

Influencia de catecolaminas endógenas en las respuestas del pulmón de rata a agonistas β -adrenérgicos

M. L. Candenas* y E. Anselmi

Departamento de Farmacología y Farmacotecnia
(Farmacognosia y Farmacodinamia)
Facultad de Farmacia
46010-Valencia (España)

(Recibido el 21 de diciembre de 1987)

M.L. CANDENAS and E. ANSELM. *Effect of Endogenous Catecholamines on Lung Responses to β -adrenoceptor Agonists in Rat*. Rev. esp. Fisiol., 44 (4), 375-380, 1988.

Relaxation responses to the β -adrenoceptor agonists: isoprenaline (non selective), salbutamol (β_2 -selective) and noradrenaline (plus phentolamine $10^{-5}M$) (β_1 -selective) have been obtained on rat lung parenchymal strips in the absence and presence of pargyline and tropolone (monoaminoxidase and catechol-O-methyltransferase inhibitors), cocaine (neuronal uptake blocking agent), corticosterone (extraneuronal uptake inhibitor) as well as in reserpinized rat. Responses to these β -adrenergic agonists were not potentiated in the presence of any of these inhibitors. This indicates that endogenous catecholamines, enzymatic or uptake processes, do not modulate β -adrenoceptor mediated responses of rat lung strip and demonstrates that there is no correlation between neuronal uptake/ β_1 -adrenoceptors and extraneuronal uptake/ β_2 -adrenoceptor mediated responses, as had previously been suggested.

Key words: Lung, β -Adrenoceptor agonists, Reserpine, Dissipation mechanisms.

La preparación de segmento aislado de parénquima pulmonar de rata descrita por LULICH *et al.* (13) ha sido objeto de múltiples controversias en lo referente a su validez como modelo representativo de las vías aéreas periféricas (6,7). Sin embargo, el parénquima pulmonar continúa siendo un territorio muy rico en receptores β -adrenérgicos (12) y recientemente se ha demostrado que el segmento aislado de pulmón de rata constituye un modelo adecuado para el estudio de fármacos que actúan a nivel de receptores β_2 (5).

En el presente trabajo, teniendo en cuenta que la potencia de un agonista depende de la concentración que alcance a nivel de la biofase, se estudia la posible influencia de las catecolaminas endógenas, procesos de degradación enzimática por la COMT y la MAO y recaptación neuronal y extraneuronal de aminas en las respuestas del segmento de pulmón de rata a isoprenalina (agonista no selectivo β_1 y β_2), salbutamol agonista β_2 —selectivo) y noradrenalina (agonista β_1 -selectivo), con el fin de determinar si alguno de estos procesos modifica la concentración de un agonista β -adrenérgico a nivel de sus receptores.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Se emplearon ratas Wistar machos adultas (200-260 g), utilizando la técnica de segmentos de pulmón aislado (13). Los segmentos de pulmón se colocaron en la copa de un baño de órganos aislados a una temperatura de 37° C y con burbujeo gaseoso constante (95 % de O₂ y 5 % de CO₂). Como líquido nutricio se empleó el Krebs-Henseleit modificado (pH 7,2-7,4), al que se adicionó NaMOPS como tampón. El segmento pulmonar se sometió a una tensión basal de 1 g y los cambios de tensión del tejido se registraron con un transductor isométrico Gould Sthatam UC2 acoplado a un preamplificador HP 8805 y a un sistema de registro HP 680M. La preparación debe mantenerse en estas condiciones durante una hora como mínimo con el fin de obtener un tono estable, procediendo a la renovación del líquido nutricio cada 5-10 minutos.

En un primer grupo de experimentos, se construyeron sobre cada preparación dos curvas dosis-respuesta control para un agonista determinado, lo que permitió comprobar la reproducibilidad del método, ya que ambas curvas no mostraron diferencias significativas entre sí. Cuando se empleó noradrenalina como agonista, todos los experimentos se efectuaron en presencia de fentolamina (10⁻⁵M).

En otros experimentos las curvas dosis-respuesta de relajación para un agonista determinado, se obtuvieron en ausencia y presencia de pargilina y tropolona (inhibidores respectivamente de la MAO y la COMT), cocaína (bloqueante de la recaptación neuronal) y corticosterona (bloqueante de la recaptación extraneuronal). En todos los casos, la concentración de inhibidor utilizada fue de 10⁻⁵M, y el tiempo de contacto con el tejido previo a la construcción de la curva fue de 30 minutos. En el caso del salbutamol, no se realizaron experimentos en presencia de cocaína o corticosterona, por estar previamente demostrado que este fármaco no es

sustrato de la recaptación neuronal ni extraneuronal (9).

Con el fin de determinar la posible influencia de las catecolaminas endógenas, se obtuvieron también las curvas dosis-respuesta para cada agonista en ratas previamente tratadas con reserpina (5 mg/kg) administrada 18-24 horas antes de su sacrificio.

A partir de los valores obtenidos y de las concentraciones de agonista empleadas se calcularon, para cada curva individual, el efecto máximo (E_{max}) y la dosis que produce el 50 % del E_{max} (DE₅₀), mediante aplicación de un método iterativo computarizado (3).

Los fármacos empleados han sido: sulfato de isoprenalina, salbutamol, clorhidrato de pargilina, tropolona, L-tartrato de L-noradrenalina de Merck; clorhidrato de cocaína de Unión Química Farmacéutica; corticosterona y NaMOPS (sal sódica del ácido morfolino propano-sulfónico) de Sigma; metansulfonato de fentolamina y reserpina de Ciba.

Las soluciones, preparadas diariamente, se conservaban a 4° C y se empleó como disolvente solución salina fisiológica. Únicamente en el caso de la corticosterona y debido a su marcada insolubilidad en agua, se recurrió al empleo de etanol absoluto para su solubilización. Las soluciones de catecolaminas se estabilizaron con ácido ascórbico (40 µg · ml⁻¹).

La evaluación estadística se realizó utilizando el test de la t de Student, estableciendo el nivel de significación estadística para p < 0,05.

Resultados

Inhibidores enzimáticos de catecolaminas. — Se estudia la posible participación de los procesos de degradación enzimática de catecolaminas en las respuestas del pulmón de rata a isoprenalina, salbutamol y noradrenalina (+ fentolamina). Los resultados de los experimentos control y en

Tabla I. Valores de potencia ($DE_{50} \pm e.t.$) obtenidos en pulmón de rata para isoprenalina, salbutamol y noradrenalina (+ fentolamina) en experimentos control, en presencia de pargilina (Parg) y tropolona (Trop) y en ratas reserpinizadas.

n = número de experimentos realizados.

Agonista	Control (M)	n	Parg + Trop (M)	n	Reserpina (M)	n
Isoprenalina	$(0,45 \pm 0,09) \times 10^{-7}$	(7)	$(0,70 \pm 0,19) \times 10^{-7}$	(6)	$(0,34 \pm 0,10) \times 10^{-7}$	(6)
Salbutamol	$(1,90 \pm 0,28) \times 10^{-7}$	(5)	$(1,80 \pm 0,41) \times 10^{-7}$	(6)	$(1,98 \pm 0,24) \times 10^{-7}$	(4)
Noradrenalina	$(0,54 \pm 0,06) \times 10^{-7}$	(5)	$(0,37 \pm 0,15) \times 10^{-7}$	(5)	$(0,32 \pm 0,09) \times 10^{-7}$	(4)

presencia de pargilina y tropolona se representan en la tabla I, mientras que la figura 1 muestra uno de los registros originales obtenidos para la isoprenalina en este grupo de experimentos.

La presencia de los inhibidores enzimáticos estudiados no modificó los valores de DE_{50} obtenidos para los diferentes agonistas β -adrenérgicos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los E_{max} correspondientes a las curvas control e interacción.

Liberación de catecolaminas endógenas. — No hay diferencias significativas entre los valores de DE_{50} obtenidos para los diferentes agonistas β -adrenérgicos en el grupo control y en ratas previamente tratadas con reserpina (tabla I), lo que indica

que no hay modificación de las respuestas por liberación de catecolaminas endógenas.

Recaptación neuronal y extraneuronal.

— Las curvas dosis-respuesta para la isoprenalina y la noradrenalina (+ fentolamina) en ausencia y presencia de cocaína, inhibidor de la recaptación neuronal (fig. 2), muestran un E_{max} de $53,51 \pm 6,15$ mg en ausencia de cocaína, y de $52,63 \pm 3,04$ mg en su presencia (n = 4). Los valores de DE_{50} fueron de $(0,32 \pm 0,05) \times 10^{-5}M$ y $(0,31 \pm 0,09) \times 10^{-5}M$ respectivamente. En el caso de la isoprenalina, los valores de E_{max} , expresados en mg de fuerza, fueron de $46,79 \pm 9,34$ mg y $42,74 \pm 7,17$ mg y las DE_{50} de $(0,51 \pm 0,06) \times 10^{-7}M$ y $(0,62 \pm 0,14) \times 10^{-7}M$ (n = 5) en au-

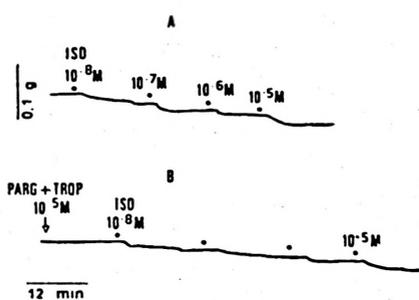


Fig. 1. Respuestas del parénquima pulmonar de rata a la isoprenalina (ISO) en ausencia (A) y presencia (B) de pargilina (PARG) y tropolona (TROP).

Ambos inhibidores se emplearon a una concentración de $10^{-5}M$, manteniéndose en contacto con la preparación durante 30 min previamente a la construcción de la curva.

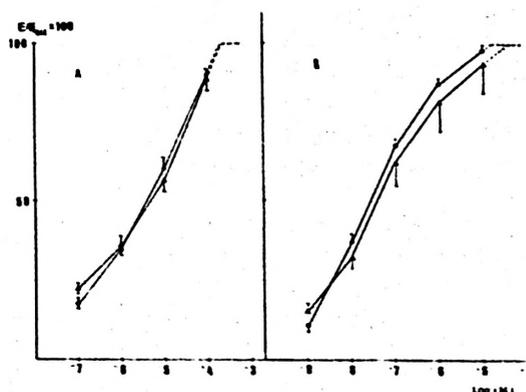


Fig. 2. Registro obtenido en pulmón de rata para la noradrenalina (NA) (+ fentolamina, FENTOL) (A) en ausencia y en presencia (B) de cocaína (COC) $10^{-5}M$.

Las concentraciones se expresan como molaridades finales en el baño de órganos.

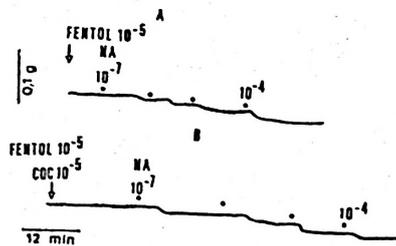


Fig. 3. Curvas dosis-respuesta obtenidas en pulmón de rata para la noradrenalina (A) y la isoprenalina (B) en ausencia (●) y presencia (▲) de corticosterona $10^{-3}M$.

sencia y presencia de cocaína. Ninguno de estos pares de valores mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, y las curvas dosis-respuesta control e interacción obtenidas resultaron prácticamente superponibles. Por tanto se puede afirmar que la recaptación neuronal no modifica las respuestas del pulmón de rata a los fármacos β -adrenérgicos.

Por último y con el fin de determinar la posible modificación de los valores obtenidos por la recaptación extraneuronal, se construyeron las curvas dosis-respuesta de isoprenalina y noradrenalina (+ fentolamina) en ausencia y presencia de corticosterona. Dada su insolubilidad en agua, se utilizó, para su solubilización etanol absoluto, alcanzando éste una concentración final en baño de $11,5 \times 10^{-6}M$. Por este motivo, realizamos previamente experimentos en los que las curvas dosis-respuesta para la isoprenalina y la noradrenalina se obtuvieron en ausencia y presencia de esta misma concentración de etanol, lo que permitió comprobar que este solvente no provoca por sí mismo alteraciones en las respuestas de la tira del pulmón.

Tampoco se observaron diferencias entre los valores de DE_{50} obtenidos para la isoprenalina $(0,44 \pm 0,05) \times 10^{-7}M$ y $(0,54 \pm 0,15) \times 10^{-7}M$, ($n = 6$) y la noradrenalina $(0,40 \pm 0,06) \times 10^{-5}M$ y $(0,49 \pm 0,08) \times 10^{-5}M$, ($n = 7$) en ausencia y presencia de corticosterona, ni entre los E_{max} de las curvas control y las obtenidas

tras preincubación con este inhibidor (figura 3), lo que sugiere que la recaptación extraneuronal no afecta, al menos de una manera significativa, las respuestas del pulmón de rata a los fármacos β -adrenérgicos.

Discusión

En un trabajo anterior (5) se demostró que la preparación de segmento de pulmón de rata puede constituir un modelo farmacológico válido para el estudio de fármacos que actúan a nivel de receptores β del subtipo β_2 . En este sentido, el presente trabajo estudia si el parénquima pulmonar de rata presenta ventajas sobre otros órganos aislados empleados como territorios β_2 . Entre ellos, el más clásicamente utilizado es la tráquea de cobaya, reactivo biológico que presenta una serie de inconvenientes, como el hecho de poseer una población considerable de receptores β_1 y unos procesos de recaptación neuronal y extraneuronal de aminas muy activos (9).

Aquí se estudia la posible influencia de las catecolaminas endógenas y de los distintos mecanismos de degradación enzimática y recaptación neuronal y extraneuronal de aminas en las respuestas a fármacos β -adrenérgicos de diferente selectividad en el segmento pulmonar de rata. Todos estos procesos pueden alterar, si son suficientemente activos, la concentración de un fármaco a nivel de sus receptores, modificando consecuentemente la potencia del mismo y llevando a un falseamiento de los resultados obtenidos (9-11).

En nuestro caso, no se ha encontrado participación de ninguno de los procesos señalados en las respuestas obtenidas para la isoprenalina, el salbutamol y la noradrenalina (+ fentolamina). La mayoría de estos resultados pueden explicarse considerando la teoría de ARIENS y SIMONIS (1), según la cual, los receptores β_1 son recep-

tores inervados o para el neurotransmisor, mientras que los receptores β_2 , predominantes en el pulmón de rata, son receptores no inervados u hormonales, activados fundamentalmente por la adrenalina circulante y no por la noradrenalina. Esta teoría es coincidente con la ausencia de inervación simpática de la preparación (2) y puede explicar la falta de participación de la recaptación neuronal y de las catecolaminas endógenas en las respuestas obtenidas para los distintos fármacos β -adrenérgicos.

Sin embargo, tampoco se ha observado una influencia apreciable del *uptake* extraneuronal, que sería, según esta hipótesis, el asociado a los receptores β_2 . No obstante, los datos coinciden con los de otros autores, quienes tampoco encuentran influencia de la recaptación extraneuronal al trabajar con órganos descritos como β_2 -homogéneos (8). Por el contrario, O'DONNELL y WANSTALL (15) han observado que respuestas mediadas exclusivamente por receptores β_1 sí que son moduladas por la recaptación extraneuronal, lo que demuestra que no existe la correlación sugerida entre receptores β_1 /recaptación neuronal y receptores β_2 /recaptación extraneuronal (4, 14).

En cualquier caso, esta falta de influencia de la recaptación en las respuestas del pulmón de rata a los fármacos β -adrenérgicos supone una clara ventaja de esta preparación sobre la tráquea de cobaya e indica que, en los experimentos para determinar la naturaleza homogénea o heterogénea de la población de receptores β en el parénquima pulmonar de rata, se puede trabajar en ausencia de cualquiera de estos inhibidores sin introducir modificaciones que puedan llevar a un falseamiento de los datos obtenidos.

Resumen

Se estudia la posible influencia de las catecolaminas endógenas y de los procesos de degradación enzimática y recaptación neuronal y extraneuronal de

aminas en las respuestas obtenidas para isoprenalina, salbutamol y noradrenalina (+ fentolamina $10^{-5}M$) en el segmento aislado de pulmón de rata. En ningún caso se han encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos en ausencia y presencia de pargilina y tropolona, cocaína, corticosterona o en rata reserpinizada. Los resultados demuestran que las respuestas del pulmón de rata a los fármacos β -adrenérgicos no son moduladas por ninguno de los procesos anteriormente citados y que no existe correlación entre receptores β_1 /recaptación neuronal y receptores β_2 /recaptación extraneuronal.

Palabras clave: Pulmón, Agonistas β -adrenoceptores, Reserpina, Mecanismos de disipación.

Bibliografía

1. Ariens, E.J. y Simonis, A.M. En: «Beta-adrenoceptor blocking agents» (P.R. Saxena y R.P. Forsyth, eds.) Elsevier North Holland Publishing Company. Amsterdam, 1976, pp. 3-27.
2. Barnes, P.J., Basbaum, C.B. y Nadel, J.A.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 127, 758-762, 1983.
3. Basulto, J., Morcillo, E., Rubio, E. y Esplugges, J.: *Arch. Farmacol. Toxicol.*, 4, 313-318, 1978.
4. Bryan, L.J., Cole, J.J., O'Donnell, S.R. y Wanstall, J.C.: *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 216, 395-400, 1981.
5. Candenias, M.L., Anselmi, E. y Villar, A.: *J. Pharmacol. (Paris)*, 17, 637-643, 1986.
6. Eyre, P. y Mirbahar, K.: *Agents and Actions*, 11, 173-176, 1981.
7. Goldie, R.G., Bertram, J.F., Papadimitriou, J.M. y Paterson, J.W.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 5, 7-9, 1984.
8. Hartley, M.L. y Pennefather, J.N.: *J. Auton. Pharmac.*, 4, 101-107, 1984.
9. Kenakin, T.P.: *Br. J. Pharmac.*, 71, 407-417, 1980.
10. Kenakin, T.P.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 4, 291-295, 1983.
11. Kenakin, T.P.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 6, 68-71, 1985.
12. Latifpour, J. y Bylund, D.B.: *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 224, 186-192, 1983.
13. Lulich, K.M., Mitchell, H.W. y Sparrow, M.P.: *Br. J. Pharmac.*, 58, 71-79, 1976.
14. O'Donnell, S.R. y Wanstall, J.C.: *Br. J. Pharmac.*, 78, 417-424, 1983.
15. O'Donnell, S.R. y Wanstall, J.C.: *Br. J. Pharmac.*, 81, 637-644, 1984.

