub>O.
  - ... 0.2 ml de NaOH 1N.
  - ... 0.05 ml de OPT (5mg/ml en metanol)
- Esperar 4 minutos.
- Añadir 0.2 ml de ác. cítrico 2M.
- Leer en el espectrofluorímetro a los 30 minutos.

b). Condiciones del espectrofluorímetro:

- Excitación: 358 nm.
- Emisión: 446 nm.
- Escala: 0.3-1.
- Rendijas A y B: 2 mm.
- Rendijas móviles: 1 mm.
- Rendijas fotomultiplicador: 2 mm.
- Voltaje: 0.8 Kv.

Programación del experimento.

Se buscan las concentraciones molares del fármaco que inhiben la respuesta de Schultz-Dale alrededor de un cien

por cien, la del cincuenta por cien y la que no inhibe. Se recoge el líquido nutritivo y se sigue el método para evidenciar la histamina liberada, que estará en relación con el peso en seco del íleo utilizado y los mililitros totales de líquido nutritivo; las lecturas ópticas se hacen por triplicado y de cada íleon control o tratado, se hace una curva patrón con histamina a 10, 20 y 50 ng/ml, para evitar las posibles interferencias con el fármaco utilizado. Al ser diferentes las medidas ópticas del líquido nutritivo obtenido, en nuestro caso utilizábamos un baño de 20 ml, y finalmente se relacionaba con el peso seco del íleo y se hallaba el valor proporcional a 100 mg de peso en seco de íleon. Ver ejemplo: Tabla 10 y Fig. 32.

	Ileosisin tratamiento		Ileos tratados			Ileosisin tratamiento	
	Control A		Teofilina	Teofilina	Teofilina	Control B	
			0.25 mM	0.5 mM	1 mM		
Líquido nutricio	30	37	45	50	35		
control	31	33	41	56	30		
	33	34	46	49	32		
	Hist.	69	74	76	81	72	
	10ng/ml	72	71	78	79	72	
Rectas	73	73	80	83	70		
patrón							
de	Hist.	110	105	120	125	118	
hista-	20ng/ml	115	115	122	120	115	
mina	108	117	115	117	114		
	Hist.	229	225	232	241	235	
	50ng/ml	234	238	237	228	228	
	230	229	237	231	231		
Líquido nutricio	71	76	60	53	79		
problema	74	70	61	56	81		
	74	73	57	50	75		
-Reacción de Schultz- Dale							
-Peso en seco del ileo en mg	360	372	310	410	330		
-ng de histamina ha- llados con respecto a su recta patrón	10.3	9.8	4.6	0.6	11.3		
-ng histamina totales	412	392	184	24	452		
-ng de histamina por 100 mg ileo seco	114	105	59	6	137		

Tabla 10

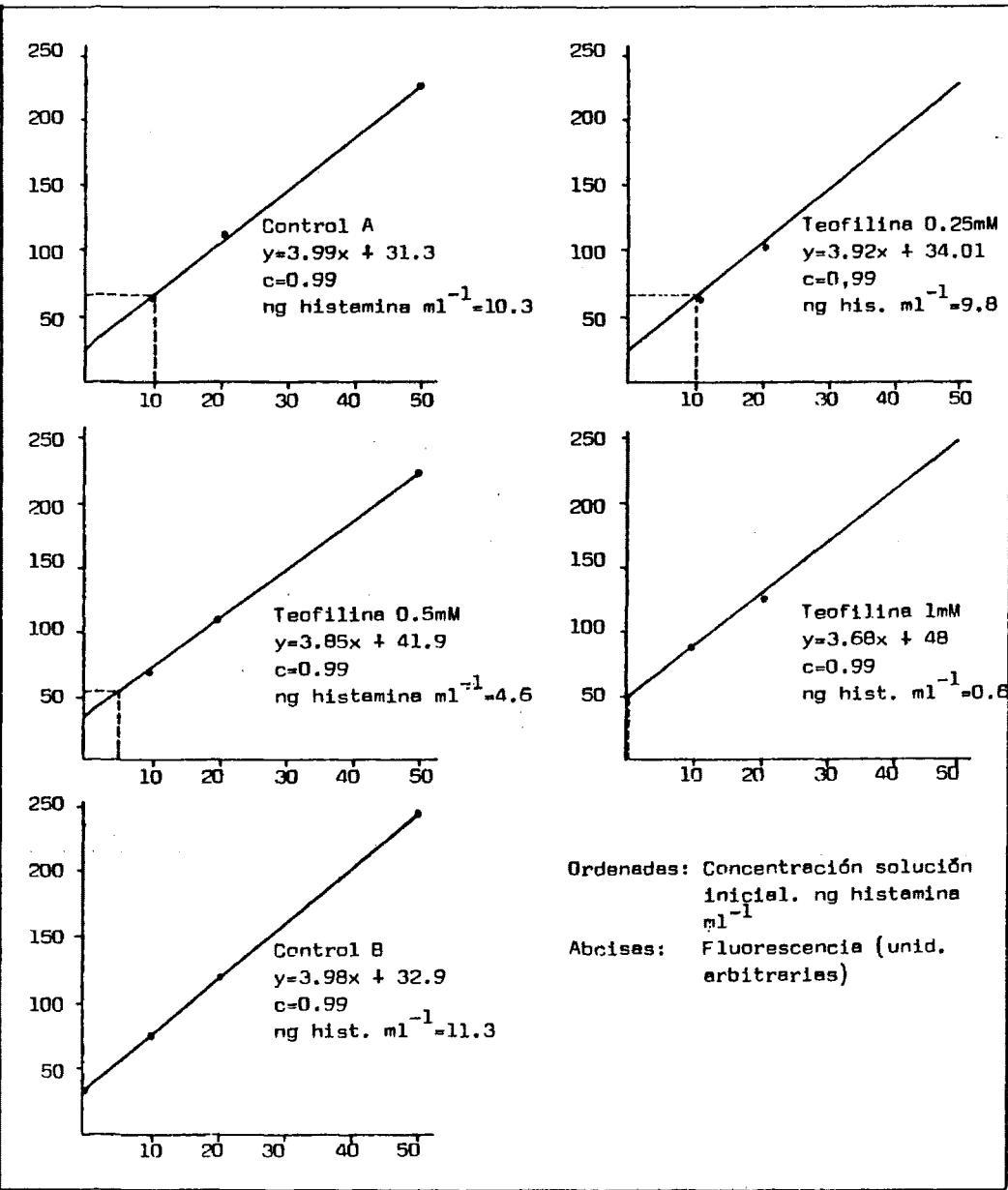


Fig. 32. Rectas patrón específicas para cada íleo según su tratamiento o no, hallando ng de histamina liberada y evitando interferencias.

3.2.5. Aplicaciones del aumento del AMPc intracelular en procesos alérgicos y asmáticos. Anafilaxia cutánea pasiva en la rata.

Animal de experimentación.

Se utilizan ratas Wistar machos de 150-170 gramos de peso, rasurándoles -previamente al experimento- el dorso. Se randomizan el tratamiento y la inyección intradérmica.

Descripción del método.

- Obtención del suero sensibilizado.

Se sensibilizan los animales con ovoalbúmina a dosis de 20 mg Kg<sup>-1</sup> disueltos en suero fisiológico, conteniendo un 5% de adyuvante de Freund; se inyecta 1 ml en total entre la vía intraperitoneal y subcutánea en los días uno, tres y quince. Se sacrifican el día veintidós, recogiendo la sangre de la arteria aorta, previa anestesia con éter. Las condiciones para obtener el suero de rata sensibilizada deben de ser rigurosas, ya que es difícil una buena sensibilización. Existen comprobaciones previas antes de sacrificar a todos los animales, tales como la reacción de Schult-Dale con el mismo antígeno, o la precipitación antígeno-anticuerpo para determinar con mayor exactitud en qué momento debe de recolectarse el suero sensibilizado.

- Procedimiento.

A los cero minutos se administran los fármacos por vía oral disueltos en metilcelulosa al dos por cien, o sólo el disolvente, según fuera el programa del experimento. A los sesenta minutos se inoculan por vía endovenosa (por las venas de la cola) 0.5 ml de una disolución de suero fisiológico que contiene el 0.5% de azul de Evans y el 0.05% de ovoalbúmina. Inmediatamente después de esta dosificación se inyectaban intradermicamente en el lomo 0.05 ml de suero sensibilizado -en nuestro caso se di-solvió a 1/8 (un octavo)-.

Debe buscarse una lesión dérmica submáxima, escogiendo previamente la disolución del suero sensibilizado, y otra intradérmica de 0.05 ml de Histamina a  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . A los 90 minutos, se sacrificaban los animales y se les cortaba la piel del dorso.

El área lesionada ofrece una nítida tinción azul, valorando su tamaño según la fórmula:

$$A = \pi \left[ \frac{d + d'}{4} \right]^2$$

siendo:

A: el área

d y d': los diferentes diámetros.



4h

4.- RESULTADOS.

4.1. PROPIEDADES IN VITRO DEL ATP Y AMPc. DISIMILITUD CON  
NEUROTRANSMISORES.

4.1.1. Ileon de cobayo.

TABLA: 11.

Se buscó la curva dosis-respuesta para comparar actividades entre los compuestos: acetilcolina, adrenalina, AMPc y ATP, utilizando cuatro animales por experimento.

A las dosis utilizadas no se detectan efectos mesurables con adrenalina ni tampoco con los compuestos ATP y AMPc.

COMPUESTO	Dosis concentración molar	Nº Experimentos	contracción íleo en cm. m. ± e.s.	% contracción respecto al máximo
Acetilcolina	$10^8$	4	$0,3 \pm 0,09$	4
Acetilcolina	$2 \times 10^{-8}$	4	$0,6 \pm 0,03$	7
Acetilcolina	$4 \times 10^{-8}$	4	$1,1 \pm 0,9$	14
Acetilcolina	$8 \times 10^{-8}$	4	$3,5 \pm 0,4$	43
Acetilcolina	$1,6 \times 10^{-7}$	4	$5,8 \pm 0,6$	72
Acetilcolina	$3,2 \times 10^{-7}$	4	$7,8 \pm 0,9$	96
Acetilcolina	$6,4 \times 10^{-7}$	4	$8,0 \pm 1$	99
Acetilcolina	$1,2 \times 10^{-6}$	4	$8,1 \pm 0,9$	100

TABLA 11

16

4.1.2. Cadena traqueal de cobayo.

TABLA: 12.

Se observa una clara contracción por parte de la acetilcolina y una manifiesta relajación con la adrenalina.

No hay respuestas apreciables a las dosis utilizadas de AMPc, ni con el ATP.

COMPUESTO	Dosis concentración molar	Nº Experimentos	Efecto en cm. m ± e.s.	% Modificación
ACETILCOLINA			CONTRACCION	
	$10^{-8}$	3	$0,3 \pm 0,02$	Δ 14
	$3 \times 10^{-8}$	3	$1,2 \pm 0,09$	Δ 55
	$10^{-7}$	3	$2,2 \pm 0,1$	Δ 100
ADRENALINA			RELAJACION	
	$10^{-8}$	3	$0,6 \pm 0,07$	↓ 21
	$3 \times 10^{-8}$	3	$1,4 \pm 0,3$	↓ 50
	$10^{-7}$	3	$2,8 \pm 0,5$	↓ 100

TABLA 12

As

4.1.3. Aurículas de cobayo.

TABLA: 13.

En este experimento fué donde se detectó mayor actividad por parte del ATP y AMPc, pero sin alcanzar la nitidez de los otros dos neurotransmisores (acetilcolina y adrenalina). Las dosis de estas dos últimas fueron mucho menores.

La adrenalina es cronotrópica e inotrópica positiva y la acetilcolina, ATP y AMP cíclico tienen acción cronotrópica e inotrópica negativa.

			CRONOTROPISMO				INOTROPISMO			
COMPUESTO	Dosis concentración molar	Nº Experimentos	Pulsación minuto línea base m. ± e.S.	Pulsación minuto después droga m. ± e.S.	Diferencia frecuencia	% Modificación	Amplitud línea base en mm. m. ± e.S.	Amplitud después droga en mm. m. ± e.S.	Diferencia contracción	% Modificación
Acetilcolina	$3 \times 10^{-9}$	5	162 ± 14	158 ± 7	- 4	2	9,5 ± 0,7	8 ± 0,6	- 1,5	16
Acetilcolina	$10^{-8}$	5	168 ± 15	141 ± 12	- 27	16	8 ± 0,9	5,5 ± 0,3	- 2,5	31
Acetilcolina	$3 \times 10^{-8}$	5	156 ± 9	116 ± 10	- 40	26	9 ± 0,6	2 ± 0,1	- 7	78
Adrenalina	$10^{-8}$	5	157 ± 11	165 ± 9	+ 12	5	8,5 ± 0,7	10 ± 0,3	+ 1,5	18
Adrenalina	$3 \times 10^{-8}$	5	142 ± 9	177 ± 8	+ 35	25	8 ± 0,8	12 ± 0,6	+ 4	50
Adrenalina	$10^{-7}$	5	159 ± 12	208 ± 10	+ 49	31	8 ± 0,5	15 ± 0,6	+ 7	88
AMP <sub>c</sub>	$10^{-5}$	5	147 ± 8	145 ± 7	- 2	1	8 ± 0,6	8 ± 0,8	—	—
AMP <sub>c</sub>	$3 \times 10^{-5}$	5	156 ± 10	147 ± 11	- 9	6	9 ± 0,6	8 ± 0,7	- 1	11
AMP <sub>c</sub>	$10^{-4}$	5	159 ± 11	144 ± 12	- 15	9	8 ± 0,5	5 ± 0,3	- 3	38
ATP	$10^{-6}$	5	151 ± 7	148 ± 6	- 3	2	9 ± 0,6	8,5 ± 0,3	- 0,5	6
ATP	$3 \times 10^{-6}$	5	147 ± 9	134 ± 9	- 13	9	8 ± 0,3	6 ± 0,2	- 2	25
ATP	$10^{-5}$	5	139 ± 6	118 ± 10	- 21	15	9 ± 0,4	4,5 ± 0,09	- 4,5	50

TABLA 13

50

4.2. TEOFILINA COMO INHIBIDOR DE LA FOSFODIESTERASA Y FOSFATASA  
ALCALINA. METODO ENZIMATICO-COLORIMETRICO (MOLIBDATO/VANA-  
DATO).

4.2.1. Reacción del AMPc a Adenosina.

TABLA: 14.

HISTOGRAMA: 1.

En la tabla 14 se detallan las dosis y número de ex-  
perimentos realizados, así como las cantidades de fósforo encon-  
trado, valorando su significancia estadística por el test de la  
"t" de Student.

En el histograma 1, se representa la inhibición cau-  
sada por la teofilina a las diferentes concentraciones.

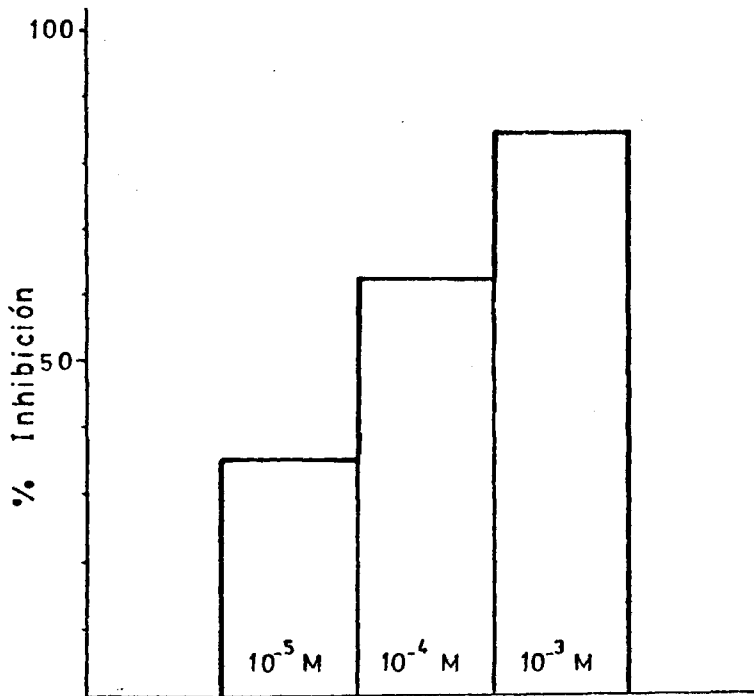


	DOSIS Concentrac. molar	Número Experimentos	Fósforo $\mu\text{g. ml}^{-1}$ $m \pm e.s.$	% Inhibición	"t" Student
Control		5	$4,8 \pm 0,4$		
Teofilina	$10^{-5}$	5	$3,1 \pm 0,6$	35	$p < 0,05$
Teofilina	$10^{-4}$	5	$1,8 \pm 0,6$	62	$p < 0,01$
Teofilina	$10^{-3}$	5	$0,7 \pm 0,4$	85	$p < 0,001$

TABLA 14

52

INHIBICION DE LA TEOFILINA A LA  
FOSFODIESTERASA Y FOSFATASA  
ALCALINA

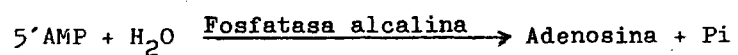


HISTOGRAMA 1. Concentración de Teofilina

4.2.2. Reacción del 5'AMP a Adenosina.

TABLA: 15.

Los resultados en este experimento vienen determinados por los valores de fósforo obtenidos según la reacción:



Estadísticamente, aplicando un método paramétrico, obtenemos unas diferencias altamente significativas.

	Dosis concentración molar	Nº Experimentos	Fósforo $\mu\text{g ml}^{-1}$ m±e.s.	% Inhibición	"t" Student
Control		4	3,3 ± 0,2		
Teofilina	10 <sup>-3</sup>	4	0,6 ± 0,09	81	p < 0,001

TABLA 15

55

#### 4.3. INTERACCION NO COMPETITIVA ENTRE HISTAMINA Y TEOFILINA.

VALOR DEL  $pd'_2$  EN CADENA TRAQUEAL DE COBAYO.

TABLA: 16.

FIGURAS: 33 y 34.

En la tabla 16, podemos observar que la histamina no logra la eficacia o actividad intrínseca en presencia de teofilina; ello nos indicará que actúan a diferente receptor.

En la figura 33, observamos un tipo de gráfica que representa una interacción no competitiva entre la teofilina y la histamina.

En la figura 34 se muestra el  $pd'_2$  de la teofilina (antagonista) con respecto a la histamina (agonista).  $pd'_2 = 4.4$ .

Nota: En la Tabla 16, % inhibición es: % inhibición respuesta máxima.

		Dosis respuesta sólo a agonista									
Dosis Agonista	Nº Experimentos	CONTRACCIONES		Teofilina: $2 \times 10^{-5}$ M		Teofilina: $4 \times 10^{-5}$ M		Teofilina: $8 \times 10^{-5}$ M			
		cm. m. $\pm$ e.s.	% Resp.	cm. m. $\pm$ e.s.	% Resp.	cm. m. $\pm$ e.s.	% Resp.	cm. m. $\pm$ e.s.	% Resp.		
$2,5 \times 10^{-8}$	4	0,43 $\pm$ 0,01	16	0,36 $\pm$ 0,06	13	0,06 $\pm$ 0,05	2	0 $\pm$ 0,0	—		
$5 \times 10^{-8}$	4	0,63 $\pm$ 0,08	24	0,46 $\pm$ 0,05	17	0,2 $\pm$ 0,02	7	0 $\pm$ 0,0	—		
10	4	1,3 $\pm$ 0,05	50	1,16 $\pm$ 0,06	44	0,56 $\pm$ 0,1	21	0 $\pm$ 0,0	—		
$2 \times 10^{-7}$	4	2,3 $\pm$ 0,1	88	2,1 $\pm$ 0,12	80	1,23 $\pm$ 0,06	47	0,03 $\pm$ 0,03	1		
$4 \times 10^{-7}$	4	2,6 $\pm$ 0,08	100	2,33 $\pm$ 0,1	89	1,5 $\pm$ 0,11	57	0,1 $\pm$ 0,05	3		

TABLA 16

15

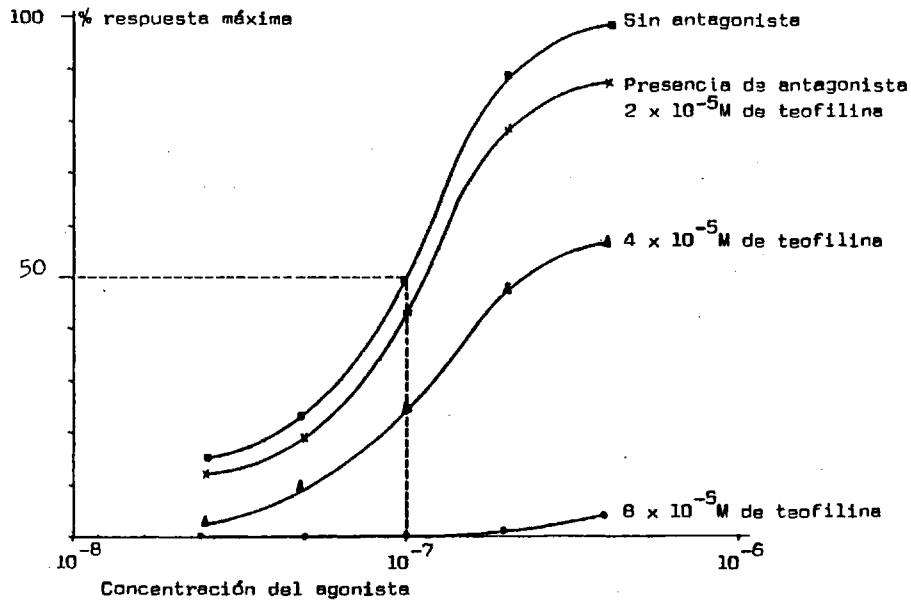


Fig. 33. Este tipo de gráfica representa una interacción no competitiva entre la teofilina y la histamina.

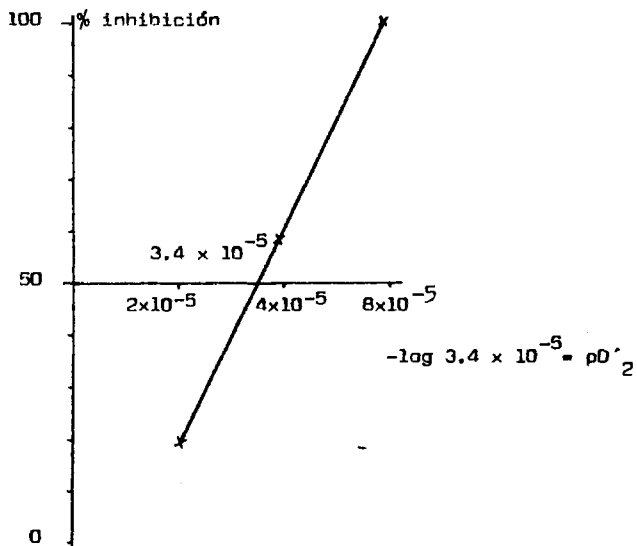


Fig. 34. El  $pD'_2$  de la teofilina (antagonista) con respecto a la histamina (agonista)  $pD'_2=4.4$ .

4.4. DIFERENCIA ENTRE UN BLOQUEO DE RECEPTOR A NIVEL DE LA MEMBRANA SINAPTICA (Mepiramina) CON UN INHIBIDOR INTRACITOPLASMATICO (Teofilina). VALORANDO EL ANTAGONISMO DE LA REACCION DE SCHULTZ-DALE CON MEDIDA DE LA LIBERACION DE HISTAMINA EN EL ESPECTROFLUORIMETRO.

TABLA: 17.

HISTOGRAMAS: 2,3,4 y 5.

En la tabla 17, observamos el bloqueo a nivel de receptor de la mepiramina sin que logre impedir la liberación de histamina. En cambio, la teofilina inhibe la liberación de histamina y el shock anafiláctico.

En los histogramas, comprobamos el bloqueo a la reacción de Schultz-Dale tanto de la teofilina como de la mepiramina a sus respectivas concentraciones. En cambio sólo teofilina inhibe la liberación de histamina.



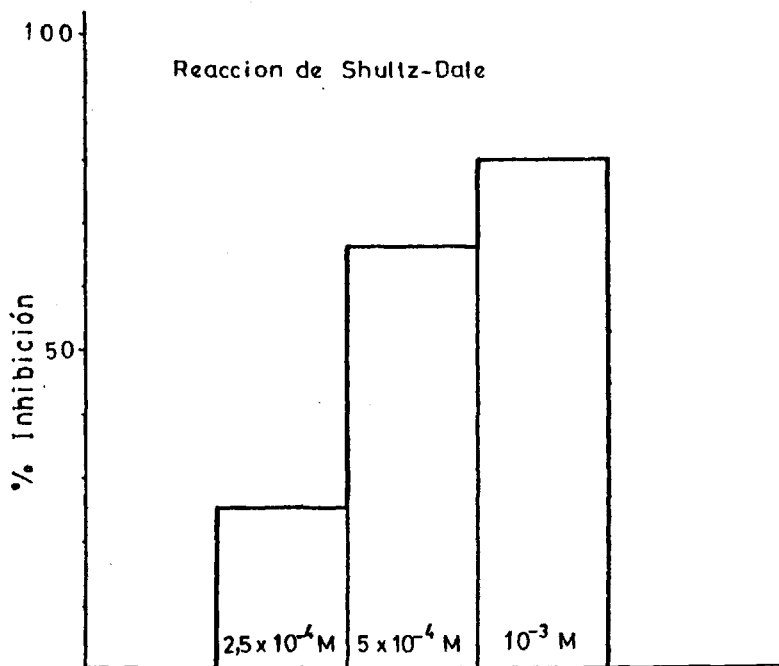
			Shultz-Dale		Liberación de Histamina	
	Dosis	N <sup>o</sup> Experimentos	Dosis ovoalbumi- na: µg/ml	% Inhibición	ng Histami- na por 100mg Ileo m±e.s.	% Inhibición
Control	—	5	10	—	141 ± 11	—
Teofilina	2,5 × 10 <sup>-4</sup>	3	10	25	137 ± 39	3
Teofilina	5 × 10 <sup>-4</sup>	3	10	66	110 ± 12	22
Teofilina	10 <sup>-3</sup> M	3	10	79	24 ± 24	83
Control	—	6	10	—	134 ± 18	—
Mepiramina	10 <sup>-9</sup> M	3	10	19	130 ± 6	3
Mepiramina	10 <sup>-8</sup> M	3	10	61	124 ± 31	7
Mepiramina	10 <sup>-7</sup> M	3	10	100	140 ± 15	0

99

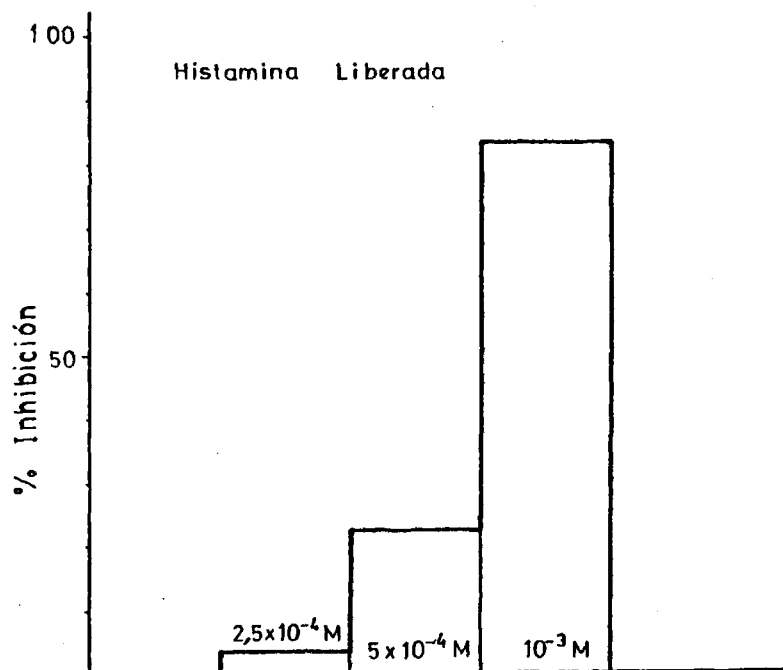
\*t  
Student  
• P < 0.05

TABLA 17

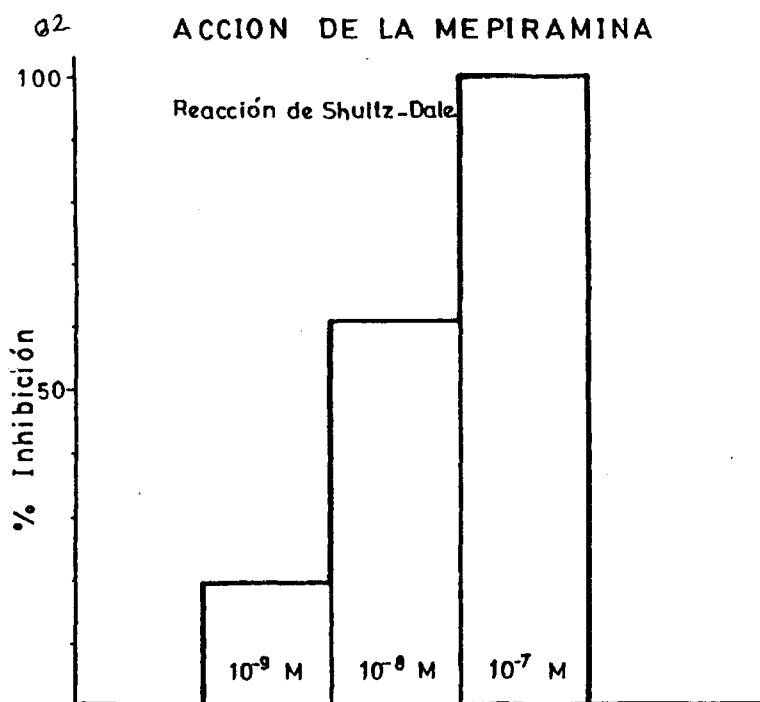
ACCIÓN DE LA TEOFILINA 61



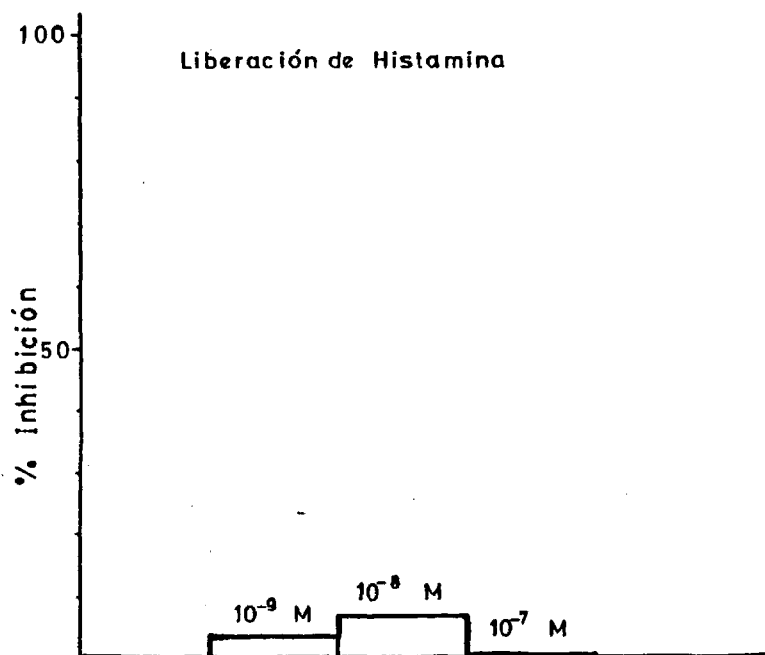
HISTOGRAMA 2. Concentración de Teofilina



HISTOGRAMA 3. Concentración de Teofilina



HISTOGRAMA 4. Concentración de Mepiramina



HISTOGRAMA 5. Concentración de Mepiramina

4.5. APLICACIONES DEL AUMENTO DEL AMPc INTRACELULAR EN PROCESOS ALERGICOS Y ASMATICOS. ANAFILAXIA CUTANEA PASIVA EN LA RATA. ESTUDIO DE LA DIFERENCIA DE ACTIVIDAD ENTRE UNA XANTINA (Teofilina) Y UN ANTIHISTAMINICO (Mepiramina).

TABLA: 18.

La teofilina inhibe con mayor uniformidad tanto a la histamina como al suero sensibilizado; en cambio la mepiramina tiene una clara preferencia por inhibir a la histamina.

Se ha valorado la significancia estadística con un modelo no paramétrico, observando las diferencias generales con el Kruskal-Wallis y comparando individualmente el grupo control con el tratado con el test de Mann-Whitney "U".

COMPUESTO	Dosis mg. Kg. <sup>-1</sup> P.O.	N° Animales	Area lesionada en mmf.			
			Histamina m±e.s.	% Inhibic.	Suero sensibili- zado: 1/8 m±e.s.	% Inhibic.
Control	—	12	39 ± 3	—	44,1 ± 2	—
Teofilina	10	12	34 ± 1	14	37,3 ± 3	15
Teofilina	30	12	27 ± 3 <sup>••</sup>	31	31,6 ± 2 <sup>••</sup>	28
Teofilina	100	12	26 ± 3 <sup>••</sup>	34	29,7 ± 2 <sup>••</sup>	33
Control	—	12	39 ± 4	—	41,1 ± 2,7	—
Teofilina	30	12	27 ± 2 <sup>•</sup>	32	28,5 ± 2 <sup>••</sup>	31
Mepiramina	3	12	28 ± 2 <sup>•</sup>	28	37,0 ± 3	10
Mepiramina	10	12	22 ± 3 <sup>••</sup>	44	33,4 ± 3 <sup>•</sup>	19
Mepiramina	30	12	16 ± 1 <sup>••</sup>	58	28,8 ± 2 <sup>••</sup>	30

\*U\* • P < 0,05

•• P < 0,01

TABLA 18

64

65

5.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

### 5. 1. PROPIEDADES "IN VITRO" DEL ATP Y AMPc. DISIMILITUD CON NEUROTRANSMISORES.

Mediante experimentos "in vitro" se diferencia la actividad de los principales neurotransmisores del sistema autónomo a nivel post-ganglionar: acetilcolina (primordialmente parasimpático) y adrenalina (fundamentalmente simpático) con respecto al ATP y al AMPc en algunos tejidos de cobayo.

Se han seleccionado varios tejidos con diferentes y contrarios efectos para poder comparar la acción de dos neurotransmisores típicos con los dos adenín-ribonucleótidos más caracterizados.

Los derivados adenílicos no logran la actividad intrínseca o eficacia de la adrenalina ni de la acetilcolina, aunque las dosis sean unas mil veces superiores a las de los neurotransmisores.

#### 5.1.1. Ileon aislado.

Las contracciones con acetilcolina son evidentes a la dosis de  $10^{-8}$  M. La adrenalina no es valorable en este método. Las respuestas al AMPc y al ATP no son evidentes a estas do

sis, siendo necesario utilizar concentraciones de 10 a 100  $\mu$ M de estos compuestos para unas respuestas con una eficacia mucho menor (Anadón, 1976).

#### 5.1.2. Cadena traqueal.

La acetilcolina contrae a unas dosis de  $10^{-8}$  M; a esta misma dosis la adrenalina relaja. Con los adenín-ribonucleótidos, no hay actividad a estas concentraciones. Brown en 1979, empieza a ver unos leves efectos a las dosis de 10  $\mu$ M. con leve tendencia miorrelajante.

#### 5.1.3. Aurículas de cobayo.

Las diferencias aquí se patentizan aún más. Son necesarias dosis diez mil veces más altas de ATP y AMPc para comparar sus actividades sin llegar a la eficacia de los neurotransmisores humorales.

Los adenín-ribonucleótidos, al igual que la acetilcolina, se comportan cronotrópica e inotrópicamente negativos (Collis, 1981, también observó este efecto); no en cambio la adrenalina que aumenta tanto el ritmo como la amplitud de la aurícula.



5.2. TEOFILINA COMO INHIBIDOR DE LA FOSFODIESTERASA Y FOSFATASA  
ALCALINA. METODO ENZIMATICO-COLORIMETRICO.

Es conocida la actividad de la teofilina como inhibidora de la fosfodiesterasa: Bertelli (1973) y Kramer (1977). Se ha querido comprobar cuál es el comportamiento de este fármaco en un sistema multienzimático, donde los principales sustratos fuesen derivados adenílicos, viendo en qué modo modificaba o inhibía estas reacciones enzimáticas.

Como se ha visto en la metodología el desarrollo del método enzimático no es suficiente; se observa la acción de la fosfodiesterasa, pero no se detecta la inhibición por la teofilina, ya que hay una superposición de las curvas espectrofotométricas, por lo tanto la lectura de inhibiciones se hace errónea o poco rigurosa, ya que su absorbancia está por encima de la proporcionalidad entre concentración y lectura óptica; ello explica la poca sensibilidad de este método, resultando poco apropiado para valorar esta acción al no precisar con nitidez la interacción existente entre enzima-sustrato. Debido a ello, es necesario - dado el primer paso enzimático - colorearlas según el método de Zilversmit (1950) (molibdato/vanadato).

Hay una clara inhibición de la xantina (teofilina) a la fosfodiesterasa así como a la fosfatasa alcalina.

Se ha utilizado la "t" de Student para comparar estadísticamente los grupos tratados de los no tratados, existiendo una clara diferenciación entre ellos; llegando a las dosis de teofilina de  $10^{-3}$  M a diferencias muy significativas:  $p < 0.001$ .

Se observa que la teofilina no es una inhibidora específica de la fosfodiesterasa, sino que también inhibe a la fosfatasa alcalina. Croce (1978), ya advirtió que las xantinas sustituidas bloqueaban a la fosfatasa alcalina. La pequeña diferencia de niveles de fósforo encontrado entre el primer experimento y el segundo, lo atribuimos a que partiendo de la misma concentración molar tanto de AMPc como de 5'AMP, y conteniendo una molécula de fósforo cada uno, son sus pesos moleculares distintos, y al valorar el contenido de fósforo en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , hallamos menos fósforo en el 5'AMP, ya que su peso molecular es mayor y proporcionalmente contendrá menos fósforo.

5.3. INTERACCION NO COMPETITIVA ENTRE HISTAMINA Y TEOFILINA.  
VALOR DEL  $pD_2$  EN CADEN TRAQUEAL DE COBAYO.

Murad (1974), expone los mecanismos de acción de algunos broncodilatadores en la cadena traqueal, relacionándolos con el metabolismo de los nucleótidos cíclicos; previamente había demostrado la existencia de los mismos en incubaciones de la cadena traqueal de cobayos. Lohmann (1977) observa que la teofilina, entre otros fármacos, relaja la cadena traqueal; Creese (1980), da a conocer el mecanismo de acción de la histamina en la cadena traqueal de cobayo. Con el diseño de este experimento se pretendía valorar el comportamiento cinético de la teofilina y la histamina en la cadena traqueal de cobayo para poder conocer si su interacción era competitiva o no competitiva y de ese modo ver si actúan en el mismo o diferente receptor.

La respuesta del agonista histamina en presencia de teofilina, no logra su eficacia aunque aumentemos considerablemente su dosis. Nos ofrece una representación típica no competitiva entre teofilina e histamina, cuyo  $pD_2$  es 4.4, preconizando la diferencia de receptores entre estos dos fármacos.

5.4. DIFERENCIA ENTRE UN BLOQUEO DE RECEPTOR A NIVEL DE LA MEMBRANA SINAPTICA (Mepiramina) CON UN INHIBIDOR INTRACITOPLASMATICO (Teofilina), VALORANDO EL ANTAGONISMO DE LA REACCION DE SCHULTZ-DALE CON MEDIDA DE LA LIBERACION DE HISTAMINA EN EL ESPECTROFLUORIMETRO.

Schultz (1910) y Dale (1913), demostraron una reacción anafiláctica "in vitro", en la cual el íleon de cobayo respondía solamente con el antígeno específico, con el que había sido previamente sensibilizado el cobayo. Schild (1936), valoró que esta respuesta de contracción del íleon de cobayo sensibilizado (reacción de Schultz-Dale), iba acompañada de una liberación de histamina. Dale (1970) midió la cantidad de histamina liberada por el íleon de cobayo en esta reacción, a los diferentes tiempos y dosis de antígeno. Llupíá (1981) diferenció el comportamiento de algunos fármacos ante la reacción de Schultz-Dale y su liberación de histamina. Este ensayo fue diseñado especialmente para diferenciar los diversos modos de acción de la teofilina y la mepiramina.

Con mepiramina bloqueamos completamente la contracción pero no la histamina liberada; con teofilina hay una inhibición casi completa de la contracción y de la liberación de histamina.

Utilizamos el test paramétrico de la "t" de Student

para diferenciar estadísticamente estos grupos. Hallamos valores significativos sólo en la inhibición de la liberación de histamina a dosis altas de teofilina:  $10^{-3}$  M.

5.5. APLICACIONES DEL AUMENTO DEL AMPc INTRACELULAR EN PROCESOS ALERGICOS Y ASMATICOS. ANAFILAXIA CUTANEA EN RATA. DESIGUAL ACTIVIDAD ENTRE UNA XANTINA (Teofilina) Y UN ANTIHISTAMINICO (Mepiramina).

Koopman (1970) y Parker (1973), han insistido en la influencia de los adenín-ribonucleótidos en las reacciones anafilácticas; Austen (1975), ha observado que si el nivel de AMPc es alto, inhibe la liberación de histamina y otros mediadores de acción anafiláctica.

En este experimento hemos querido diferenciar entre el efecto por anafilaxia cutánea pasiva según Ovary (1963) y la lesión cutánea de la histamina, comprobando el efecto de un inhibidor del metabolismo adenílico (teofilina) y un antihistamínico (mepiramina), y esto porque:

1º.- Es un método clásico para detectar actividades antagonistas a determinados fármacos. En este caso lo utilizamos para observar como una xantina, que aumenta los niveles de AMPc, hace disminuir las lesiones cutáneas anafilácticas.

2º.- Las lesiones cutáneas producidas por histamina y por el antígeno son inhibidas con parecido paralelismo por la teofilina; en cambio hay una clara afinidad de la mepiramina para bloquear la lesión por histamina, siendo mucho menos eficaz para la anafilaxia cutánea pasiva.

Se ha utilizado un test estadístico no paramétrico, ya que las lecturas de las áreas lesionadas es subjetivo y puede existir excesiva variabilidad; aunque el experimento esté randomizado, se considera más adecuado el uso de estos modelos porque es de mayor rigurosidad. Primeramente se vió la existencia de diferencias entre todos los grupos hallando la " $H_0$ " de Kruskal-Wallis y seguidamente se diferenció grupo por grupo con el test de Mann-Whitney viendo sus niveles de significancia estadística.

75

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.



Considerando estos resultados, llegamos a las siguientes conclusiones:

Primera conclusión:

Las dosis de los neurotransmisores utilizados - tanto de adrenalina como de acetilcolina - en las pruebas "in vitro" realizadas: Ileon, cadena traqueal y aurícula de c<sub>o</sub>bayo, vienen a ser de unas mil a diez mil veces menores que las de los derivados adenílicos.

Segunda conclusión:

Los adenín-ribonucleótidos no logran la actividad intrínseca o eficacia de los neurotransmisores.

Tercera conclusión:

Dada la poca actividad de los adenín-fosfatos a nivel de la membrana celular, se ha utilizado una xantina (teofilina) relacionada estructuralmente con los adenín-ribonucleótidos, pues posee un anillo púrico y funcionalmente inhibe la fosfodiesterasa, quedando de este modo aumentados los niveles de AMPc.

Cuarta conclusión: -

Este mismo fármaco, la teofilina, también inhibe a la fos

fatasa alcalina - enzima que cataliza el paso de 5'AMP a adenosina - implicando por tanto un incremento de los adenín-fosfatos.

Quinta conclusión:

Valorando el  $pD_2$  de acción no competitiva entre la histamina y la teofilina a nivel de la cadena traqueal de co-bayo, se deduce que los receptores para cada una de estas substancias son diferentes.

Sexta conclusión:

Valorando la reacción de Schultz-Dale y la medida espectrofluorimétrica de la histamina liberada, determinamos que el mecanismo de acción de un antihistamínico  $H_1$  consiste en el bloqueo de este receptor, mientras que la acción de la teofilina estriba en impedir la liberación de la histamina.

Séptima conclusión:

El aumento intracitoplasmático de los adenosín-fosfatos, frena la liberación de histamina; por lo tanto, conlleva propiedades antianafilácticas.



Octava conclusión:

Las lesiones por anafilaxia cutánea pasiva en rata quedan inhibidas cuando los niveles de AMPc están aumentados.

CONCLUSION GENERAL:

Por todo ello, podemos dar mayor credibilidad o considerar más acertada la teoría de Greengard (1978) que, aceptando la gran importancia de estos adenín-ribonucleótidos, los propone no como neurotransmisores, sino como mediadores y moduladores intracitoplasmáticos.

79

7.- BIBLIOGRAFIA.

- ALEGRIA, E.- Manual de Farmacología Cardiovascular. Ed. Eunsa; (1977), p. 13-35.
- ANADON, A.- Cronofarmacología del fenómeno de rebote producido por estímulos intramurales en intestinos con inhibición vegetativa. Arch. de Farmacol. y Toxicol; II. p. 133-142, (1976).
- ARIENS, E.J.- Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. Part I Arch. int. Pharmacodyn. Théor., 99: 32-49, (1954).
- ARIENS, E.J. y J.M. VAN ROSSUM.-  $pD_x'$ ,  $pA_x$  y  $pD'_x$  values in the analysis of pharmacodynamics. Arch. int. Pharmacodyn., 110: 275-299, (1957).
- AUSTEN, K.F. y R.P. ORANGE.- Bronchial asthmas the possible role of the chemical mediator of immediate hypersensitivity in the pathogenesis of subacute chronic disease. Am. Rev. Respir. Dis; 112: 423-436, (1975).
- AVNER, S.E.- Beta-adrenergic bronchodilators. Pediatr. Clin. North. Am., 22: 129-139, (1975).
- BABOR, J.A. y J. IBARZ.- Ley de acción de masas. En Química Gene-

ral Moderna. Ed. Marín, (1977); p. 291-293.

BABOR, J.A. y J.IBARZ.- Enzimas. En: Química General Moderna.Ed. Marín, (1977); p. 1062-1065.

BALDESSARINI, R.J.- Release of catecholamines. En: Handbook of Psychopharmacology. Ed. L.L. Iversen; S.D. Iversen y S.H. Snyder, (1975), p. 37-137.

BERTELLI, A., C. BIANCHI, y L. BEANI.- Interaction between Beta-Adrenergic stimulant and Phosphodiesterase Inhibiting Drugs on the Bronchial Muscle. *Experientia.*, 29: 300-302, (1973).

BESSON, M., A.CHERAMY, C.GAUCHI, y J. GLODWINSKY.- In vivo continuous estimation of <sup>3</sup>H-dopamine synthesis and release in the cat caudate nucleus. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 278: 101-105, (1973).

BLACK, J.W., W.A.M. DUNCAN, C.J. DURANT, C.R. GANELLIN y E.H. PARSONS.- Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> receptors. *Nature Lond.*, 236: 385-390, (1972).

BLASCHKO, H.- The specific action of L-DOPA decarboxilase. *J. Physiol. (Lond.)*, 96: 50-51, (1939).

BORTOFF, A.- Myogenic control of intestinal motility. *Physiol.*

Rev., 56: 418-424, (1976).

BOTAR, J.- The autonomic system. Ed. Akademici Kiado, Budapest, (1966).

BRIGGS, G.E., y J.B.S. HALDANE.- A criticism of Michaelis and Menten's equation. Biochem. J., 19: 338-339, (1925).

BROWN, C., G. BURNSTOCK y T. COCKS.- Effects of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and methylene ATP on the rat urinary bladder. Br. J. Pharmac., 65: 95-102, (1979).

BUCHANAN, J.M.- Enzymic synthesis of the purine nucleotides. Harvey Lectures., 54: 104-130, (1960).

BURNSTOCK, G.- Purinergic nerves. Pharmac. Rev., 24: 509-581, (1972).

BURNSTOCK, G., T. COCKS, R. CROWE y L. KASAKOV.- Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. Br. J. Pharmac., 63: 125-138, (1978).

BUTCHER, R.W. y E.W. SUTHERLAND.- Adenosine 3', 5'-phosphate in biological materials I. Purification and properties of cyclic-3', 5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3'-5'-phosphate in human urine. J. Biol. Chem., 237: 1244-1250, (1962).

CANTAROW, A., y B. SCHEPARTZ.- Enzimas. Bioquímica 4ª ed., Ed. Interamericana (1969), p. 205-251.

CASTILLO y DE BEER.- Tracheal chain. En: Pharmacological Experiments on Isolated preparations. 2ª ed., Ed. Churchill Livingstone (1980), p. 100-103.

CLARK, A.J.- The antagonism of acetylcholine by atropine. J. Physiol., 61: 547-556, (1926).

COLLIS, M.G., y S.J. PETTINGER.- Can ATP activate P<sub>1</sub> purine receptor in the guinea-pig atrium. British Pharmacological Society, 16 a 18 December. (1981), C-119.

CREESE, B.R., y M.A. DEMBOROUGH.- The effect of histamine on cyclic AMP levels in guinea-pig tracheal smooth muscle. European J. Pharmacol., 66: 95-101, (1980).

CROCE, M.A., G.L. KRAMER y D.L. GARBERS.- Inhibition of alkaline phosphatase by substituted xantines. Biochem. Pharmacology. 28: 1227-1231, (1979).

CROSSLAND, J.- Receptors. En: Lewis's Pharmacology. Ed. Churchill Livingstone (1971), p. 62-84.



- CUENCA, E.- Inhibidores presinápticos de la terminación adrenérgica. Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Vol. IV: 119-130, (1978). Fundación García Muñoz.
- CURTIS, D.R. y J.M. CRAWFORD.- Central synaptic transmission-microelectrophoretic studies. A. Rev. Pharmac., 9: 209-240, (1969).
- CURTIS, D.R. y G.A.R. JOHNSTON.- Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.*, 69: 97-188, (1974).
- CHASIN, M., D.N. HARRIS, M.B. PHILLIPS y S.M. HESS.- 1-ethyl-4-(isopropylidenehydrazino)-1H-pyrazolo-(3,4-b)-pyridine-5-carboxylic acid, ethyl ester, hydrochloride (SQ 20009). A potent new inhibitor of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 244-2450, (1972).
- CHURCH, M.K.- Cromoglicate-like anti allergic drugs: A review. *Drugs of Today* vol. 14 nº:7 p. 281-341, (1978).
- DALE, H.H.- The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 4: 167-223, (1913)
- DALE, H.H., y L. ZILLETI.- The Schultz-Dale response of the lon

itudinal muscle strip preparation of guinea-pig ileum.  
Br. J. Pharmac., 39: 542-555, (1970).

DAVENPORT, H.W.- Aparato neuromuscular del tubo digestivo inferior. En: Fisiología de la Digestión. Ed. Interamericana (1968), p. 18-35.

DAVIS, B.D., R. DULBECCO, H.N. EISEN, H.S. GINSBERG y W.B. WOOD.- Hipersensibilidad. En: Tratados de Microbiología. Ed. Salvat. (1977), p. 537-593.

DUNLOP, D., y R.G. SHANKS.- Selective blockade of adrenoceptive beta-receptors in the heart. Br.J.Pharmac., 32: 201-218, (1968).

ERANKO, O., y L. ERANKO.- Small, intensely fluorescent granule-containing cells in the sympathetic ganglion of the rat. En: Histochemistry of Nervous Transmission. Ed. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, (1971), p. 39-51.

FRIED, R.C. y M.P. BLAUSTEIN.- Synaptic vesicles recycling in synaptosomes in vitro. Nature 261: 255-256, (1976).

GANONG, W.F.- Fisiología de las células nerviosas y musculares. En: Manual de Fisiología Médica. Ed. Manual Moderno. (1980) p. 24-39.

- GARATTINI, S., y L. VALZELLI.- Serotonin and the gastrointestinal tract. En. Serotonin. Ed. Elsevier, Amsterdam, (1965), p. 82-102.
- GARCIA-DIEZ, J.M., y F.J. MORALES-OLIVAS.- Derivados adenílicos. Transmisión purinérgica. En: Perspectivas Terapéuticas con su Fundamento Farmacológico, vol IV, 2ª edición, editado por J. Espluges, (1978), p. 271-286.
- GIUDICELLI, J.F.- Calcul des pAx. J.Pharmacol.,2: 373-380,(1971)
- GLOWINSKI, J.- Properties and functions of intraneuronal monoamine compartments in central aminergic neurons. En: Handbook of Psychopharmacology. Ed. L.L. Iversen, S.D. Iversen, S.H. Snyder, Plenum, New York (1975), p. 139-167.
- GOKHALE, S.D.- Potentiation of inhibitory and excitatory effects of catecholamines by bretylium. Brit. J. Pharmacol.16: 327, (1961).
- GREENGARD, P.- Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science.192: 218, (1978).
- GUYTON, A.C.- Inervación del intestino. En: Tratado de Fisiología Médica. Ed. Interamericana (1971), p. 787-788.
- HILLARP, N.A.- The constitution and functional organization of

the autonomic innervation apparatus. Acta Physiol. Scandinav.; 46: 1-38, (1959).

HODGKIN, A.L., y A.F. HUXLEY.- Properties of nerve axons. I. Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 17: 43-52, (1952).

HOLTON, P.- The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. J. Physiol-Lond., 145: 494-504, (1959).

HORN, A.S.- Characteristics of neuronal dopamine uptake. En: Advances in Biochemical Pharmacology. Ed. P.J. Roberts, G.N. Woodruff, & L.L. Iversen, Raven Press, New York, (1978), 19: 25-34.

HORNYKIEWICZ, O.- Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic indications (including the clinical use of L-DOFA). Br. Med. Bull., 29: 172-178, (1973).

HUTCHINSON, D.W.- Nucleosides and coenzymes. Ed. Methuen Co., (1964), London.

JACOB, F., y J. MONOD.- Genes of structure and genes of regulation in the biosynthesis of proteins. Compt. rend., 249: 1282-1284, (1959).

- JACOB, F., y J. MONOD.- Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3: 318-356,(1961).
- KARLSON, P.- Acidos nucléicos y biosíntesis de proteínas. En: *Manual de Bioquímica*. Ed. Marín, (1969), p. 112-145.
- KOELLE, G.B.- Transmisión neurohumoral y sistema nervioso autónomo. En: *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, editado por L.S. Goodman y A. Gilman. Ed. Interamericana, (1978), p. 340-374.
- KOSHLAND, D.J., y K.E. NEET.- The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 37: 359,(1968).
- KRAMER, G.L., J.E. GARST, S.S. MITCHEL, y J.N. WELLS.- Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases by analogues of 1-Methyl- $\beta$ -isobutylxantine. *Biochemistry*, 16: 3316-3321, (1977).
- KREBS, H.A.- Body size and tissue respiration. *Biochim. et Biophys. Acta*, 4: 249-269, (1950).
- LANE, J.D. y H.H. APRISON.- Calcium-dependent release of endogenous serotonin, dopamine and norepinephrine from nerve endings. *Life Sci.*, 20: 665-672, (1977).

LANGLEY, J.N.- On the mutual antagonism of atropin and pilocarpin, having especial reference to their relations in the sub-maxillary gland of the cat. J. Physiol., 1:339-369, (1878).

LINEWEAVER, H., y D. BURK.- Determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-666, (1934).

LIVETT, B.G.- Histochemical visualization of peripheral and central adrenergic neurones. Brit. Med. Bull., 29: 93-99, (1973).

LOCKE, F.S.- Zentbl. Physiol., 14: 670, (1900). En: Physiological salt solutions. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. Ed. Churchill Livingstone, (1980), p. 152-153.

LOHMANN, S.M.- Effects of isoproterenol, theophylline and carbachol on cyclic nucleotide levels and relaxation of bovine tracheal smooth muscle. Biochim. Biophys. Acta 499:238, (1977).

LYNCH, H.J., S.S. RAPHAEL, L.D. MELLOR, P.D. SPARE y M.J.H. INWOOD.- Métodos de análisis. En: Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana, (1972), p. 64-92.

LLUPIA, J. y D. ROBERTS.- The Schultz-Dale reaction in guinea-pig ileum as a test model for antianaphylactic drugs.

Tercer encuentro Hispano-Francés. Toulouse (1981),  
p. 123.

MAGNUS, R.- Pflügers Arch. ges. Physiol., 102: 123, (1904). En:  
Experiments with intestinal smooth muscle. Pharmacological  
Experiments on Isolated Preparations. Ed. Churchill  
Livingstone, (1980), p. 58-63.

MICHAEL, CH.- Psicología fisiológica. En: Procesamiento de las  
imágenes visuales en la retina. Ed. Blume (1963), p.  
327-336.

MICHAELIS, L., y M.L. MENTEN.- Kinetics of invertase action. Bi  
chem. Z., 49: 333-369, (1913).

MONOD, J., J.P. CHANGEUX, y F. JACOB.- Allosteric proteins and  
cellular control systems. J. Mol. Biol. 6: 306-329,  
(1963).

MOSER, M., B. BRODOFF, A. MILLER, y A.G. GOLDMAN.- Paraglyline  
treatment of hypertension. Jama, 187: 192, (1964).

MURAD, F., y H. KIMURA.- Cyclic nucleotide levels in incubati-  
ons of guinea-pig trachea. Biochem. Biophys. Acta 343  
275, (1974).

NATHANSON, J.A., y P. GREENGARD.- Second messengers in the bra  
Nerve cells communicate by secreting neurotransmitte

these chemical messages are translated by second messengers within the cell into transient and longer-lasting physiological action. *Scientific. American.*, 237: 108-119, (1977).

ORANGE, R.P., y K.F. AUSTEN.- Immunological release of the chemical mediators of anaphylaxis in identification of asthma. Ciba Foundation study. Ed. R. Porter y Birch, J. Churchill-Livingstone Ltd. London (1971), p. 99-110.

OVARY, Z.- Properties of guinea-pig 7S antibodies II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and systemic anaphylaxis. *J. Exp. Med.*, 117: 951, (1963).

PARQUER, C.W. y J.W. SMITH.- Alterations in cyclic adenosine monophosphate metabolism in human bronchial asthma. I. Leukocyte responsiveness to Beta-adrenergic agents. *J. Clin. Invest.*, 52: 48-59, (1973).

POLIDORO, G., M. CICCONE, y P.L. IPATA.- Nuevo método espectrofotométrico per la determinazione dell'attività adenilato ciclico fosfodiesterasica. *Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale.*, 46: 582-586, (1970).

RAITERI, M., F. CERRITO, A.M. CERRONI, R. DELCARMINE, M.J. RIBERA,



- y G. LEVI.- Studies on dopamine uptake and release in synaptosomes. En: Dopamine. Advances in Biochemical Psychopharmacology. Ed. P.J. Roberts, G.N. Woodruff, L.L. Iversen, Raven Press. New York, (1978), 19:35-56.
- ROBERTS, D.- Modo de acción de clebopride como bloqueante selectivo de los receptores dopamínicos periféricos y centrales. Revista Española de las enfermedades del aparato digestivo. Septiembre. Tomo LVI. Supl. I. (1979), p. 7-42.
- RODWELL, V.- Enzimas. En: Manual de Química Fisiológica, editado por H.A. Harper. Ed. Manual Moderno (1974), p. 135-181
- RYALL, R.W.- Techniques used to study transmitters and drug action in the C.N.S. En: Cambridge University Press (1978) p. 42-51.
- SAH, H.J., P.P.T. SAH, y S.A. PEOPLES.- The new antihypertensive agent, guanethidine a review. *Arzneim. Forsch.*, 1: 53, (1966).
- SCHILD, H.O.- Histamine release in anaphylactic shock from various tissues of the guinea-pig. *J. Physiol. Lond.*, 92: 393-403, (1936).
- SCHILD, H.O.- pa a new scale for the measurement of drug antago

nism. Br. J. Pharmac. Chemoter., 2: 189-206, (1947).

SCHULTZ, W.H.- Physiological studies in anaphylaxis. I. The reaction of smooth muscle of the guinea-pig sensitized with horse serum. J. Pharmacol.exp.Ther., 1: (1910), p.549-566.

SCHUMANN, H.J. y I. HELLER.- Uber den hydroxytyramin gehalt der organe. Arch. exp. Path. Pharmak. , 236: 474-482, (1959).

SHORE, P.A., A. BURKHALTEN, y V.H. COHN.- A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. J. Pharmac. exp. ther., 127: 182-186, (1959).

SILINSKY, E.M., y J.I. HUBBARD.- Release of ATP from rat motor nerve terminals. Nature, London, 243: 404-405, (1973).

SMITH, A.- Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves. Br. Med. Bull., 29: 123-129, (1973).

STEPHENSON, R.P.- A modification of receptor theory. Br. J. Pharmac. Chemoter., 11: 379-393, (1956).

SUTHERLAND, E.W., y T.W. RALL.- Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J. Biol. Chem., 232: 1077-1091, (1958).

- TARRUS, E.- Imidazoles y sus interacciones con enzimas dependientes de metales. Tesis doctoral. Facultad de química de la Universidad de Barcelona, (1978).
- TOMAS, J.N.- Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos. Fundación Juan March. Serie Universitaria nº:161, (1981).
- TYRODE, M.- Action of some purgative salts. Arch. Intern. Pharmacodyn., 22: 205-222, (1910). En: Physiological salt solutions. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. Ed. Churchill Livingstone, (1980), p.152-153
- VEDA, Y., y F. OKUMURA.- Effects of cloroform, diethy-ether and propiophenone derivative 3-dimethylamino-2-methyl-2-phenoxipropiophenone hydrochloride, upon cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Biochem. Pharmacol., 20: 1967-1971, (1971).
- WATSON, J.D.- Molecular biology of the gene. Ed. Benjamin Inc., Nueva York-Amsterdam, (1965).
- WEBB-JOHNSON, D.C., M.B., B. CHIR, y J.L. ANDREWUS.- Bronchodilator therapy. The New England Journal of Medicine., 297: 476-482, (1977).
- ZILVERSMIT, D.B., y A.K. DAVIS.- Microdetermination of plasma

-95-

phospholipides by trichloroacetic acid precipitation.

J. Lab. Clin. Med., 35: 155-160, (1950).



BIBLIOTECA