

ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE ISOPROTERENOL Y PROPRANOLOL EN TRAQUEA AISLADA DE COBAYO

Dr. RUPERTO ESCALERAS,
Universidad Central y Laboratorios "Life", Quito.

Desde los trabajos iniciales de Ahlquist¹, numerosas investigaciones se han realizado para determinar las características fisiológicas y farmacológicas de los receptores adrenérgicos alfa y beta en las diversas estructuras orgánicas, tanto de preparaciones aisladas *in vitro* como de organismos intactos de varias especies animales.

En los bronquios, se ha señalado la presencia de receptores exclusivamente tipo beta, cuya excitación da como resultado relajación de la musculatura lisa con el consiguiente aumento del calibre bronquial¹⁻⁴. De acuerdo con estas bases anatómo-fisiológicas, se ha determinado cualitativa y cuantitativamente el efecto bronco-relajante de las aminas simpaticomiméticas que tienen propiedades estimulantes de los beta receptores. Según los resultados obtenidos con diferentes técnicas experimentales, las más activas de estas sustancias, en orden de potencia son: el isoproterenol, la adrenalina y la noradrenalina⁴⁻⁶.

Con el advenimiento de las drogas bloqueantes beta-adrenérgicas, el campo de investigación se ha ampliado considerablemente. Por un lado, se

han estudiado las propiedades farmacodinámicas de varios compuestos sintéticos correspondientes a esta categoría de drogas, de entre las cuales el propranolol es la más importante por su alta potencia y por estar desprovista de acciones intrínsecas^{9,10}. Por otra parte, se ha estudiado también el antagonismo de estas drogas frente a las diversas propiedades farmacodinámicas de las aminas simpaticomiméticas estimulantes de los beta-receptores⁷⁻¹⁰. Investigaciones recientes han demostrado que el propranolol presenta un antagonismo competitivo frente a las acciones hemodinámicas y metabólicas del isoproterenol^{11,12}.

El presente trabajo tuvo por objeto investigar el efecto del propranolol sobre la musculatura lisa de la tráquea aislada de cobayo, tanto en condiciones de tonicidad normal como de contracción espástica provocada por acción de la acetilcolina. Se verificó, además, si el propranolol presenta un antagonismo de tipo competitivo frente a la acción broncorelajante del isoproterenol, en las mismas condiciones experimentales señaladas anteriormente.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la tráquea aislada de cobayo según la técnica descrita en un trabajo anterior¹³. Fueron empleados cobayos de 300 a 500 gm. de peso. Una vez que el animal fue sacrificado se retiró la tráquea y se la seccionó en forma espiral continua hasta obtener una cinta de 3 mm. de ancho por 10 cm. de longitud. Esta cinta espiral fue doblada en su parte media para constituir una sola preparación de 5 cm. la cual fue inmediatamente colocada en una cámara de perfusión de 50 ml. de capacidad, con solución Tyrode a 37° C. y una mezcla de oxígeno al 95% con CO₂ al 5% a burbujeamiento constante. (Fig. Nº 1). El

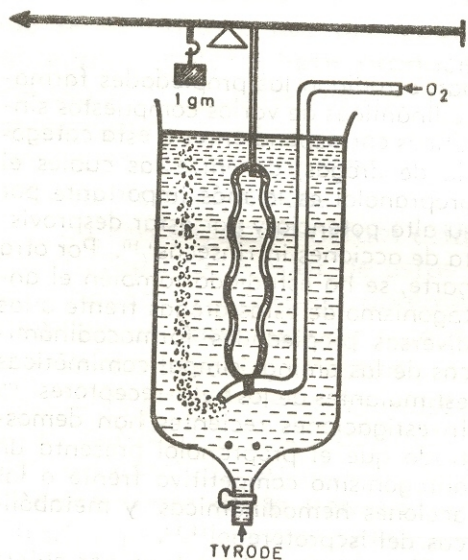


Fig. Nº 1.—Doble segmento espiral de tráquea aislada de cobayo en la cámara de perfusión, con solución Tyrode a 37° C. (50 ml. de capacidad) y una mezcla de O₂ y CO₂ a burbujeamiento constante.

extremo libre de este doble segmento fue conectado a una palanca de inscripción frontal, con una amplificación equivalente a 15 para el registro de los movimientos de contracción

o de relajación en un quimógrafo cuya velocidad fue de 4 mm. por minuto.

Por el tiempo de una hora se dejó a la preparación bajo una tensión equivalente a un sobrepeso de 5 gm. y cada 15 minutos se efectuó un recambio del líquido de perfusión. Luego se retiró dicho sobrepeso y se esperó que la tráquea adquiriera la línea base correspondiente a su tonicidad normal, después de lo cual se efectuaron los ensayos previstos mediante la adición de las drogas al líquido de perfusión.

1.—EFECTO DEL PROPRANOLOL:

A.—PREPARACION EN ESTADO DE TONICIDAD NORMAL: Determinada la línea base correspondiente al estado de tonicidad normal, en ensayos individuales, se estudió el efecto de las siguientes concentraciones de propranolol: 2,5; 5; 10; 20 y 40 ng/ml. Por el tiempo de 20 minutos se observaron posibles variaciones en cuanto a la línea base de la preparación.

B.—PREPARACION EN ESTADO DE CONTRACCION ESPASTICA: Determinada la línea base se añadió al líquido de perfusión acetilcolina (concentración final en el baño: 1×10^{-6}) con lo que se obtuvo una contracción maximal de carácter estable y permanente mientras la preparación no fue lavada¹³. Sobre esta nueva línea base correspondiente al estado de contracción espástica de la tráquea se procedió, como en el caso anterior, a probar el efecto de las mismas concentraciones de propranolol: de 2,5 a 40 ng./ml. El tiempo de observación fue también de 20 minutos.

2.—ANTAGONISMO ENTRE PROPRANOLOL E ISOPROTERE-NOL:

A.—PREPARACION EN ESTADO DE TONICIDAD NORMAL: Para es-

tos ensayos se utilizaron series de relación dosis-efecto con isoproterenol, mediante la obtención en el líquido de perfusión de concentraciones acumuladas y crecientes en progresión geométrica. Las dosis respectivas fueron añadidas con intervalos de dos minutos. En ensayos previos se establecieron los límites de la escala de concentraciones acumuladas entre 1,25 y 640 ng/ml.

En primer lugar, se efectuó una serie de control con las 5 primeras concentraciones de la escala: 1,25; 2,5; 5; 10 y 20 ng/ml. Con esta última concentración se obtuvo en casi todas las preparaciones un descenso equivalente a 3,8 cm. en promedio, con respecto a la línea base. Terminada esta prueba se efectuaron lavados sucesivos, con intervalos de 5 minutos hasta obtener un retorno a la línea base inicial.

Luego se añadió al líquido de perfusión la dosis de propranolol a ensayarse (se utilizaron en pruebas individuales las siguientes concentraciones: 2,5; 5; 10; 20 y 40 ng/ml.); se dejó la droga por un tiempo de 15 minutos y a continuación se repitió la serie control inicial de relación dosis-efecto con isoproterenol. Cuando no se observó efecto alguno, se utilizaron en forma sucesiva las concentraciones inmediatamente superiores, hasta obtener una broncorelajación equivalente a la producida por la serie inicial. Obtenido este efecto se procedió a lavar la preparación durante 30 minutos y se repitió la serie de control, con isoproterenol, tantas veces como fue necesario, hasta obtener una completa recuperación, en cuanto a la respuesta broncorelajante. En cada caso se determinó el tiempo exacto requerido para obtener esta recuperación.

B.—PREPARACION EN ESTADO DE CONTRACCION ESPASTICA: Se determinó previamente la línea base correspondiente al estado de contrac-

ción maximal y espástica por acción de la acetilcolina y luego se procedió como en el caso anterior. Se efectuó una relación dosis-efecto de isoproterenol con las 5 primeras concentraciones de una escala ascendente en progresión geométrica cuyos límites estuvieron entre 12,5 y 6.400 ng/ml. Las 5 primeras de estas concentraciones fueron utilizadas para la serie de control (de 12,5 a 200 ng/ml.) y las restantes, para los ensayos en que se administró previamente propranolol, según el mismo sistema descrito anteriormente.

Las concentraciones investigadas de propranolol fueron las mismas utilizadas con la preparación en estado de tonicidad normal: de 2,5 a 40 ng/ml. en progresión ascendente. Frente a cada una de estas concentraciones se determinó el tiempo de recuperación en cuanto al efecto broncorelajante del isoproterenol.

RESULTADOS

1.—EFECTO DEL PROPRANOLOL:

Esta droga no produjo efecto alguno sobre la musculatura lisa de la tráquea aislada de cobayo, durante el tiempo de observación que fue de 20 minutos. No se observó contracción ni relajación de la preparación en las dos condiciones experimentales: estado de tonicidad normal y estado de contracción provocada por acción de la acetilcolina.

2.—ANTAGONISMO ENTRE PROPRANOLOL E ISOPROTERENOL:

A.—PREPARACION EN ESTADO DE TONICIDAD NORMAL: En las series de dosis-respuesta de control con isoproterenol se observó que esta droga produjo, en forma general, una disminución del tono normal de la musculatura lisa de la tráquea; disminución de tono traducida por un

descenso en la curva de registro con respecto a la línea base. Este efecto fue proporcional a la concentración de la droga en el líquido de perfusión. La relajación máxima se obtuvo, en todas las preparaciones, con la concentración acumulada de 20 ng/ml. y fue equivalente a $3,8 \pm 0,32$ cm. de descenso con relación a la línea base.

El propranolol antagonizó el efecto broncorelajante del isoproterenol en forma proporcional a la dosis empleada. A medida que se aumentó la concentración de droga antagonista fue necesario utilizar concentraciones cada vez más altas de isoproterenol, para obtener una relajación idéntica a la obtenida en la serie de control. (Fig. 2). Así por ejemplo, con la concentración de 2,5 ng/ml. de propranolol fue necesario utilizar la siguiente serie de concentraciones acumuladas de isoproterenol: 2,5; 5; 10; 20 y 40 ng/ml. Con 5 ng. se emplearon de 5 a 80 ng/ml. y así suce-

sivamente. Las concentraciones de droga agonista y antagonista que se utilizaron en los diferentes ensayos se resumen en la Tabla I.

El efecto antagónico del propranolol fue, en general, de larga duración. Este efecto fue desapareciendo progresivamente a medida que se efectuaron numerosos lavados de la preparación. Con la dosis mínima de propanolol: 2,5 ng/ml. la recuperación y con la concentración máxima de 40 ng/ml. el tiempo fue de 18 horas.

B.—PREPARACION EN ESTADO DE CONCENTRACION ESPASTICA:

Con la tráquea en estado de contracción espástica por acción de la acetilcolina, la relación dosis-efecto para el isoproterenol efectuada con las concentraciones acumuladas de 12 a 200 ng/ml. se caracterizó por una curva de relajación progresiva, que en su grado máximo fue equivalente a 4,2.

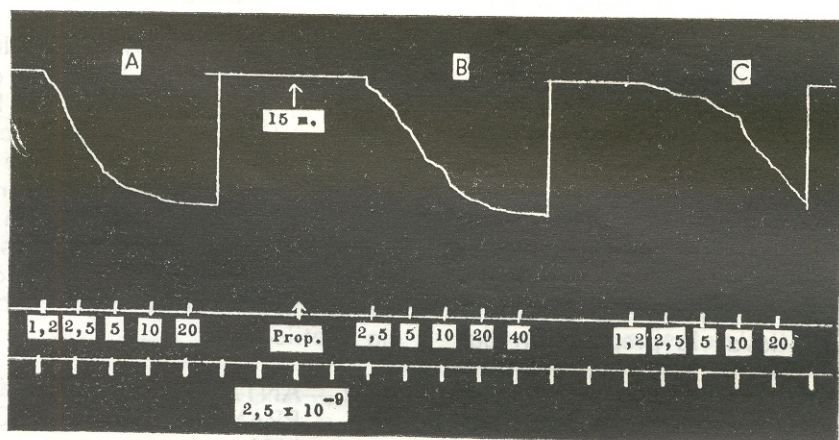


Fig. Nº 2.—Tráquea aislada de cobayo. **A:** Relación dosis-efecto con isoproterenol (agonista) y con la preparación en estado de reposo. Las concentraciones son acumuladas y crecientes en progresión geométrica: de 1,2 a 20 ng/ml. **B:** Luego de 15 minutos de la administración de antagonista (propranolol 2,5 ng/ml.) las concentraciones necesarias de isoproterenol para obtener idéntico grado de broncorelajación que la serie de control, van de 2,5 a 40 ng/ml. **C:** Después de 30 minutos de la administración de propranolol y de repetidos lavados, las concentraciones de isoproterenol de la serie control (A) producen un menor efecto broncorelajante. Línea inferior: señal de tiempo cada 2 minutos.

TABLA I

ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE ISOPROTERENOL Y PROPRANOLOL

Concentraciones acumuladas de droga agonista (isoproterenol) requeridas para neutralizar diferentes dosis de antagonista (propranolol) en tráquea aislada de cobayo mantenida en estado de tonicidad normal y en estado de contracción espasmódica por acción de la acericolina (concentración: 1×10^{-6}).

Concentración de propranolol	Concentración de isoproterenol *	
	Tráquea en tono normal Relajación máxima: 3,8 cm.	Tráquea en contracción Relajación máxima: 4,2 cm.
0 (control)	De 0,00125 a 0,020 mcgm/ml.	De 0,012 a 0,2 mcgm/ml.
2,5 ng/ml.	De 0,0025 a 0,040 "	De 0,025 a 0,4 "
5,0 "	De 0,005 a 0,080 "	De 0,05 a 0,8 "
10,0 "	De 0,010 a 0,160 "	De 0,10 a 1,6 "
20,0 "	De 0,020 a 0,320 "	De 0,20 a 3,2 "
40,0 "	De 0,040 a 0,640 "	De 0,40 a 6,4 "

* Las concentraciones anotadas de isoproterenol corresponden a los límites inferior y superior de 5 concentraciones acumuladas y crecientes en progresión geométrica, frente a cada ensayo con propranolol.

$\pm 0,4$ cm. Del mismo modo que en los ensayos anteriores, el propranolol inhibió el efecto broncorelajante del isoproterenol en forma proporcional a la concentración utilizada. Para obtener una relajación idéntica a la observada en la serie de control fue necesario emplear dosis progresivamente mayores de droga agonista a medida que se aumentó la concentración de droga antagonista en el líqui-

do de perfusión (Fig. 3). Las diversas concentraciones que se utilizaron para estos ensayos se resumen en la Tabla I.

La duración del efecto antagónico del propranolol fue, como en el caso anterior, de larga duración. El tiempo de recuperación varió entre 3 horas para la concentración mínima de 2,5 ng/ml. y de 15 horas para la concentración máxima de 40 ng/ml.

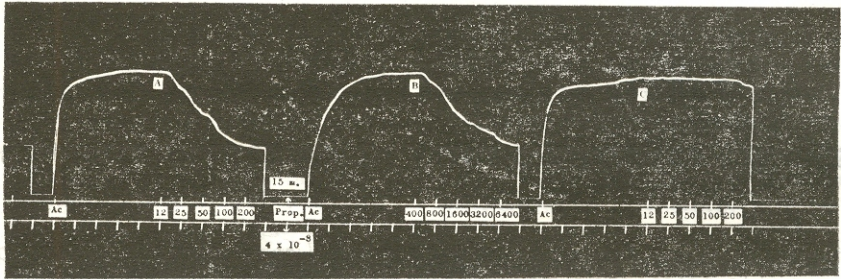


Fig. Nº 3.—Tráquea aislada de cobayo. **A:** Relación dosis-efecto de isoproterenol con la tráquea en estado de contracción por efecto de la acetilcolina (1×10^{-6}). Las concentraciones son acumuladas y crecientes en progresión geométrica: de 12 a 20 ng/ml. **B:** Luego de 15 minutos de la administración de propranolol (40 ng/ml.) las concentraciones de isoproterenol para obtener idéntico grado de broncorelajación que la serie de control van de 400 a 6.400 ng/ml. **C:** Después de 30 minutos de la administración de propranolol y de varios lavados de la preparación, las concentraciones de la serie de control (A) no producen efecto relajante. Señal de tiempo cada 2 minutos.

DISCUSION

El propranolol, por sí solo, en las concentraciones investigadas de 2,5 a 40 ng/ml. no produjo cambios en la tonicidad de la musculatura lisa de la tráquea aislada de cobayo. No se observó contracción ni relajación de la preparación en las dos condiciones experimentales estudiadas: estado de tonicidad normal y estado de contracción espástica por acción de la acetilcolina. Este resultado está de acuerdo con las observaciones de otros autores en el sentido de que esta droga no posee acciones farmacodinámicas intrínsecas sobre estructuras inervadas por el sistema simpático, como sucede con el dicloroisoproterenol¹⁴ y el pronetalol⁸ que pertenecen también a la categoría de drogas beta bloqueantes adrenérgicas.

Para los ensayos de antagonismo fue necesario verificar, en primer término, si la respuesta al isoproterenol de esta preparación aislada era constante y susceptible de valoración cuantitativa, tanto en condiciones de tonicidad normal como de contracción espasmódica. Las curvas de dosis-

respuesta en los ensayos de control demostraron, en ambos casos, una caída progresiva de la correspondiente línea base, a medida que se aumentó acumulativamente la concentración de la droga en el líquido de perfusión. La concentración total de isoproterenol con la que se obtuvo el máximo efecto relajante fue de 20 ng/ml. en los ensayos con tonicidad normal y de 200 ng/ml. o sea 10 veces mayor, en las pruebas con la tráquea previamente contraída.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el propranolol fue capaz de antagonizar el efecto relajante del isoproterenol en la tráquea con su tonicidad normal y también en estado de contracción espasmódica provocada por la acetilcolina. Sin embargo, pudo observarse que concentraciones proporcionalmente mayores de la droga agonista fueron capaces de "sobreponer" su efecto a la acción inhibitoria del antagonista. En consecuencia, las curvas de dosis-respuesta del isoproterenol fueron desplazadas en forma paralela y progresivamente a la derecha, a medida que se aumentó la concentración del

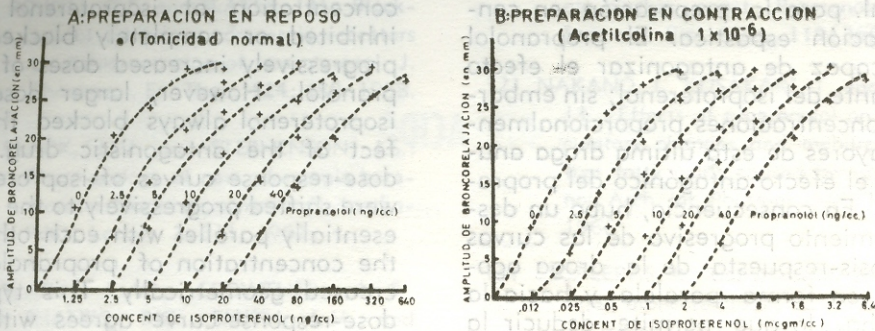


Fig. N° 4.—Curvas de relación dosis-efecto de isoproterenol (agonista), en tráquea aislada de cobayo, antes y después de concentraciones progresivamente crecientes de propranolol (antagonista). Cada curva corresponde al promedio de 5 ensayos individuales: **A**: preparación en estado de tonicidad normal y **B**: tráquea en estado de contracción por efecto de la acetilcolina (1×10^{-6}). Obsérvese el progresivo desplazamiento hacia la derecha de las curvas de dosis-respuesta de la droga agonista, a medida que se aumenta la concentración de la droga antagonista.

propranolol. (Fig. N° 4). Este conjunto de "familias" de dosis-respuesta, según Aries y Simonis¹⁵, constituyen un modelo característico de antagonismo competitivo entre dos sustancias. Lo cual en el presente caso, significa que el aumento de la concentración de isoproterenol en el líquido de perfusión, siempre dio como resultado el desplazamiento del propranolol de los receptores beta adrenérgicos con la consiguiente aparición de la broncorelajación.

Este mismo tipo de interacción competitiva ha sido demostrado en otras acciones farmacodinámicas del isoproterenol, tales como el aumento del cronotropismo e inotropismo cardíaco¹¹, y el aumento de la glucosa y de los ácidos grasos libres del plasma¹². También existe evidencia de idéntico tipo de antagonismo con respecto a la vasodilatación periférica¹¹. Puede suponerse entonces, que este antagonismo competitivo no es referido exclusivamente a un determinado sistema anatómico, sino que es común a todas las estructuras orgánicas cuya actividad fisiológica o bioquímica depende, en último término, de la estimulación de los receptores beta adrenérgicos.

RESUMEN

En la tráquea aislada de cobayo, seccionada en espiral continua, se investigó el efecto del propranolol y la naturaleza del antagonismo entre esta droga y el isoproterenol. Los ensayos se efectuaron en dos condiciones experimentales: preparación mantenida en estado de tonicidad normal y en estado de contracción espasmódica por acción de la acetilcolina.

El propranolol, en ambos casos, y en concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 40 ng/ml. no produjo contracción ni relajación de la musculatura lisa de la tráquea, lo que confirma la hipótesis de carencia de actividad intrínseca de esta droga bloqueante beta adrenérgica.

Para los ensayos de antagonismo se efectuaron curvas de dosis-respuesta con isoproterenol, utilizando el sistema de concentraciones acumuladas y crecientes en progresión geométrica en el líquido de perfusión. Esta droga produjo una relajación proporcional a la concentración empleada. El efecto máximo broncorelajante se obtuvo con la concentración final de 20 ng/ml. para la preparación en reposo y de 200

ng/ml. para la preparación en concentración espástica. El propranolol fue capaz de antagonizar el efecto relajante del isoproterenol; sin embargo, concentraciones proporcionalmente mayores de esta última droga anularon el efecto antagonístico del propranolol. En consecuencia, hubo un desplazamiento progresivo de las curvas de dosis-respuesta de la droga agonista en forma paralela y hacia la derecha, lo que permite deducir la existencia de un antagonismo de tipo competitivo entre estas dos drogas, similar al observado en otras acciones farmacodinámicas del isoproterenol.

SUMMARY

The effect of propranolol and isoproterenol was investigated in the isolated guinea pig's trachea. Two experimental conditions were set-up: preparation in normal tonicity and in acetylcholinic spasmodic contraction. At the same time, the nature of the antagonism between the two drugs was determined.

Isoproterenol produced relaxation of the muscle in the trachea in proportion to the concentration employed. Dose-response curves were obtained with geometrically increased and cumulative doses in the perfusion liquid. The maximal broncho-relaxing effect (4 cm. from the basal line) was reached with 20 ng/ml. in the trachea in normal tonicity and with 200 ng/ml. in the trachea in acetylcholinic contraction.

Propranolol in both experimental conditions and in different concentrations (from 2.5 to 40 ng/ml.) did not produce contraction nor relaxation of the smooth muscle in the trachea. This data confirms the hypothesis that propranolol is a beta-receptor blocking agent without any intrinsic sympathomimetic action.

In the antagonism assays, it was observed that the effect of a given

concentration of isoproterenol was inhibited or completely blocked by progressively increased doses of propranolol. However, larger doses of isoproterenol always blocked the effect of the antagonistic drug. The dose-response curves of isoproterenol were shifted progressively to the right, essentially parallel with each other as the concentration of propranolol increased geometrically. This type of dose-response curve agrees with the general concept of competitive antagonism between two pharmacologic agents.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) AHLQUIST, R.P.: Study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* **153**: 586, 1948.
- 2) EPSTEIN, S.E. and BRAUNWALD, E.: Beta-adrenergic receptor blocking drugs. Mechanisms of action and clinical applications. *New Eng. J. of Med.* **275**: 1106, 1966.
- 3) KOELLE, G.B.: Neurohumoral transmission and the autonomic nervous system. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Goodman L.S. y Gilman A. 3th. ed. The Macmillan Co. New York, 1965.
- 4) GREEN, A.F. and BOURA, A.L.: Depressants of peripheral sympathetic nerve function. Evaluation of drug activities. *Pharmacometrics.* Academic Press. London. Vol. 1, págs. 369, 1964.
- 5) LANDS, A.M. and BROWN, T.: A comparison of the cardiac stimulating and bronchodilator actions of selected sympathomimetic amines. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **116**: 331, 1964.
- 6) CARMINATI, C.M. e CATTORINI, M.: L'attività broncodilatatoria in vitro sugli anelli tracheali di cavia. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **163**: 186, 1966.

- 7) POWELL, C.E. and SLATER, I.H.: Blocking of inhibitory adrenergic receptors by dichloro analog of isoproterenol. *J. Pharmacol. Ex. Ther.*, **124**: 480, 1958.
- 8) BLACK, J.W. and STEPHENSON, J.S.: Pharmacology of new adrenergic beta-receptor-blocking compound (nethalide). *Lancet*, **2**: 311, 1962.
- 9) BLACK, J. W., CROWTHER, A. F., SHANKS, R.G., SMITH, L.H. and DORNHORST, A.C.: New adrenergic beta-receptor antagonist. *Lancet*, **1**: 1080, 1964.
- 10) LISH, P.M., WEIKEL, J.H. and DUNGAN, K.W.: Pharmacological and toxicological properties of two new beta-adrenergic receptor antagonists. *J. Pharm. and Exp. Ther.*, **149**: 161, 1965.
- 11) NAKANO, J. and KUSAKARI, T.: Competitive antagonism between isoproterenol and a new beta-receptor adrenergic blockin agent, Propranolol. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **119**: 350, 1965.
- 12) NAKANO, J., KUSAKARI, T. and BERRY J.L.: Effects of propranolol on the circulatory changes and mobilization of free fatty acids caused by isoproterenol. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **164**: 120, 1966.
- 13) ESCALERAS, R.: Comparación de la actividad broncorelajante de varias drogas en tráquea aislada de cobayo. *Actas del II Cong. Latinoamericano de Alergología*, Pág. 333, Edit. Universitaria, Quito.
- 14) MORAN, N.C., and PERKINS, M.E.: Adrenergic blockade of mamalian heart by dichloro analogue of isoproterenol. *J. Pharmacol. & Exper. Therp* **124**: 223, 1958.
- 15) ARIENS, E.J., and SIMONIS, A.M.: A molecular basis for drugs action. *J. Pharm. Pharmacol.* **16**: 137, 1964.