

EFFECTOS FARMACOLOGICOS DE LAS BEBIDAS DE FERMENTACION SOBRE LA FISIOLOGIA CARDIACA.

(PHARMACOLOGIC EFFECTS OF THE BEVERAGE OF FERMENTATION ON THE CARDIAC PHYSIOLOGY)

por

J. M. GONZALEZ RODRIGUEZ-CORDOBA*; F. J. CASTEJON MONTIJANO**

J. MARTINEZ HENS**; A. LOPEZ FERNANDEZ* y J. TOVAR BUSTOS**

* Departamento de farmacología. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España)

** Departamento de fisiología. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España)

S u m m a r y .

The pharmacological effects of fermentated beverages on heart physiology have been investigated. The intravenous way was used for the administration of tested samples (1 ml/kg doses).

In both substance groups, the modifications of electrocardiographic parameters are practically similar; they were identified with histamine effects on heart physiology.

The main alterations produced were: a) decreasing of the R-R space in all tests; b) transformation of the wave T to a difasic wave lost of voltage of the positive component and over-throw of the wave T; c) light decreasing of the ST segment.

R e s u m e n .

Se investigan los efectos farmacológicos de las bebidas de fermentación sobre la fisiología cardíaca. Las muestras ensayadas (vino íntegro y vino destilado) se administran a las dosis de 1 ml/kg, por vía intravenosa.

Las modificaciones que ambos grupos de sustancias imprimen en la morfología, duración y voltaje del trazado electrocardiográfico son prácticamente iguales y se identifican con los efectos que sobre la fisiología del músculo cardíaco produce la histamina.

Entre las alteraciones producidas destacamos: a) disminución del espacio R-R en el 100 p. 100 de las experiencias; b) desdoblamiento de la onda T en una onda difásica, pérdida de voltaje del componente positivo e inversión de dicha onda y c) ligera disminución del segmento ST.

En recientes publicaciones^{11, 12} se ha responsabilizado al componente histamínico de las bebidas de fermentación de los trastornos vasculares (hipotensión), respiratorios (hiperpnea) y gastrointestinales (hipermotilidad) detectados en las condiciones de experimentación allí descritas.

La presencia de receptores histamínicos en el músculo cardíaco²⁷ justificará, de ser válidas las conclusiones antes comentadas, la modificación de la actividad cardíaca tras la administración intravenosa de los líquidos citados.

De los componentes detectados en las bebidas de fermentación con capacidad para provocar modificaciones en la actividad cardíaca y, en consecuencia, en el trazado electrocardiográfico, merecen especial atención el alcohol etílico, por su alta concentración, y la histamina, amina de gran actividad intrínseca.

En preparaciones cardio-pulmonares se ha estudiado el efecto del alcohol etílico y se ha llegado a la conclusión de que se trata de una sustancia de acción directa y de efecto depresor sobre ambos órganos. Sin embargo, la sensibilidad del corazón y pulmón para este efecto del alcohol etílico es diferente, de tal modo que la depresión cardíaca se produce a concentraciones varias veces superiores a las necesarias para provocar parada respiratoria.

En preparaciones de corazón aislado³⁰, el efecto depresor del alcohol etílico, aparece cuando su concentración en el líquido de perfusión supera los 400 mg/100 ml, mientras que la ingestión moderada de este alcohol no produce alteraciones cardíacas²⁴.

El empleo de perros intubados^{13, 22} ha permitido confirmar las conclusiones antes comentadas y establecer que el alcohol etílico altera la fisiología del músculo cardíaco cuando su concentración en sangre se eleva a 1000-1300 mg/100 ml.

El mecanismo de acción de los efectos cardíacos del alcohol etílico se atribuye⁹ al incremento de la velocidad de repolarización, que provoca una ligera disminución del potencial de acción, mientras que el potencial de reposo y la velocidad de despolarización no se afectan.

Desde el descubrimiento de la liberación de histamina en el miocardio durante el choque anafiláctico^{5, 7} se suscita un gran interés por el estudio de la concentración y distribución¹⁰ de este autacoide en el corazón de los mamíferos, y en precisar las posibles implicaciones de esta amina biógena en la regulación fisiológica de la actividad cardíaca^{16, 17, 20, 21}.

Como los efectos cardíacos atribuidos a la histamina persisten aunque previamente se haya provocado la depleción de noradrenalina, la destrucción de los botones adrenérgicos terminales, o el bloqueo de los distintos receptores del sistema adrenérgico^{4, 6, 8}, parece claro el mecanismo de acción directa de la histamina sobre la actividad cardíaca^{14, 15, 19, 23, 27, 31}.

En el trazado electrocardiográfico, la acción de la histamina se traduce en una disminución del voltaje de la onda T, que puede llegar a ser negativa², disminución

GONZALEZ Y COL.: EFECTOS DE BEBIDAS FERMENTADAS SOBRE FISIOL. CARDIACA.

del tiempo de conducción A-V, con taquicardia compensadora (disminución de espacios R-R) y en un acortamiento transitorio del espacio PQ.

En individuos normales la probabilidad de que la histamina contenida en las bebidas de fermentación llegue en cantidad suficiente a su "locus de acción" cardíaco es prácticamente nula, dada su rápida destrucción por las histaminasas tisulares y plasmáticas. No obstante, no debe olvidarse que la concentración y actividad de estas enzimas (MAO y DAO principalmente) en plasma y tejidos están sujetas a modificaciones genéticas y a una serie de factores, entre los que se citan: aporte insuficiente de Cu y vitaminas³, hipofunción adrenal¹⁸ y determinados estados patológicos^{1, 29}. Por consiguiente, no se puede descartar que bajo alguna de estas condiciones los organismos sean sensibles a la acción del componente histamínico de las bebidas de fermentación, y que esta amina biógena complique algunos procesos producidos por la ingestión de estos líquidos.

En este trabajo nos proponemos estudiar las influencias que, sobre el ECG, ejerce la administración intravenosa de estas bebidas, y determinar la naturaleza de la(s) sustancia(s) responsable(s) de tales efectos.

Material y métodos.

Se ha utilizado un total de diez perros de 6 meses a 3 años de edad, sin síntoma de enfermedad.

Para la administración de las sustancias ensayadas se canula la vena cefálica. La colocación de los electrodos de registro se realiza en las zonas que prescribe la técnica de Ponce Vázquez²⁵. Antes de hacer los registros basales se deja transcurrir un cierto tiempo (20-30 minutos) para que el animal se tranquilice y se adapte a la nueva situación de experimentación.

De diferentes clases de vinos con 15° de alcohol y positiva la prueba biológica cualitativa de histamina, se toma una determinada cantidad y se procede a su destilación al vacío durante 30 minutos, a una temperatura de 80-85° C. Terminada esta operación se repone el volumen inicial con agua destilada y se comprueba la existencia de histamina por su efecto constrictor sobre el íleon aislado de cobayo y porque es bloqueado por el clemizol-antihistamínico H₁.

De esta manera las muestras a ensayar quedan constituídas por: a) vino íntegro con 15° de alcohol y positiva la prueba biológica cualitativa de la histamina, y b) vino destilado, sin alcohol y positiva la prueba biológica de la histamina.

Tras la administración a las dosis de 1 ml/Kg de peso vivo i. v., se registra la actividad eléctrica del corazón. La vía de administración i. v. permite asegurar la interacción histamina-receptores cardíacos, ya que coloca a los animales de experimentación en una situación semejante a la que tienen los individuos con déficit de histaminasas en el tracto digestivo.

En cada experiencia se ensayan las dos muestras con un intervalo de 15 a 20 minutos y alternando el orden de comienzo del mismo.

El análisis estadístico se realiza mediante pruebas *t* de Student.

Resultados.

Los parámetros cronológicos y voltaje de los ECG obtenidos en condiciones basales y bajo la acción de las sustancias citadas se recogen en los cuadros I y II.

En dichas condiciones se detecta una arritmia sinusal respiratoria en el 30 p. 100 de los animales, con períodos máximos de 1'40 sg y mínimos de 0'47 sg; trastorno que desaparece a los pocos segundos (fig. 1) de la administración de las dos sustancias ensayadas, y se detecta un incremento significativo de la frecuencia cardíaca en el 100 p. 100 de las experiencias. La frecuencia cardíaca inicial oscila entre 0'41 y 1'40 sg, con un valor medio de $0'706 \pm 0'233$ sg (cuadro I).

La administración de vino íntegro incrementa este parámetro en todas las experiencias y se obtienen unos valores máximos y mínimos de 0'52 y 0'24 sg, respectivamente, con un incremento medio de $0'358 \pm 0'095$ sg; valores que en los ensayos con vino destilado alcanzan unos máximos y mínimos de 0'53 y 0'26, respectivamente, y un valor medio del período de $0'342 \pm 0'090$ (cuadro I).

La onda P, que en condiciones basales muestra una duración media de $0'042 \pm 0'004$ sg (cuadro I), y un voltaje de $0'16 \pm 0'071$ mV (cuadro II), tras la administración de vino íntegro modifica su duración a $0'028 \pm 0'008$ sg (cuadro II), e incrementa su voltaje a $0'28 \pm 0'15$ mV. La inyección de vino destilado produce en estos parámetros de la onda P unos efectos similares, ya que los valores medios de duración y voltaje son, respectivamente, de $0'034 \pm 0'10$ sg (cuadro II) y $0'24 \pm 0'12$ mV (cuadro II). Todos estos valores quedan dentro de los límites de normalidad descritos por otros autores²⁶.

El segmento PQ, en condiciones basales, presenta un valor medio de duración de $0'069 \pm 0'018$ sg (cuadro I); valor que por acción del vino íntegro disminuye ligeramente ($0'057 \pm 0'014$ sg); y de forma más acentuada cuando se emplea vino destilado ($0'051 \pm 0'007$ sg).

En estas condiciones el trazado del complejo QRS se caracteriza por la falta de onda Q en el 90 p. 100 de los casos. Para la onda R se calcula un voltaje medio de $1'67 \pm 0'040$ mV (cuadro II) y una duración media de $0'037 \pm 0'005$ sg (cuadro I), parámetros que para la onda S alcanzan las cifras medias de $0'01 \pm 0$ sg y $0'22 \pm 0'075$ mV (cuadros I y II).

Los cambios de configuración de este complejo, por acción de los líquidos que comentamos, afectan principalmente al voltaje de la onda R. así, se observa una disminución de su valor medio, tanto en las experiencias con vino íntegro ($1'50 \pm 0'45$ mV) como vino destilado $1'48 \pm 0'40$ mV. La duración de esta onda así como la cuantía del voltaje y la duración de la onda S, no se ven afectadas en ninguna experiencia (cuadros I y II).

GONZALEZ Y COL.: EFECTOS DE BEBIDAS FERMENTADAS SOBRE FISIOL. CARDIACA.

CUADRO I. Resumen de la duración (sg) de los diferentes componentes del trazado electrocardiográfico antes y después de la administración de las sustancias ensayadas.

	Período	Onda P	Onda Q	Onda R	Onda S	Onda T	Seg PQ	Seg ST	Esp PQ	EspQRS	Esp QT
Basal (10)											
\bar{X}	0'706	0'042	—	0'037	0'010	0'067	0'069	0'095	0'104	0'045	0'205
σ	0'233	0'004	—	0'005	—	0'007	0'018	0'017	0'018	0'007	0'035
min.	0'410	0'040	—	0'030	0'010	0'060	0'040	0'060	0'070	0'030	0'170
max.	1'400	0'050	—	0'040	0'010	0'080	0'090	0'120	0'130	0'050	0'280
V. I. (10)											
\bar{X}	0'358	0'028	0'004	0'035	0'010	0'060	0'057	0'089	0'082	0'046	0'195
σ	0'095	0'008	0'005	0'005	—	0'010	0'014	0'020	0'008	0'008	0'034
min.	0'240	0'020	0'010	0'030	0'010	0'040	0'040	0'060	0'070	0'030	0'160
max.	0'520	0'040	0'010	0'040	0'010	0'080	0'080	0'120	0'090	0'060	0'260
p. var.	100	80	30	20	0	90	50	80	80	10	80
V. D. (10)											
\bar{X}	0'342	0'034	0'003	0'036	0'010	0'057	0'051	0'088	0'082	0'044	0'118
σ	0'090	0'010	0'005	0'005	—	0'009	0'007	0'013	0'008	0'008	0'025
min.	0'260	0'010	0'010	0'030	0'010	0'040	0'040	0'060	0'070	0'030	0'160
max.	0'530	0'040	0'010	0'040	0'010	0'070	0'060	0'100	0'090	0'060	0'240
p. var.	100	50	20	10	0	80	80	60	90	30	80

Entre paréntesis, número de animales utilizados en cada experiencia. V. I. = Vino íntegro, V. D. = Vino destilado. \bar{X} = media de los diez valores obtenidos en cada experiencia. σ = desviación típica, mín. = valor mínimo obtenido, max. = valor máximo obtenido, p. var. = porcentaje de variación.

GONZALEZ Y COL.: EFECTOS DE BEBIDAS FERMENTADAS SOBRE FISIOL. CARDIACA.

CUADRO II. Resumen del voltaje (mV) de las ondas electrocardiográficas en condiciones basales y durante el efecto de las sustancias ensayadas.

	Onda P	Onda Q	Onda R	Onda S	Onda T
Basal (10)					
\bar{X}	0'160	—	1'670	0'220	0'150
σ	0'071	—	0'400	0'075	0'034
min.	0'050	—	1'100	0'100	0'100
max.	0'220	—	2'500	0'400	0'200
V. I. (10)					
\bar{X}	0'280	0'017	1'500	0'250	0'239
σ	0'140	0'028	0'450	0'055	0'351
min.	0'020	0'050	0'800	0'150	1'200
max.	0'450	0'070	2'100	0'300	0'010
p. var.	90	30	80	70	100
V. D. (10)					
\bar{X}	0'240	0'025	1'480	0'220	0'158
σ	0'120	0'057	0'400	0'074	0'099
min.	0'050	0'050	1'000	0'150	0'0250
max.	0'400	0'180	2'100	0'320	0'010
p. var.	90	30	100	50	100

Entre paréntesis: número de animales utilizados en cada experiencia. V. I. = Vino íntegro.

V. D. = Vino destilado. \bar{X} = media de los diez valores obtenidos en cada experiencia.

σ = desviación típica. min. = valor mínimo obtenido. max = valor máximo obtenido.

p. var. = porcentaje de variación.

Todos los valores medios obtenidos, tanto en condiciones basales como durante la acción de los efectos de los líquidos ensayados, quedan dentro de los márgenes de normalidad.

En los ECG basales, la onda T da unos valores medios de duración y voltaje de $0'067 \pm 0'007$ sg y $0'15 \pm 0'034$ mV, respectivamente. La administración de vino íntegro destilado produce, en el 90 p. 100 de las experiencias, una pérdida paulatina del voltaje; más tarde se hace difásica, con T_1 negativa y T_2 positiva, para transformarse, en la casi totalidad de los ensayos, en una onda monofásica y negativa (fig. 1, cuadro II).

El segmento pQ exhibe, tanto en condiciones basales como durante el efecto de los líquidos ensayados, una suave desnivelación hacia la negatividad, dando la impresión de que inicia la formación de la onda Q. En condiciones basales su duración ofrece un valor medio de $0'069 \pm 0'018$ sg) y algo más ($0'051 \pm 0'007$ sg) por efecto del vino destilado.

El segmento ST no sufre variaciones significativas por efecto de las distintas muestras ensayadas, pues de un valor medio basal de $0'095 \pm 0'017$ sg pasa a $0'089 \pm 0'02$ sg por acción del vino íntegro y a $0'088 \pm 0'013$ sg cuando se administra vino sin alcohol.

La sístole eléctrica auricular, que en condiciones basales presenta unos valores medios de $0'104 \pm 0'018$ sg, cambia significativamente tanto por la administración de vino íntegro ($0'082 \pm 0'008$ sg) como de vino destilado ($0'082 \pm 0'008$ sg).

Por acción de los dos líquidos ensayados desciende el valor medio de la sístole eléctrica ventricular, pasa de un valor medio de $0'025 \pm 0'035$ sg en condiciones basales, a $0'195 \pm 0'034$ sg, en las experiencias con vino íntegro, y a $0'118 \pm 0'025$ sg en los ensayos con vino destilado.

Discusión.

El estudio comparativo de los ECG obtenidos en condiciones basales y bajo el efecto de las dos clases de sustancias ensayadas, nos muestra que las modificaciones que éstas imprimen al trazado electrocardiográfico son prácticamente iguales, aunque existan pequeñas variaciones que matizaremos más tarde.

El período sufre en el 100 p. 100 de las experiencias una disminución estadísticamente significativa al 99 p. 100, y pasa de un valor medio de $0'706 \pm 0'233$ sg, calculado en condiciones basales, a $0'358 \pm 0'095$ sg por efecto del vino íntegro; y a $0'342 \pm 0'90$ sg en las experiencias con vino destilado. Estos resultados evidencian la acción de una sustancia de efecto cronotrope positivo.

La similitud de los valores medios de los períodos producidos por los dos tipos de sustancias es un dato evidente de que, en las condiciones de la experiencia, la taquicardia no puede explicarse por acción del alcohol; sustancia que no afecta al cronotropismo²⁴ o le afecta negativamente³⁰. Esta acción del alcohol podría justificar el mayor valor medio obtenido en las experiencias con vino íntegro

en relación con el calculado en los ensayos con vino destilado. Es lógico pensar que, al menos en las condiciones de las experiencias, el alcohol etílico bloquea ligeramente el efecto cronotrope positivo del vino. Resultados parecidos se obtuvieron al estudiar los efectos de las sustancias que nos ocupan sobre la frecuencia respiratoria, hipotensión y motilidad intestinal^{11, 12}.

El efecto cronotrópico positivo queda suficientemente explicado por la acción que ejerce sobre la conductancia del K la histamina²¹; sustancia detectada y cuantificada por nosotros, en esta clase de bebidas, y con características físico-químicas que garantizan su persistencia en los vinos destilados en las condiciones descritas en el apartado de material y métodos.

La taquicardia es la responsable de la abolición de la arritmia sinusal respiratoria en todos los animales en los que previamente se había detectado.

En la sístole eléctrica auricular se observa, tras la administración de las sustancias ensayadas, una ligera disminución de la duración de la onda P, así como del segmento PQ, y en consecuencia del espacio PQ. Ninguna de estas modificaciones puede ser atribuida al alcohol, ya que aparecen en los dos tipos de ensayos. Parece lógico, sin embargo, atribuir las al componente histamínico, de contrastado efecto dromotropo negativo.

La contradicción de estos resultados con el efecto dromotropo negativo de la histamina, que debería producir un alargamiento de este espacio, queda justificada por los hallazgos de Flake y col.⁸.

En la sístole eléctrica ventricular los valores observados en condiciones basales y tras la administración de las sustancias ensayadas, no presentan diferencias significativas en cuanto a su duración. No hay acortamiento del segmento ST, como se podría esperar al incrementarse la frecuencia cardíaca por efecto de las sustancias ensayadas, como ya hemos indicado anteriormente. La acción moduladora de la histamina sobre la conductancia de los iones de Ca^{++} K^{+} ^{16,17,21} podría explicar estos resultados.

Aunque el voltaje del complejo QRS no cambia significativamente en el conjunto de las experiencias con vino íntegro o vino destilado, creemos conveniente señalar que existe una ligera disminución, como puede deducirse de las figuras 1 y 2.

En la morfología y voltaje de la onda T es donde encontramos las modificaciones más significativas del trazado electrocardiográfico por la acción de los líquidos estudiados. Así, la onda T positiva en condiciones basales se va haciendo progresivamente difásica (con T_1 positivo y T_2 negativo), hasta terminar en una onda T negativa (figs. 1 y 2, cuadro II). Este cambio en la morfología se hace por una disminución progresiva del componente T_1 positivo y aumento del componente T_2 negativo.

Los cambios producidos en la morfología de la onda T_2 por efecto de los líquidos que ensayamos se pueden explicar de la siguiente forma: en condiciones

normales la onda T tiene el mismo signo que el complejo QRS, ya que las presiones intraventriculares producidas durante el período de contracción isométrica son grandes y retardan los procesos de repolarización en el endocardio, lo que permite que la repolarización endocárdica comience en el subepicardio y tenga un signo contrario al esperado²⁷.

Tras la administración de las sustancias empleadas en este experimento hay una disminución significativa del período diastólico ventricular. Esto lleva consigo una menor repleción sanguínea de los ventrículos de forma progresiva. Disminuyen las presiones intraventriculares que provocan el retardo de la repolarización endocárdica, por lo que progresivamente se va produciendo la repolarización en el endocardio (onda T negativa).

El hecho de que la inversión de esta onda no produzca un alargamiento del segmento ST nos permite descartar la posibilidad de que estos fenómenos sean la consecuencia de un proceso isquémico.

Bibliografía.

1. Andrianov, P. I. *Stomatologia*, 40, 14-19 (1961).
2. Ballesteros, E. En *Farmacología y su proyección a la clínica*, (Velázquez, L. Ed. Oteo, Madrid (1978)).
3. Buffoni, F. *Pharm. Rev.*, 18, 4, 1163-1199 (1966).
4. Bum, S. H. and M. J. Rand. *Br. Med. J.*, 1, 137-139 (1958).
5. Csaba, E., T. Szilagyi, S. Danyanowich and A. Koeber. *Acta Physiol. Hung.*, 23, 363-369 (1963).
6. Dean, P. M. *Brit J. Pharmacol.*, 32, 65-77 (1968).
7. Feigen, G. A., E. M. Vaughan Williams, J. K. Peterson and B. Nielson. *Circulation Res.*, 8, 713-723 (1960).
8. Flacke, W. D. Atanackovic, R. A. Gillis and M. H. Alper. *J. Pharmacol. Expt. Therap.*, 155, 271-278 (1967).
9. Gimeno, A. L., M. F. Gimeno, M. F. Gimeno and J. L. Webb. *Am. J. Physiol.* 203, 194-196 (1961).
10. Giotti, A., A. Guidotti, P. P. Mannaioni and L. Zilletti. *J. Physiol.*, 184, 113-120 (1966).
11. González, J. M.; J. M. Cabanás, P. Tovar; F. Castejón; A. López y F. Infante. *Panorama veterinario*, 71, 32-35 (1979).
12. González, J. M.; J. M. Cabanás; A. López; F. Castejón; D. Santiago y F. Infante. *Panorama veterinario*, 71, 325-330 (1979).

13. Haggard, H. W., L. A. Greenberg, L. H. Cohen and N. J. Rakieta. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 71, 358-363 (1958).
14. Hashimoto, H. *Arch. Inter. Med.*, 35, 609-625 (1925).
15. Hirschowitz, B. I. *An. Rev. Pharmacol.*, 19, 203-244 (1978).
16. Houki, S. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 206, 113-120 (1973).
17. Inui, J., H. Inamura. *Nanuyu-Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 294, 211-269 (1976).
18. Karady, S., B. Rose, J. S. L. Browne. *Am. J. Physiol.*, 130, 539-542 (1940)
19. Kukovetz, W. R., G. Poch. *Advan. Cyclic Nucleotide Res.*, 1, 261-290 (1972).
20. Levi, R., A. Giotti. *Experientia*, 23, 66-69 (1967).
21. Levi, R., A. J. Pappano. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 204, 625-633 (1968).
22. Loomis, T. A. *Quart. J. Studies Ale.*, 13, 561-568 (1952).
23. Mc Neill, J. H., S. C. Verma. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 188, 180-188, (1978).
24. Murdoch, J. En *Bases farmacológicas de la terapéutica* (Goodman and Gelman Eds.) Interamericana 4.^a ed., 110-121 (1974).
25. Ponce Vázquez, J. En *Electrocardiografía clínica. Arritmias cardíacas en el perro*. Tesis doctoral. Facultad de veterinaria de Madrid.
26. Pouchelon, J. L., R. Moraillon and B. Clerc. *Rec. Med. Vét.*, 151, 673-678 (1973).
27. Powell, J. R. M. J. Brody. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 196, 1-14 (1976).
28. Sodi Pallarés, D., G. A. Medrano, A. Bisteni, J. Ponce de León. En *Electrocardiografía clínica* (Ediciones del Instituto Nacional de Cardiología de Méjico) (1968).
29. Spencer, P. S. J. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 148, 31-39 (1964).
30. Wakin, K. G. *Federation Proc.*, 5, 109-119 (1946).
31. Zavecs, J. H., R. Levi. *Federation Proc.*, 35, 645-651 (1976).