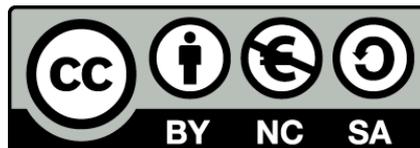




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio farmacológico de la acción sináptica del bretilio y de su posible mecanismo de acción

Silvia Sánchez González



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

R.454.794

U N I V E R S I D A D D E B A R C E L O N A

F A C U L T A D D E F A R M A C I A

Estudio farmacológico de la acción sináptica  
del bretilio y de su posible mecanismo de ac  
ción.

Tesis presentada para optar  
al grado de Doctor en Farma  
cia por Doña Silvia Sánchez  
Gonzalez, Licenciado en Far  
macia.

Barcelona, Mayo 1.981

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083919

Esta Tesis ha sido realizada  
en el Departamento de Farma-  
cología de la Facultad de Me-  
dicina de Barcelona, bajo la  
dirección del Profesor Dr.D.  
Francisco García-Valdecasas  
Santamaría.

A mi esposo y a mis padres.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor Dr. D. Francisco García-Valdecasas - Santamaría, quien me ha hecho el honor de dirigir - esta Tesis, y quien desde mis inicios como alumno - interno de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina de Barcelona, ha orientado mi trabajo, tanto investigador como docente.

Deseo expresar también mi gratitud, al Profesor Dr. D. Ramon Sanmartín Casamada, Catedrático de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, en cuyo Departamento he tenido el honor de colaborar, y de quien siempre he recibido apoyo y orientación. Mi agradecimiento se centra en esta ocasión, en la amable acogida que ha dispensado a esta Tesis, dignándose apadrinarla para su presentación ante el Ilustre Tribunal.

A la Dra. M<sup>o</sup>Eulalia Planas Domingo, Profesor Adjunto de Farmacología de la Facultad de Medicina de Barcelona, que con su íntima amistad y apoyo moral ha contribuido, en todo momento, a la realización de esta Tesis.

Al Dr. D. Angel Díez-Cascón Menéndez, Profesor Ayudante de Farmacología de la Facultad de Medicina de Barcelona, que tanto ha contribuido con su orientación y ayuda a la realización de los trabajos experimentales de esta Tesis.

A mis compañeros Antonia Casellas, Andreu Calvet y Alfonso Tristán, por su colaboración en la realización práctica de parte de los trabajos.

A todos mis compañeros de Departamento, de quienes, en ningún momento, me ha faltado su ayuda y comprensión.

A mi esposo, doblemente, por su constante estímulo y apoyo, y por la gran ayuda que él y D. Pedro Juanola me han prestado para la realización de todo el material gráfico de la Tesis.

A la Fundación Pedro Pons, por la ayuda económica prestada para la realización de esta Tesis.

## I N D I C E

	Págs.
PARTE TEORICA	1 - 68
- Introducción	1 - 44
- Estudio del Bretilio	45 - 68
OBJETIVOS DE LA TESIS	69 - 70
PARTE EXPERIMENTAL	71 - 162
- Material	71 - 72
A. Animales empleados	71
B. Substancias utilizadas	71 - 72
- Métodos	73 - 88
C. Perfusión de bazo de gato "in situ"	73 - 77
D. Conducto deferente de rata "in vivo"	78 - 81
E. Conducto deferente de rata "in vitro"	82 - 83
F. Determinación de la actividad de la MAO	84 - 86
G. Estudios de Fijación	87 - 88
- Resultados	89 - 162
I. Liberación de NA en bazo de gato perfundido "in situ". Acción del bretilio y la reserpina	89 - 90
II. Interacción bretilio-reserpina en el conducto deferente de rata "in vivo"	91 - 93

III. Conducto deferente de rata	
"in vitro"	94 - 146
IV. Determinación de la actividad	
de la MAO	147 - 148
V. Estudios de Fijación	149 - 162
DISCUSION	163 - 180
CONCLUSIONES	181 - 187
BIBLIOGRAFIA	188 - 230

P A R T E T E O R I C A

I N T R O D U C C I O N

## CONCEPTO DE SINAPSIS

El creador del concepto de sinapsis, fué Santiago Ramón y Cajal (1886), que llamó "articulación nerviosa" al lugar de contacto entre la terminación nerviosa aferente y el soma o dendrita de la neurona eferente. Sin embargo, el primero que introdujo el término "sinapsis" fué C. Sherrington según este último autor, las relaciones entre neuronas, pueden hacerse, bien a través de un espacio interneuronal, o bien a través de una superficie de contacto como se ha demostrado por microscopia electrónica (Pappas y Púrpura, 1972

En el primer caso, se acepta, en general, que se trata de un tipo de sinapsis, en la cual, la transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra se realiza a través de un mediador químico (quimiosinapsis). En el segundo caso cuando existe contacto directo entre ambas neuronas, diremos que se trata de una sinapsis electrotónica, donde la transmisión del impulso nervioso, se realiza por potenciales eléctricos originados en la misma membrana.

En los vertebrados superiores, la mayoría de las sinapsis son químicas, por lo que no comentaremos nada más respecto a las sinapsis electrotónicas.

Aún cuando el término de sinapsis se acuñó para la conexión interneuronal, se han adscrito al mismo concepto, sin discusión alguna, otros contactos nerviosos. Podemos distinguir, desde el punto de vista morfológico:

- 1) Sinapsis interneuronales
- 2) Sinapsis neuromusculares
- 3) Sinapsis neuroglandulares

En cada una de estas tres hay que distinguir además, una serie de variedades.

Las sinapsis representan, pues, un conjunto muy polimorfo de estructuras, caracterizado por ciertos rasgos comunes.

Otra forma de clasificar a las sinapsis, es por criterios bioquímicos:

- 1) Sinapsis adrenérgicas
- 2) Sinapsis colinérgicas, etc.

En esta división que podemos considerar clásica, surgen continuamente, nuevas variantes, pues, en especial, - dentro del sistema nervioso central, parece que la bioquímica de los transmisores se complica: sinapsis dopaminérgicas sinapsis serotoninérgicas, sinapsis purinérgicas, etc...

## BASES MORFOLOGICAS DE LA SINAPSIS QUIMICA

Las neuronas y células gliales, junto con sus prolongaciones están densamente empaquetadas en el sistema nervioso central dejando entre sí espacios extracelulares de unos 200 Å de anchura. La región sináptica, cumple también con esta ordenación estructural, y así, vemos que entre dos neuronas existe una hendidura característica que es el espacio sináptico o canal sináptico. Este canal es el que determina o separa las llamadas membranas pre y post-sinápticas, proporcionando así una correlación morfológica para la diferenciación funcional de los elementos llamados pre y post sinápticos (Eccles, J.C. 1964).

La especialización funcional de las membranas sinápticas no ha podido, por el momento, relacionarse con ultraestructuras especializadas en las dos partes homónimas de las membranas que intervienen en la formación de la sinapsis. A raíz de los estudios realizados hasta el momento, la estructura de estas membranas especializadas, responde a la misma composición que el resto de las membranas de la neurona. No obstante, se observa una densificación de la imagen a nivel del citoplasma limitante con las membranas sinápticas.

La terminación axónica, es decir, la porción presináptica, posee unas características estructurales que comentaremos acto seguido:

### A.- Estructuras Presinápticas

Aparte de elementos más o menos comunes a toda célula y a otras regiones de la neurona, en la terminación sináptica encontramos los siguientes elementos específicos:

1.- Vesículas sinápticas: son unos elementos característicos del botón presináptico, diferenciándolo claramente del elemento postsináptico. Los estudios de aislamiento de los llamados sinaptosomas (todos los orgánulos típicos de -

la terminación sináptica) de los cuales forman parte las vesículas sinápticas, parecen demostrar claramente la función de almacenamiento y liberación del neurotransmisor químico por dichas estructuras vesiculares (Whittaker, 1972)

En cuanto al origen de las vesículas sinápticas ha sido discutido por varios autores, las cuestiones principales son: 1) a partir de qué componente celular se forman y 2) en que lugar de la neurona tiene lugar esa formación.

Los estudios ultraestructurales y citoquímicos, han apuntado a los microtúbulos (De Robertis, 1964; Pellegrino de Iraldi y De Robertis, 1968) mitocondria (Sprigg y cols. 1967) membrana de las células nerviosas (Andres, 1964; Westrum, 1965; Birks, 1966; Kanasaki y Kadota, 1969; Gray y Willis, 1970; Douglas y cols. 1971; Holtzman y cols. 1971), el aparato de Golgi (Akert y cols. 1971; Stelzner, 1971; Ijima y Awazi, 1973) y el retículo endoplásmico liso (Rodríguez, Echandria y cols. 1971; Machado, 1971; Stelzner, 1971; Korneliussen, 1972; Tranzer, 1972; Hökfelt, 1973; Teichberg y Holtzman, 1973) como posibles precursores.

Ya en los primeros estudios de microscopía electrónica realizados en tejidos nerviosos, fueron descritas vesículas pequeñas, con un diámetro de alrededor de unos 500 Å como componentes intracelulares de la porción presináptica (De Robertis y Benivet, 1954; Palade y Palay, 1954; Sjöstrand, 1954)

Grillo y Palay (1962) reconocieron, como mínimo dos tipos distintos de vesículas granulares descritas como:

- vesículas granulares pequeñas, de un diámetro aproximado de unos 500 Å (SGV)
- vesículas granulares grandes, de un diámetro aproximado de unos 1000 Å (LGV)

Además de las clásicas vesículas agranulares sinápticas.

Experiencias posteriores indicaron, utilizando bien la adición de aminas exógenas (Tranzer y Thoenen, 1967; Hökfelt, 1968) o una técnica de fijación con  $KMNO_4$  (Richardson, 1966) que prácticamente todas las vesículas en las fibras nerviosas adrenérgicas contienen un núcleo denso (Hökfelt, 1969; Woods, 1970; Fillenz, 1971). Ambos tipos de vesículas SGV y LGV, pueden, de acuerdo con técnicas químicas almacenar y recaptar la amina (Hökfelt, 1968; Tranzer y Thoenen, 1968; Fillenz, 1971). Las vesículas granulares del tipo SGV y LGV se localizaron, en primer lugar, en el interior de las terminaciones de las neuronas adrenérgicas.

En estudios realizados con el músculo dilatador del iris de rata (Hökfelt, 1969) se vió que el número de vesículas por varicosidad presentaba una media de 300-500, de las cuales un 2% eran del tipo LGV y el resto del tipo SGV. En el conducto deferente de rata se encontraron un 40% de las vesículas del tipo LGV (Farrell, 1968), mientras que en el bazo de gato, se encontró un 20% de vesículas del tipo LGV (Bisby y Fillenz, 1971). También se vieron vesículas granulares del tipo SGV y LGV en los axones y cuerpos celulares de las neuronas adrenérgicas. En los axones, la proporción de LGV parecía ser mayor que en las terminaciones (Geffen y Ostberg, 1969; Hökfelt, 1969) aunque ocasionalmente también se podían ver grupos de vesículas SGV.

La alta incidencia de vesículas en las regiones sinápticas y la escasez de ellas en regiones no sinápticas de la neurona representan los extremos de una distribución de frecuencias. Esta distribución de las vesículas sinápticas a través de lo que podríamos llamar "región de transición" es claramente debida a un factor y no se debe al azar. En la mayoría de las sinápsis, el perfil de la distribución de frecuencias de la población de vesículas, representado frente a la distancia de dichas vesículas a la hendidura sináptica, tiene la forma de función continua.

El cilindro axónico en dichos sistemas contiene un enrejado de finos neurofilamentos. Es claro que la localización de las vesículas en esas sinápsis no se debe a una difusión con una constante de difusión pequeña. En el caso de un proceso de difusión entre un estado de equilibrio con gran concentración de vesículas y otro estado estable, de baja concentración (en los lugares alejados de la sinápsis) encontraríamos un perfil de densidad de población de vesículas que disminuiría linealmente con la distancia a la sinápsis (Shea, Karnovsky y Bossert, 1969)

Este hecho sugeriría que el mecanismo que rige la localización de las vesículas pueda ser la presencia de una barrera absorbente o refractante. Un mecanismo de este tipo que decidiera la localización de las vesículas, podría tener importancia transcendental para la transmisión sináptica.

2.- Filamentos y Túbulos: Los botones sinápticos en algunas partes del sistema nervioso contienen neurofilamentos (Gray y Guillery, 1966). Dichos filamentos, de unos 75 Å, de diámetro aparecen a menudo como un trayecto circular en la terminación rodeando a las vesículas y las mitocondrias. Se ha sugerido que estos filamentos corresponden a las neurofibrillas visualizadas por el microscopio óptico, (Palay y Palada, 1955). En los axones se encuentran también a veces neurotúbulos, y algunos investigadores han sugerido que pueden interconvertirse en neurofilamentos (Peters y Vaughn, 1967). Sin embargo, existen datos que no confirman la interconversión de dichas estructuras (Schmit Wuerker, y Palay, 1969). La sugerencia de que las vesículas sinápticas proceden de una transformación de los microtúbulos (De Robertis, 1964) no ha tenido una demostración palpable y ha sido incluso criticada desde el punto de vista bioquímico (Grafstein, Mc Ewan y Shelanski, 1970). Lo que parece cierto es que los neurotúbulos desempeñan un papel importante en el transporte axoplásmico (Gray, 1970).

3.- Banda sináptica: Es una estructura densa en forma de vara, localizada en las terminaciones en contacto con los receptores. Este tipo de estructuras se encuentran descritas en los receptores de la retina (Sjöstrand, 1958) células ciliares cocleares (Smith y Sjöstrand, 1961), electroreceptores (Wachtel y Szamier, 1966) y células de la línea lateral de la anguila (Hama, 1965). También se han descrito en la sinápsis de las células bipolares de la retina (Dowling, 1968; Dowling y Boycott, 1966). Las vesículas se encuentran arracimadas alrededor de esta banda o bastón sináptico.

#### B.- Estructuras Postsinápticas

El elemento postsináptico puede no ofrecer ninguna característica que lo identifique como tal. Podemos encontrar, diversas estructuras especializadas en el elemento post-sináptico, pero ninguna de ellas, sola, es suficiente para catalogar inequívocamente al elemento como post-sináptico.

Frecuentemente existe una densificación del material citoplasmático frente a la membrana presináptica, en la región de lo que llamamos membrana post-sináptica. Otras estructuras típicas, aunque no específicas todas ellas son:

- mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso, cuerpos postjuncionales, cisternas subsinápticas, el llamado aparato dendrítico espinoso, cuerpos multivesiculares y especializaciones micropinocíticas.

1.- Cuerpos densos postjuncionales: Llamados así porque son estructuras opacas al microscopio electrónico, forman una organización hexagonal subyacente a la membrana post-sináptica. Fueron descritos por primera vez en la habénula y los núcleos interpedunculares del gato (Milhaud y Pappas, 1966) ambas estructuras se caracterizan por su alto contenido en monoamino oxidasa (MAO) (Shimizu, Morikawa y Okada, 1959; Smith, 1963), aunque el nivel de dicha enzima en otras regiones no está totalmente determinado.

No es posible, por el momento, asignar a estas estructuras un papel determinado en la sinapsis. Estos cuerpos - han sido ocasionalmente descritos en las denominadas "puncta adherentia", no sinápticas, entre procesos o prologaciones neuronales. (Milhaud y Pappas, 1966).

2.- Cisternas subsinápticas: Han sido descritas en numerosos lugares del sistema nervioso, tanto en superficies sinápticas, como no sinápticas, por lo que Rosenbluth (1962) concluyó que se distribuían al azar en relación con las estructuras extraneuronales. Sin embargo, las cisternas que se encuentran inmediatamente por debajo de la superficie membranosa de la sinapsis, se localizan específicamente bajo la unión sináptica formada por los nervios eferentes - en el sistema acústico lateral de ciertos animales inferiores (Pappas y Púrpura, 1962). En el núcleo óculo motor de la rana, se encuentran estructuras similares subyacentes a ciertas sinapsis, donde rodean íntimamente todo el botón sináptico, por lo que las proyecciones del botón y la cisterna en la membrana son prácticamente idénticas. Por otra parte, jamás se han visto cisternas subsinápticas en las sinapsis electrotónicas.

3.- Aparato dendrítico espinoso: Gray (1959) fué quien primero describió una serie de vacuolas aplanadas, formando capas en disposición paralela en las espinas dendríticas - del córtex visual de la rata. Más tarde, se observaron idénticas formaciones en somas neuronales, en las proximidades de sinapsis axosomáticas. Estructuras similares se han observado en las dendritas, cerca de las espinas dendríticas. En el gato, por ejemplo, existen en gran número en el córtex visual, y son muy escasas en el córtex motor. En el mono estas estructuras se encuentran en el núcleo caudado, pero son raras en el núcleo óculo motor. Se ha dicho que el aparato dendrítico espinoso puede estar implicado en procesos cerebrales, como el aprendizaje o la memoria (Hamlyn, 1962), pero no se ha podido demostrar.

4.- Cuerpos multivesiculares: Estas estructuras fueron descritas por vez primera en las neuronas por Palay y Palade. Se encuentran frecuentemente en las espinas dendríticas y somáticas, lo cual probablemente está relacionado, con la actividad micropinocítica en los procesos postsinápticos (Waxman y Pappas, 1969).

5.- Especializaciones micropinocitóticas: En las membranas postsinápticas se observan a menudo, invaginaciones encapsuladas. Varios razonamientos apoyan la teoría que dichas estructuras intervienen en la pinocitosis, aunque la pinocitosis puede ocurrir en la presinapsis, se da con mucha mayor frecuencia en la áreas postsinápticas. En estudios de sinaptogénesis en córtex cerebelar (Larramendi, 1969) se ha observado la presencia de invaginaciones encapsuladas en las membranas postsinápticas de las sinapsis con los axones en cesta de las células de Pukinje, sugiriéndose que dichas invaginaciones representarían un estadio de un proceso membranoso que actuaría dividiendo en dos las adherencias sinápticas, dando lugar así a diversas uniones más pequeñas. La presencia de semejantes estructuras en tejidos nerviosos ya adultos, no invalida esta hipótesis.

Otro autor, Chalazonitis (1969) de acuerdo con los estudios realizados en las terminaciones axónicas del Hélix, interpreta la formación de estas vesículas como el reflejo de una reorganización estructural de las membranas, tanto en procesos de biosíntesis, como de degradación. Varios trabajos parecen demostrar que la actividad pinocitótica en las sinapsis proporciona una base morfológica para el intercambio selectivo de materiales entre neuronas que están relacionadas entre sí funcionalmente.

## FISIOLOGIA DE LA SINAPISIS

En esencia se admite que la función de la sinapsis, es la transmisión de los impulsos nerviosos en sentido uni direccional. Este concepto viene apoyado en los siguientes datos:

1.- Los impulsos nerviosos se conducen por fibras en forma de variaciones de potencial de membrana, que tienen, un voltaje y una duración característica para cada tipo de fibra (Eccles, 1964). Es decir, todos los impulsos, son iguales para cada fibra del mismo tipo. La modulación de la intensidad se hace por la frecuencia de impulsos. Una estimulación intensa de un órgano sensitivo da una frecuencia de disparo mayor que otra estimulación débil.

2.- Cada neurona recibe sinapsis de fibras procedentes de muy distintos orígenes, resultando así un centro de conexiones en el que hay múltiples entradas y una sola salida, el axon, cuya frecuencia de disparo se corresponde, con el estado de polarización general de la membrana de la célula. No cabe por lo tanto esperar la correspondencia, de: un estímulo que llega por la presinapsis-un estímulo que sale por el axon. Ocurre esto sólo en casos muy contados (en realidad sólo en el de las fibras del músculo esquelético o placa motriz), casos por otra parte, que fueron los primeramente estudiados por las condiciones especiales que permitían la investigación con medios simples.

3.- El impulso nervioso presináptico muere en la sinapsis, produciendo allí la descarga de una sustancia química que atravesando la junción, viene a iniciar en la membrana postsináptica, una serie de eventos que terminan de forma muy diferente ya se trate de una célula efectora (muscular, grasa, glandular, etc. ) o de una segunda neurona. En este último caso el fenómeno terminal es, o un aumento o una disminución de la polaridad de la membrana. El aumento de la polaridad significa inhibición de la conducción nerviosa, y lo contrario significa excitación.

Como consecuencia de estas características lo que el impulso hace al llegar a la sinapsis interneuronal no es - crear otro impulso en la segunda neurona, sino modificar - localmente el valor de su potencial de membrana. Como a la segunda neurona no llega sólo una sinapsis, sino cientos - o aún imles (unas diez mil para las grandes células piram<sup>i</sup>dales de la corteza cerebral), la frecuencia de disparo - por el axon (única variable que condicionan) dependerá de el conjunto de impulsos (excitadores e inhibidores) recib<sup>i</sup>dos en sumación espacial y temporal (dentro de los límites del tiempo de la variación producida). Por ello una neuro- na más que a un sistema de contactos, a lo que se parece , es a un sistema de circuitos como los que se utilizan en - los computadores electrónicos y que se conocen con los nom<sup>b</sup>res de "nor", "not" y "and": varias entradas y una sola - salida. Como en ellos, la salida es únicamente "sí o no" - (Ley del todo o nada), como se conoce desde los tiempos de Pfluger, y como en ellos las entradas pueden provocar au - mento de frecuencia en la salida, o a la inversa, como su - cede en las células "on" y "off" de la retina.

## SINAPSIS ADRENERGICA

La primera proposición concreta de un mecanismo neurohumoral, se hizo alrededor de los comienzos del siglo XX

Lewadonsky (1898) y Langley (1901) observaron por separado, la semejanza que hay entre los efectos de la inyección de extractos de glándula suprarrenal y la estimulación de nervios simpáticos. En 1905 Elliot, empleó estas observaciones y postuló que los impulsos nerviosos simpáticos liberan pequeñas cantidades de una substancia semejante a la adrenalina, en contacto inmediato con las células efectoras, consideró que esta substancia era el paso químico en el proceso de la transmisión. También descubrió que mucho después de que los nervios simpáticos se habían degenerado, los órganos efectores aún respondían en forma característica de la hormona de la médula suprarrenal. También en 1905, Langley postuló que las células efectoras tenían "substancias receptoras" excitadoras e inhibitoras, y que la respuesta a la adrenalina dependía de cual de ellas estuviera presente.

Las investigaciones de Loewi (1921) en las que obtuvo la liberación de una substancia aceleradora en el corazón de rana en determinadas circunstancias, establecieron la primera prueba real de la mediación química de los impulsos nerviosos mediante la liberación periférica de substancias específicas. En el mismo año, Cannon y Uridill, informaron que en el hígado, cuando se estimulan los nervios hepáticos simpáticos, se libera una substancia parecida a la adrenalina que aumenta la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, pero no dilata la pupila. Experimentos ulteriores, principalmente los de Cannon y cols, demostraron que esta substancia es el mediador químico liberado por los impulsos de los nervios simpáticos en las uniones neuroefectoras. El mediador fue llamado originalmente "simpatina

En muchas de sus cualidades farmacológicas y químicas, la "simpatina" de Cannon, se asemejaba mucho a la adrenalina, pero las dos sustancias diferían en algunos aspectos importantes. Cuando se inyecta adrenalina en el organismo provoca efectos excitadores e inhibidores. Así acel<sup>u</sup>era la frecuencia cardíaca, pero al mismo tiempo dilata algunos lechos vasculares y causa constricción de otros. En cambio, los efectos excitadores de la "simpatina" podían producirse por separado.

En 1910, Barger y Dale, observaron que los efectos de la estimulación del simpático se parecían más a los causados por aminas primarias simpaticomiméticas que a los producidos por la inyección de adrenalina u otras aminas secundarias.

Muchas veces se ha enunciado que la noradrenalina pudiera ser la "simaptina", pero la prueba definitiva de su papel como uno de los mediadores simpáticos, sólo se obtuvo cuando se elaboraron métodos para la determinación cuantitativa de pequeñas cantidades de aminas simpaticomiméticas en extractos tisulares y líquidos corporales.

La prueba de que es la noradrenalina y no la adrenalina la catecolamina predominante en los tejidos periféricos y en las terminaciones adrenérgicas, se debe a las investigaciones de von Euler (1946, 1948, 1950, 1957). Este autor comparó las acciones farmacológicas de extractos de nervios adrenérgicos (nervios esplénicos) y de órganos inervados por este tipo de terminaciones con la acción de la adrenalina, llegando a identificar finalmente como el transmisor adrenérgico a la noradrenalina, aunque también la estimulación del simpático puede, en ocasiones liberar pequeñas cantidades de adrenalina.

Después de la demostración que la noradrenalina se encuentra en órganos inervados por el sistema nervioso sim

pático, se obtuvo la prueba de que esta substancia era liberada por la estimulación nerviosa postganglionar simpática. Peart (1949) lo demostró tras la estimulación del nervio esplénico de gato; Mann y West (1950, 1951) lo demostraron en el hígado, bazo, útero e intestino de gato; Outchoorn y Vogt (1952) en la oreja de conejo perfundida.

Posteriormente ha sido posible demostrar directamente la presencia de noradrenalina en las terminaciones simpáticas empleando métodos histoquímicos de fluorescencia, (Falck, 1962; Fillenz, 1971).

Estudios sistemáticos han revelado la presencia de noradrenalina en casi todos los órganos y tejidos, con la notable excepción de la placenta, órgano sin inervación. Esto sugiere que la presencia de esta amina en los órganos y tejidos depende de la presencia de tejido nervioso. La sección e los nervios adrenérgicos del corazón y de algunos otros órganos y su subsiguiente degeneración produce un descenso en el contenido en noradrenalina hasta valores muy bajos, o hasta su total desaparición. Estas experiencias confirman la hipótesis que la presencia de noradrenalina en los tejidos está en relación con la existencia de terminaciones adrenérgicas. Por otra parte, el hallazgo de que la regeneración de los filetes nerviosos previamente seccionados hace aumentar el contenido de noradrenalina del corazón, hasta valores aproximadamente normales (von Euler, 1972).

De estas observaciones se puede deducir, que el contenido en noradrenalina de un órgano o tejido, puede ser una indicación de la riqueza de su inervación adrenérgica.

Hoy también está claro, que la noradrenalina es transmisor neurohumoral en ciertos tramos del sistema nervioso central.

Hay pruebas farmacológicas cuantitativas, y demostraciones directas de histofluorescencia que sustentan la idea de la presencia selectiva de noradrenalina y de otras monoaminas en varias vías nerviosas centrales (Rothballer, - 1959; Hillarp y cols, 1966; Salmoiraghi, 1966; Marley y - Stephenson, 1972). Además, es probable que su inmediato precursor, la dopamina sea el principal transmisor adrenérgico en el sistema extrapiramidal de los mamíferos y en todo el sistema nervioso de ciertos invertebrados (Carlsson, 1959; Hornykiewicz, 1966).

## CICLO DEL NEUROTRANSMISOR: NORADRENALINA

El neurotransmisor en las sinapsis adrenérgicas, tal como hemos citado anteriormente, es la noradrenalina; las etapas de su ciclo se pueden esquematizar como sigue:

- 1.- Síntesis.
- 2.- Almacenamiento y depósito.
- 3.- Liberación. Regulación de la liberación. Acción sobre los receptores presinápticos.
- 4.- Acción sobre los receptores postsinápticos.
- 5.- Difusión en el espacio sináptico, sin sufrir modificaciones.
- 6.- Inactivación.
- 7.- Recaptación.

### 1.- Síntesis.

Tiene lugar en el cerebro, en las células cromafines en los nervios simpáticos y en los ganglios simpáticos.

Se inicia a partir de la fenilalanina (aminoácido esencial). Los pasos que se muestran en la figura 1., fueron propuestos por Blaschko (1939), aunque la conversión global se demostraría varios años después, cuando Gurin y Delluva (1947) administraron fenilalanina radiactiva a ratas y recuperaron adrenalina radiactiva en las glándulas suprarrenales. El proceso ha sido confirmado, y se han identificado y caracterizado la mayoría de los enzimas que participan en él.

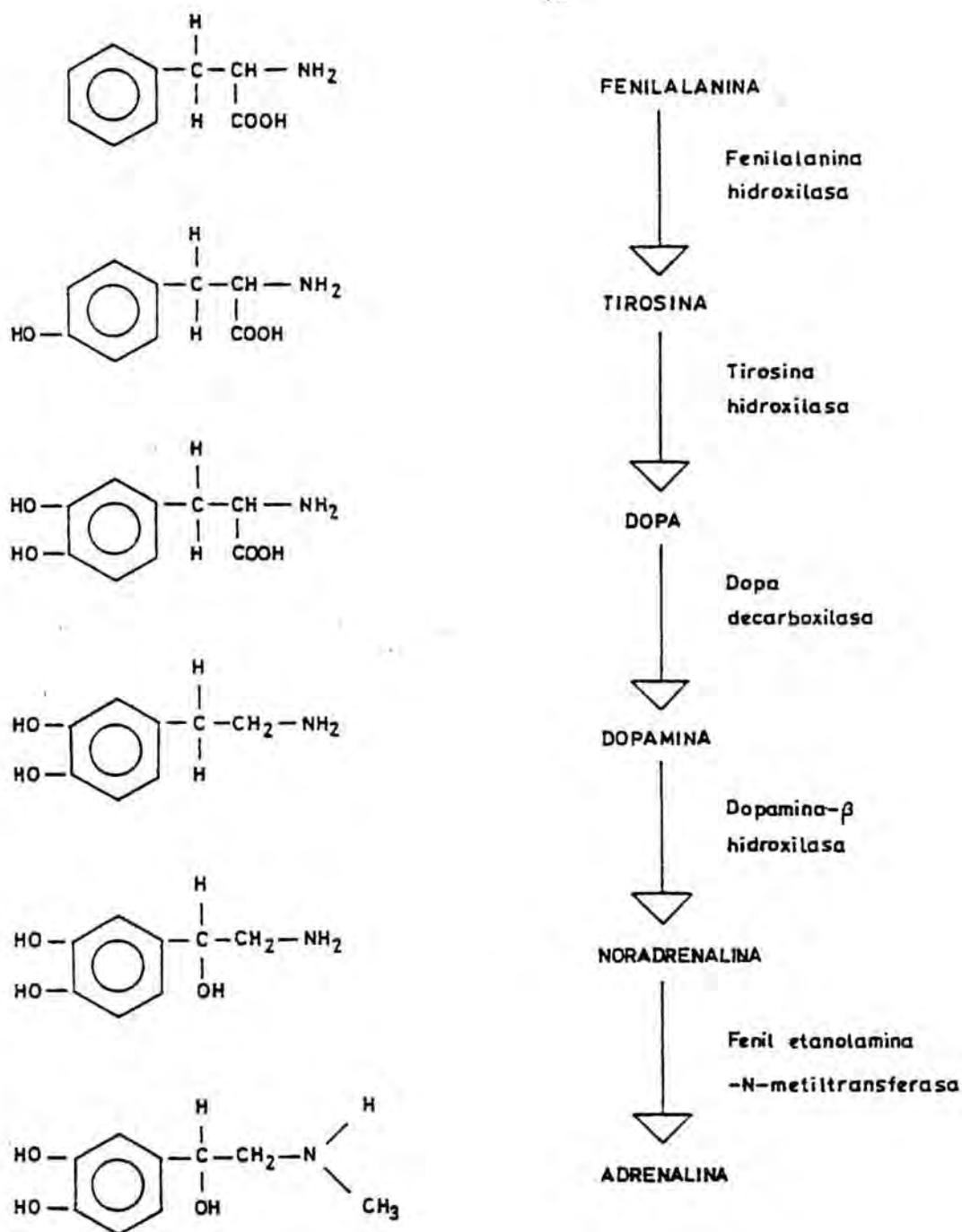


Fig. 1.- Pasos de la síntesis enzimática de la noradrenalina y la adrenalina. (Según Blaschko, 1939; Gurin y Delluva, 1947).

Fenilalanina ----- Tirosina  
Fenilalanina-hidroxilasa

Este paso es previo, y tiene lugar en el hígado. La síntesis puede empezar con el siguiente paso

L-Tirosina ----- L-Dopa  
Tirosina-hidroxilasa

La L-Tirosina penetra en la neurona por transporte activo. Este paso es llevado a cabo por el enzima tirosina-hidroxilasa, que es un enzima específico de las células catecolaminérgicas, estereoespecífico, y que requiere oxígeno,  $Fe^{++}$  y tetrahidropteridina.

La transformación de L-Tirosina a L-Dopa, es el paso limitante en la síntesis de noradrenalina, puesto que el enzima tirosina hidroxilasa es el enzima más específico de los que intervienen en esta cadena de síntesis.

Este paso puede ser inhibido por: alfa metil tirosina, noradrenalina o análogos, siendo en este caso una inhibición por feed-back, y también por tropolonas y quelantes del  $Fe^{++}$ , que actúan inhibiendo al enzima.

L-Dopa ----- Dopamina  
Dopa-decarboxilasa

La L-Dopa pasa a Dopamina, gracias a la dopa-decarboxilasa. Este enzima no es específico, ya que en realidad es una decarboxilasa de L-Aminoácidos aromáticos, que puede convertir por ejemplo, la alfa metil dopa en alfa metil dopamina, la cual a su vez, por acción de la dopamina-beta hidroxilasa, se convierte en alfa metil noradrenalina, el "transmisor falso". La dopa decarboxilasa requiere, para ejercer su efecto, piridoxal y puede ser inhibida por la alfa metil dopa, carbidopa y benserazida.

Dopamina ----- Noradrenalina  
Dopamina-beta-hidroxilasa

La Dopamina pasa a Noradrenalina por acción de la dopamina-beta-hidroxilasa.

Este enzima es una protefina que contiene  $\text{Cu}^{++}$  y se encuentra ligada a la membrana de las vesículas o gránulos de las varicosidades, por ello, la síntesis final de la noradrenalina tiene lugar en los gránulos. Requiere, para su actuación oxígeno y ácido ascórbico. Puede ser inhibida por sustancias quelantes del  $\text{Cu}^{++}$ , mediante grupos disulfuro y ácido fusárico.

Noradrenalina ----- Adrenalina

Finalmente, la metilación de la noradrenalina por la fenil-etanol-N-metiltransferasa origina la adrenalina.

En la médula adrenal, la mayor parte de la noradrenalina sale de los gránulos, y es metilada a adrenalina en el citoplasma y entonces vuelve a entrar a un grupo distinto de gránulos intracelulares, donde es almacenada hasta su liberación.

## 2.- Almacenamiento.

Las catecolaminas, tanto en los nervios simpáticos, como en la médula adrenal, se almacenan en gránulos membranosos o vesículas (Falck, 1962; Malmforms, 1965; Tranzer y Thoenen, 1968; Hökfelt, 1968; Fillenz, 1971). Estas vesículas tienen una alta concentración de ATP, con una relación constante catecolaminas:ATP de 4:1 (Hillarp y cols, 1953; Weiner y cols, 1964) además también se ha demostrado la presencia en ellas, de calcio y otros iones divalentes (Rajan y cols, 1974). En estas vesículas se han identificado, proteínas específicas, como la dopamina-beta-hidroxilasa, (Potter y Axelrod, 1963; Potter, 1967; Bisby y cols, 1973) y diversasa cromograninas, la mitad de las cuales es cromogranina A (Geffen y cols, 1970; Geffen y Livet, 1971; De Potter y cols, 1972).

A pesar de que prácticamente toda la noradrenalina presente en la terminación se encuentra en forma estable,

fijada, hay experiencias que sugieren la existencia de más de un tipo de almacenamiento de neurotransmisor. Así Trendelenburg (1961) se refería a la "noradrenalina disponible" para designar una pequeña fracción que aparecía liberable, como respuesta a la estimulación nerviosa y a varios agentes, como la tiramina. Este almacén fácilmente disponible, se nutriría de otro depósito mayor y más estable (Crout y cols, 1962; Trendelenburg, 1963). El almacén o depósito pequeño, periférico de fácil liberación parece estar relacionado directamente e incluso formar parte de la membrana axonal a nivel de la porción presináptica (von Euler, 1970

De diversas experiencias realizadas "in vivo" e "in vitro" para estudiar la captación y almacenamiento de la noradrenalina en las vesículas, se desprende que son necesarios grupos catecol y beta-hidroxilo de la molécula de noradrenalina.

El proceso de almacenamiento requiere ATP y  $Mg^{++}$  (von Euler y cols, 1963, 1969) es termodependiente y se bloquea por la reserpina. Las catecolaminas liberadas por la reserpina, son desaminadas y por tanto fisiológicamente inactivadas por las monoamino oxidasas intraneuronales, antes de que abandonen la terminación (Kopin y cols, 1962)

### 3.- Liberación.

Tiene lugar por acción del impulso nervioso, que provoca una despolarización, lo que requiere  $Ca^{++}$ . También puede ser producida por agentes externos que penetran en la terminación adrenérgica (tiramina, anfetamina...) y en este caso no se precisa  $Ca^{++}$ .

En la médula adrenal, las catecolaminas se encuentran casi exclusivamente en los gránulos cromafines, mientras que la noradrenalina existente en las terminaciones adrenérgicas periféricas se localiza fundamentalmente, en las vesículas granulosas.

Existen muchas similitudes entre los procesos de liberación estudiados a nivel de la médula adrenal y a nivel de las terminaciones simpáticas periféricas aunque no se puede afirmar que los mecanismos sean totalmente idénticos.

Experimentalmente se demuestra que siempre que en una preparación de cápsula suprarrenal perfundida, se estimula la liberación de catecolaminas, aparecen en el medio, así mismo, cantidades de ATP que coinciden con la cantidad de catecolaminas liberadas, manteniendo la misma proporción de ambas sustancias (ATP y catecolaminas) que la que guardan en el interior del gránulo intacto. Aún más, bajo condiciones experimentales adecuadas, se puede comprobar que el ATP liberado está intacto, a pesar de que la terminación nerviosa es rica en ATP-asa, lo cual sugiere, que el ATP es liberado directamente desde el gránulo al exterior sin pasar por el citoplasma.

Para que esto se lleve a término, y tal como parecen apoyar las microfotografías electrónicas, seguramente la vesícula cargada, se aproxima a la membrana citoplasmática, fundiéndose con ella y abriéndose al exterior, para vaciar su contenido directamente.

Las proteínas específicas del gránulo, las cromograninas, también aparecen en el perfusado de cápsula suprarrenal estimulada, puesto que dichas proteínas no pueden atravesar membranas intactas, lo lógico es suponer, que salen al exterior por exocitosis.

La dopamina-beta-hidroxilasa se encuentra también en el perfusado, en la misma proporción que en el interior del gránulo. Todo ello va en apoyo, pues, de la teoría de la exocitosis, sin embargo, vamos a tener en cuenta las siguientes consideraciones, hechas por Baldezarinni (1975):

a) La microscopia electrónica ha dado una evidencia consistente para las primeras sugerencias hechas por de Ro-

bertis y Vas Ferreira (1957) referentes al hecho de que la exocitosis pueda ser el proceso que media la liberación de catecolaminas.

b) La exocitosis como proceso biológico está bastante bien establecido, tanto morfológica como fisiológicamente para varios tejidos no adrenérgicos, incluyendo el leucocito (Hirsch, 1962) así como también la célula betapancreática (Lacy, 1967) el páncreas exocrino, y puede también tener lugar en otras células neurosecretoras y exocrinas, (Douglas, 1968; Sachs, 1970). La evidencia que ha mostrado la microscopia electrónica para la exocitosis en la médula adrenal es bastante buena (Coupland, 1965; Diner, 1967; D'Anzi, 1969; Grynszpan, Winograd, 1971) especialmente siguiendo a una estimulación (Smith y van Order, 1973).

c) Si la exocitosis es un evento importante en la normal liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas adrenérgicas, entonces varios elementos del proceso permanecen por explicar. El  $Ca^{++}$  es esencial para la liberación de catecolaminas por estímulo fisiológico (estimulación nerviosa o agonistas nicotínicos) en la médula adrenal o en la neurona simpática (Hukövic y Muscholl, 1962). Sin embargo, se conoce poco de las consecuencias fisiológicas del paso de  $Ca^{++}$  al interior de la célula. Este hecho, puede jugar un papel en los mecanismos que llevan a un vaciado final de las vesículas de almacenamiento. Estos pasos se pueden resumir en la siguiente secuencia, que es una forma de concretar el proceso denominado "stimulation-secretion-coupling" (Douglas, 1968):

1) despolarización ----- entrada de  $Ca^{++}$  (con su posterior unión a las mitocondrias o microsomas, o su salida fuera de la célula).

2) acercamiento de la vesícula a la membrana celular

3) unión y posible fusión a dicha membrana

4) apertura de la membrana al exterior

5) expulsión de la noradrenalina

6) separación, para volver la membrana vesicular al interior del citoplasma.

No se sabe si los movimientos brownianos de las vesículas son adecuados para contribuir a que se ponga en contacto la superficie de la membrana de la célula, o si hay, algunos procesos más ordenados, por los cuales se aproximan. Por ejemplo, algunos de los elementos que forman parte de la célula, tales como los microtúbulos, podrían servir de guía para las vesículas (Axelrod, 1972). La presencia de  $Ca^{++}$  podría también facilitar los procesos de acercamiento y unión puesto que los cationes divalentes, tienden a incrementar la agregación o aglutinación de muchas estructuras membranosas subcelulares.

d) Además del  $Ca^{++}$ , un factor que ha recibido una atención considerable para explicar los mecanismos de liberación de las catecolaminas, es la presencia de lisolecitina (palmitato de glicerol-fosforil-colina) (Blaschko y col 1967; Smith y Winkler, 1972). Mientras que muchos elementos subcelulares membranosos contienen solamente trazas de este fosfolípido, es sin embargo muy abundante en las vesículas de almacenamiento del tejido cromafín. Parece que capacita a las membranas de la célula para fusionarse, tal como se ha visto durante las experiencias "in vitro" con eritrocitos de aves (Howell y Lucy, 1969). La posible importancia de este lípido, en la liberación neuronal de noradrenalina, es todavía un enigma, ya que el contenido en lisolecitina de las vesículas del nervio esplénico, a pesar de tratarse de un órgano muy rico en catecolaminas, es bajo y probablemente sólo algo mayor que el de las membranas de microsomas o mitocondrias de otras células (Lagercrantz 1971).

e) Otro factor a considerar, es el tiempo relativamente largo requerido para la exocitosis, factor que no

parece favorecer la idea de que este mecanismo sea el de la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas, ya que ésta se libera en menos de la milésima de segundo.

f) Por otra parte, la presencia de mucho ATP en las vesículas y de una ATPasa en la membrana de las vesículas y probablemente también en la membrana plasmática ayuda a especular sobre la posible intervención de la energía del enlace del grupo fosfato, al romper las barreras membranosas para que se libere el transmisor.

g) De acuerdo con la aparente semejanza con la contracción muscular (stimulation-contraction coupling) es interesante que los fármacos, colchicina y los alcaloides de la Vinca, que interfieren con la estructura y función de la proteína de los neurotúbulos (la tubulina) y una de los microfilamentos (citocalasina B) puedan inhibir la liberación de noradrenalina y dopamina-beta-hidroxilasa, del conducto deferente, por estimulación preganglionar del nervio hipogástrico (Thoa y cols, 1972) o la liberación de noradrenalina del corazón por KCl (Sorimachi y cols, 1973). Para que aparezca este efecto, se requieren concentraciones elevadas de estas sustancias (0,1-1.0 mM). A tales concentraciones pueden interferir con la captación y liberación de varios neurotransmisores putativos en el interior del tejido cerebral, del cual ha sido aislada una proteína parecida a la actiomiosina (neurostenina) (Berl y cols, 1973) (Niklas y cols, 1973) que posee una actividad estimulada por la  $Mg^{++}$ - $Ca^{++}$ ATPasa. Hay pruebas de que la stenina (porción parecida a la miosina) es característica de la membrana vesicular presináptica, mientras que la neurina (porción parecida a la actina) pueda aparecer en la membrana plasmática neuronal. Además la neurina puede estimular la actividad ATPasa de la stenina. Estas observaciones han llevado a la sugerencia de que la entrada de  $Ca^{++}$  durante la despolarización neuronal puede facilitar la interacción neurina-stenina, necesaria para uno o más de los pasos de la exocitosis (Berl y cols, 1973).

h) Se pueden considerar también otras cuestiones, para decidir si las vesículas son vaciadas simplemente una vez por exocitosis y destruidas, o si son reutilizadas varias veces.

En primer lugar, uno se pregunta porqué la síntesis de noradrenalina en las terminaciones nerviosas puede ser regulada (Baldezarinni y Karobath, 1973) en cada momento por un producto final inhibidor de la cadena de síntesis (Spector y cols, 1967) si la función de las vesículas es simplemente ser rellenas y luego vaciadas en la liberación. La regulación de la síntesis parecería tener su mayor importancia fisiológica si algunos o todos sus almacenes vesiculares de transmisor, estuvieran en un estado dinámico de relleno y reutilización.

La segunda consideración es que la repetida observación que la noradrenalina recientemente sintetizada es liberada preferentemente (Kopin y cols, 1968; Gewirtz y Kopin 1970 b; Wennmalm, 1971) no ha sido nunca explicada de forma adecuada, e incluso ha sido cuestionada (Kirpekar y Yamamoto, 1971). Es difícil imaginar como este evento podría ocurrir, si la liberación involucrara el simple vaciado, sólo una vez, de las vesículas llenas de neurotransmisor. Es sin embargo, concebible que vesículas que hayan acabado de liberar (total o parcialmente) sus contenidos, tengan una elevada probabilidad de ser rellenas y vuelvan a usarse de nuevo, por ejemplo, si tienen tendencia a permanecer cerca de las membranas celulares durante un tiempo.

i) Una cuestión final relacionada con el proceso de expulsión del contenido soluble de las vesículas presinápticas es si alguno de los materiales liberados aparte de la noradrenalina tiene actividad biológica.

Como resumen se puede decir que a pesar de todas estas pruebas favorables a la idea de que la exocitosis sea el mecanismo de liberación del neurotransmisor en el sistema adrenérgico periférico todavía quedan detalles relativos al ciclo vital de las vesículas sinápticas y algunos

aspectos cuantitativos de la exocitosis en las neuronas, - que son inciertos y problemáticos.

En consecuencia, han surgido otras hipótesis que intentan explicar los mecanismos de liberación de la noradrenalina.

El impulso nervioso es un fenómeno de membrana. Está bien establecido que consiste en una onda propagada de despolarización durante la cual se produce un intercambio electrolítico, entrando  $\text{Na}^{++}$  del exterior al interior de la célula. Para un mismo tipo de fibra nerviosa, el voltaje, duración y velocidad de la onda son siempre las mismas. Por regla general, las fibras gruesas tienen voltaje y velocidad rápida. Llegada la señal nerviosa a la terminación, las observaciones de Eccles y cols. han demostrado, con registro intracelular, que la variación de potencial presináptico no pasa directamente el canal sináptico hasta la post sinapsis. Hay un "retraso" sináptico, muy pequeño, variando en las motoneuronas de los mamíferos entre 0,3 y 0,45 msec. Este valor puede considerarse superior a la realidad ya que es imposible medir el tiempo de conducción desde el lugar de aplicación del impulso a la sinapsis a través de las finas ramificaciones finales. Si se hace la corrección adecuada, el retraso sináptico puede quedar reducido a poco más de una diez milésima de segundo. Un tiempo tan pequeño difícilmente puede ser suficiente para un proceso tan complicado como la exocitosis, sobre todo si tenemos en cuenta que puede repetirse hasta una frecuencia de 100/sec., sin notarse agotamiento ni disminuir el voltaje del potencial post-sináptico. (Eccles, 1964).

Parece haber además una correlación estrecha entre el potencial del impulso nervioso, cantidad de transmisor liberado y potencial postsináptico producido.

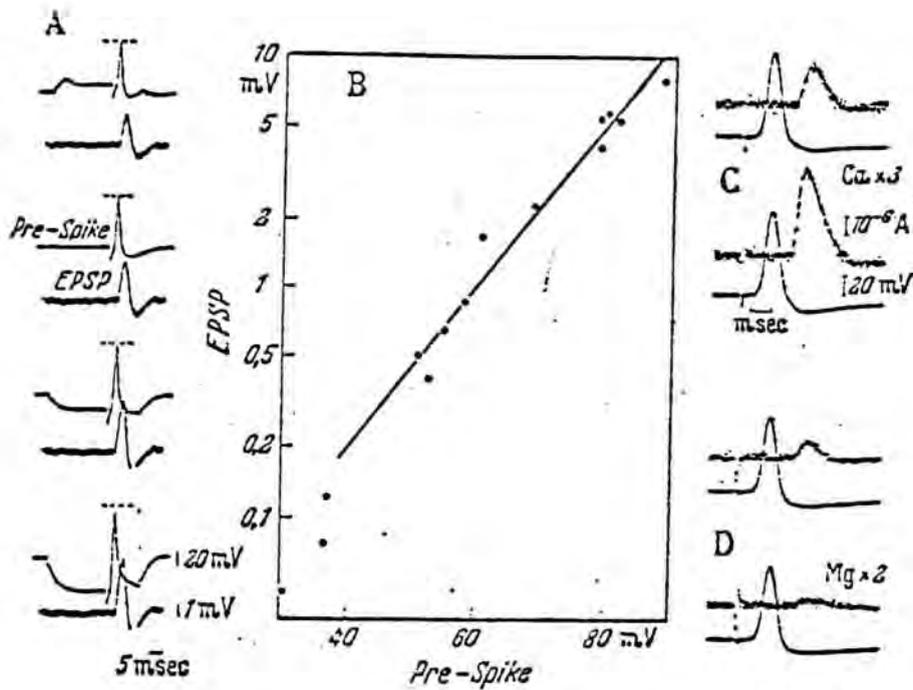


Fig. 2.- Relación entre el potencial de la fibra presináptica y el potencial producido en la postsinapsis (tomada de Takeuchi y Takeuchi) La altura del potencial presináptico se varía aplicando una corriente de despolarización antes de producir el impulso excitatorio. Como el potencial postsináptico depende de la cantidad de transmisor liberada, este experimento es una demostración de que la cantidad de transmisor depende a su vez del potencial presináptico.

Utilizando microelectrodos intracelulares en la sinapsis gigante del ganglio estrellado del calamar, Takeuchi y Takeuchi (1962) han obtenido los resultados que se representan en la gráfica de la fig. 2. En el diafragma de rata el fenómeno es semejante (Hubbard y Willis, 1962) y el aumento del potencial del impulso nervioso produce un enorme aumento del potencial postsináptico. Eccles considera que los pequeños potenciales que se producen (potenciales postsinápticos miniatura) espontáneamente en las sinapsis en reposo, son debidos a la liberación de cuanta de acetilcolina. El potencial postsináptico excitatorio sería consecuencia del aumento considerable de cuanta producidos por la presinapsis. Como en condiciones experimentales se llegaba a producir un aumento del EPP (potencial de placa terminal) de hasta veinte veces "debe haber una concentración notable de vesículas sinápticas hacia el canal sináptico.. si realmente las vesículas son los paquetes preformados". Sería de gran valor, dice Eccles (1973) comprobar si un tal concentración de vesículas puede ser observada con el microscopio electrónico. Hoy sabemos, que dicha concentración no existe.

Una explicación más simple para todos estos hechos, puede ser el suponer que los cuanta de transmisor se corresponden con la variación del potencial de membrana directamente, por existir previamente el transmisor en la membrana mantenido por fuerzas químico-electrostáticas. Al llegar así a la presinapsis una determinada cantidad de electricidad con la señal nerviosa, quedaría liberado el transmisor exactamente en proporción a dicha cantidad, según exige la evidencia anteriormente expuesta. Este depósito que sugerimos es perfectamente compatible con la complejidad admitida hoy día para la membrana celular. (Valdecasas, y cols, 1962, 1967, 1975).

## Regulación de la Liberación.-

Hasta hace pocos años nuestro conocimiento del papel de la neurotransmisión en las terminaciones nerviosas adrenergicas se polarizaba en la síntesis, almacenamiento, liberación y captación neuronal del neurotransmisor. Durante la liberación provocada por la llegada del impulso nervioso, el neurotransmisor interactúa con receptores específicos localizados en la membrana de la célula efectora post-sináptica, originando la respuesta típica del órgano de que se trate. Hasta hace muy poco tiempo, no habían indicios de la existencia de receptores específicos en la terminación adrenergica.

En 1957 Brown y Gillespie describieron que la fenoxibenzamina, un bloqueante alfa adrenergico, aumenta el flujo de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo de gato perfundido. Estos autores postularon que el receptor alfa adrenergico del órgano efector era un lugar importante de utilización del transmisor liberado. En otras palabras, el transmisor liberado durante la estimulación nerviosa, no se combinará con los receptores adrenergicos, si éstos se encuentran ocupados por un agente bloqueante. De la observación de la fig. 3, queda claro que un incremento el flujo de transmisor, resulta del bloqueo de uno o varios de los lugares de utilización, o a un aumento de la liberación de nor

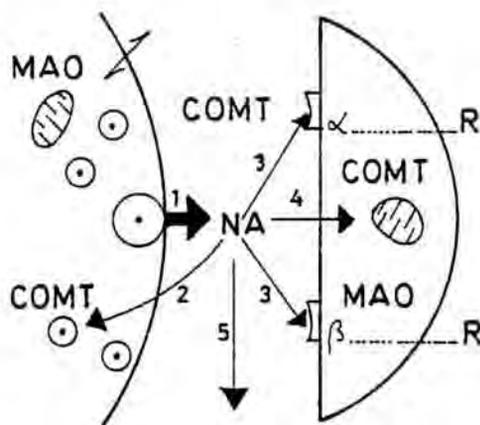


Fig. 3 Tomado de Langer, 1977

adrenalina, estén o no afectados, los lugares de utilización.

Otros hechos experimentales modificaron la hipótesis de Brown y Gillespie. Así Hertting (1965) e Iversen (1965) describieron que la fenoxibenzamina no puede inhibir la recaptación neuronal y extraneuronal (Iversen y cols, 1967; - Iversen y Langer, 1969). Así mismo se obtuvo una inhibición de la recaptación neuronal de noradrenalina con sustancias que no bloquean los receptores alfa adrenérgicos ( como cocaína o desipramina) observándose que no hay aumento, o si lo hay es pequeño, de flujo de transmisor durante la estimulación nerviosa.

Estas y otras observaciones condujeron a la hipóte - sis de que hay receptores alfa adrenérgicos en la superfi - cie exterior de las terminaciones nerviosas adrenérgicas. De acuerdo con esta hipótesis, los receptores presinápti - cos alfa adrenérgicos, están implicados en la regulación - de la liberación de noradrenalina, a través de un mecanis - mo de realimentación negativa, mediado por el mismo neuro - transmisor (Fig. 4) (Farnebo y Hamberger, 1971,a; Kirpekar y Puig, 1971; Starke y cols. 1971,a,b; Enero y cols, 1972 Starke, 1972). Esta hipóte - sis se ha visto apoyada al demostrarse que algunos ago - nistas alfa adrenérgicos, - inhiben la liberación de - transmisor durante la esti - mulación nerviosa (Langer y cols, 1972; Starke, 1972; - Starke y Montel, 1974; Kir - pekar y cols, 1973) y que

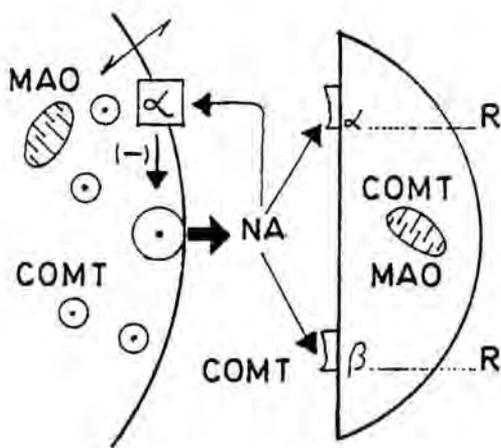


Fig. 4 Tomado de Langer, 1977

se observa igualmente la reducción en la liberación de transmisor obtenida por la exposición a agonistas alfa adrenérgicos, en tejidos en los que la respuesta del órgano efector es mediada por receptores alfa (Starke y Montel, 1974 ; Kirpekar y cols, 1973; Starke y cols, 1975) o receptores beta (Langer y cols, 1972; Starke, 1972; Rand y cols, 1975)

Recientemente se ha postulado que, además de existir un mecanismo de realimentación negativa para la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa via receptores alfa, existe un mecanismo de realimentación positiva en las terminaciones nerviosas adrenérgicas, que se pone en funcionamiento a través de la activación de receptores beta adrenérgicos presinápticos (Fig 5) (Langer y cols, 1974; Adler-Graschinsky, Enero, 1975; Stjarne y Brundin, 1975,1976; Langer, 1976). Esta hipótesis se basa en que la exposición a bajas concentraciones de isoprenalina aumenta la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa a bajas frecuencias, en varios órganos con inervación adrenérgica : aurícula de cobaya, bazo de gato perfundido, aorta torácica de gato, membrana nictitante de gato, oviducto y nervios vasoconstrictores humanos , (Falck, 1962; von Euler,1972 Moran y Perkins, 1958; Lands y cols, 1967; Brown y Gillespie, 1957). Los efectos de la isoprenalina en la liberación del transmisor, pueden paliarse por preincubación con propranolol 0.1 M (Adler-Graschinsky, Langer, 1975 ). La naturaleza beta 1 o beta 2 de los receptores presinápticos, está sujeta toda-

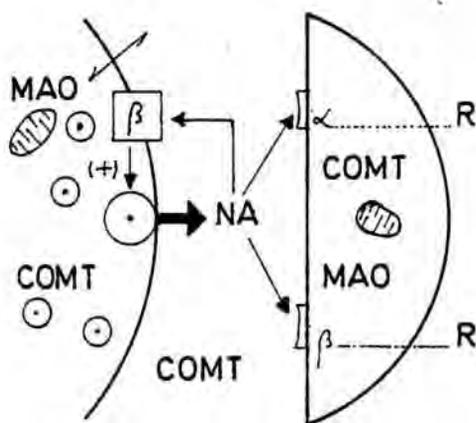


Fig. 5 Tomado de Langer,1977

vía a controversias. Según Dahlof y cols, (1975) los receptores presinápticos son beta 1 porqué son bloqueados selectivamente por metoprolol. Según Stjarne y Brundin, los receptores presinápticos son beta 2, dado que la terbutalina, y el salbutamol favorecen la liberación del transmisor (1976).

Los mecanismos presinápticos parecen estar incluidos en la autorregulación de la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa. El primero, a través de receptores alfa, se pondría en marcha cuando la concentración de transmisor es alta en el botón sináptico, originando una inhibición en la liberación de noradrenalina. El segundo, mediado por receptores beta, se activaría a bajas concentraciones de noradrenalina ocasionando un aumento en la liberación del transmisor (Fig 6.)

También se ha podido confirmar en estudios empleando prostaglandinas, sobre todo las de tipo E: PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub> (Weeks, 1972; Brody y Kadowitz, 1974) la demostración, inicialmente realizada por Hedqvist (1970), de que las prostaglandinas podían disminuir la liberación de noradrenalina del bazo, corazón y conducto de ferente perfundidos. Mientras que todavía se está investigando la posibilidad de que las prostaglandinas puedan provenir de las neuronas presinápticas, se ha propuesto que la prostaglandina E es liberada de las células post sinápticas para ejercer sus efectos presinápticamente. Las prostaglandinas están en muchos tejidos inervados

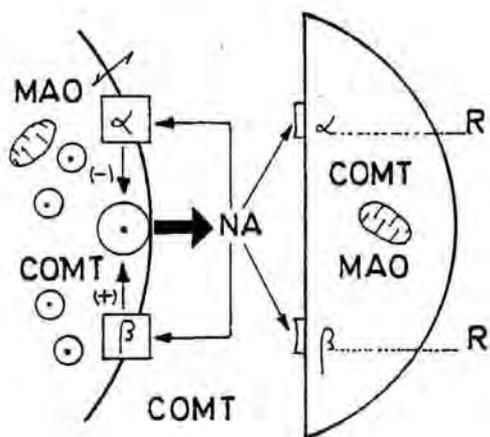


Fig. 6 Tomado de Langer, 1977

por el sistema nervioso simpático, y también en el sistema nervioso central, y la estimulación nerviosa puede incrementar su síntesis y su salida (Ramwell y Shaw, 1966; Davies y cols, 1968; Hedqvist, 1970,1973). Las prostaglandinas son intensamente activa biologicamente, y tienen un amplio espectro de actividad, incluyendo los efectos estimulantes e inhibidores en el músculo liso, así como también en las neuronas periféricas y centrales, en concentraciones fisiológicas muy bajas (Hedqvist, 1970; Wennmalm, 1971; Weeks, 1972; Brody y Kadowitz, 1974). Entre estas acciones está la disminución de los efectos postsinápticos de la noradrenalina, pero también una aparente reducción en la liberación de noradrenalina, como se ha demostrado en algunos (Hedqvist,1970 Swedin, 1971) pero no todos (Weeks, 1972; Brody y Kadowitz, 1974) los estudios en que se han empleado PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub> a concentraciones del orden de 10-100 nM (Hedqvist, 1970,1973 ; Wennmalm, 1971).

En un experimento parecido al de Loewi, la estimulación de un corazón dador perfundido, liberó una substancia parecida a la prostaglandina, la cual disminuía la liberación de noradrenalina en un segundo corazón "receptor", además este fenómeno era prevenido por pretratamiento con ácido eicosatrélico, un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (Wennmalm, 1971).

En el estudio de las interacciones entre varias substancias endógenas y la liberación de noradrenalina, hay varias observaciones que sugieren que algunos polipéptidos pequeños pueden alterar el proceso de liberación de noradrenalina.

La vasopresina, generalmente disminuye el flujo de noradrenalina, debido probablemente a una vasoconstricción y no a una acción sináptica local (Schümann, 1970; Starke y cols, 1971,a). En contraste, varias observaciones sugieren

que la angiotensina II puede producir incrementos moderados del flujo de noradrenalina provocado por estimulación eléctrica del órgano (Schümann, 1970; Schümann y cols, 1970; - Starke, 1971; Starke y Schümann, 1972).

Las aminas endógenas, histamina y serotonina, tienen efectos despolarizantes, y la serotonina puede actuar como un estimulante ganglionar (Haefly, 1972).

Mientras que el AMP<sub>c</sub> puede tener importantes acciones al mediar los efectos postsinápticos de las catecolaminas, la posibilidad de que pueda jugar un papel en la liberación de los neurotransmisores permanece sólo parcialmente estudiada. Poco se sabe acerca de los efectos del AMP<sub>c</sub> en la liberación de noradrenalina, aunque hay algunas propuestas de que puede mediar en las acciones fisiológicas de la acetilcolina en la liberación de catecolaminas de la médula adrenal. Sin embargo, estas sugerencias no han sido totalmente aceptadas (Jaanus y Rubin, 1974). Así mientras que los agonistas nicotínicos pueden aumentar los niveles de AMP<sub>c</sub> de la médula adrenal, la aparición de este fenómeno es más lento que la rápida liberación de catecolaminas. Finalmente la teofilina, la cual tiende a incrementar la actividad del AMP<sub>c</sub> por inhibición de la fosfodiesterasa, deja de aumentar las acciones de los agonistas nicotínicos. A pesar de todo ello, se cree que el AMP<sub>c</sub> puede intervenir en la liberación neuronal. Así la inhibición de la fosfodiesterasa aumenta la liberación de noradrenalina procedente del conducto deferente, mientras que el dibutiril-AMP<sub>c</sub> aumenta la liberación inducida, o la liberación espontánea de noradrenalina y dopamina-beta-hidroxilasa con o sin Ca<sup>++</sup> en el medio (Wooten y cols, 1973).

Esto podría sugerir un papel del AMP<sub>c</sub> en el proceso acoplado de estimulación-secreción, lo cual es coincidente con la entrada de Ca<sup>++</sup>, o podría ser sólo un efecto farmacológico interesante de una sustancia con un amplio espec-

tro de actividad biológica. Hay también varias observaciones hechas con la preparación de nervio frénico de rata, - las cuales indican que altas concentraciones de dibutiril-AMP<sub>c</sub> así como también de inhibidores de la fosfodiesterasa pueden incrementar la cantidad de acetilcolina disponible, para la liberación, quizás por un incremento en su síntesis. También se ha visto que el AMP<sub>c</sub> puede modificar la cinética de la tirosina hidroxilasa, aumentando así la síntesis de catecolaminas (Harris, Baldesarini, Morgwnorth y Roth, 1975)

#### 4.- Acción sobre los receptores postsinápticos

En 1948 Alqhist postuló la existencia de receptores adrenérgicos alfa y beta en el músculo liso y el músculo cardíaco, para explicar las diferentes respuestas de dichas estructuras a las diversas catecolaminas: noradrenalina, adrenalina e isoprenalina.

En consecuencia propuso denominar alfa receptores de las células efectoras a aquellos sensibles sobre todo a la adrenalina, noradrenalina y mucho menos a la isoprenalina, y beta receptores a los receptores localizados en células particularmente sensibles a la isoprenalina, menos a la adrenalina y mucho menos a la noradrenalina.

Los tejidos efectores del organismo pueden poseer los dos tipos de receptores o solamente uno de ellos.

A partir del descubrimiento de inhibidores beta adrenérgicos selectivos para uno u otro efecto de las catecolaminas, Lands y cols (1967) propusieron subdividir el grupo de los receptores beta adrenérgicos en:

- receptores beta<sub>1</sub>, cuya activación es responsable de los fenómenos cardíacos y metabólicos.

- receptores beta<sub>2</sub>, cuya activación provoca la relajación de las fibras musculares lisas.

EFFECTOS DE LA ACTIVACION DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS

	$\alpha$	$\beta$
Corazón	Aumento del período refractario	Taquicardia( <sub>1</sub> ) Aumento de la fuerza de las contracciones( <sub>1</sub> )
Vasos coronarios	Contracción	Dilatación( <sub>1</sub> o <sub>2</sub> )
Bronquios	Contracción	Dilatación ( <sub>2</sub> )
Vasos	Contracción	Dilatación ( <sub>2</sub> )
Músculos esqueléticos	?	Aumento de las contracciones Temblores ( <sub>2</sub> )
Bazo	Contracción de la cápsula	?
Útero	Contracción	Relajación ( <sub>2</sub> )
Tracto gastrointestinal	Relajación	Relajación
Glándulas salivares	Secreción	Secreción
Músculos pilomotores	Contracción fenómeno de horripilación	?
Insulina	Disminución de secreción	Aumento de la secreción
Glucogenolisis	Aumento en hígado	Aumento en músculos
Lipolisis		Aumento: liberación incrementada en el plasma de ácidos grasos no esterificados y glicerol
Renina		Aumento de la actividad renina plasmática

Tabla 1.- Tomado de Freslon, 1980

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS

	Agonistas		Antagonistas
$\alpha$	Neosinefrina Metaraminol Nafazolina Oximatazolina Timazolina	$\alpha$	Yohimbina Alcaloides del cornezuelo del centeno Fenoxibenzamina Fentolamina Moxisilita Prazosina
$\beta_1$ $\beta_2$	Isoprenalina Orciprenalina Isoxsupirina Dobutamina	$\beta_1$ $\gamma$ $\beta_2$	Propranolol Pindolol Alprenolol Oxprenolol Timolol Sotalol
$\beta_1$		$\beta_1$	Acebutolol Atenolol Metoprolol
$\beta_2$	Salbutamol Terbutalina	$\beta_2$	Butoxamina
$\alpha$ y $\beta$	Adrenalina Noradrenalina	$\alpha$ $\gamma$ $\beta$	Labetalol

Tabla 2.- Tomado de Freslon, 1980

Los principales efectos farmacológicos provocados por la excitación de los receptores alfa y beta vienen indicados en la tabla 1.

Así pues, los diversos receptores adrenérgicos están definidos farmacológicamente. Como ya hemos visto en el caso de los dos neurotransmisores y la isoprenalina, anteriormente mencionados, existen sustancias, denominadas agonistas, que poseen la capacidad de activar -selectivamente o no- dichos receptores. Por el contrario, ciertos antagonistas pueden bloquear -selectivamente o no- los efectos de los agonistas (Tabla 2 ).

Mecanismos de acción resultantes de la excitación de los receptores alfa y beta adrenérgicos.

Los efectos adrenérgicos consecutivos a la excitación de los receptores beta se consideran actualmente, secundarios a un aumento de la concentración intracelular de 3'-5' AMP<sub>c</sub> debida a la activación de la adenilciclasa.

El 3'-5' AMP<sub>c</sub> es responsable de la mayor parte de los efectos metabólicos y provocaría además modificaciones de la influencia del calcio, que producirían el efecto mecánico. De hecho, el efecto parece depender de las variaciones de la relación 3'-5' AMP<sub>c</sub> / 3'-5' GMP<sub>c</sub>.

El mecanismo de excitación de los receptores alfa adrenérgicos, en cambio, no se conoce tan bien. Algunos autores han sugerido que el efecto alfa sería el resultado de una inhibición de la actividad adenilciclasa básica y de una disminución de las concentraciones intracelulares de AMP<sub>c</sub>. Para otros investigadores, los efectos estarían en relación con variaciones de la permeabilidad de la membrana para determinados iones.

#### 5.- Difusión en el espacio sináptico sin sufrir modificaciones

Este fenómeno da origen a la reserva de catecolaminas que se encuentran en forma inactiva en la orina.

#### 6.- Inactivación

Se lleva a cabo fundamentalmente por dos enzimas la COMT (catecol orto metil transferasa) y la MAO (mono amino oxidasa). Ambas enzimas actúan sobre una amplia gama de -aminas y cada una de ellas es totalmente activa sobre el -producto de degradación de la otra (Molinoff y cols, 1971) Es decir el metabolismo de una catecolamina puede comenzar con la acción sobre ella de la MAO o de la COMT y el producto de degradación obtenido será metabolizado, a su vez, por la COMT o por la MAO, respectivamente (Fig. 7)

La COMT: este enzima fué descrito primeramente en el hígado de rata (Molinoff y cols, 1971) es un enzima que requiere S-adenosil metionina, como dador de metilo y Mg.

Está repartido ampliamente entre los mamíferos y en algunas plantas, en general su máxima concentración aparece en hígado y riñón, en la mayoría de las especies. En el cerebro existe un reparto desigual, según las distintas zonas cerebrales. La mayor parte del enzima se encuentra en la fracción citoplásmica soluble, aunque existen pequeñas cantidades en las membranas de células adiposas y en los -microsomas. La COMT es un enzima preferentemente extraneuronal, en contraposición a la MAO, que predomina en el interior de la terminación nerviosa (Molinoff y cols, 1971).

El papel fisiológico de la COMT parece ser el de metabolizar las catecolaminas liberadas a la circulación, así como la inactivación de las catecolaminas presentes en ex-

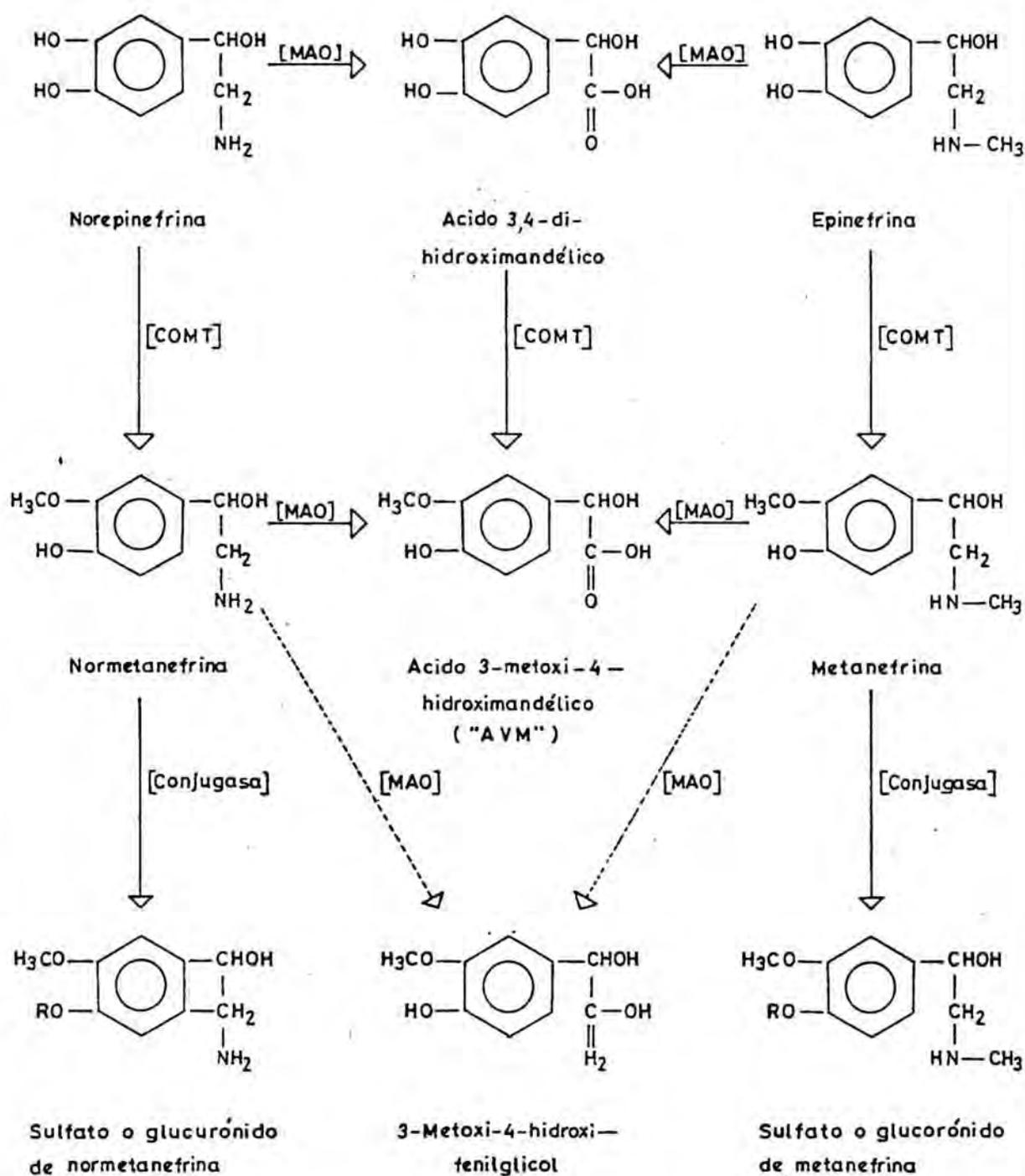


Fig. 7.- Pasos de la eliminación metabólica de las catecolaminas. Según Axelrod y otros (1963).

ceso en los tejidos carentes o pobres en inervación adre -  
nérica. Finalmente, la COMT puede estar implicada en el -  
mecanismo de captación extraneuronal de catecolaminas.

Entre los inhibidores de la COMT están: dicloromercu -  
benzoato, pirogalol.

La MAO: es una flavoproteína que actúa sobre monoami -  
nas alifáticas, primarias, secundarias y terciarias, la -  
longitud de cadena óptima está comprendida entre los 5 y 6  
C unidos, y sobre diaminas de cadena larga (más de 7 c).

Es responsable de la desaminación oxidativa de monoa -  
minas fisiológicamente activas, tales como: tiramina, cate -  
colaminas e indolaminas, benzilamina, quinuramina, etc....  
y no es sensible a los reactivos de tipo carbonilo, semi -  
carbácida y cianhídrico.

Ya en 1955, Satake sugería que la MAO podía ser una  
mezcla de enzimas que tuviesen distinta especificidad de -  
substrato y en cada tejido se presentaría una distribución  
diferente de dichos enzimas.

Alles y Heegard (1943) utilizaron una gran variedad  
de substratos para determinar la actividad enzimática MAO,  
de hígado de diferentes especies, obteniendo diferencias -  
substanciales en la velocidad de oxidación de los diferen -  
tes substratos empleados.

Después de estas primeras observaciones, y con el es -  
tudio de las sustancias inhibitoras de la MAO, se han ido  
acumulando pruebas adicionales indirectas de que la MAO se  
halla en más de una forma.

La existencia de dos formas enzimáticas A y B en el  
cerebro de rata, se infieren en los estudios realizados -  
"in vivo" e "in vitro" por Johnston (1968) y Hall Logan -

(1969). El enzima A, era sensible a la acción de la clorgilina (inhibidor de la MAO) y desamina oxidativamente a la tiramina y serotonina, mientras que el enzima B, era relativamente insensible a la clorgilina y oxidaba a la tiramina, pero no a la serotonina. La proporción de estas 2 formas difería en varias localizaciones (Neef y Goridis, 1972).

Las características de termo-estabilidad (Youdin y Sourkes, 1965; Jarrot, 1971) y pH óptimos (Barbato y Abood, 1963; Youdin y Sourkes, 1965) de las preparaciones de MAO mitocondrial, también varían con el substrato empleado, y este ha sido otro motivo para evidenciar la multiplicidad del enzima (Gorkin y Romanova, 1959; Gorkin, 1966).

Aunque habían una serie de pruebas que demostraban la presencia de múltiples formas de MAO, nadie había demostrado su existencia, hasta que Youdin y Saudler (1967) consiguieron por electroforesis sobre gel poliacrilamida, separar bandas de actividad enzimática de la MAO de hígado de rata.

Sin embargo, ya que los métodos empleados para la purificación y solubilización del enzima a partir de la membrana exterior de la mitocondria (Schnaitman y cols, 1967) eran drásticos, dió motivos a una nueva interpretación en la cual se consideraba a las formas múltiples como artefactos de los procesos de purificación. Poco tiempo después, Kim y D'Iorio (1968) confirmaron la existencia de las formas múltiples, utilizando electroforesis sobre acetato de celulosa. Dichos autores emplearon numerosos procedimientos para la solubilización del enzima y concluyeron que las formas múltiples no eran artefactos. Desde estas observaciones otros investigadores han obtenido pruebas evidentes de que la MAO puede existir en formas moleculares múltiples (Gornes y cols, 1969; Shih y Eiduson, 1969; Baker, 1971; Nagatsu y cols, 1972).

La MAO está ampliamente distribuida en los tejidos de muchas especies de animales vertebrados, localizada en la membrana exterior de las mitocondrias. En corazón y glándula salival, se ha comprobado que existe MAO en la fracción microsomal. En tejidos inervados por el simpático, la destrucción de dichas estructuras nerviosas provoca una marcada reducción del contenido en MAO de las terminaciones simpáticas (Molinoff y cols, 1975).

Aunque la inhibición de la MAO no juega un papel importante en la duración de los efectos de la noradrenalina, se sabe que es indispensable en la regulación del nivel intracelular de neurotransmisor. Toda molécula que se encuentra en el axoplasma, fuera de los depósitos específicos es metabolizada por la MAO.

Los inhibidores de la MAO han sido muy utilizados desde su introducción, tanto desde el punto de vista experimental como terapéutico, entre ellos tenemos: hidracina, iproniacida, tranilcipromina, harmalina ...

### 7.- Recaptación

El proceso de captación de noradrenalina tiene una enorme importancia fisiológica, en primer lugar porque representa un medio de reaprovechamiento de aminas y, en consecuencia, un ahorro en la síntesis; en segundo lugar es el medio más eficaz para suprimir la acción de las aminas sobre el receptor, tanto en condiciones normales, como cuando existe un exceso de amina circulante (Axelrod, 1965).

Para la interpretación y evaluación de las experiencias realizadas sobre la captación, debemos hacer constar, que existen dos tipos de captación:

- a nivel de la membrana presináptica
- a nivel de los gránulos de almacenamiento

Esta distinción es también interesante, puesto que diversos fármacos actúan selectivamente a uno u otro nivel, - por ejemplo la reserpina, no afecta la captación axonal y - sí, en cambio, impide la captación a nivel de los gránulos (Malmforms, 1965).

La máxima capacidad de captación dentro de un órgano determinado se encuentra a nivel de las terminaciones adrenergicas. Existe además una correlación entre contenido en catecolaminas de un órgano determinado y su capacidad de - captación de catecolaminas exógenas (Whitby y cols, 1961).

La simpatectomía quirúrgica, química o inmunológica , reduce grandemente el fenómeno de captación de noradrenalina, y la pequeña cantidad que consigue fijarse se supone - que lo hace por mecanismos inespecíficos (Anden y cols, 1963

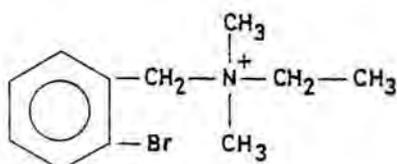
De las experiencias realizadas por diversos autores , se infiere que la captación de aminas es de dos tipos fundamentales:

- específica, en depósitos especiales
- inespecífica, ya sea en depósitos intraneuronales o extraneuronales.

Dentro de los depósitos específicos se acepta la existencia de un gran depósito granular y un depósito periférico, quizás en la membrana axonal, que representan el pequeño almacén fácilmente liberable (Stjarne, 1964).

## DESCRIPCION Y ACCIONES DEL BRETILIO

El bretilio (N-O-Bromobencil-N-etil-N-N-dimetil amonio)



es un derivado de benzilamonio cuaternario introducido en terapéutica a raíz del conocimiento de la estructura química y acciones farmacológicas de la xilocolina.

La xilocolina presenta acciones parasimpaticomiméticas, y además acciones bloqueantes adrenérgicas. Posteriormente, fueron descubiertos otros derivados de benzilamonio cuaternario que bloqueaban específicamente los efectos de la estimulación de los nervios adrenérgicos, pero que carecían de las acciones parasimpaticomiméticas que presenta la xilocolina (Boura y cols. 1959).

Uno de estos compuestos, con mayor actividad y selectividad de acción es el bretilio. De todas sus sales estudiadas el tosilato es la menos higroscópica y por este motivo, es la más empleada en terapéutica.

La toxicidad del tosilato de bretilio, es equivalente en base molar a la del bromuro.

La DL<sub>50</sub> del tosilato de bretilio en ratón es aproximadamente: 20 mg/kg i.v.; 72 mg/kg s.c. y 400 mg/kg via oral.

Las experiencias iniciales demostraron que esta sustancia disminuía la tensión arterial en personas normotensas e hipertensas, por su acción bloqueante sobre el sistema ner-

vioso adrenérgico.

Los estudios autoradiográficos han mostrado que el bretilio se acumula en las terminaciones nerviosas adrenérgicas. La administración parenteral de bretilio va asociada con efectos simpaticomiméticos, como resultado de la capacidad de esta substancia de liberar noradrenalina de las terminaciones nerviosas adrenérgicas. En consecuencia, el bretilio bloquea la liberación de noradrenalina inducida por la estimulación nerviosa, aunque libera noradrenalina como primer efecto.

En concordancia con lo anterior, se ha visto también, que el bretilio puede inhibir la recaptación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas, produciendo por este efecto similar al de la cocaína, la potenciación de las acciones de las catecolaminas circulantes (Haeusler y cols, 1969)

El bloqueo adrenérgico, confiere al bretilio propiedades antiarrítmicas y se administra por vía i.m. o i.v. en casos de urgencia, cuando otros fármacos antiarrítmicos no surten efecto.

El bretilio afecta directamente las propiedades eléctricas del músculo cardíaco. Tiene un pequeño efecto directo en la automaticidad del nódulo sinusal aislado, perfundido, (Papp y Vaughan Williams, 1969) Algunas veces, disminuye el ritmo del seno carotídeo en perros con corazones denervados, (Waxman y Wallace, 1972).

Inmediatamente después de la administración de bretilio la velocidad de despolarización de las fibras de Purkinje "in vitro" aumenta, y además se vuelven automáticas fibras que anteriormente estaban en reposo (Wit y cols, 1970 ; Bigger y Jaffe, 1971). Se cree que estos efectos son causados por la liberación de catecolaminas de las terminaciones nerviosas adrenérgicas, puesto que son inhibidos por el pre-

tratamiento con reserpina o propranolol.

El bretilio tiene un efecto pequeño en el umbral de corriente eléctrica diastólica (Waxman y Wallace, 1972). Sin embargo, el fármaco aumenta significativamente el umbral para la fibrilación ventricular (Bacaner, 1968; Allen y cols, 1972; Kniffen y cols, 1975). Esta acción no depende seguramente de la acción bloqueante neuronal adrenérgica del bretilio.

En la aurícula aislada de conejo, el bretilio no induce cambios ni en la duración del potencial de acción, ni en el período refractario efectivo (Papp y Vaughan Williams 1969).

Tanto en perros normales, como en perros simpatectomizados, el período refractario efectivo de la aurícula aumenta después de la administración de bretilio. Este fármaco, causa una prolongación muy marcada de los potenciales de acción en las fibras de Purkinje de perro (Wit y cols, 1970; Bigger y Jaffe, 1971; Waxman y Wallace, 1972).

En humanos, el bretilio disminuye la presión arterial y causa hipotensión ortostática (Boura y cols, 1959; Taylor y Donald, 1960; Doyle y cols, 1960). Tiene un efecto variable en el rendimiento cardíaco, y bloquea el reflejo de vasoconstricción mediado por los nervios adrenérgicos (Conway 1960; Laurence y Rosenheim, 1960; Freis y cols, 1960; Hayden y Baake, 1960), pero tiene un efecto pequeño en el reflejo de vasodilatación ya que se cree que debe estar asociado con mecanismos colinérgicos postganglionares simpáticos (Blair y cols, 1964).

También en humanos, el bretilio disminuye el ritmo del seno carotídeo y aumenta los intervalos P-R y Q-T, sin embargo la duración del complejo QRS no cambia.

### Efectos indeseables

El principal de ellos es la hipotensión, que aparece, cuando se administra tosilato de bretilio i.v. en arritmias agudas.

La administración i.v. rápida puede causar náusea y vómito.

Durante el tratamiento prolongado por vía oral, muchos pacientes desarrollan taquifilaxia a los efectos hipotensivos, pero no a los efectos antiarrítmicos del bretilio. También se ha descrito en algunos casos la aparición de dolor en las glándulas parótidas.

## ACCION FARMACOLOGICA DEL BRETILIO

La acción farmacológica del bretilio ha sido ampliamente estudiada por numerosos autores. Boura y Green (1959, 1965) han recopilado numerosos datos que resumimos a continuación:

### Acción "in vivo" sobre el sistema nervioso simpático

Tras la administración de bretilio, en especial por vía i.v. aparecen efectos simpaticomiméticos pasajeros, que son más pronunciados cuanto mayor es la dosis utilizada. Posteriormente, los efectos son simpaticolíticos.

Los efectos simpaticomiméticos del bretilio se manifiestan sobre:

a) corazón y vasos: la presión arterial de los gatos anestesiados con cloralosa, generalmente aumenta con dosis i.v. de 3 a 10 mg/kg de bretilio, y luego, tras un período de 2 a 10 minutos desciende gradualmente.

Esta hipertensión va acompañada de taquicardia.

Este efecto del bretilio es mayor en animales con presión arterial baja, por ejemplo en la preparación de gato espinal, y también persiste después de un bloqueo ganglionar, o de una adrenalectomía.

b) membrana nictitante: en gatos anestesiados con cloralosa, la membrana nictitante se contrae tras la administración i.v. de grandes dosis de bretilio (10-20 mg/kg). Esta acción persiste después de ser seccionados los nervios pre o postganglionares y la extirpación de las glándulas adrenales apenas tiene efecto.

La administración de 1 mg de bretilio en la arteria carótida de un gato adrenalectomizado causa una pequeña re

- tracción de la membrana nictitante.

c) ganglio superior cervical: en la preparación de ganglio superior cervical perfundido de gato, la inyección, de 100 mg de bretilio causa una retracción pequeña y temporal de la membrana nictitante, seguida de una inhibición de los efectos de la estimulación preganglionar.

d) útero de conejo: en el útero aislado de conejo la estimulación del nervio hipogástrico provoca contracciones. Esta respuesta a la estimulación nerviosa, se ve inhibida, por la administración de bretilio a concentraciones de 3 a 10 microgramos/ml.

Los efectos simpaticolíticos del bretilio, se manifiestan sobre:

1) corazón y vasos: el bretilio reduce el reflejo de hipertensión causado por la estimulación del nervio vago y la causada por la oclusión de la carótida en el gato, así como también las respuestas presoras causadas por la excitación de los quimiorreceptores, a causa de una anoxia o de inyección de cianuro. La acción del bretilio sobre la presión arterial varía en las distintas especies animales, dependiendo probablemente del nivel del tono simpático en cada una de ellas.

2) membrana nictitante: por el contrario, la administración s.c. de 5 a 10 mg/kg de bretilio a un gato, le causa relajación de la membrana nictitante y estrechamiento de la hendidura parpebral. Generalmente, este efecto no aparece hasta transcurridas 3 horas, y es mayor entre las 12 y 24 horas siguientes a la administración. El tono normal de la membrana no se recupera hasta que han transcurrido 36-48 horas. Cuando el bretilio es administrado por vía oral, se necesitan dosis mayores para obtener los mismos efectos.

La membrana nictitante de los perros también se relaja tras la administración de bretilio en cantidades similares a las utilizadas en las experiencias con gatos. Sin embargo, en los perros la presentación de este efecto es más lenta y persiste por los menos 24 horas.

3) bazo: el bretilio, en bazo de gato perfundido, inhibe la liberación de noradrenalina cuando se estimula el nervio esplénico.

4) íleo de conejo: en el íleo aislado de conejo, la estimulación del nervio visceral provoca una inhibición de los movimientos pendulares del íleo, tal inhibición es suprimida por la adición de bretilio a concentraciones de 1 a 3 microgramos/ml.

5) La administración de 10 mg/kg de bretilio por vía s.c. al conejo, va seguida de una vasodilatación, que es fácilmente apreciable en las venas marginales de la oreja.

En una preparación de oreja perfundida de conejo, la estimulación del nervio auricular provoca vasoconstricción, esta vasoconstricción no se presenta si se adiciona bretilio de 30 a 100 microgramos/ml, al baño, o si éste se aplica localmente entre los electrodos estimulantes y la oreja.

La idea de que los efectos simpaticomiméticos del bretilio son atribuibles principalmente, a una liberación periférica de catecolaminas procedentes de los tejidos adrenérgicos, fué sugerida por Boura y Green (1959) después de ver que tales efectos eran muy manifiestos en los gatos espinales, que persistían después de la adrenalectomía o el bloqueo ganglionar y que se presentaban en las preparaciones de músculo liso aislado.

De acuerdo con lo expuesto, están las experiencias que muestran que una administración previa de dosis depletoras de reserpina reducen de forma muy marcada la respuesta

presora del bretilio en las ratas (Gillis y Nash, 1961) y también las respuestas simpaticomiméticas de las tiras de aorta de conejo o las de aurícula de cobaya (Kirpekar y Furchgott, 1964). Estas experiencias eran similares en perros, (Yelnowsky y Mortimer, 1961) y en gatos espinales (Gokhale, Gulati y Kelder, 1963).

Además hay evidencia directa de la liberación de noradrenalina tritiada procedente del bazo de gato (Hertting, Axelrod y Patrick, 1962; Gilmore y Spiegel, 1962), también se observó que el bretilio libera catecolaminas a la sangre venosa coronaria del perro.

#### Inhibición de la monoamino oxidasa.

Küntzman y Jacobson (1963) realizando experiencias con corazones de rata, observaron que los compuestos que contienen bromo en la posición orto, son diez veces más activos como inhibidores de la monoamino oxidasa, que los compuestos sin sustitución orto, para el bretilio obtuvieron, los siguientes resultados:

Conc. de bretilio	$5 \times 10^{-4} M$	$5 \times 10^{-5} M$	$5 \times 10^{-6} M$
-------------------	----------------------	----------------------	----------------------

---

% Inhibición MAO	82%	24%	0%
------------------	-----	-----	----

Wakade y cols (1964) observaron que el pretratamiento con bretilio aumentaba de forma muy marcada la sensibilidad a la tiramina de la aurícula izquierda de cobaya.

Furchgott (1964) utilizando aurículas de cobayas reserpinizadas para sus experiencias, observó que el pretratamiento con bretilio potenciaba de forma muy marcada, la capacidad de respuesta de la tiramina, si previamente se había incubado el preparado con noradrenalina.

Los resultados obtenidos por dichos autores, sugerían

la posibilidad de que el bretilio actuara como inhibidor de la monoamio oxidasa.

Posteriormente Furchgott y cols (1971) utilizando también aurícula aislada de cobaya, observaron que el bretilio es recaptado activamente y almacenado en las terminaciones nerviosas adrenérgicas, produciendo una inhibición efectiva de la monoamino oxidasa, que persiste durante bastante tiempo, incluso después de lavar el bretilio de la preparación.

Esta inhibición podría explicar total o parcialmente, los siguientes efectos causados por el pretratamiento con -bretilio:

1) potenciación de la respuesta de la aurícula normal a la tiramina.

2) la potenciación de la capacidad de una incubación con noradrenalina para restaurar la respuesta a la tiramina u otros agentes simpaticomiméticos indirectos, de la aurícula reserpinizada.

3) el aumento de la recaptación neta de noradrenalina por la aurícula normal, o bien por la reserpinización.

La inversión de los efectos del pretratamiento con -bretilio por la exposición prolongada de la aurícula reserpinizada a elevadas concentraciones de tiramina, se atribuye a un desplazamiento competitivo del bretilio por la tiramina, de los lugares de unión intraneuronales, con una consecuente disminución de la inhibición de la monoamino oxidasa.

La capacidad del pretratamiento con bretilio para proteger la aurícula frente a ciertos efectos irreversibles resultantes del tratamiento con iproniácida o feniprazina, favorece la idea de que el bretilio inhibe la monoamino oxidasa por combinación reversible con los lugares activos del enzima.

### Acción sobre el sistema nervioso parasimpático

Tras la administración i.v. de bretilio, se observa un bloqueo ganglionar transitorio (Boura y Green, 1959; Gertner y Romans, 1961). También aparece un ligero efecto similar al nicotínico tras la administración de grandes dosis de bretilio en el ganglio superior cervical (Boura y Green, 1959).

En las preparaciones de músculo liso aislado, grandes concentraciones de bretilio causan efectos muscarínicos (Boura y Green, 1959; Gokhale y cols, 1963).

En la preparación de músculo recto aislado de rana, las respuestas a la acetilcolina son potenciadas por el bretilio. En esta misma preparación el bretilio antagoniza la acción inhibitoria de la d-tubocurarina (Gokhale y cols, 1963) sin embargo, en la preparación de diafragma de rata, la d-tubocurarina y el decametonio actúan sinérgicamente con el bretilio.

De las experiencias de Chang y cols (1967) en preparaciones de diafragma de rata y músculo sartorio de rana, se deduce que el bretilio tiene una acción bloqueante postsináptica en las uniones neuro-musculares.

Esta acción es debida a la capacidad que tiene esta substancia para reducir la amplitud de los potenciales de placa terminal, y los potenciales de placa terminal miniatura, sin afectar extracelularmente el potencial de acción nerviosa presináptico o el potencial de la membrana muscular.

En las preparaciones de músculo recto abdominal de rana y músculo digástrico de pollo, las respuestas a la acetilcolina, en presencia de neostigmina, son reducidas por

el bretilio. Sin embargo, se cree que este efecto no es la causa principal del bloqueo neuromuscular que provoca el bretilio.

Se demostró que la causa principal del bloqueo, era una disminución de la liberación de acetilcolina procedente de la estimulación de las fibras motoras. Estimulando repetidamente dichas preparaciones se observó que al aumentar la frecuencia de estimulación se intensifica el bloqueo neuromuscular y disminuye rápidamente la amplitud de los sucesivos potenciales de placa terminal.

#### Acciones sobre el sistema nervioso central

Administrando bretilio a gatos a dosis suficientes para relajar la membrana nictitante, no se observan cambios importantes en el comportamiento de estos animales, no obstante tras la administración de dosis de 10 a 30 mg/kg, en algunos casos se observaba letargo.

No se detecta cambio alguno en las cuentas de actividad de un ratón a los 15 a 20 minutos posteriores a la administración de 50 mg/kg de bretilio i.p., ni tampoco a las 2 horas siguientes a la administración de 2,5 a 40 mg/kg de bretilio por vía i.p.

Sin embargo, a las 4 y 6 horas siguientes a la administración de 10 o 20 mg/kg de bretilio, las cuentas de actividad se reducían a la mitad con respecto al valor control.

La administración de 12,5 mg/kg de bretilio por vía i.v. prologa débilmente la hipnosis producida por 60 mg/kg i.v. de pentobarbital sódico.

El bretilio no presenta acción analgésica alguna, según se ha puesto de manifiesto administrando dosis tan gran

des como 50 mg/kg a la rata, y observando su comportamiento frente a estímulos dolorosos.

### Tolerancia inducida por el bretilio

Durante la administración diaria de bretilio, se desarrolla una tolerancia a la depresión de las funciones adrenérgicas.

Los estudios realizados en las respuestas de las membranas nicotínicas, sugieren que la probable explicación, reside en el desarrollo por parte del músculo liso de una hipersensibilidad a las catecolaminas.

En principio esta hipersensibilidad al transmisor adrenérgico compensa la disminución de su propia liberación debida al bloqueo neuronal adrenérgico. Además, debe tenerse en cuenta que durante el bloqueo neuronal adrenérgico - completo, no puede ni siquiera ser mantenida la hipotonía del simpático, debido precisamente a ese incremento de la sensibilidad a las catecolaminas de la médula suprarrenal.

La tolerancia es menos marcada en los sistemas que adquieren menor hipersensibilidad a las catecolaminas, como por ejemplo los vasos.

### Efectos del tratamiento crónico con bretilio

Murdoch y cols (1977) observaron, tras un tratamiento crónico con bretilio, el edema de las mitocondrias y la pérdida de sus crestas, en las neuronas simpáticas, de conducto deferente de rata, este hecho confirmó las primeras experiencias realizadas por Angeletti y Levy-Montalcini (1972), Caramia y cols (1972) y Juul (1973). Además se apreciaron también inclusiones de aspecto denso en el interior de las mitocondrias, inclusiones que raramente eran vistas

en los controles, aunque sí habían aparecido, algunas veces en varias situaciones patológicas (Hopfner y cols, 1970; - Jordan y cols, 1972). La sugerencia de que estas inclusiones fueran el resultado de una alteración en el metabolismo mitocondrial (Hopfner y cols, 1970) pareció atractiva, ya que el bretilio inhibe parcialmente la fosforilación oxidativa in vitro (Malmquist y Oate, 1968).

La frecuencia de aparición de estas inclusiones en las neuronas simpáticas, incluso 6 semanas después de haber cesado el tratamiento con bretilio, sugiere una alteración persistente en algunos aspectos de la función mitocondrial.

Durante el tratamiento con bretilio, hubo un 60% de mortalidad entre las ratas adultas, pero no en las recién nacidas. La razón de este efecto se desconoce, pero parece estar relacionada con las propiedades antiadrenérgicas del fármaco.

En ratas pretratadas con bretilio, se observó un incremento considerable en la respuesta contráctil máxima a la acetilcolina y noradrenalina en el conducto deferente de estos animales. Ya que tanto las contracciones inducidas por la acetilcolina, como por la noradrenalina, se veían incrementadas el cambio tenía que tener lugar a un nivel posterior al receptor, en la cadena de sucesos que provocan la contracción. El microscopio óptico y electrónico no aportan bases estructurales que expliquen este aumento en la contractilidad en términos de tamaño de células y ordenamiento de la ultraestructura de las células del músculo liso.

Este incremento en las respuestas máximas observado después del tratamiento crónico con bretilio, podría ser debido a cambios en la permeabilidad celular (Namm y col. 1975). Los aumentos inducidos por el fármaco, en la contractilidad del músculo cardíaco, habían sido relacionados con un flujo

de  $\text{Ca}^{++}$  alterado (Glyn, 1964; Grossman y Furchgott, 1964; - Gorman y Marmour, 1974).

La respuesta de los conductos deferentes tratados con bretilio y los controles a la noradrenalina, era comparable para todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  estudiadas, mientras que las respuestas a la acetilcolina en presencia de elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$ , estaban muy aumentadas. Esto podía reflejar el hecho de que las contracciones inducidas por la noradrenalina, usaran principalmente depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$ , mientras que la acetilcolina dependiera más de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  exógeno, para iniciar la contracción (Hudghins y Weiss, 1968; Van Breeman y cols, 1973; Deth y Van Breeman, 1974). Es interesante decir que de acuerdo, con Westfall (1970) quien sugirió que la dependencia del  $\text{Ca}^{++}$  externo es reflejada en las pendientes de las curvas concentración-respuesta, había un pequeño pero consistente aumento en la pendiente de las curvas concentración acetilcolina-respuesta del conducto deferente de rata tratado con bretilio, comparadas con los controles. En cambio en la pendiente, al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  sugiere que el tratamiento crónico con bretilio, podría alterar la entrada de este ión y de este modo aumentar la fuerza de contracción.

## DISTRIBUCION SELECTIVA DEL BRETILIO

Las experiencias realizadas por Boura y cols. (1960), estudiando la distribución de bretilio-C<sup>14</sup> en los distintos tejidos del gato, tras la administración subcutánea de distintas dosis de bretilio-C<sup>14</sup>, a distintos intervalos de tiempo (ver tabla 3), sugieren que la especificidad de la acción bloqueante del bretilio en las neuronas adrenérgicas, puede estar relacionada con su acumulación selectiva en dichas neuronas.

El hecho más interesante en la distribución del bretilio tras su administración subcutánea al gato, es la lenta acumulación de altas dosis del fármaco en los ganglios simpáticos y sus fibras nerviosas postganglionares (tabla 3). Además, los resultados para los distintos intervalos de tiempo, muestran que los niveles de bretilio en los ganglios simpáticos y sus fibras nerviosas postganglionares están relacionados temporalmente con el grado de relajación de la membrana nictitante, que es una manifestación de la acción bloqueante neuronal del bretilio (Boura y Green, 1959).

Observando la tabla, se puede apreciar, que en otros órganos (hígado, corazón...) se alcanzan concentraciones de bretilio más elevadas incluso que las de la sangre, y sin embargo, el nivel máximo de concentraciones se alcanza o incluso desciende antes del inicio del bloqueo simpático.

En general, los órganos ricos en catecolaminas, acumulan bretilio pero no está muy clara la relación entre las concentraciones de catecolaminas y el grado de acumulación del fármaco.

Es interesante, el hecho de que, aunque el bretilio no atraviesa la barrera hematoencefálica, se pueden encontrar pequeñas cantidades del fármaco en el hipotálamo, y el

CONCENTRACION DE BRETILIO EN TEJIDOS NERVIOSOS PERIFERICOS

Valores obtenidos en gatos, en  $\mu\text{m moles/gr}$ . de tejido húmedo (cada valor representa una experiencia). Los tiempos indican el intervalo transcurrido entre la inyección subcutánea de 10, 50 o 6 mg/kg de  $^{14}\text{C}$ -yoduro de bretilio y el sacrificio del animal.  $1\text{mp mol}=0.37\ \mu\text{g}$  de yoduro de bretilio.

Tejido	10 mg/kg					50 mg/kg	6 mg/kg
	3 hr.	12 hr.	18 hr.	18 hr.	72 hr.	18 hr.	13 hr.
<b>Nervios adrenérgicos</b>							
Cervical simpático postganglionar	42	78	--	700	31	696	49
Hipoástrico	--	174	--	---	41	421	61
Gástrico	--	99	--	---	--	---	62
Cardíaco inferior	22	136	--	---	19	196	53
<b>Nervios colinérgicos</b>							
Cervical simpático preganglionar	28	29	--	80	8	114	23
Gran esplénico	14	30	--	--	8	37	24
Vago	15	19	--	40	2	47	--
Frénico	11	94	--	40	-	--	--
<b>Ganglios simpáticos</b>							
Cervical superior	197	270	445	890	61	965	174
Cervical medio	---	---	---	510	--	---	---
Estrellado	168	315	303	770	16	728	185
Celiáco	158	374	450	950	41	634	225
Mesentérico superior	---	59	258	700	--	---	---
Mesentérico inferior	290	362	---	430	49	440	152
<b>Otros ganglios</b>							
Nodoso	38	15	41	30	1	37	6
Ciliar	--	64	--	30	-	--	-
Otico	--	7	--	1	-	--	-
Raíz dorsal	--	16	--	10	-	--	-
Semilunar	--	1	--	1	-	--	-

CONCENTRACION DE BRETILIO EN VARIOS TEJIDOS

Valores obtenidos en gatos, en  $\mu\text{m moles/gr}$  de tejido húmedo (cada valor representa una experiencia). Los tiempos indican el intervalo transcurrido entre la inyección subcutánea de 10 o 50 mg/kg de  $^{14}\text{C}$ -yoduro de bretilio y el sacrificio del animal.  $1\text{mp mol}=0.37\ \mu\text{g}$  de yoduro de bretilio. A otras concentraciones en gato eran: glándula parótida 10  $\mu\text{m moles}$ , ovario 38  $\mu\text{m moles}$ , tiroides 14  $\mu\text{m moles}$ , ganglio linfático cervical 5  $\mu\text{m moles}$  b y c) son las concentraciones en la corteza y la médula respectivamente d) ventriculo izquierdo e) corteza cerebral y cerebelar y médula espinal.

Tejido	10 mg/kg					50 mg/kg		
	1 hr.	3 hr.	3 hr.	12 hr.	18 hr. (a)	18 hr.	72 hr. 18 hr.	
Sangre	23	15	--	13	28	17	1	24
Hígado	288	78	201	62	23	27	--	--
Riñón	113	--	---	--	9	13	--	--
Glándula adrenal						110(b)		
	77	53	---	20	78	164(c)	1	85
Corazón (d)	400	131	---	44	22	32	1	38
Bazo	205	34	102	235	142	108	25	45
Pulmón	---	88	---	---	---	---	--	--
Diafragma	52	--	---	---	45	50	--	--
Area Póstrema	1	25	---	---	---	20	--	--
S.N.C. (e)	1	1	---	1	---	1	--	--
Hipotálamo	1	3	---	---	---	---	--	--

Tabla 3.- Tomado de Boura y cols. 1960

área póstrema, regiones que contienen catecolaminas (Vogt, - 1954).

En principio, todas las neuronas adrenérgicas son capaces de acumular bretilio, pero la facilidad de su acceso y por lo tanto de la acción bloqueante, puede estar influida por la vascularización de cada región determinada.

La vascularización de los ganglios parece ser mayor que la de los otros troncos nerviosos, y esto puede estar en relación con la mayor rapidez en alcanzar una concentración capaz de provocar el bloqueo.

El hecho de que el bretilio se acumule en el corazón, es puso de manifiesto en los primeros estudios de distribución del bretilio realizados por Boura y Green, (1960).

Como se ha citado anteriormente, estos autores, demostraron que el bretilio se acumula selectivamente, en grandes cantidades, en las neuronas simpáticas, y por lo tanto, atribuyeron el elevado contenido de bretilio en el corazón, al hecho de estar este órgano inervado densamente por el sistema nervioso simpático.

También, la gran diferencia entre el contenido de bretilio en el músculo cardíaco, respecto al músculo esquelético (30:1) en ratas simpatectomizadas, es una prueba de que ciertos tejidos tienen afinidades más elevadas que otros por el bretilio. Podría ser que estas afinidades estuvieran determinadas por otros factores distintos a la inervación simpática.

Las experiencias de Namm y cols (1974) sugieren la existencia en el corazón, de unos receptores para el bretilio de naturaleza no neuronal, sino localizados en las membranas celulares. Esta sugerencia podría ser cierta, basándose en la naturaleza catiónica del bretilio, lo que podría limitar

su acceso a los distintos componentes intracelulares cardíacos. Estos autores, vieron que pequeños cambios en las concentraciones de potasio del medio, podrían cambiar de forma muy marcada la unión del bretilio, y por tanto se podría concluir que la unión del bretilio a las células cardíacas, fuese el resultado de fuerzas electrostáticas entre la parte catiónica de la molécula de bretilio y la parte electro negativa de las membranas celulares. Naturalmente, podría ser, que los lugares de unión para el bretilio, en corazones de ratas inmunosimpatectomizadas, no estuvieran relacionados con las células musculares cardíacas, sino, con otro tipo de células, tales como: tejido vascular, tejido conectivo o células cromafines.

Las experiencias de Garcia y cols (1975), muestran que la presencia de sodio es necesaria para la recaptación de bretilio en las terminaciones nerviosas adrenérgicas, de la aurícula de cobaya. De igual forma, la recaptación de noradrenalina es dependiente de la presencia de iones sodio (Iversen y Kavitz, 1966; Gillis y Paton, 1967; Kirpekar y Wakade, 1968,b; Horst, Kopin y Ramey, 1968; Bogdanski y Brodie, 1969). En estas experiencias de Garcia y cols (1975) una concentración baja (25mM) en el medio, o incluso la ausencia total de sodio, reduce la acumulación de noradrenalina inducida por el bretilio, indicando un bloqueo de la recaptación del bretilio al interior de las terminaciones nerviosas, que probablemente tiene lugar a través del mismo mecanismo de recaptación de la noradrenalina.

Las experiencias de Ross (1976) y Ross y Gosztonyi (1975), están de acuerdo también con esta última hipótesis. El pretratamiento de ratas con 6-hidroxi dopamina reduce de una forma muy marcada la recaptación de bretilio en el conducto deferente, indicando esto, que las terminaciones nerviosas, son las responsables de esta recaptación. Es interesante mencionar que cuando la administración de 6-hidroxi dopamina

se realizaba según la siguiente pauta (2 x 50 mg/kg i.v. + 2 x 100 mg/kg i.v., 1 y 2 semanas respectivamente antes de la experiencia) no se observaba reducción en la recaptación de bretilio o de noradrenalina. Este hallazgo negativo, es probablemente debido a que las neuronas que contienen noradrenalina en el conducto deferente, son de axon muy corto, y se regeneran mucho más rápidamente que las neuronas más largas de otros órganos (T. Malmforms, comunicación personal).

La inhibición de la recaptación de bretilio, por los inhibidores de la recaptación de noradrenalina, apoya también la teoría de que la recaptación de bretilio tiene lugar en esas neuronas.

Las experiencias de Hosotani y Misu (1977) demuestran que el bloqueo neuronal adrenérgico inducido por el bretilio en la preparación de íleo de conejo, estimulando el nervio periarterial, es evitado por varios procedimientos que inhiben la recaptación de noradrenalina hacia el interior de las neuronas simpáticas, tales como, un medio sin sodio, baja temperatura, presencia de ouabaína, y anoxia (Iversen y Kavit, 1966; Kirpekar y Wakade, 1968; Bogdanski, Brodie 1969; Dengler y cols. 1961; Green y cols, 1966).

Hosotani y Misu (1977) también muestran, de acuerdo con Ross y Kelder (1975), que el bretilio es recaptado hacia el interior de las terminaciones nerviosas adrenérgicas por un mecanismo activo dependiente del sodio. Esto concuerda con experiencias de Ross y Kelder (1976) respecto a que la recaptación de <sup>3</sup>H-bretilio, es dependiente de la concentración de sodio y de la temperatura, según se ha puesto de manifiesto empleando cortes de conducto deferente de rata, y que esta recaptación es inhibida por acción de la ouabaína en la aurícula de rata.

De acuerdo con la idea de que el bretilio es transportado hacia el interior de las neuronas adrenérgicas a través

del mismo mecanismo que transporta la noradrenalina, Hosotani y Misu (1977) pensaron que la noradrenalina misma, podría prevenir el bloqueo neuronal adrenérgico inducido por el bretilio.

Prasad y cols, ya en (1973) obtuvieron unos resultados similares en conducto deferente de cobaya. Una explicación es que la noradrenalina que entra en las terminaciones nerviosas adrenérgicas simultánea o seguidamente al bretilio, compita por los mismos lugares con los que se une el bretilio para inhibir la liberación del transmisor, o bien, que desplaze de esos lugares al bretilio ya combinado a ellos.

Esta interpretación de Hosotani y Misu, se basa en las experiencias de Ross y Gosztonyi (1975) de que la recaptación de  $^3\text{H}$ -bretilio en la aurícula de rata "in vitro" es inhibida de forma muy marcada por la noradrenalina, y también en los datos aportados por Fischer y cols (1966) de que en el corazón y bazo de gato aislado 14 y 20 horas después de la administración intramuscular de  $^3\text{H}$ -bretilio, el fármaco no era liberado al perfusado por infusión de noradrenalina, pero si era liberado por estimulación nerviosa.

Por otra parte, la incubación con una solución de calcio 10 mM, produce fácilmente una recuperación completa del bloqueo inducido por el bretilio, lo que concuerda con las experiencias de Burn y Welsch (1967) en la misma preparación. Este efecto inversor producido por altas concentraciones de calcio era duradero y no reaparecía el bloqueo.

Estos resultados apoyan la idea, de que el calcio que entra en la terminación nerviosa, alcanza los mismos lugares en el interior de la terminación, con los que se combina el bretilio, desplaza a éste y restaura las respuestas mediadas por las fibras nerviosas.

De las experiencias de Hosotani y Misu (1977) se puede concluir, pues, que el transporte activo de bretilio sensible al sodio, es necesario y que la competición entre el bretilio y el calcio, pudiera ser un factor esencial para el desarrollo de la acción bloqueante neuronal del bretilio.

Puesto que la acumulación del bretilio, en los tejidos, no es afectada por la reserpina (Brodie y cols, 1965 ; Ross y Gosztonyi, 1975) hay que pensar que el bretilio no tiene afinidad por las vesículas intraneuronales de noradrenalina. Ya que el bretilio es metabólicamente estable, y es un derivado de amonio cuaternario, por lo que atraviesa las membranas de la célula por difusión muy lenta, puede servir de modelo para los estudios de los mecanismos de paso de membranas de las neuronas simpáticas. Sin embargo, no se puede excluir el hecho que el bretilio se una intraneuronalmente a otros lugares distintos a las vesículas.

## EFFECTO DEL BRETILIO SOBRE LOS DEPOSITOS DE AMINAS DE LOS TEJIDOS

Las experiencias de Abbs (1965) demostraron que tras una inyección i.v. de 10 mg/kg de bretilio, hay un aumento inmediato de la concentración de catecolaminas en la sangre venosa esplénica.

Un año más tarde, Abbs (1966) y Carlsson (1966) sugirieron que estas catecolaminas liberadas podían provenir de una pequeña parte del depósito de catecolaminas esencial para el propio funcionamiento de las fibras nerviosas adrenérgicas. Si la amina liberada de este almacén, no es reemplazada, puede dar como resultado una deplección localizada, tal deplección podría ser responsable de la actividad bloqueante neuromuscular que posee el bretilio.

Posteriormente, el mismo Abbs y Robertson (1970) detectaron niveles elevados de noradrenalina en el plasma de gato, durante los 30 minutos siguientes a la administración de bretilio, y también apoyó la teoría expuesta anteriormente de que esta amina puede provenir del depósito esencial para el funcionamiento propio de los nervios adrenérgicos, porque cuando esta amina ha sido liberada, las fibras adrenérgicas se encuentran bloqueadas, y además la liberación de noradrenalina tras la estimulación nerviosa se encuentra casi totalmente inhibida.

La liberación de noradrenalina "per se", es poco probable que sea la causa de ese bloqueo neuronal adrenérgico porque la anfetamina que evita o invierte la acción inhibidora de los bloqueantes adrenérgicos (Day, 1962; Day y Rand 1962) administrada a una dosis que produce una simpatomimesis menor que la producida por el bretilio, ni causa deplección de noradrenalina, ni produce bloqueo neuronal adre -

nérgico. Por tanto, el bretilio debe producir algún efecto adicional, para explicar su acción bloqueante, seguramente, no debe sólo liberar la noradrenalina del almacén del cual es normalmente liberada en la estimulación nerviosa, sino, que también debe prevenir el relleno de dicho almacén y en caso de que éste se rellene, debe prevenir la liberación de la amina en la estimulación nerviosa.

Posteriormente Abbs y Pycoc (1973), vieron que la administración de 10 mg/kg de bretilio, producía un descenso selectivo en el contenido en noradrenalina endógena de la subfracción microsomal equilibrada en sacarosa 0,7 M, cuando se había establecido totalmente el bloqueo de los nervios cardioaceleradores de la rata. En muchos estudios de subfraccionamiento se había hecho la distinción entre vesículas de almacenamiento de noradrenalina, ligeras y pesadas (Roth y cols, 1968; Bisby y Fillenz, 1970; Fillenz y Howe, 1971). Las ligeras, habían sido caracterizadas generalmente como las que se equilibraban en densidades de sacarosa de 0,4-0,7 M, y las pesadas, como las que se equilibraban entre 1-1,2 M.

El bretilio disminuía así el contenido en noradrenalina endógena de la subfracción microsomal, la que contenía las vesículas de almacenamiento ligeras, son estas vesículas las que están implicadas principalmente, en la liberación del transmisor en la estimulación nerviosa (Fillenz, 1971; Fillenz y Howe, 1971; Geffen y Livet, 1971). Esta sustancia no producía efecto detectable en el contenido en noradrenalina endógena de la subfracción microsomal correspondiente a las vesículas de almacenamiento pesadas, las cuales, según Fillenz y Howe (1971) parecía que podrían estar también involucradas en la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa.

El bretilio también producía en el corazón, una disminución selectiva en el contenido y en la actividad especí -

fica de la noradrenalina de la fracción microsomal, esta acción era observada tanto si la noradrenalina radiactiva era sintetizada a partir de la tirosina, como si lo era a partir de la dopamina. El bretilio no tenía un efecto demostrable en la actividad específica de la noradrenalina en el homogeneizado total o en las otras fracciones subcelulares (Pycock, 1972). Como la integridad del contenido en noradrenalina de la fracción microsomal era aparentemente esencial para el funcionamiento propio de los nervios adrenérgicos, (Abbs y Pycock, 1971, 1973) y como la noradrenalina nuevamente sintetizada se sabe, que es liberada preferentemente en la estimulación nerviosa (Kopin y cols, 1968; Stjarne y Wwnmalm, 1970), estas experiencias indican que el bretilio puede bloquear los nervios adrenérgicos, evitando que la noradrenalina, esencial para la función nerviosa, permanezca, en el depósito de donde es normalmente liberada. De acuerdo con los trabajos de Abbs y Pycock (1973) se puede deducir, que el bretilio puede primero desplazar la noradrenalina de la fracción microsomal, y evitar entonces, que se almacene a este nivel.

O B J E T I V O S

Con la realización de esta Tesis, nos proponemos ampliar el estudio del mecanismo de acción del bretilio, y puesto que no se han descrito, para este fármaco, acciones postsinápticas adrenérgicas, pensamos que sería una adecuada herramienta farmacológica que contribuiría a ampliar el conocimiento de los procesos fisiológicos que tienen lugar en la porción presináptica de la terminación adrenérgica.

Los trabajos iniciales sobre bretilio (Boura y Green, 1965) demostraron que esta substancia interfiere la liberación del mediador adrenérgico, pero sin disminuir el contenido en catecolaminas de los depósitos en la terminación adrenérgica. Por otra parte, se ha postulado que el bretilio, al igual que los derivados guanetidínicos, actúa inicialmente como simpaticomimético indirecto, liberando catecolaminas de las terminaciones adrenérgicas. Corroboran esta hipótesis, las experiencias de Boura y cols (1960) que demostraron que el bretilio se acumula selectivamente en las neuronas simpáticas.

Para llevar a cabo nuestro estudio, utilizaremos el conducto deferente de rata, ya que al ser un órgano densamente innervado por el simpático, posee un gran número de terminaciones adrenérgicas, y por tanto un elevado contenido en catecolaminas. Por otra parte, se trata de un órgano muy adecuado para realizar técnicas "in vivo", gracias a la facilidad de su disección y asimismo resulta idóneo para las experiencias "in vitro", ya que colocado en un baño de órgano aislado, se muestra sensible a concentraciones muy pequeñas de simpaticomiméticos y bloqueantes adrenérgicos, al mismo tiempo que, se mantiene en

condiciones óptimas de respuesta durante largo tiempo.

También utilizaremos el bazo de gato perfundido "in situ". Aunque se trata de una técnica más difícil de realizar, es también idónea para el estudio de los mecanismos adrenérgicos, por la gran riqueza en catecolaminas de este órgano.

Con estas preparaciones farmacológicas estudiaremos el efecto del bretilio, así como las posibles interacciones con otras sustancias.

Conjuntamente con estas experiencias "in vivo" y en órgano aislado, realizaremos otra serie de estudios encaminados a caracterizar el tipo de fijación que tiene lugar entre el bretilio y la porción presináptica de la terminación nerviosa adrenérgica, utilizando para ello fracciones de membrana de conducto deferente.

Con estas proposiciones que inicialmente consideramos, creíamos poder contribuir al mecanismo de acción del bretilio y más aún, al discutido problema del mecanismo de liberación de los transmisores sinápticos. En realidad, los resultados obtenidos han confirmado nuestras propuestas y como veremos en los resultados experimentales y en las conclusiones finales, se aportan argumentos positivos para la mejor comprensión de estos problemas.

P A R T E   E X P E R I M E N T A L

M A T E R I A L

#### A.- ANIMALES EMPLEADOS

Se han utilizado gatos de ambos sexos, con un peso aproximado de 2,5 Kg; y ratas macho Sprague-Dawlwy de peso - comprendido entre 250 y 280 gr.

Las ratas estaban alojadas en cajas de plástico de tipo Makrolon<sup>R</sup>, a una Temperatura ambiente de 22°C ± 2, y una humedad del 60%.

Estos animales se alimentaban con una dieta standard tipo Panlab<sup>R</sup>, con la siguiente composición:

Proteína	21,3%
Grasa	3,5%
Fibra	4,4%
Minerales	6,2%
Humedad	9,2%

y agua, hasta el momento de iniciar la experiencia.

#### B.- SUBSTANCIAS UTILIZADAS

Las sustancias empleadas en nuestras experiencias - fueron:

Bretylium Tosylate (Gayoso Wellcome, S.A.)  
Bretilio tritiado (Amersham)  
Fentolamina (Regitina<sup>R</sup>, Ciba)  
Fenoxibenzamina ClH (Smith Kline and French)  
Propranolol (Sumial<sup>R</sup>, Ici Farma)  
Atropina (Miró)  
Antazolina (Antistina<sup>R</sup>, Ciba)  
Cimetidina (Fremet<sup>R</sup>, Antibióticos S.A.)  
Desmetilimipramina (Ciba)  
Anfetamina Sulfato (Miquel)  
Cocaína ClH (Eastmen Organic Chemicals)

Noradrenalina ClH (Fluka)  
Adrenalina ClH (Fluka)  
Yohimbina ClH (Merck)  
Guanetidina (Ismelin<sup>R</sup>, Ciba)

Las diluciones de las distintas drogas se hicieron en:

agua destilada  
suero fisiológico  
solución nutritiva de Krebs

añadiéndose al baño en volúmenes no superiores a 1 ml  
La concentración se expresa en gramos de sustancia base/ml  
de solución.

M E T O D O S

### C.- PERFUSION DE BAZO DE GATO "IN SITU"

De acuerdo con la técnica de Kirpekar y Misu (1967) - se han utilizado gatos de ambos sexos, de un peso aproximado de 2,5 Kg. Estos animales se anestesiaron primeramente - con éter y a continuación con cloralosa (80-100 mg/kg) administrada por vía endovenosa a través de la femoral. La traquea fué canulada y el abdomen abierto por una incisión en la línea media, eliminando el intestino desde el duodeno - hasta el colon, al extraerse el intestino se disecó la vena mesentérica superior hasta la unión con la vena esplénica, - dejando un muñón lo suficientemente largo para su canulación posterior. Seguidamente se ligaron y cortaron las conexiones vasculares entre el bazo y el estómago y el peritoneo, y los dos últimos fueron eliminados. Se procedió a la extracción de las dos suprarrenales a fin de excluir la posibilidad de liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo. La arteria hepática fué ligada, y se colocó una cánula en la vena mesentérica superior y otra en la aorta, con el fin de perfundir el bazo. Inmediatamente antes de empezar - la perfusión, el animal fué sangrado hasta su muerte por medio de la cánula situada en la carótida. Así pues, el líquido de perfusión penetra por la arteria aorta y llega al bazo después de pasar por la arteria celíaca y por la esplénica, y después de atravesar el órgano aparece el flujo venoso de la vena mesentérica superior.

La perfusión fué llevada a cabo con solución bicarbonatada de Krebs:

Cl Na: 82,6 gr/l	Agua destilada hasta
Cl K : 4,2 gr/l	1.100 ml
Cl <sub>2</sub> Ca (anhidro): 3,3 gr/l	
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K : 1,9 gr/l	
SO <sub>4</sub> Mg + 7 H <sub>2</sub> O : 3,5 gr/l	
CO <sub>3</sub> HNa : 2,45 gr/l	
Glucosa : 2,15 gr/l	

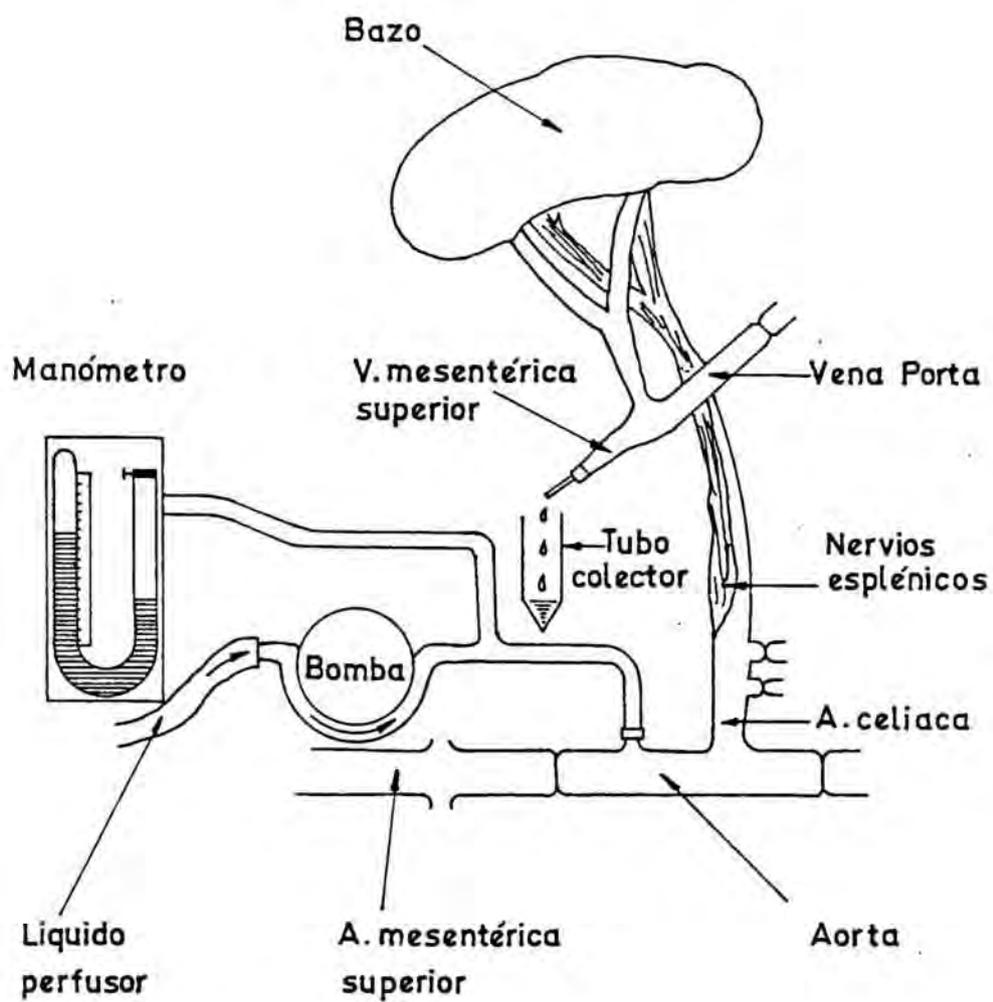


Fig. 8.- Esquema representativo de la perfusión de bazo de gato "in situ". Según Kirpekar y Misu (1967).

aireada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>), mantenida a una temperatura de 35°C e impulsada por medio de una bomba a una velocidad de 7 ml/min.

En primer lugar, el bazo se perfundía durante 20 minutos con solución de Krebs; pasado este tiempo, a un grupo de gatos se les perfundía con solución de Krebs que contenía reserpina (4,1 x 10<sup>-5</sup> M) y a otro grupo de gatos se les perfundía el bazo, primero con solución de Krebs que contenía bretilio (1,2 x 10<sup>-5</sup> M) y 18 minutos más tarde se les perfundía con reserpina (4,1 x 10<sup>-5</sup> M).

C.- a. Determinación bioquímica de la noradrenalina en el perfusado

Las muestras venosas se recogían cada 2 minutos. El contenido en noradrenalina de dichas muestras venosas, se determinó por medio del método de Schelleberger y Gordon (1971) que consiste en:

1) Igualar al volumen máximo todas las muestras venosas extraídas del gato con ácido perclórico 0,4 N

ClO<sub>4</sub>H: 50 mg de EDTA  
3,42 ml de ClO<sub>4</sub>H de 70%  
100 mg de Na<sub>2</sub>S<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

e introducir las en la centrífuga refrigerada de 10-15 min.

2) Transferir las muestras a unos tubos especiales en los que se añade Buffer Tricine para conseguir un pH de 7,6 a 8,1

Buffer Tricine: NaOH 0,525 N  
25 gr de EDTA  
17,9 gr de Tricine  
H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

3) Preparación de dos standarts internos de 0,5 gamas por ml:

6 ml de  $\text{ClO}_4\text{H}$

0,1 ml de una solución compuesta por 19 ml de  $\text{ClH}$  0,01 N y 1 ml de noradrenalina

Se debe comprobar que el pH de esta solución sea también de 7,6-8,1

4) Añadir a todas las muestras y a los standarts internos de 300 a 400 mg de alúmina (que elimina las sustancias fluorescentes no catéquicas).

5) Agitar durante 15 minutos.

6) Aspirar el líquido y dejar la alúmina y seguidamente añadir unos 10 ml de agua destilada fría.

7) Agitar durante 5 minutos.

8) Aspirar y volver a adicionar 10 ml de agua destilada fría.

9) Agitar durante 5 minutos.

10) Aspirar de nuevo, y volver a adicionar 10 ml. de agua destilada fría.

11) Agitar durante 5 minutos.

12) Aspirar de nuevo y adicionar 3,5 ml de  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,05N

13) Agitar durante 15 minutos.

14) Centrifugar todos los tubos durante 5 minutos a 1.200 revoluciones por minuto.

15) Preparación de standarts externos:

- 3 tubos de 0,5 gamas de noradrenalina:  
0,9 cc  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,05 N y 0,1 cc de solución de NA
- 3 tubos de 0,25 gamas de noradrenalina:  
0,95 cc  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,05 N y 0,05 cc de solución de NA
- 3 tubos de 1 gama de noradrenalina:  
0,8 cc  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,05 N y 0,2 cc de solución de NA

#### Fase de oxidación

Se preparan para cada muestra y standart interno 3 tubos, 2 para oxidar y 1 para blanco.

16) Añadir a todos los tubos 1,5 ml de Na-K-P Buffer

5,353 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,27 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

9,52 gr  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$

9 gr EDTA

Agua destilada hasta 1000 ml y después llevar el pH a 7 utilizando NaOH 5 N.

17) Añadir a todos los blancos 0,5 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

2,5 gr de  $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 ml con agua destilada, y coger de éstos, 5 ml y llevarlos a 50 ml con NaOH 5N

18) Añadir a todos los tubos 0,2 ml de yodo y a los 2 minutos exactos añadir 0,5 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a los oxidados.

19) Añadir a todos los tubos 0,4 ml. de ácido acético glacial.

20) Introducir los tubos al baño maria 3,5 minutos y seguidamente en un recipiente con hielo otros 3,5 minutos.

21) Leer en el espectrofotofluorímetro a las siguientes longitudes de onda: Activación 380 y Emisión 480

#### D.- CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VIVO"

Para realizar estas experiencias se siguió la técnica de Laporte y cols (1966) que se indica a continuación.

Se sacrificó el animal mediante un golpe en la cabeza procediéndose a continuación a la disección del conducto de ferente. Para ello se incidió el saco escrotal dejando al descubierto los testículos, que se evertieron hacia el exte rior, con lo que se visualizaban los conductos deferentes de ambos lados.

El conducto deferente se extiende desde el epidídimo, hasta la vesícula seminal, donde forma el conducto eyaculador, el cual a su vez, tras atravesar la próstata, desemboca en la uretra. Se trata de un conducto cilíndrico de pa red notablemente gruesa, por el interior del cual discurre el líquido seminal.

A continuación se seccionó el conducto deferente por sus dos extremos, proximal y distal, con lo que presentaba, una longitud aproximada de 3 a 6 cms. y un peso en seco de unos 60 a 90 miligramos.

Seguidamente, y manteniéndolo siempre en hielo se pro cedió a la determinación del contenido en noradrenalina por el método de Chang (1964).

En líneas generales, este método consiste en la extra cción de las catecolaminas de los tejidos por medio de buta nol, una adsorción simple con alúmina para eliminar las sus tancias fluorescentes no catélicas, y la formación de fluo róforos por acción del yodo.

Siguiendo una comunicación personal de Giacalone, se ha sustituido la alúmina por cloroformo, lo que simplifica

el método sin perder precisión, al eliminarse todos los procesos para ajustar el pH de la alúmina.

D.- a. Determinación bioquímica de la noradrenalina - en el deferente

Para la determinación de la noradrenalina se procedió de la forma siguiente:

1) Se homogeneizó un deferente con 4 ml de butanol ácido, lavando el homogeneizador a continuación con 1 ml del mismo butanol. El homogeneizado se transfirió a una serie de tubos de vidrio de 20 ml de capacidad, a los que se añadió el butanol del lavado del homogeneizador.

2) Se tomaron los homogeneizados y se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 revoluciones/minuto

3) Se transfirieron 4 ml de la fase orgánica a una serie de tubos de vidrio que contenían 8 ml. de heptano lavado y 0,6 ml de ClH 0,1 N.

4) Se agitaron los tubos durante 5 minutos, en posición horizontal.

5) A continuación se centrifugaron a 2.000 revoluciones, durante 3 minutos.

6) Se transfirió la fase ácida (aproximadamente 0,54 ml) a una serie de tubos de hemólisis de 7 ml de capacidad que contenían 3 ml de cloroformo lavado; se agitaron durante 10 minutos y se centrifugaron durante 3 minutos a 4.000 revoluciones/minuto.

Tras este paso, se podía interrumpir la determinación durante un período de tiempo no superior a 3 horas, dejando la solución al abrigo de la luz.

### Fase de oxidación.-

Las soluciones que intervienen en esta fase son las siguientes:

- solución 1: EDTA 0,1 M +  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1 M; 3,72 gr de EDTA y 13,6 gr de acetato sódico se disuelven en 100 ml de agua destilada corrigiendo el pH a 9,2 con NaOH (aproximadamente de 2,7 a 3 ml).

- solución 2: Yodo 0,1 N. 1,27 gr de yodo se disuelven en una probeta de 100 ml enrasando con alcohol etílico absoluto.

- solución 3:  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Debe prepararse inmediatamente antes de su uso. Para ello se pesan 250 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  que se disuelven en 9 ml de NaOH 5 N y 1 ml de agua destilada.

- solución 4:  $\text{CH}_3\text{COOH}$  5 N. 28,6 ml de ácido acético glacial completados hasta 100 ml con agua destilada.

La oxidación se lleva a cabo de la forma siguiente:

A 0,4 ml de la fase ácida se añaden 0,2 ml de la solución 1) y 0,1 ml de la solución 2). Después de 2 minutos se añaden 0,2 ml de la solución 3) y después de otros 2 minutos 0,2 de la solución 4). Después de la adición de cada solución se agita manualmente durante 5 segundos, aproximadamente.

Después de la oxidación se colocaron los tubos al baño maría hirviendo durante 2 minutos, al cabo de los cuales se enfriaron inmediatamente en agua y se leyeron en el espectrofotofluorímetro a las siguientes longitudes de onda: Activación 385 y Emisión 485.

Preparación del standart externo: Se toman 0,4 ml de ClH 0,1 N y se le añaden 400 mg de noradrenalina (0.02 ml

de la solución de 20 gamas/ml) A continuación se les pasa a la fase de oxidación.

Preparación del standart interno: A 5 ml de butanol - acidificado se le añaden 400 mg de noradrenalina (0,02 ml - de la solución de 20 gamas/ml). Se agita durante 10 minutos y de aquí se toman 4 ml que se añaden a los tubos conteniendo heptano y clorhídrico. A partir de aquí el método se sigue igual que con los tubos que contienen hmogeneizado de tejido.

Preparación del blanco de tejido: Se sigue todo el método como se ha descrito hasta llegar a la fase de oxidación. Al llegar a ésta, se ponen primero las soluciones correspondientes a esta fase y al final se le añade los 0,4 ml - de la fase ácida. Después se ponen los tubos al baño maria, y se enfria normalmente.

Preparación del "pool" para el cálculo de la recuperación: Se homogeneizan tres deferentes en 5 ml de butanol acidificado cada uno. Los homogeneizados se transfieren juntos a un tubo de 50 ml. A continuación se centrifugan durante 5 minutos a 3.000 revoluciones/minuto. Se toman 4 ml de la fase orgánica y se hacen pasar normalmente a través del método. Otros 4 ml de esta misma fase orgánica, se ponen en tubos de vidrio y se les añade 400 nanogramos de noradrenalina (0,02 de la solución de 20 gamas/ml) y se les hace pasar también por todo el método.

## E.- CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

En estas experiencias se ha utilizado también para describir el conducto deferente, la técnica de Laporte y cols (1966) ya descrita anteriormente.

Una vez disecado, se colocó el conducto deferente, en una cápsula de Petri, provista del mismo líquido nutritivo - que se emplea para el baño de órgano aislado, y a una temperatura de 31°C. Se eliminaron los restos de tejido graso - que pudiera haber en su exterior, así como las secreciones que ocupaban su luz.

El extremo más grueso del órgano, que es el correspondiente a la uretra, se ligó uniéndolo a una varilla metálica que se introducía en el baño, conteniendo el líquido nutritivo, y el extremo testicular, se unió por medio de un hilo lo suficientemente largo, en unas experiencias a un transductor de tensión isométrica Harvard, acoplado a un polígrafo Harvard modelo 2120; y en otras experiencias, el hilo se unió a un transductor de tensión isométrica Letica, acoplado a un polígrafo Letica (registro térmico).

La capacidad del baño era de 15 ml, manteniéndose a una temperatura constante de 31°C, gracias a un aparato de perfusión continua (Water Thermosta, Radiometer-Copenhagen).

El líquido nutritivo fue la solución bicarbonatada de Krebs, en cuyo interior se hizo burbujear de forma constante carbógeno (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>)

Una vez dispuesta la preparación de la forma reseñada se deja estabilizar durante unos 15 minutos, a fin de obtener una mayor constancia de las respuestas. Pasado este intervalo de tiempo, se añade al baño la sustancia a estudiar, registrándose el efecto obtenido mediante el polígrafo.

La preparación se lavaba por perfusión con líquido nutritivo nuevo, que penetraba por la parte inferior del baño , mientras que el líquido que lo ocupaba anteriormente era aspirado por vacío por su parte superior. De esta forma, se lograba que el órgano no dejara de estar en ningún momento sumergido en la solución nutritiva.

La duración del lavado era aproximadamente de 10 segundos. Seguidamente, se espera a que la aguja inscriptora vuelva a la línea de base para continuar la experiencia.

F.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA MONOAMINO  
OXIDASA

Para la determinación de la posible actividad inhibitoria de la monoamino oxidasa que pueda tener una sustancia determinada, en nuestro caso el bretilio, se procede a la valoración del grado de actividad de la MAO después de la administración de la sustancia problema.

Esta valoración (Levy, 1968) puede llevarse a cabo por medio de técnicas directas o indirectas. Las primeras pueden realizarse a su vez "in vivo" o "in vitro".

En nuestro estudio se ha empleado la técnica directa "in vivo". Las experiencias consistieron, en esencia, en tratar a los animales con el presunto inhibidor de la MAO y después de un tiempo determinado se procede al sacrificio del animal y a la homogeneización de los órganos o tejidos a estudiar.

Estos homogeneizados se ponen en contacto con un sustancia sustrato de la MAO, determinando después de un intervalo de tiempo fijo, bien su metabolización, bien el consumo de oxígeno, bien la cantidad de amoníaco liberado, bien el aldehído formado en la desaminación oxidativa, o bien la radiactividad de las sustancias marcadas que se utilizan como sustratos.

Aunque en líneas generales, todos los métodos de determinación de la actividad de la MAO "in vivo" son semejantes, varían en cuanto a los sustratos utilizados:

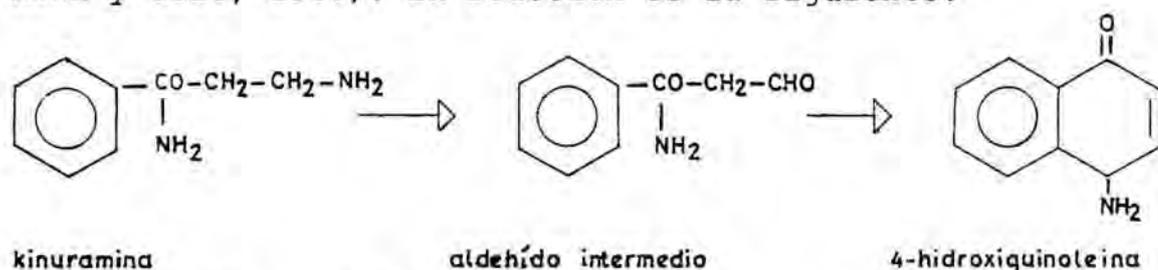
Los más corrientemente utilizados son:

- serotonina (Bogdanski y cols, 1957)
- tiramina (Horita y Mc. Grath, 1960)

- triptamina (Weissbach y cols, 1960; Lovenberg y col 1962).
- noradrenalina (Shore y cols, 1957)
- kinuramina (Weissbach y cols, 1960; Krajl, 1965)
- bencilamina (Robinson y cols, 1968)
- yodobencilamina (Zeller y cols, 1963).

En nuestras experiencias se ha empleado el método de Krajl (1965), con el cual se determina la cantidad de 4-hidroxiquinoleína, que se forma al incubar el sustrato, kinuramina, con el tejido a investigar.

La 4-hidroxiquinoleína se forma por ciclación espontánea del aldehído intermedio que es formado por la desaminación oxidativa de la kinuramina, debido a la MAO (Weissbach y cols, 1960). La reacción es la siguiente:



El método de Krajl, se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1) Se homogeneiza el tejido con agua destilada.
- 2) A 1 ml de dicho homogeneizado se le añaden 0,5 ml de buffer fosfatos 0,5 M (pH 7,4); 0,5 ml de una solución de kinuramina de 200 microgramos/ml y 1 ml de agua destilada.
- 3) Seguidamente se incuba a 37°C, durante 30 minutos.
- 4) Se añaden 4 ml de ácido tricloroacético al 10%.
- 5) Se centrifuga durante 10 minutos a 3.000 rev/min.

6) A continuación se extrae 1 ml de la capa sobrenadante y se añaden 2 ml de NaOH 1 N.

7) Por último, se lee inmediatamente en un espectrofotofluorímetro, a una longitud de onda de 315 para la excitación y de 380 para la emisión.

Se preparan muestras que contienen tejido procedente de animales no tratados, son los denominados standarts, que luego pasan también por todos los pasos del método.

También se preparan unas muestras denominadas "blancos" que no contienen kinuramina, sino agua destilada, de esta forma, con estas muestras, conocemos la fluorescencia propia de los reactivos y tejidos.

El cálculo de la inhibición de la actividad de la MAO se hizo por comparación con la lectura de la muestra control (standart) a la que se le dió un valor de 100 por 100.

## G.- ESTUDIOS DE FIJACION

Se realizó el aislamiento de membranas por la técnica de L.T. Williams y R.J. Lefkowitz.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de  $200 \pm 10$  gramos a las que después de sacrificar se extirpan los conductos deferentes, que se homogeneizan (con homogeneizador de vidrio) a la máxima velocidad, durante 15 segundos a  $0^{\circ}\text{C}$  en sacarosa 0.25 M, tris-HCl 5 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Después de filtración a través de gasa hidrófila, se centrifuga el homogeneizado a 600 g a  $3^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos, descartándose el sedimento. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 20.000 g a  $3^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos. El sedimento así obtenido, después de lavarse dos veces con tampón de incubación helado se resuspende en tris-HCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, a razón de 10 mg de tejido original por mililitro de tampón.

Se incubaron porciones de 5 ml de la preparación obtenida con concentraciones de cloruro de bretilio marcado uniformemente, variables entre  $2,5 \times 10^{-9}$  M y  $2,5 \times 10^{-4}$  M a  $37^{\circ}\text{C}$  y a tiempos comprendidos entre 0 y 20 minutos.

Transcurrido el tiempo predeterminado para la incubación se pone fin a ésta añadiendo 5 ml de tampón de incubación helado y centrifugando a 105.000 g durante 30 minutos. Se lava el sedimento con tampón de incubación y se añaden 22 ml de ácido fórmico al 85% para su disolución. A las 48 horas se introducen las muestras en viales de centelleo que contienen 10 ml de Merit (Isolab) y se cuentan durante 10 minutos.

Se considera como específica la diferencia entre la fijación así obtenida y la resultante de desplazar con una concentración de bretilio frío 1000 veces superior.

A otro grupo de muestras, después de transcurrido el tiempo de incubación con bretililio tritiado, se les añade noradrenalina, adrenalina, anfetamina, fenoxibenzamina, propranolol, desipramina, yohimbina y guanetidina, con el fin de observar un posible desplazamiento del bretilio fijado.

Paralelamente a estas experiencias, se han realizado preincubaciones con las sustancias citadas anteriormente y posterior fijación de bretilio tritiado e incubación simultánea con bretilio tritiado en presencia de las mismas sustancias.

R E S U L T A D O S

PERFUSION DE BAZO DE GATO

NA en el perfusado

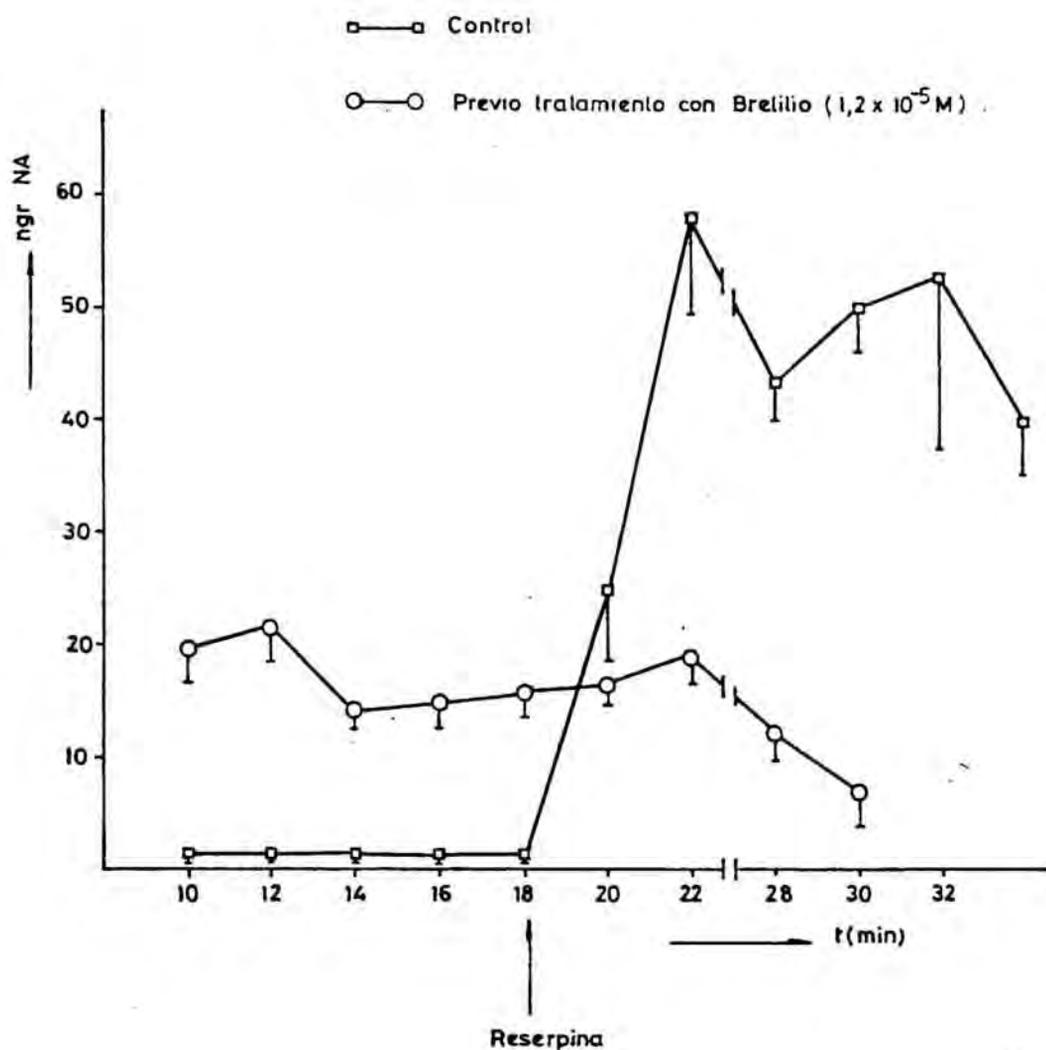


Fig. 9.- Representación gráfica de la interacción: bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M)-reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M) - en el bazo de gato perfundido "in situ".

Podemos observar, que el bretilio a la concentración estudiada, frena la liberación de noradrenalina producida por la reserpina.

## II.- INTERACCION BRETILIO-RESERPINA EN EL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VIVO"

En una primera serie de experiencias se ha determinado el contenido en noradrenalina del conducto deferente de rata sin tratar, de un peso aproximado de  $250 \pm 10$  gr. Esta determinación se ha realizado por el método de Chang, obteniéndose una cantidad de noradrenalina de 10,78 ng/gr. Esta noradrenalina, la consideramos como valor normal o control.

Seguidamente, y en otra serie de experiencias, se ha procedido a inyectar bretilio, a una dosis de 10 mg/kg, por vía intraperitoneal, a unos lotes de 4 ratas cada uno, sacrificando los animales de los distintos lotes, a distintos tiempos: 30 min, 1 hora, 2, 4 y 8 horas, después de la administración del bretilio, determinándose seguidamente el contenido en noradrenalina. Los resultados obtenidos, expresados gráficamente en la figura 10, se recogen en la siguiente tabla:

<u>Tiempo</u>	<u>Bretilio</u> 10 mg/kg	<u>Reserpina</u> 2,5 mg/kg	<u>Bretilio + Reserpina</u>
30 min	$10,07 \pm 0,60$	$8,45 \pm 0,60$	$12,3 \pm 0,69$
1 hora	$11,29 \pm 0,71$	$7,48 \pm 0,51$	$12,2 \pm 0,20$
2 "	$10,80 \pm 1,09$	$5,77 \pm 0,31$	$11,3 \pm 0,54$
4 "	$12,11 \pm 1,01$	$1,15 \pm 0,13$	$6,5 \pm 0,33$
8 "	$9,39 \pm 1,22$	$1,06 \pm 0,12$	$3,2 \pm 0,54$

Cada uno de estos valores representa la media de un mínimo de 5 experiencias. Entre los valores obtenidos con reserpina, y los obtenidos con bretilio + reserpina, en los distintos tiempos, existe una diferencia estadísticamente muy significativa ( $0,005 < P < 0,001$ )

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VIVO"

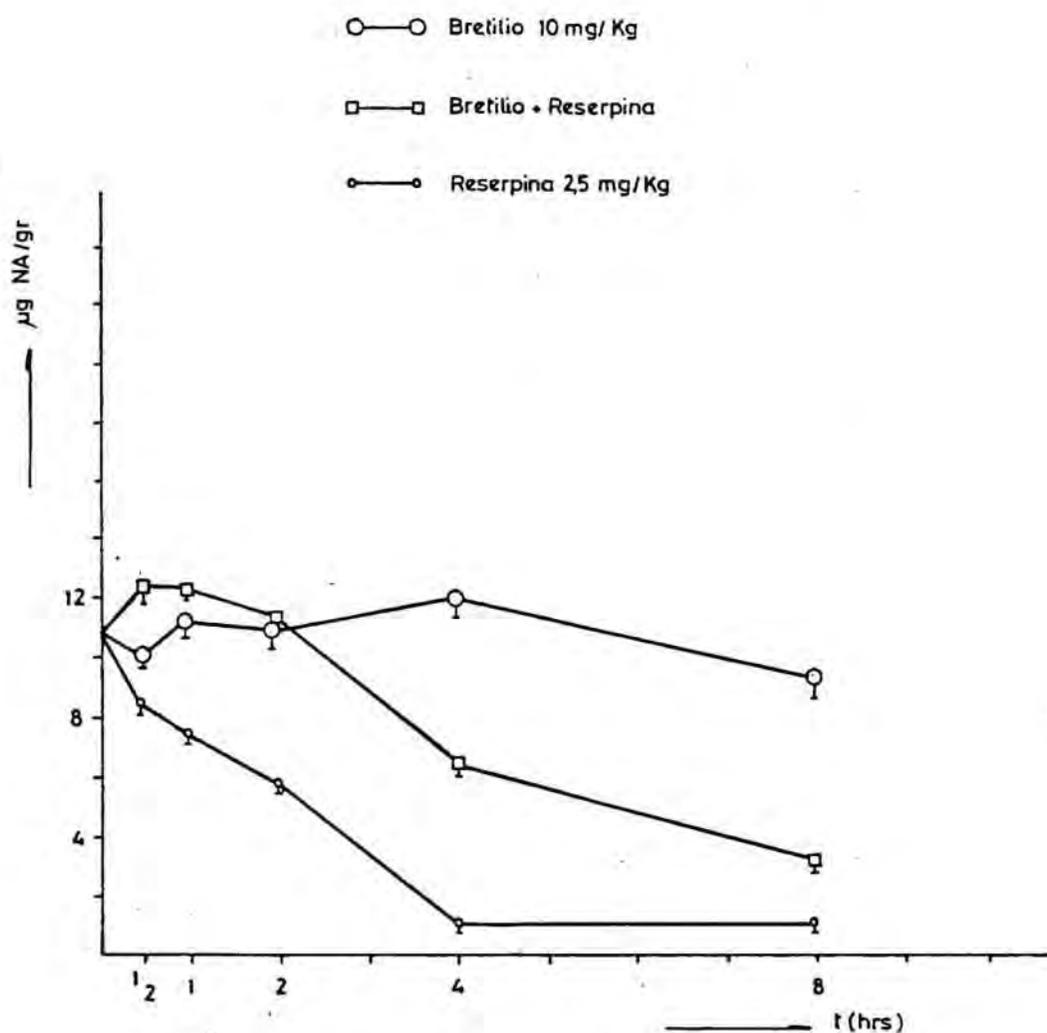


Fig. 10.- Representación gráfica el efecto del bretilio (10 mg/kg), la reserpina (2,5 mg/kg) y la asociación de ambas substancias, en el conducto deferente de rata "in vivo".

Como puede observarse, el bretilio, a ninguno de los tiempos ensayados, modifica significativamente el contenido en noradrenalina del conducto deferente, respecto al valor control. También con lotes de 4 ratas cada uno, se ha determinado el contenido en noradrenalina del conducto deferente, tras la administración intravenosa de reserpina a la concentración de 2,5 mg/kg, sacrificando también los animales de los distintos lotes, a los tiempos señalados anteriormente: 30 minutos, 1, 2, 4 y 8 horas, después de la administración del alcaloide. Los resultados obtenidos, expresados gráficamente en la figura 10, se recogen en la tabla anterior.

La depleción de noradrenalina producida por la reserpina es comparable con los datos ya obtenidos anteriormente en nuestro Departamento (Planas, Tesis Doctoral, 1972).

Posteriormente, y utilizando también lotes de 4 ratas cada uno, se ha administrado bretilio (10 mg/kg) por vía intraperitoneal, y transcurrida 1 hora, se ha inyectado reserpina (2,5 mg/kg) por vía intravenosa, y se han sacrificado los animales, a los mismos tiempos indicados arriba, después de la reserpina. Se determina posteriormente el contenido en noradrenalina del conducto deferente. Los resultados obtenidos, expresados gráficamente en la figura 10, se recogen también, en la tabla anterior.

Como podemos observar, la depleción de noradrenalina producida por la reserpina, es casi total una vez pasadas, las 4 horas, mientras que al administrar el bretilio previamente, queda inhibida dicha depleción. Esta inhibición, es completa durante las 2 primeras horas, pasadas las cuales, es solamente parcial.

### III.- CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Estas experiencias las hemos llevado a cabo, con el fin de estudiar la acción del bretilio sobre el conducto deferente de rata. Para ello, hemos utilizado también en esta ocasión, ratas macho Sprague-Dawley de un peso aproximado de  $250 \pm 10$  gramos.

En primer lugar, hemos podido comprobar, como ya lo había hecho con anterioridad en nuestro Departamento, Jané (1970), que el conducto deferente de rata aislado, en las condiciones experimentales descritas en el apartado correspondiente de material y métodos, no muestra, por sí solo, actividad espontánea alguna, manteniéndose constante la línea basal de registro, como se puede observar en la figura 11.

En cambio, si se adiciona bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño, tras haber dejado estabilizar el conducto deferente de rata, durante unos 20 minutos, aparecen, tras un intervalo de 5 a 10 minutos, tras la adición del bretilio, unas contracciones frecuentes, intensas y de larga duración - figura 12, observadas durante unas 8 horas.

Si el bretilio se adiciona a una concentración 10 veces superior ( $1,2 \times 10^{-4}$  M), se obtienen unas contracciones del mismo tipo, aunque más frecuentes y de menor altura, - ver figura 13.

Realizamos también una serie de experiencias, en las que adicionamos el bretilio a una concentración 10 veces inferior ( $1,2 \times 10^{-6}$  M), no obteniéndose respuesta alguna.

Seguidamente, hicimos un estudio comparativo de las alturas (mm.) y las frecuencias (contracciones/minuto) de

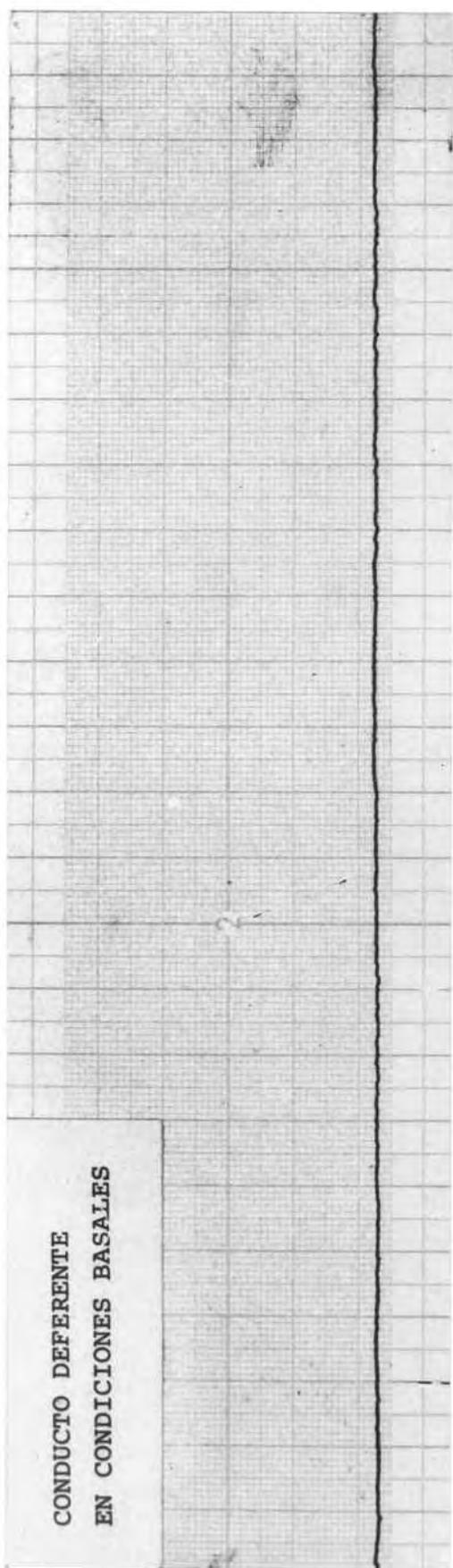


Fig. 11.- Comportamiento del conducto deferente aislado de rata "in vitro" en condiciones basales.

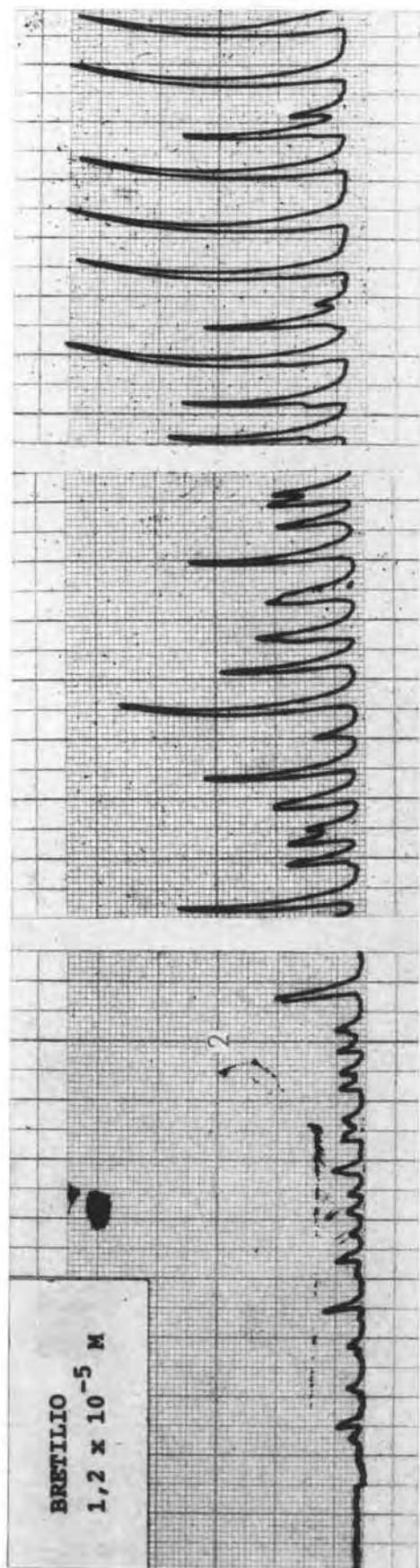


Fig. 12.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (1,2 x 10<sup>-5</sup> M), adicionado al baño.

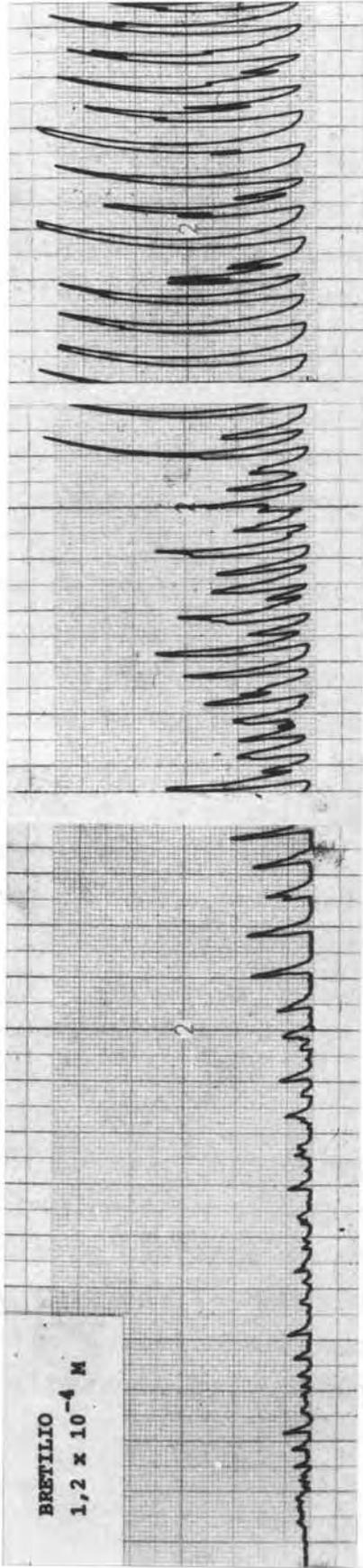


Fig. 13.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), adicionado al baño.

las contracciones obtenidas con las dos concentraciones citadas de bretilio. Los datos se recogen en la tabla 4.

Las figuras (14 y 15) muestran los valores de las alturas (mm.) (ordenadas) y de las frecuencias (contracciones /minuto) (ordenadas) de las contracciones, respecto a los distintos intervalos de tiempo (abcisas) transcurridos desde que se inicia la experiencia. Dichos intervalos de tiempo son:

el primero, representado por 15<sup>va</sup> desde el min. 10 al 15

el segundo, representado por 35<sup>va</sup> desde el min. 30 al 35

el tercero, representado por 50<sup>va</sup> desde el min. 45 al 50

Como se puede observar en la figura (14), las alturas para la concentración de  $1,2 \times 10^{-4}$  M, van aumentando de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ), durante el transcurso de la experiencia.

También en la misma figura (14) podemos observar que para la concentración de  $1,2 \times 10^{-5}$  M, las alturas también aumentan hasta 35<sup>va</sup> después de iniciada la experiencia, mostrando un ligero descenso, estadísticamente no significativo ( $P < 0,1$ ) a partir de este momento. Las alturas iniciales máximas, las obtenemos con la concentración de  $1,2 \times 10^{-5}$  M.

En la figura (15) podemos observar, como las frecuencias, para ambas concentraciones ( $1,2 \times 10^{-4}$  M y  $1,2 \times 10^{-5}$  M) se mantienen bastante constantes durante los primeros 35<sup>va</sup> después de iniciada la experiencia, mostrando a partir de este momento, un descenso, estadísticamente no significativo ( $P < 0,1$ ) para la concentración de  $1,2 \times 10^{-4}$  M.

BRETILIO	15 minutos		35 minutos		50 minutos	
	Frecuencias	Alturas	Frecuencias	Alturas	Frecuencias	Alturas
$1,2 \times 10^{-4}$ M	$2,8 \pm 0,4$	$11,6 \pm 0,36$	$2,9 \pm 0,36$	$33,27 \pm 1,37$	$1,9 \pm 0,5$	$42,5 \pm 0,71$
$1,2 \times 10^{-5}$ M	$2 \pm 0,2$	$18,27 \pm 0,89$	$2 \pm 0$	$41 \pm 1,4$	$1,8 \pm 0$	$38,3 \pm 1,2$
$1,2 \times 10^{-6}$ M	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Frecuencias (contracciones/min.) y alturas (mm.) de las contracciones obtenidas en el conducto deferente aislado de rata, cuando se añaden al baño las concentraciones indicadas. Cada uno de estos valores representa una media de un mínimo de 5 experiencias.

Tabla 4.-

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio adicionado al baño

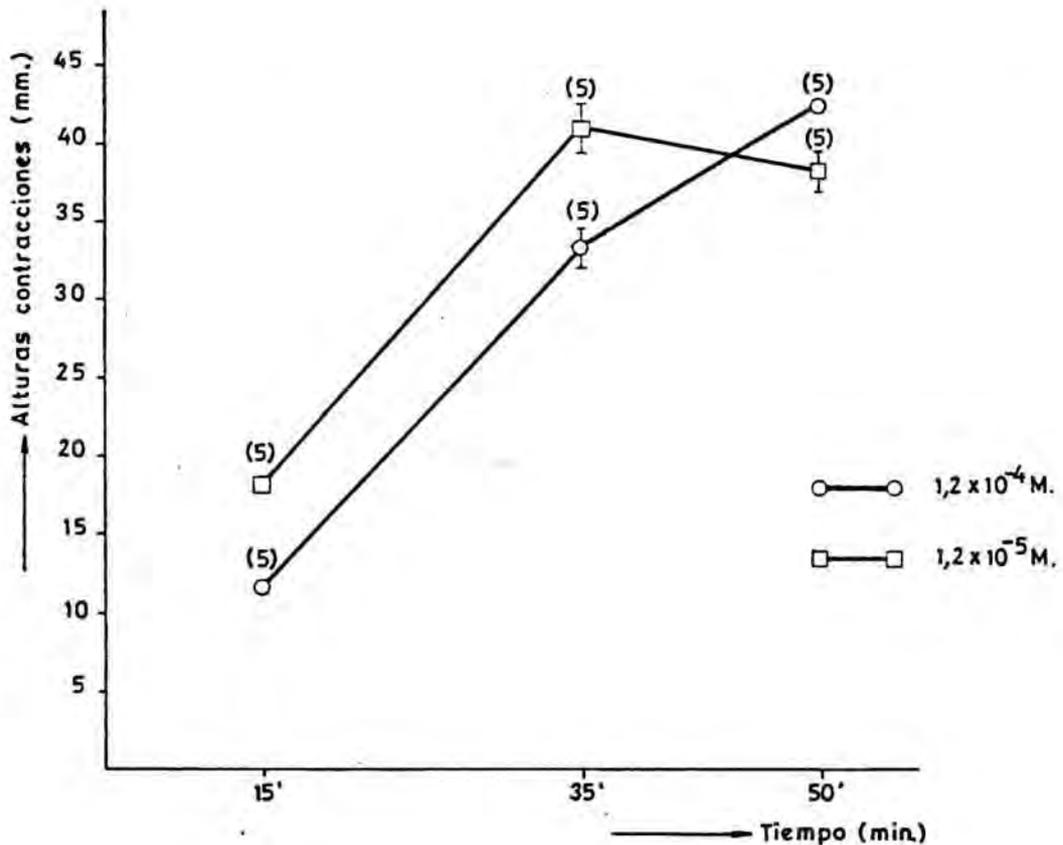


Fig. 14.- Evolución de las alturas (mm.) en ordenadas de las contracciones del conducto deferente, obtenidas al adicionar bretilio ( $1,2 \times 10^{-5} M$  y  $1,2 \times 10^{-4} M$ ) al baño, respecto al tiempo (min.) total de duración de la experiencia, en abscisas. Los errores relativos inferiores a 1, no se representan.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio adicionado al baño

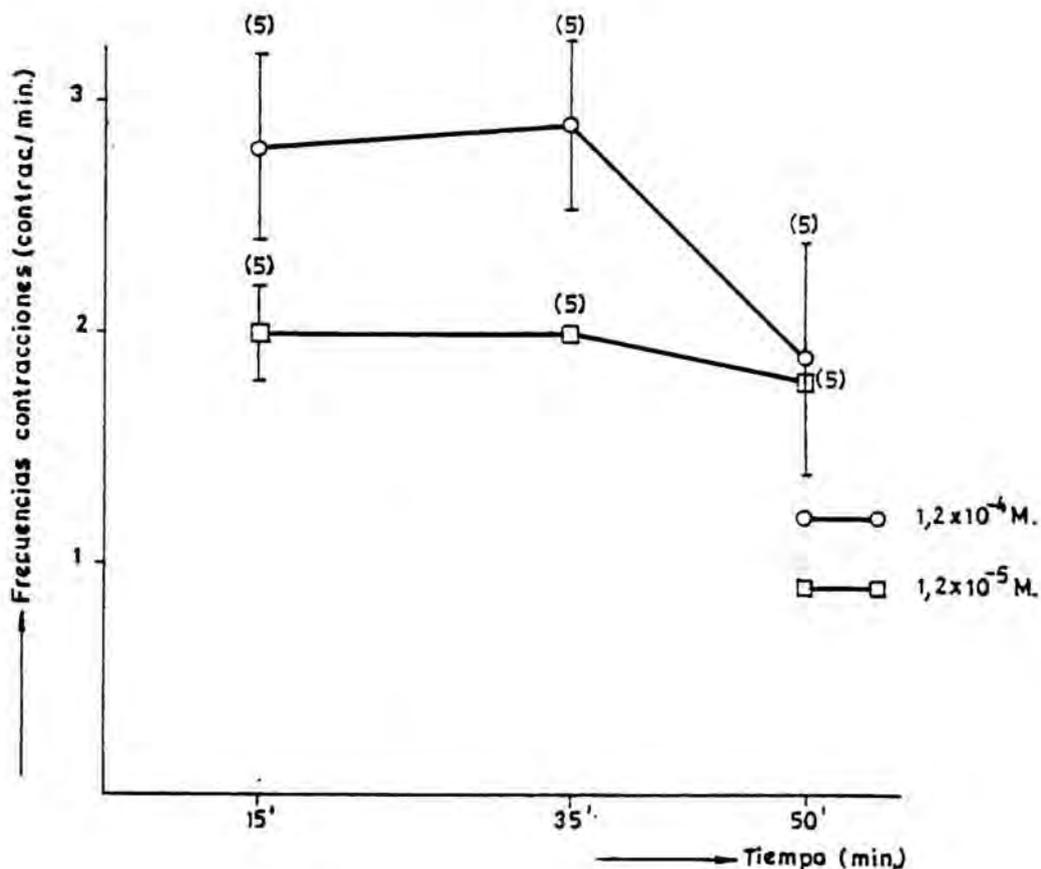


Fig. 15.- Evolución de las frecuencias (contracciones/min.) de las contracciones del conducto deferente (en ordenadas), obtenidas al adicionar bretilio ( $1,2 \times 10^{-4}$  M y  $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño, respecto al tiempo total de duración de la experiencia (min.) en abscisas.

Seguidamente, pasamos a considerar cual podría ser la causa que provoque la aparición de estas contracciones en el conducto deferente aislado de rata.

Desde los trabajos de microscopia de fluorescencia de Richardson (1962), Owman y Sjöstrand (1965), Norberg (1967), Norberg y cols (1967), Farell (1968), Graham y cols (1968), es conocida la inervación del conducto deferente de rata. Estos autores demostraron que el conducto deferente de rata, contiene una densa inervación de tipo simpático. También se demostró que el conducto deferente de rata, contiene una elevada concentración de noradrenalina (Birmingham, 1968; Birmingham e Iversen, 1969; Maitre y Stahelin, 1968; Kasuya y cols, 1969; Jané y cols, 1970; Spano y cols, 1978; Sjöstrand 1965; Sjöstrand y Swedin, 1967; Vohra, 1969). Por todo ello, pensamos como primera posibilidad, que las contracciones observadas se deberían a la liberación de noradrenalina. En las experiencias de Jané (1970) se demostró que este neurotransmisor, cuando se pone en contacto con el conducto deferente de rata, produce una contracción proporcional al log. de la dosis y de características, hasta cierto punto semejantes a las obtenidas por nosotros.

Para corroborar esta hipótesis, realizamos el siguiente grupo de experiencias en el que estudiamos el efecto sobre las contracciones inducidas por el bretilio, de un grupo de sustancias, tales como:

bloqueantes alfa: fentolamina y fenoxibenzamina

bloqueantes beta: propranolol

bloqueantes presinápticos: reserpina

bloqueantes de la recaptación: desmetilimipramina (DMI)  
cocaína

Como puede observarse en las figuras (16 y 17), las -  
contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M), dis-  
minuyen en intensidad y frecuencia hasta prácticamente desa-  
parecer, cuando añadimos al baño fentolamina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M)  
o bien fenoxibenzamina ( $1,6 \times 10^{-7}$  M).

La adición de propranolol, a concentraciones crecien-  
tes, desde ( $1,9 \times 10^{-7}$  M a  $3,8 \times 10^{-6}$  M), no produce altera-  
ción alguna en las contracciones provocadas por el bretilio  
( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figura 18).

La adición de reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M), provoca una-  
disminución de las contracciones inducidas por el bretilio  
( $1,2 \times 10^{-5}$  M), pero sin llegar a su total desaparición.

Con la reserpina, realizamos otras experiencias con -  
sistentes en reserpinizar los animales con 5 mg/kg del alca-  
loide por via intravenosa, 24, 48 y 72 horas antes del sa-  
crificio de los animales. Seguidamente, y una vez aislado -  
el conducto deferente, pudimos observar, como la adición de  
bretilio al baño ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el caso de haber reserpi-  
nizado a los animales 24 y 48 horas antes de su sacrificio,  
no provoca la aparición de contracciones, en cambio, éstas  
si empiezan a manifestarse, si la reserpinización se reali-  
za 72 horas antes.

En vista de estos resultados, pasamos a utilizar una  
dosis de reserpina mayor, 10 mg/kg, también por via intrave-  
nosa, pero encontramos unos resultados idénticos a los obte-  
nidos en el caso anterior.

Por último, estudiamos el efecto de los bloqueantes -  
de la recaptación sobre las contracciones inducidas por el  
bretilio.

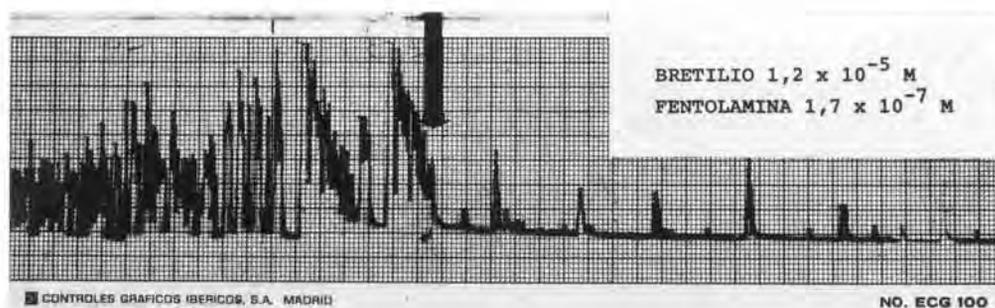


Fig. 16.- Inhibición producida por la fentolamina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata (registro térmico).

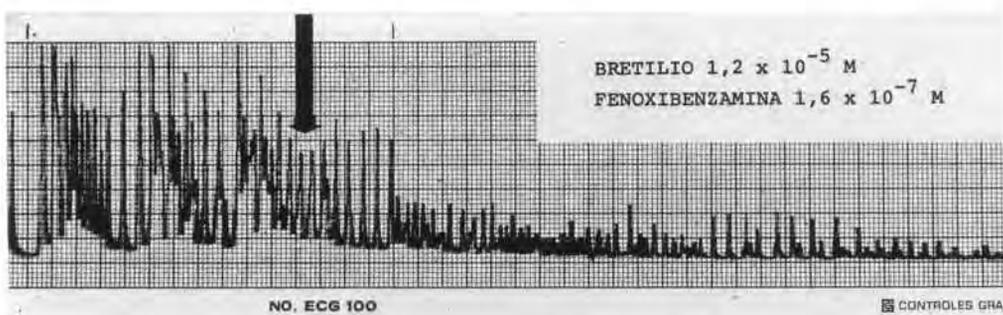


Fig. 17.- Inhibición producida por la fenoxibenzamina ( $1,6 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata (registro térmico).

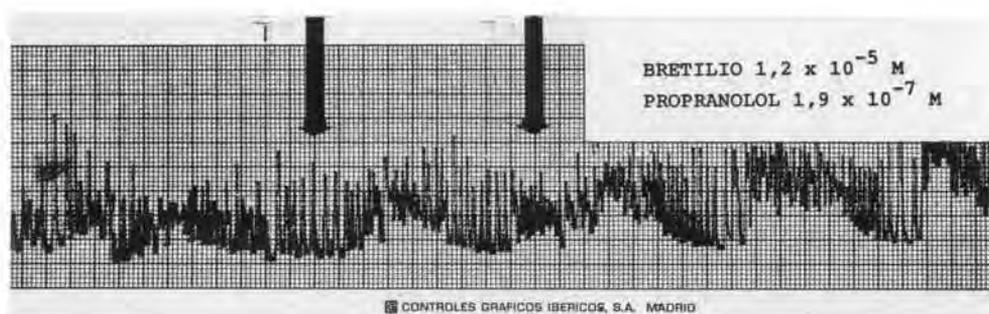


Fig. 18.- Acción del propranolol ( $9,6 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata (registro térmico).

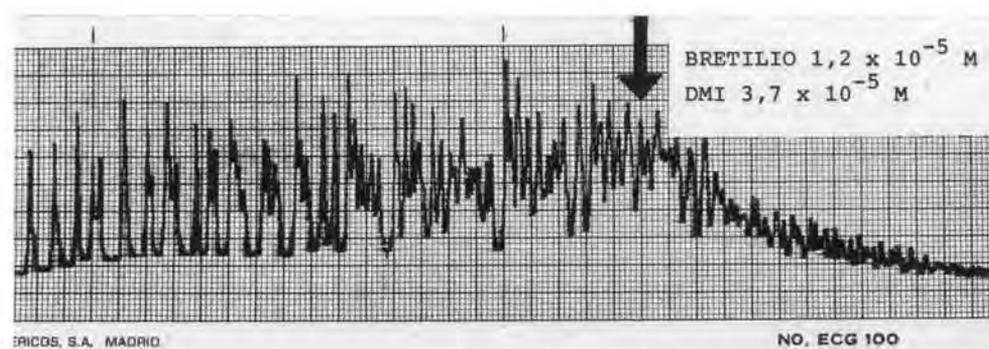


Fig. 19.- Inhibición producida por la desipramina ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) sobre las contracciones inducidas en el conducto deferente aislado de rata (registro térmico).

En primer lugar, pudimos observar que la adición de DMI ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) provoca una inhibición de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figura 19).

En cambio, cuando la misma substancia, la DMI, se adiciona a una concentración de ( $3,7 \times 10^{-6}$  M), provoca una potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M), y al adicionarla a concentraciones de ( $3,7 \times 10^{-7}$  M;  $3,7 \times 10^{-8}$  M; y  $3,7 \times 10^{-9}$  M), no provoca modificación alguna de dichas contracciones

<u>DESMETILIMIPRAMINA</u>	<u>BRETILIO <math>1,2 \times 10^{-5}</math> M</u>
$3,7 \times 10^{-5}$ M	Inhibe 100%
$3,7 \times 10^{-6}$ M	Potencia 227%
$3,7 \times 10^{-7}$ M	No modifica
$3,7 \times 10^{-8}$ M	No modifica
$3,7 \times 10^{-9}$ M	No modifica

Otro inhibidor de la recaptación que hemos estudiado es la cocaína.

Adicionando cocaína a una preparación de conducto deferente aislado de rata, a dosis crecientes de  $2,06 \times 10^{-6}$  M;  $4,1 \times 10^{-6}$  M;  $8,2 \times 10^{-6}$  M; y  $1,6 \times 10^{-5}$  M, no provoca modificación alguna en el preparado.

Si se estimula el conducto deferente con noradrenalina, se obtiene una respuesta contráctil que resulta muy aumentada, si previamente se ha puesto en contacto el órgano con cocaína, a una dosis de  $1,6 \times 10^{-5}$  M. Esta experiencia, demuestra el efecto simpaticomimético indirecto por inhibición de la recaptación, que produce la cocaína.

Comprobado el efecto inhibitor de la recaptación de - noradrenalina, producido por la cocaína, proseguimos nuestro estudio con esta substancia, y pudimos observar que, al adicionarla al baño a concentraciones de  $8,2 \times 10^{-6}$  M;  $8,2 \times 10^{-7}$  M; y  $8,2 \times 10^{-8}$  M, induce un aumento tanto de la intensidad, como de la frecuencia de las contracciones provocadas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figuras 20 y 21).

<u>COCAINA</u>	<u>BRETILIO <math>1,2 \times 10^{-5}</math> M</u>
$8,2 \times 10^{-6}$ M	Potencia 253%
$8,2 \times 10^{-7}$ M	Potencia 259%
$8,2 \times 10^{-8}$ M	Potencia 212%

Sin embargo, no podíamos descartar, de entrada, la posibilidad de que las contracciones fueran provocadas por una liberación de acetilcolina o histamina, por parte del conducto deferente, hipótesis poco probable, puesto que en nuestro Departamento se había demostrado que el conducto deferente de rata, es escasamente sensible a la acción de la acetilcolina y de la histamina (Jané, 1970).

Por ello, estudiamos también el efecto sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M), de:

bloqueantes muscarínicos: atropina

antihistamínicos  $H_1$ : antazolina

antihistamínicos  $H_2$ : cimetidina

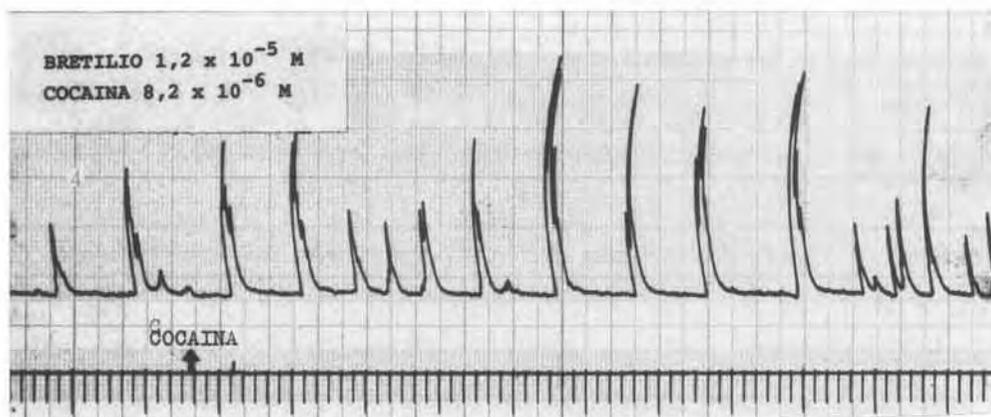


Fig. 20.- Potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata, por la acción de la cocaína ( $8,2 \times 10^{-6}$  M).

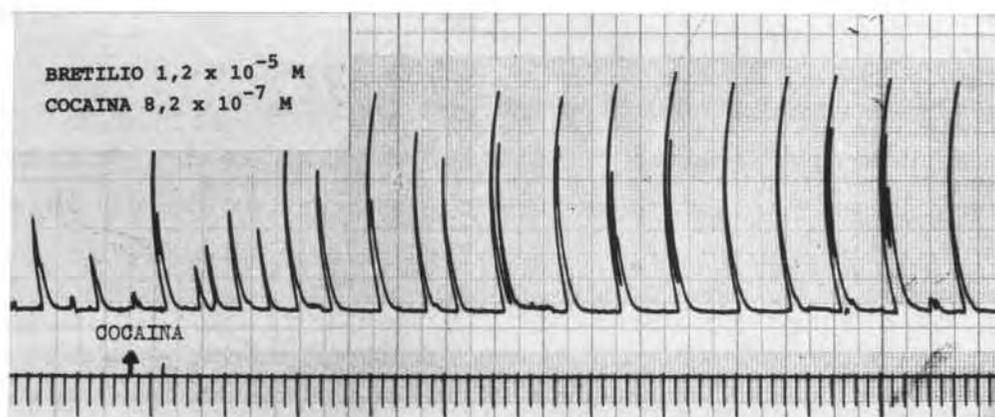


Fig. 21.- Potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata, por la acción de la cocaína ( $8,2 \times 10^{-7}$  M).

La adición de atropina al baño, una vez instauradas - las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M), a concentraciones de ( $1,7 \times 10^{-7}$  M y  $1,7 \times 10^{-4}$  M), no produce alteración alguna en las contracciones (fig. 22 y 23).

Asimismo, ni la adición de antazolina ( $1,8 \times 10^{-4}$  M, y  $1,8 \times 10^{-7}$  M) ni la de cimetidina ( $2,1 \times 10^{-4}$  M y  $2,1 \times 10^{-7}$  M) produce alteración alguna en las contracciones inducidas en el conducto deferente de rata por la adición de bretilio al baño ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figuras 24, 25, 26 y 27).

Puesto que sabíamos, por las experiencias de Kuntzman y cols. (1970) que el bretilio no es metabolizado en la rata, nos pareció interesante estudiar si la administración de bretilio al animal, antes de su sacrificio, inducía también la aparición de las contracciones descritas, cuando el bretilio es adicionado al baño.

Para este estudio, realizamos una primera serie de experiencias, en las que procedimos a inyectar bretilio a una dosis de 10 mg/kg, por vía intraperitoneal, 1 hora antes del sacrificio de los animales.

Como podemos observar en la figura 28, en este caso, aparecen, de forma inmediata, unas contracciones del conducto deferente, similares a las obtenidas con el bretilio adicionado al baño ( $1,2 \times 10^{-5}$  M).

Si en lugar de administrar 10 mg/kg, administramos a los animales, 5 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, 1 hora antes de su sacrificio, no obtenemos modificación alguna del comportamiento normal del órgano, es decir no aparece actividad contráctil alguna.

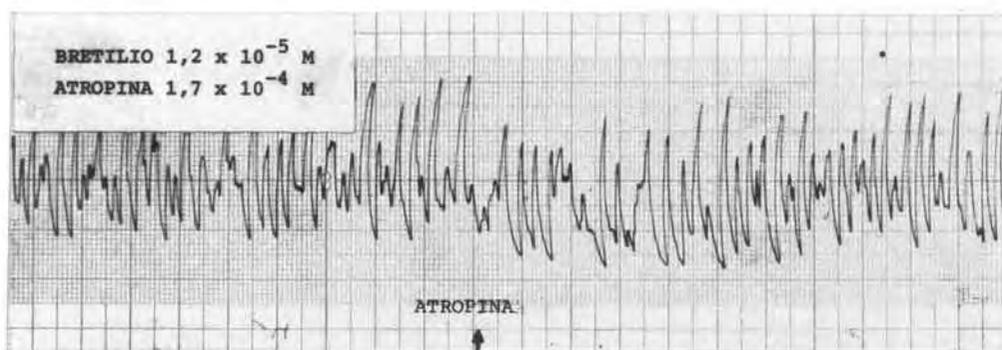


Fig. 22.- Acción de la atropina ( $1,7 \times 10^{-4}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata.

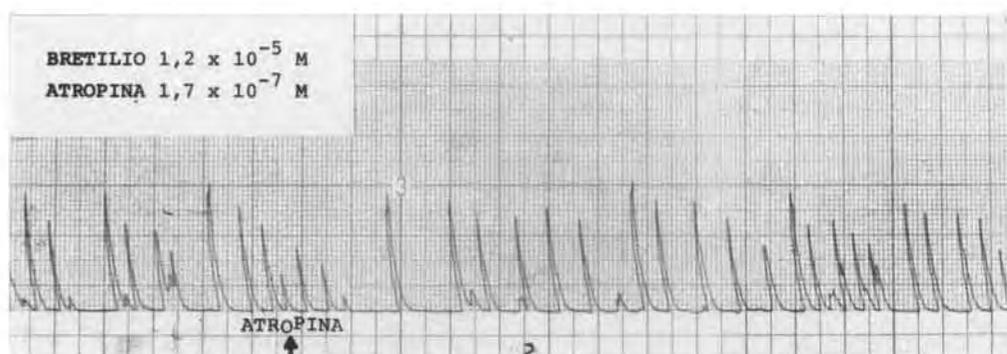


Fig. 23.- Acción de la atropina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado de rata.

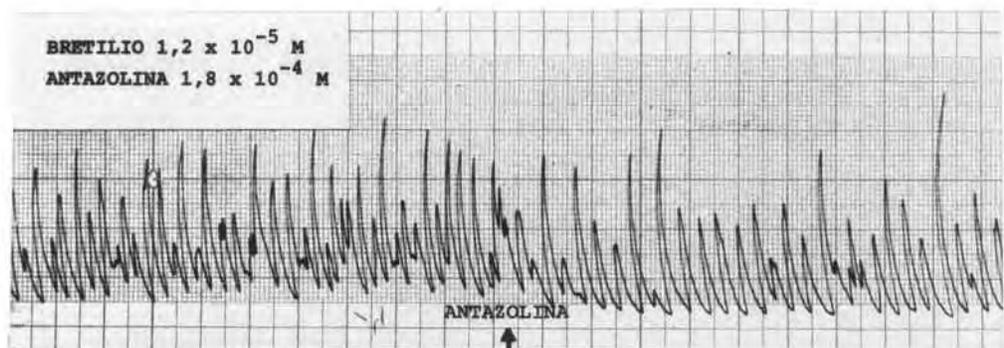


Fig. 24.- Acción de la antazolina ( $1,8 \times 10^{-4}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado - de rata.

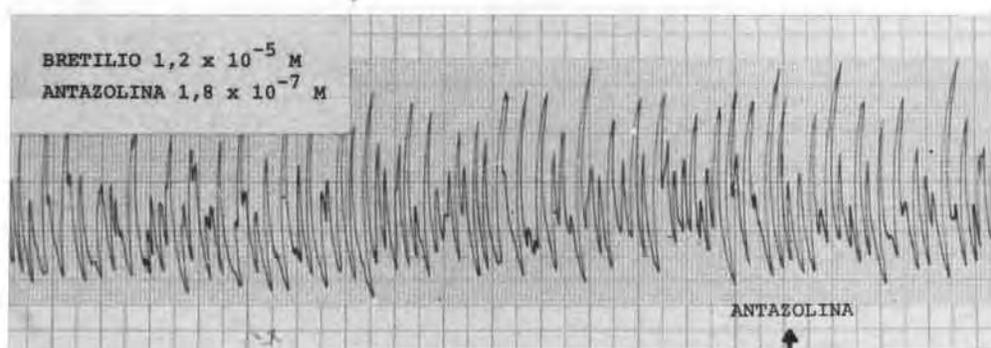


Fig. 25.- Acción de la antazolina ( $1,8 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado - de rata.

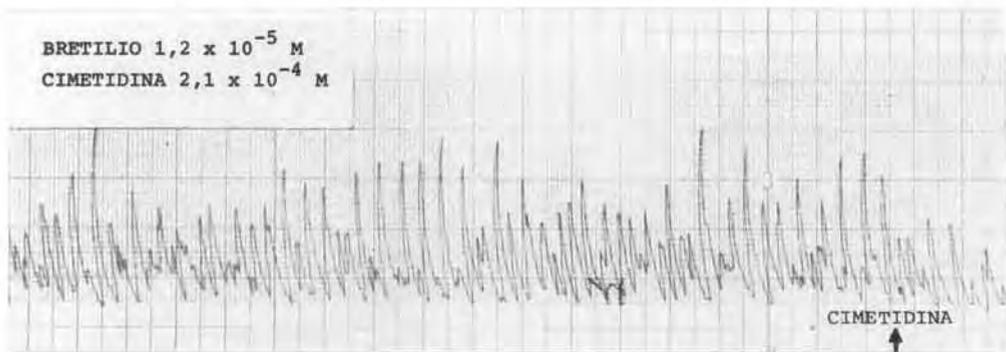


Fig. 26.- Acción de la cimetidina ( $2,1 \times 10^{-4}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado - de rata.

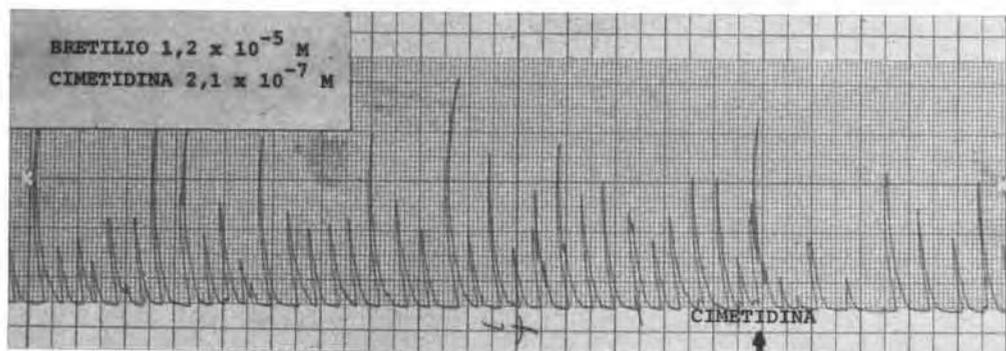


Fig. 27.- Acción de la cimetidina ( $2,1 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el conducto deferente aislado - de rata.

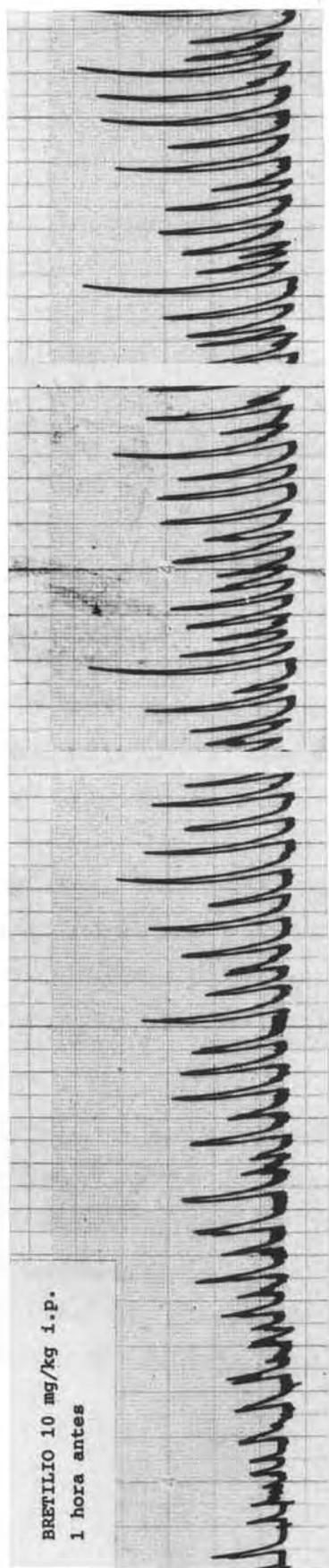


Fig. 28.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p.) administrado 1 hora antes del sacrificio del animal.

Si administramos una dosis superior (20 mg/kg) por via intraperitoneal, 1 hora antes del sacrificio de los animales, si que observamos, de nuevo, la aparición inmediata de las contracciones (figura 32).

También pensamos que existiría una relación entre dosis y efecto, por lo que decidimos estudiar con más detalle este proceso, para ello, variamos los dos parámetros que pueden influir en él:

a) dosis: 10 y 20 mg/kg de bretilio.

b) lapso de tiempo transcurrido entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales: 1, 2, 4, y 8 horas respectivamente.

Las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg de bretilio por via intraperitoneal, 1, 2, 4 y 8 horas antes del sacrificio de los animales, se observan en las figuras, 28, 29, 30 y 31.

Asimismo, las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio por via intraperitoneal, 1, 2, 4 y 8 horas antes del sacrificio de los animales, se observan en las figuras, 32, 33, 34 y 35.

También en este grupo de experiencias, hicimos el estudio comparativo de las alturas (mm.) y las frecuencias en (contracciones/minuto) de las contracciones obtenidas al administrar bretilio (10 y 20 mg/kg) 1, 2, 4 y 8 horas antes del sacrificio de los animales. Los datos se recogen, respectivamente, en las tablas 5 y 6.

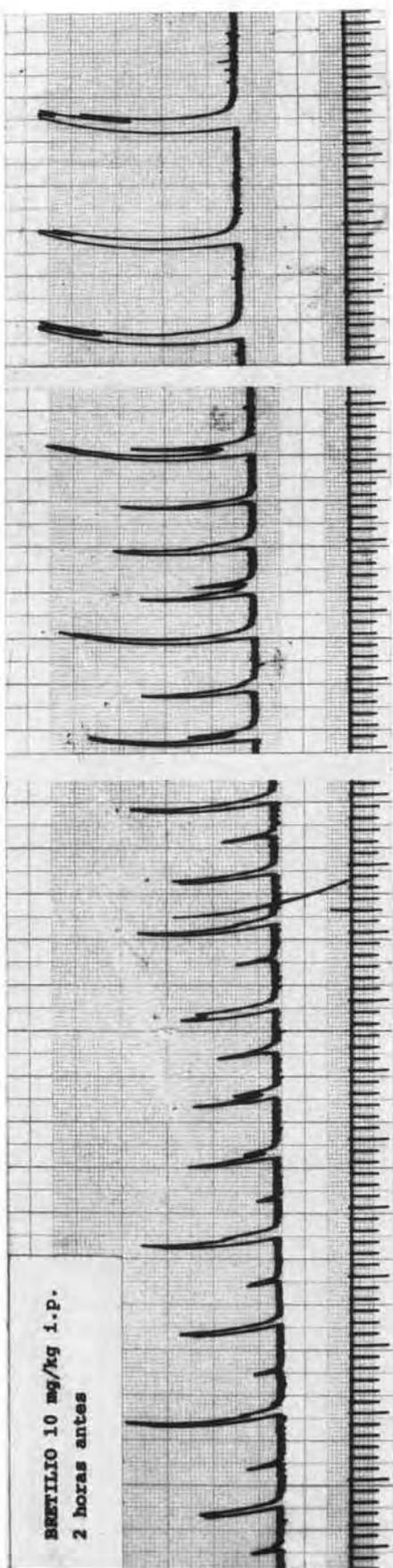


Fig. 29.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p.) administrado 2 horas antes del sacrificio del animal.

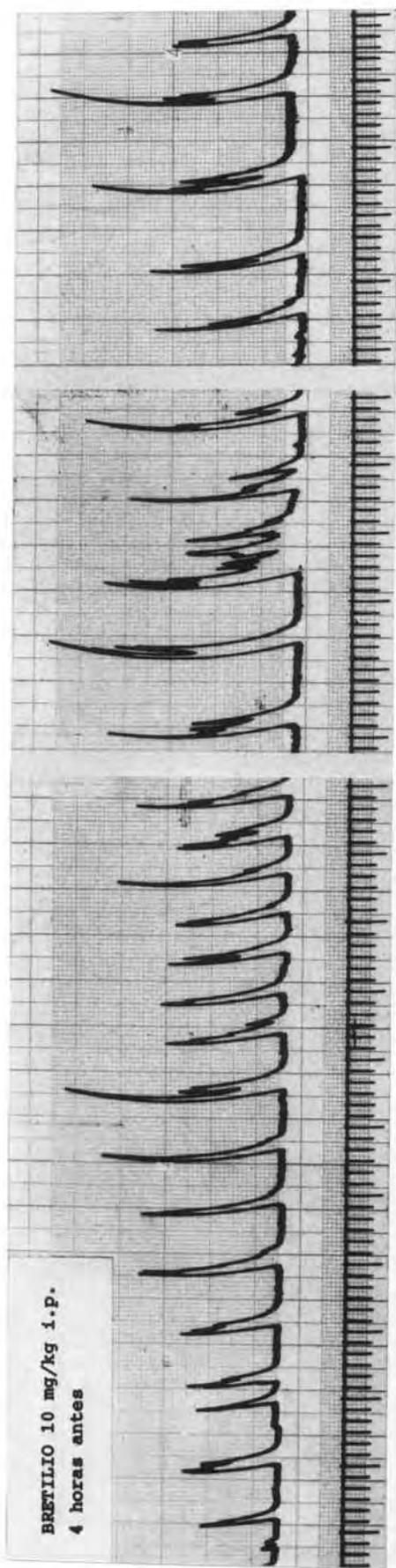


Fig. 30.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p.) administrado 4 horas antes del sacrificio del animal.

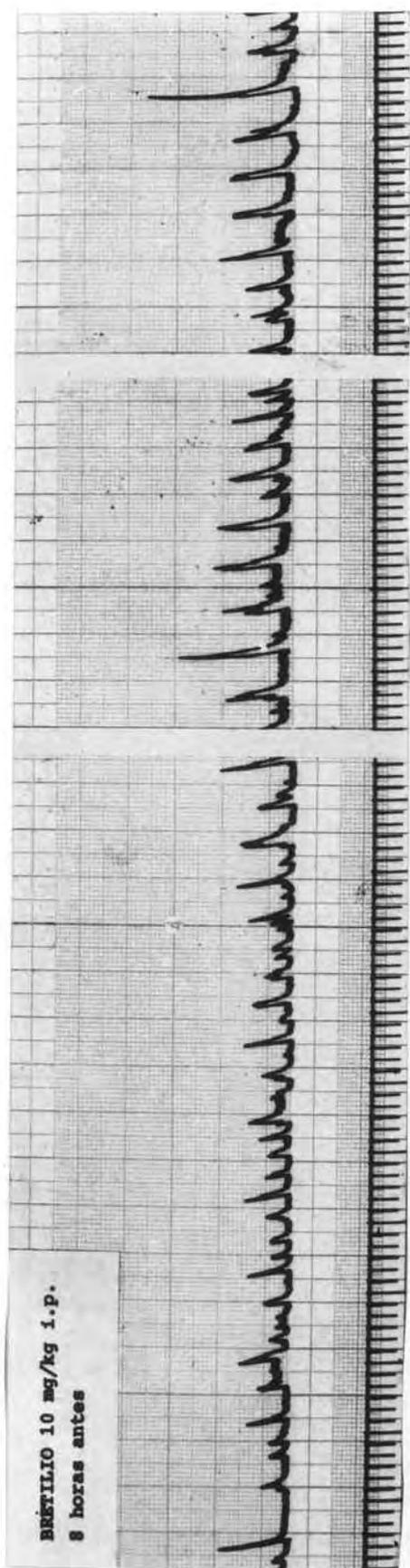


Fig. 31.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p.) administrado 8 horas antes del sacrificio del animal.

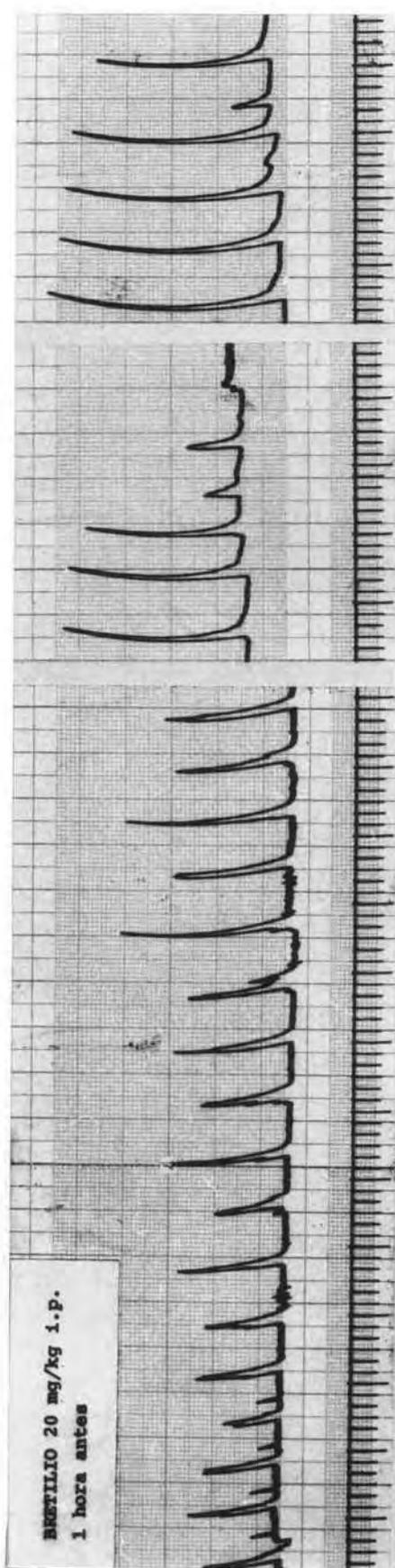


Fig. 32.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (20 mg/kg i.p.) administrado 1 hora antes del sacrificio del animal.

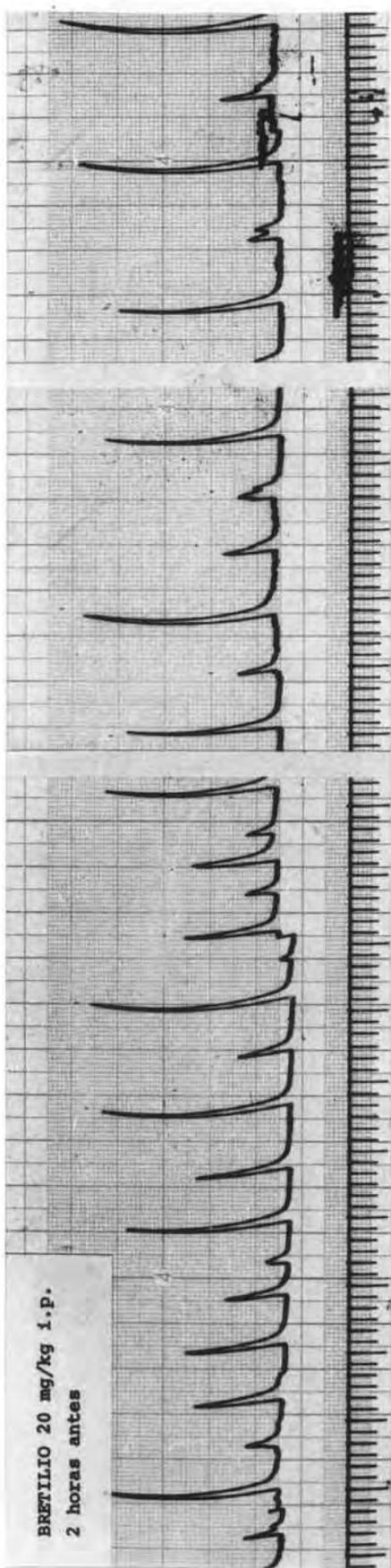


Fig. 33.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (20 mg/kg i.p.) administrado 2 horas antes del sacrificio del animal.

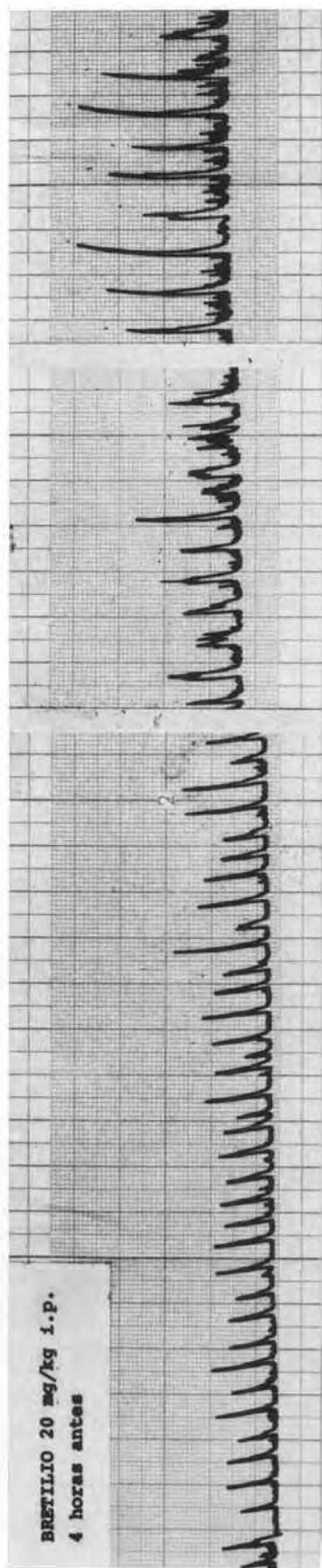


Fig. 34.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (20 mg/kg i.p.) administrado 4 horas antes del sacrificio del animal.

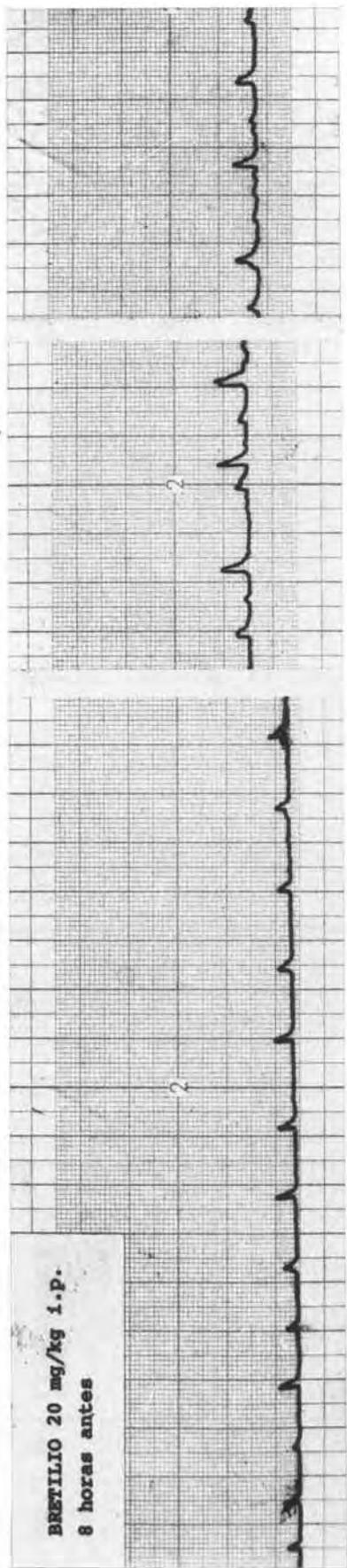


Fig. 35.- Conducto deferente de rata aislado. Contracciones inducidas por el bretilio (20 mg/kg i.p.) administrado 8 horas antes del sacrificio del animal.

BRETILIO	15 minutos		35 minutos		50 minutos	
	Frecuencias	Alturas	Frecuencias	Alturas	Frecuencias	Alturas
10 mg/kg i.p.						
1 hora	1,2 ± 0,16	20,9 ± 0,81	0,8 ± 0	20,6 ± 0,75	0,54 ± 0,05	26,2 ± 0,69
2 horas	2,7 ± 0,3	31,8 ± 1,6	1,4 ± 0,17	38,6 ± 1,7	0,7 ± 0,1	44,3 ± 1,1
4 horas	2,6 ± 0,2	13,3 ± 0,45	2,3 ± 0,3	13,2 ± 0,48	2,1 ± 0,1	19,7 ± 1
8 horas	1,9 ± 0,1	9,4 ± 0,4	1,8 ± 0	11,6 ± 0,46	1,6 ± 0	9,7 ± 0,5

Frecuencias (contracciones/min.) y alturas (mm.) de las contracciones obtenidas en el conducto deferente aislado de rata, tratada con 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, 1, 2, 4, y 8 horas antes del sacrificio. Cada uno de estos valores representa una media de un mínimo de 5 experiencias.

Tabla 5.-

La figura 36, nos muestra la evolución de las alturas (mm.) (ordenadas) iniciales, las obtenidas en los primeros minutos tras la instalación del deferente en el baño, de las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, tanto 1, como 2, 4 y 8 horas antes del sacrificio de los animales (abcisas).

Como se puede observar, la altura inicial máxima, la obtenemos cuando el bretilio es administrado 2 horas antes del sacrificio de los animales, y la altura inicial mínima corresponde al intervalo de 8 horas entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales. Existen diferencias estadísticamente muy significativas ( $P < 0,001$ ) entre las alturas iniciales obtenidas cuando el animal se sacrifica a las 2 horas de la administración del bretilio, respecto a las obtenidas cuando el animal se sacrifica a cada uno de los otros intervalos de tiempo representados en la figura (1, 4 y 8 horas). Los resultados, son por lo tanto lógicos, máxime si tenemos en cuenta que la vida media del bretilio en la rata, es alrededor de las 12 horas, según Kuntzman y cols, (1970).

La figura 37, nos muestra la evolución de las alturas (mm.) (ordenadas) de las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg de bretilio, tanto 1, como 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales, con respecto al intervalo de tiempo transcurrido desde que se sacrifica el animal (15', 35', 50' en abcisas). La significación de estos intervalos se ha expuesto anteriormente.

Como se puede observar, las alturas van aumentando, aunque no de una forma estadísticamente significativa, durante el transcurso de la experiencia, cuando los animales se sacrifican a la hora, 2 y 4 horas después de la adminis-

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA " IN VITRO "

Bretilio 10 mg./Kg. i.p.

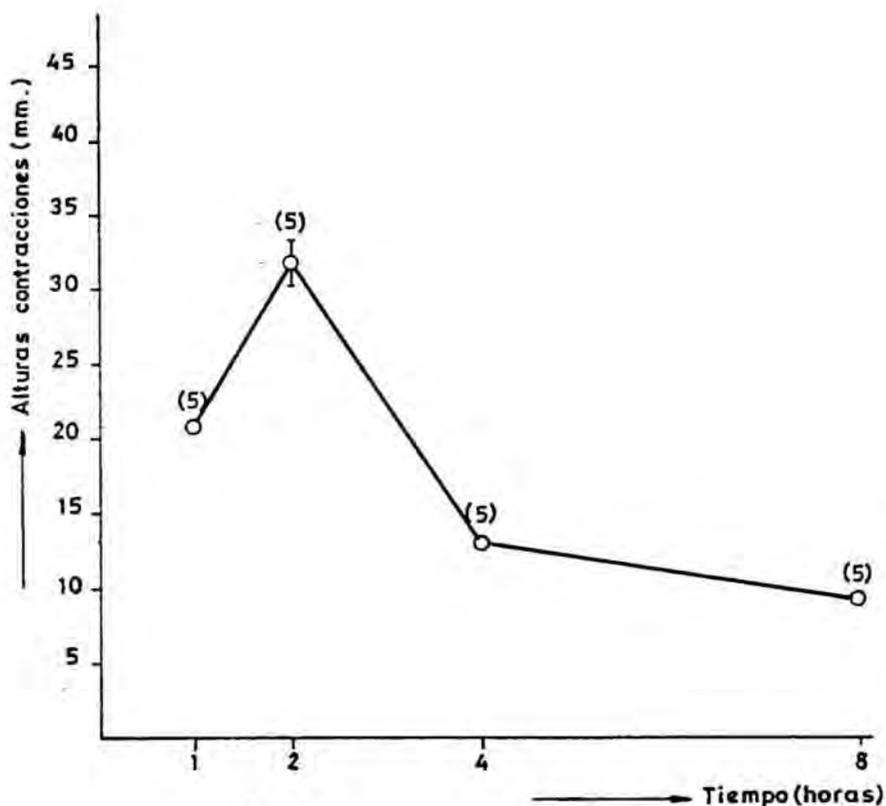


Fig. 36.- Relación entre las alturas iniciales (mm.) en ordenadas, de las contracciones del conducto deferente, obtenidas al administrar 10 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, en abcisas. Los errores relativos inferiores a 1, no se representan.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 10 mg./Kg. i.p.

○—○ 1 hora  
 □—□ 2 "  
 △—△ 4 "  
 ●—● 8 "

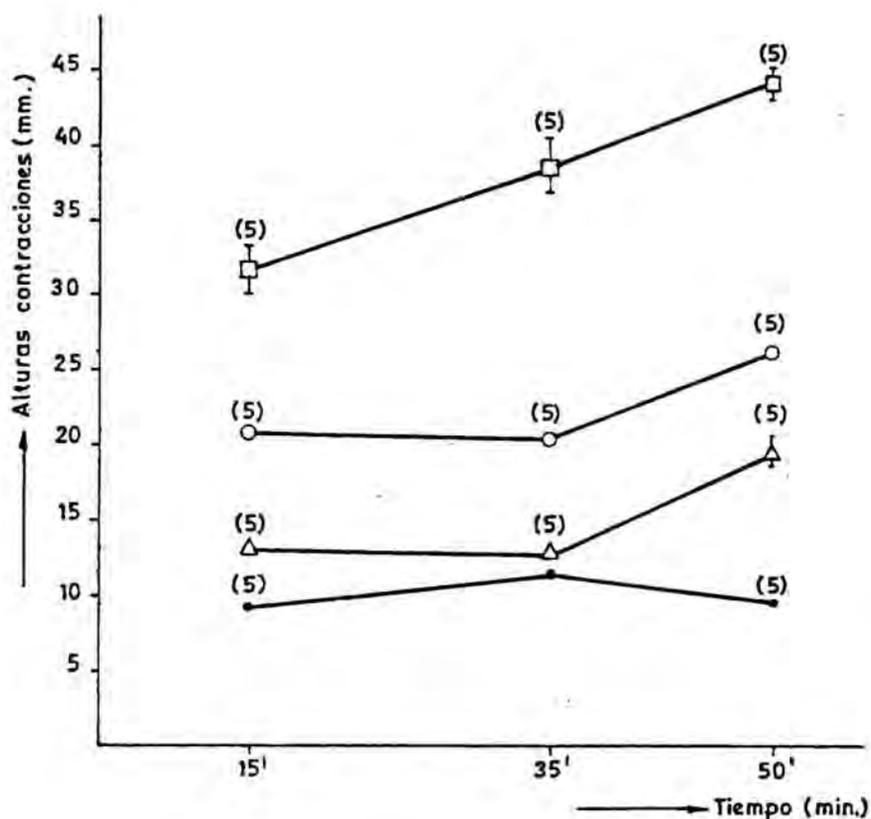


Fig. 37.- Evolución de las alturas (mm.) en ordenadas de las contracciones del conducto deferente, obtenidas al administrar 10 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, ya sea, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, con respecto a los intervalos de tiempo (min.) de observación de dichas contracciones, en abcisas. Los errores relativos inferiores a 1, no se representan.

tración de bretilio. En cambio, las alturas disminuyen un poco conforme transcurre el tiempo de la experiencia, cuando los animales se sacrifican al cabo de 8 horas de haber sido administrado el bretilio. Son estos resultados, por lo tanto coincidentes con lo que cabía esperar.

La figura 38, nos muestra la evolución de las frecuencias (contracciones/minuto) (ordenadas) iniciales, las obtenidas en los primeros minutos tras la instalación del deferente en el baño, de las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, tanto 1, como 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales (abcisas).

Como se puede observar, la frecuencia inicial máxima, la obtenemos cuando el bretilio es administrado 2 horas antes del sacrificio de los animales, y la frecuencia inicial mínima corresponde al intervalo de 1 hora entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales. Existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre las frecuencias iniciales obtenidas cuando los animales son sacrificados a las 2 horas de la administración del bretilio, respecto a las obtenidas cuando los animales son sacrificados al cabo de 1 hora de la administración del bretilio.

La figura 39, nos muestra la evolución de las frecuencias (contracciones/minuto) (ordenadas) expresadas en % respecto a la frecuencia inicial, de las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg de bretilio, tanto 1, como 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales, con respecto a los intervalos de tiempo transcurridos desde que se sacrifican los animales (15', 35', 50') (abcisas). La significación de estos intervalos se ha expuesto anteriormente.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 10 mg/Kg i.p.

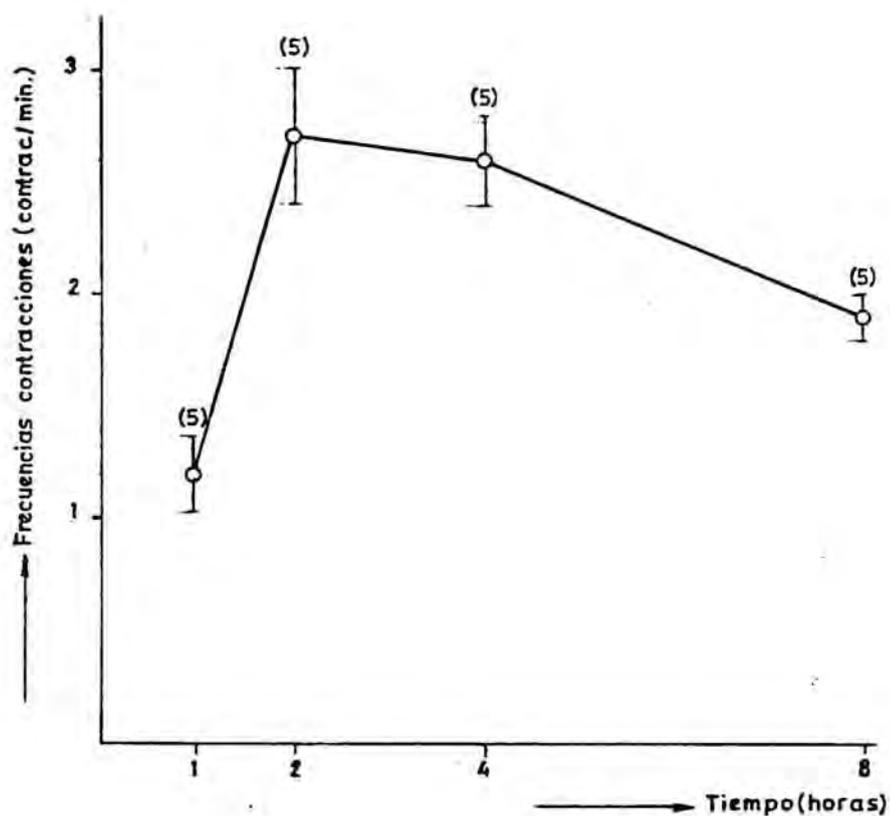


Fig. 38.- Relación entre las frecuencias iniciales - (contrac./min.), en ordenadas, de las contracciones del conducto deferente, obtenidas al administrar 10 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, en abscisas.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 10 mg./Kg. i.p.

- 1 hora
- 2 "
- △—△ 4 "
- 8 "

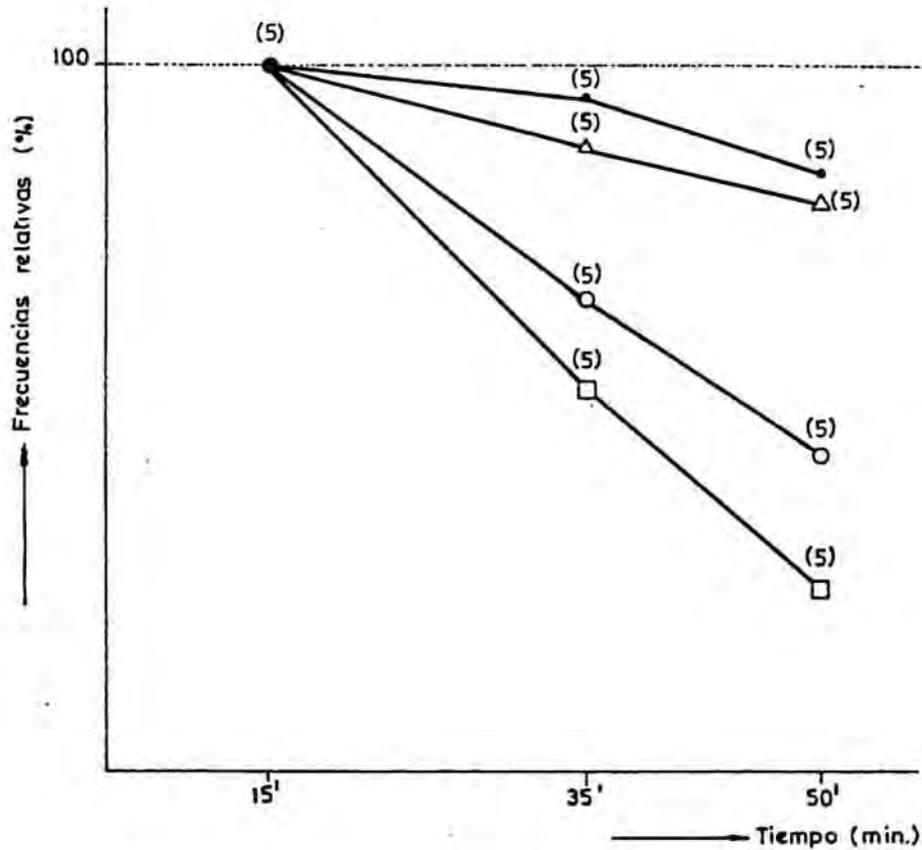


Fig. 39.- Evolución de las frecuencias (contrac./min) en ordenadas, expresadas en % respecto a la frecuencia inicial obtenida en cada caso, de las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg i.p. de bretilio, ya sea, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio respecto a los intervalos de tiempo (min.) de observación de dichas contracciones, en abcisas.

Como se puede observar, las frecuencias van disminuyendo, aunque de forma estadísticamente no significativa, durante el transcurso de la experiencia, cuando los animales se sacrifican a los distintos intervalos de tiempo estudiados, tras la administración de bretilio.

La figura 40, nos muestra la evolución de las alturas (mm.) (ordenadas) iniciales, las obtenidas en los primeros minutos, tras la instalación del deferente en el baño, de las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, tanto 1, como 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales (abcisas).

Como se puede observar, la altura inicial máxima, la obtenemos, en este caso también, cuando el bretilio es administrado 2 horas antes del sacrificio del animal, y la altura inicial mínima corresponde al intervalo de 8 horas entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales. Existen diferencias estadísticamente muy significativas ( $P < 0,001$ ) entre las alturas iniciales obtenidas cuando los animales se sacrifican a las 2 horas de la administración del bretilio, respecto a las obtenidas cuando los animales se sacrifican a cada uno de los otros intervalos de tiempo representados en la gráfica (1, 4 u 8 horas).

La figura 41, nos muestra la evolución de las alturas (mm.) (ordenadas) de las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, tanto 1 como 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales, con respecto al intervalo de tiempo transcurrido desde que se sacrifica el animal (15', 35', 50' en abcisas). La significación de estos intervalos se ha expuesto anteriormente.

BRETILIO 20 mg/kg i.p.	15 minutos		35 minutos		50 minutos	
	Frecuencias	Alturas	Frecuencias	Alturas	Frecuencias	Alturas
1 hora	1,32 ± 0,17	12,3 ± 0,42	1,4 ± 0,11	13,6 ± 0,69	0,75 ± 0,05	18,6 ± 1,75
2 horas	1,26 ± 0,08	20,8 ± 1,18	0,8 ± 0,05	48,6 ± 1,44	0,64 ± 0,07	51,3 ± 1,08
4 horas	1,35 ± 0,05	8,6 ± 0,45	0,8 ± 0,21	14,0 ± 0,46	0,53 ± 0,13	19 ± 0,64
8 horas	0,73 ± 0,06	3,3 ± 0,26	0,7 ± 0,06	5,4 ± 0,33	0,8 ± 0,1	5,8 ± 0,22

Frecuencias (contracciones/min.) y alturas (mm.) de las contracciones obtenidas en el conducto deferente aislado de rata, tratada con 20 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, 1, 2, 4 y 8 horas antes del sacrificio. Cada uno de estos valores representa una media de un mínimo de 5 experiencias.

Tabla 6.-

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 20 mg./Kg. i.p.

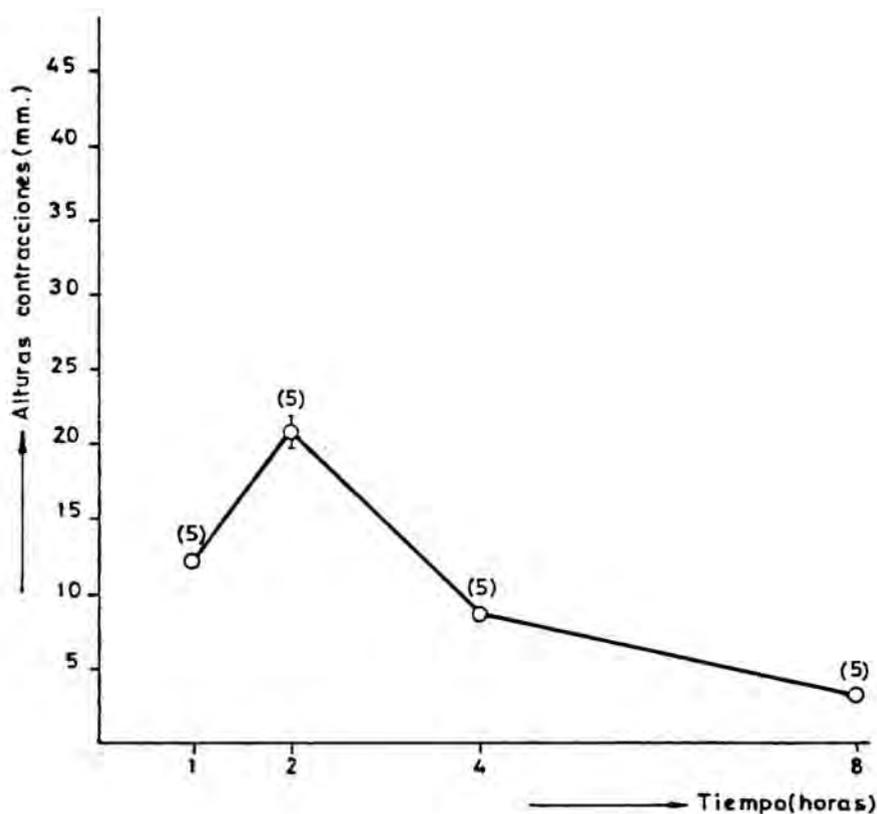


Fig. 40.- Relación entre las alturas iniciales (mm.) en ordenadas, de las contracciones del conducto deferente, obtenidas al administrar 20 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, en abcisas. Los errores relativos inferiores a 1, no se representan.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 20 mg./Kg. i.p.

○—○ 1 hora  
 □—□ 2 "  
 △—△ 4 "  
 ●—● 8 "

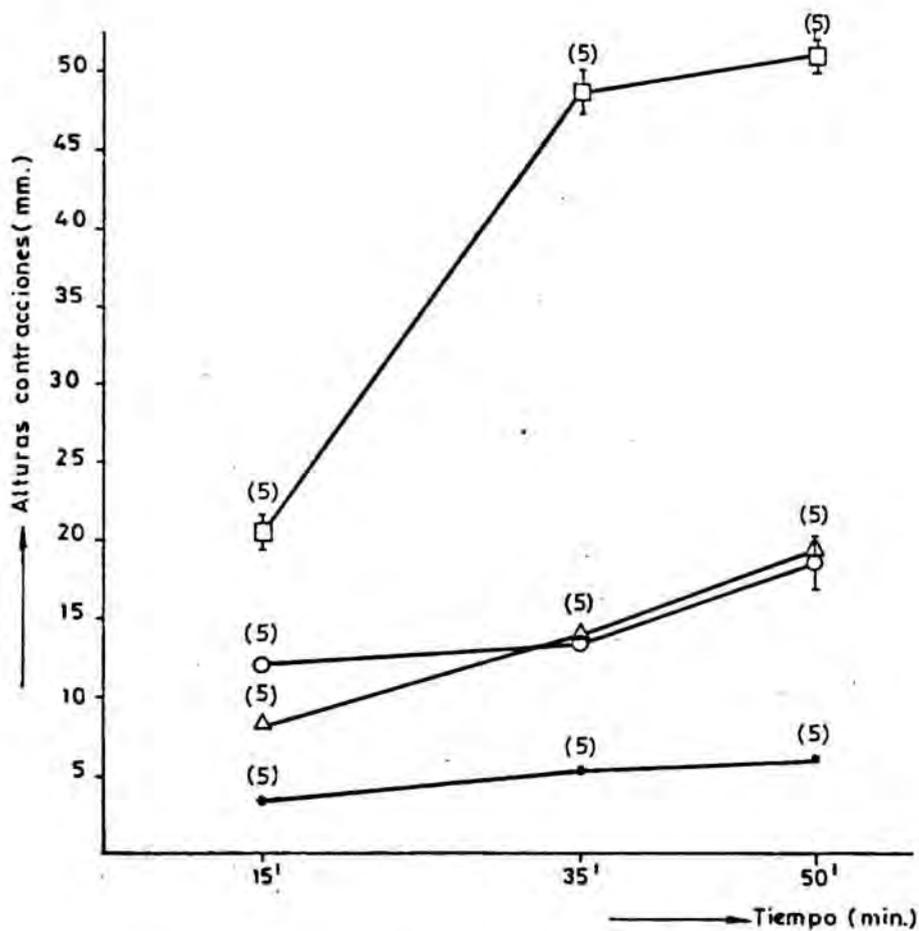


Fig. 41.- Evolución de las alturas (mm.) en ordenadas de las contracciones del conducto deferente, obtenidas al administrar 20 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, ya sea, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, con respecto a los intervalos de tiempo (min.) de observación de dichas contracciones, en abcisas. Los errores relativos inferiores a 1, no se representan.

Como se puede observar, las alturas van aumentando de forma estadísticamente muy significativa ( $P < 0,001$ ) durante el transcurso de la experiencia, cuando los animales se sacrifican a las 2 y 4 horas de la administración del bretilio. En cambio, cuando sacrificamos los animales, al cabo de 1 y 8 horas de la administración del bretilio, el aumento en las alturas de las contracciones, aunque visible, no es estadísticamente significativo, como en los dos casos anteriores.

La figura 42, nos muestra la evolución de las frecuencias (contracciones/minuto) (ordenadas) iniciales, las obtenidas en los primeros minutos tras la instalación del deficiente en el baño, de las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, tanto 1 como 2, u 8 horas antes del sacrificio de los animales (abcisas).

Como se puede observar, en este caso, la frecuencia inicial de las contracciones obtenidas al administrar el bretilio, 1, 2 0 4 horas antes del sacrificio de los animales, no muestran diferencias estadísticamente significativas, en cambio, si hay una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre las frecuencias iniciales obtenidas al sacrificar los animales a las 8 horas de la administración del bretilio, respecto a las frecuencias iniciales obtenidas al sacrificar los animales al cabo de 1, 2 y 4 horas después de la administración del bretilio. Hemos de destacar, que la frecuencia inicial mínima obtenida con 20 mg/kg de bretilio, es la que corresponde a 8 horas de intervalo entre la administración del fármaco y el sacrificio de los animales.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 20 mg/Kg. Ip.

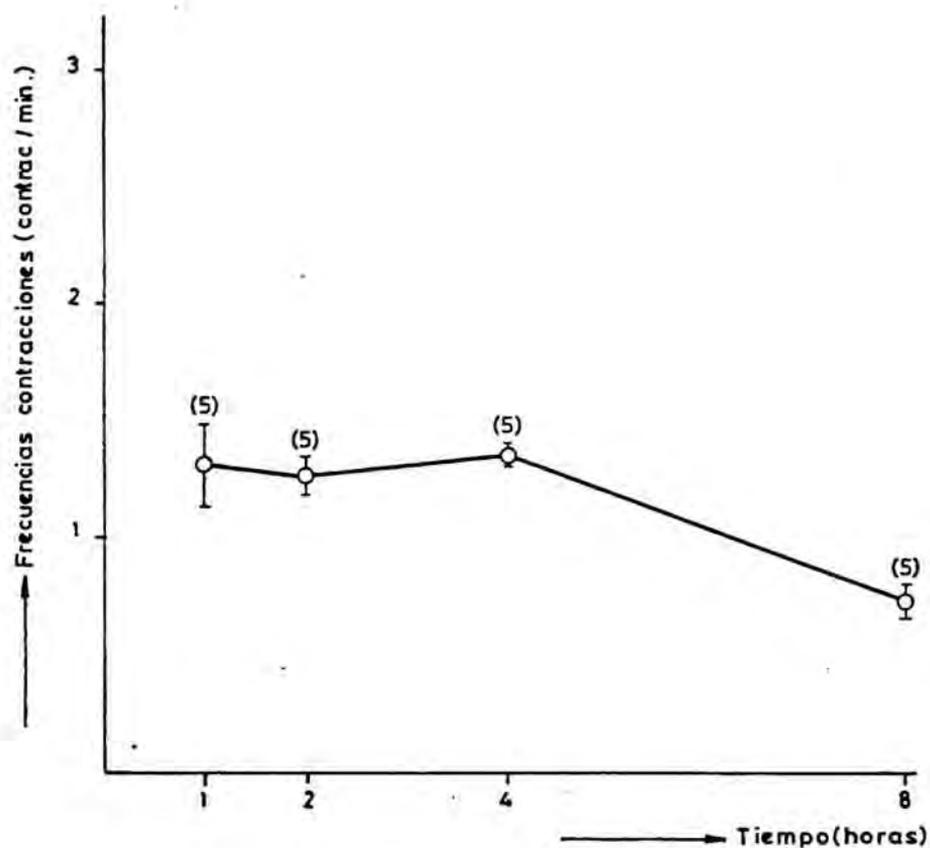


Fig. 42.- Relación entre las frecuencias iniciales - (contrac./min), en ordenadas, de las contracciones - del conducto deferente, obtenidas al administrar 20 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, en abcisas.

La figura 43, nos muestra la evolución de las frecuencias (contracciones/minuto) (ordenadas) expresadas en % respecto a la frecuencia inicial, de las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio, tanto 1, como 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales, con respecto al intervalo de tiempo transcurrido desde que se sacrifican los animales (15', 35', 50' en abcisas). La significación de estos intervalos se ha expuesto anteriormente.

Como se puede observar, las frecuencias van disminuyendo aunque de forma no estadísticamente significativa, durante el transcurso de la experiencia, cuando los animales se sacrifican al cabo de 1, 2 o 4 horas después de la administración del bretilio. Sin embargo, cuando el intervalo transcurrido es de 8 horas, las frecuencias de las contracciones, parece que aumentan un poco durante el transcurso de la experiencia.

A continuación, en otra serie de experiencias, comprobamos que las sustancias que inhiben las contracciones obtenidas al adicionar el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño, lo hacen también cuando las contracciones se deben a la administración de 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, 1 hora antes del sacrificio del animal.

Como se observa en las figuras (44 y 45) los bloqueantes alfa: fentolamina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M) y fenoxibenzamina ( $1,6 \times 10^{-7}$  M) adicionados al baño, una vez instauradas las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg) provocan también una disminución, tanto en la intensidad como en la frecuencia de las contracciones, hasta que éstas llegan a desaparecer.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA "IN VITRO"

Bretilio 20 mg/Kg. i.p.

○—○ 1 hora  
 □—□ 2 "  
 △—△ 4 "  
 ●—● 8 "

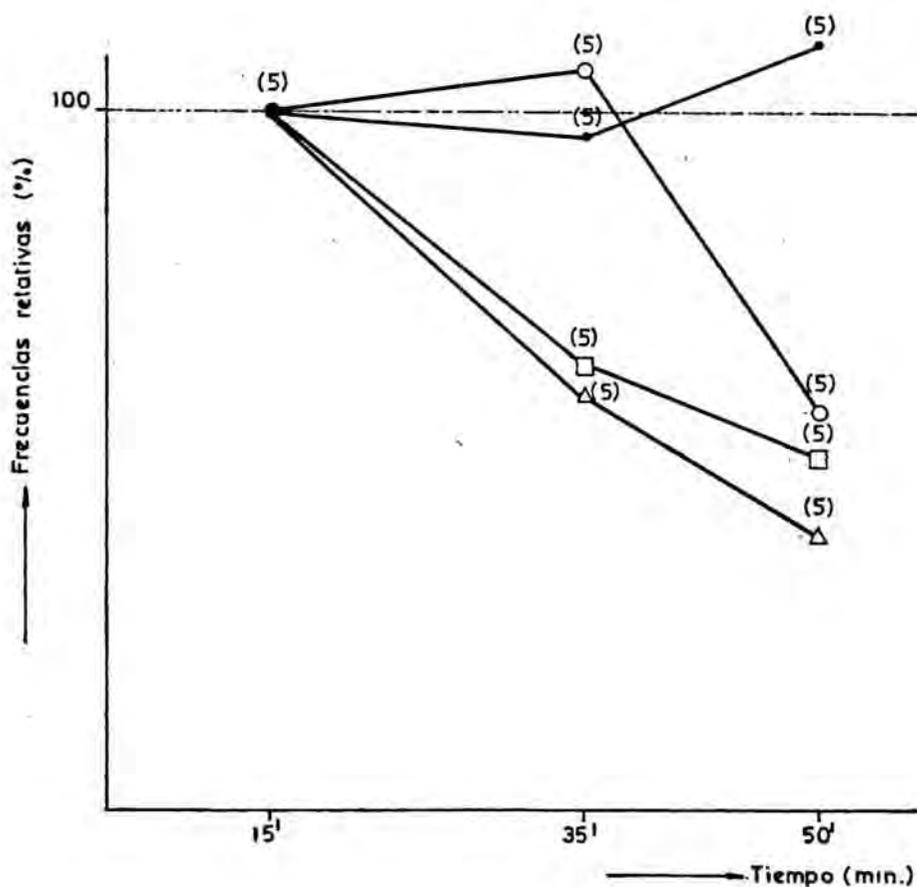


Fig. 43.- Evolución de las frecuencias (contrac./min) en ordenadas, expresadas en % respecto a la frecuencia inicial obtenida en cada caso, de las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg i.p. de bretilio, a los animales, ya sea, 1, 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio, respecto a los intervalos de tiempo (min.) de observación de dichas contracciones, en abscisas.

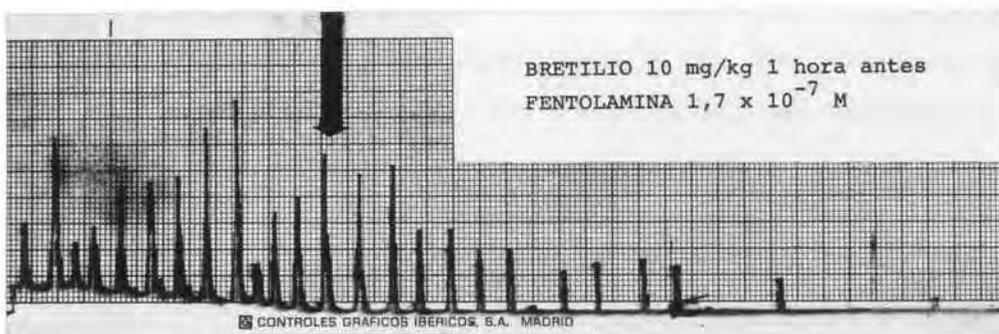


Fig. 44.- Inhibición producida por la fentolamina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., 1 hora antes del sacrificio del animal) en el conducto deferente aislado de rata. (registro térmico).

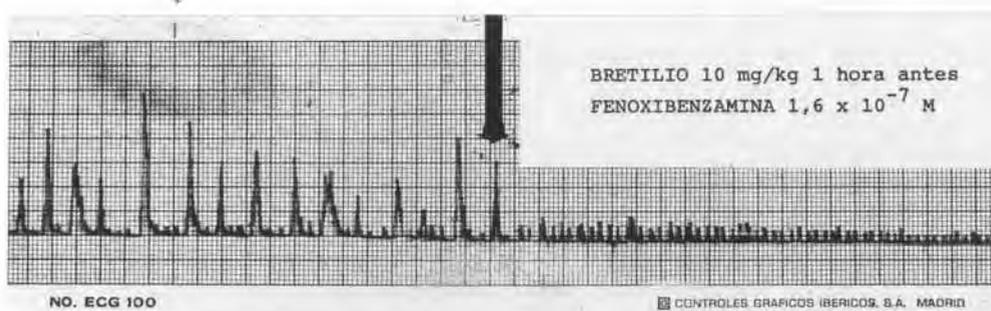


Fig. 45.- Inhibición producida por la fenoxibenzamina ( $1,6 \times 10^{-7}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., 1 hora antes del sacrificio del animal) en el conducto deferente aislado de rata. (registro térmico).

La reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M) (figura 46) adicionada al baño, provoca también una disminución de las contracciones, pero sin llegar a provocar, en este caso, su desaparición total.

La DMI ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) (figura 47) adicionada al baño, provoca la desaparición de las contracciones obtenidas con 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, 1 hora antes del sacrificio del animal.

La DMI ( $3,7 \times 10^{-6}$  M) (figura 48) potencia las contracciones producidas por la administración de 10 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, al animal 1 hora antes de su sacrificio.

La cocaína ( $8,2 \times 10^{-6}$  M) y ( $8,2 \times 10^{-7}$  M) (figuras, 49 y 50) potencia en ambos casos las contracciones producidas por la administración de 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, al animal 1 hora antes de su sacrificio.

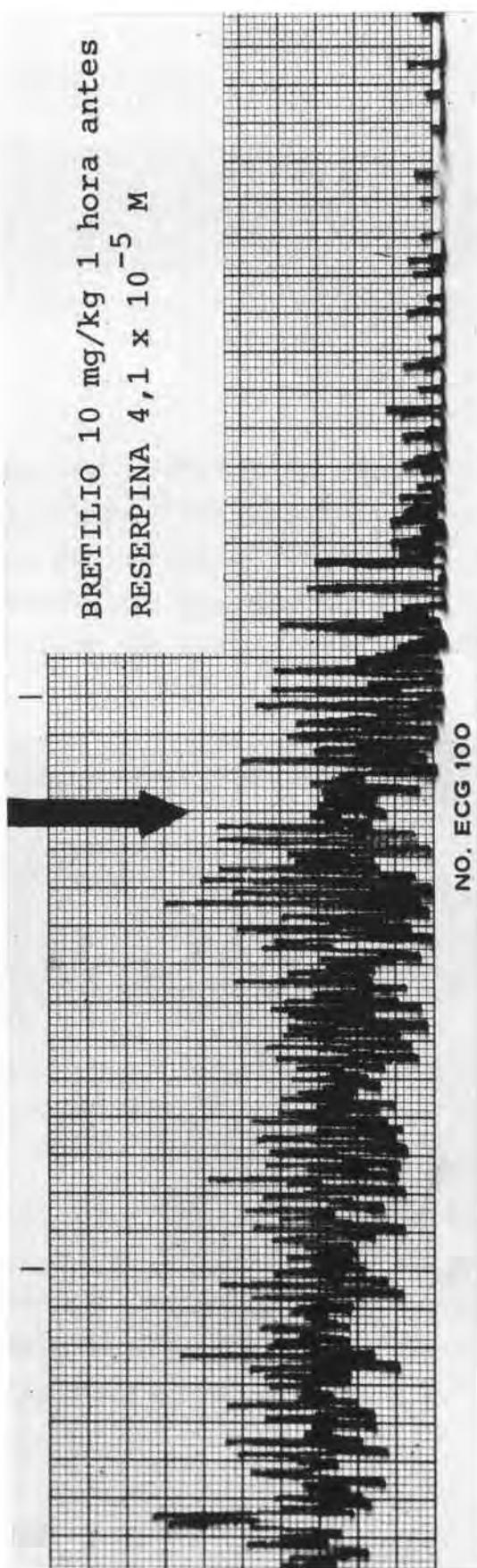


Fig. 46.- Inhibición producida por la reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., administrado 1 hora antes del sacrificio del animal) en el conducto deferente aislado de rata. (registro térmico).

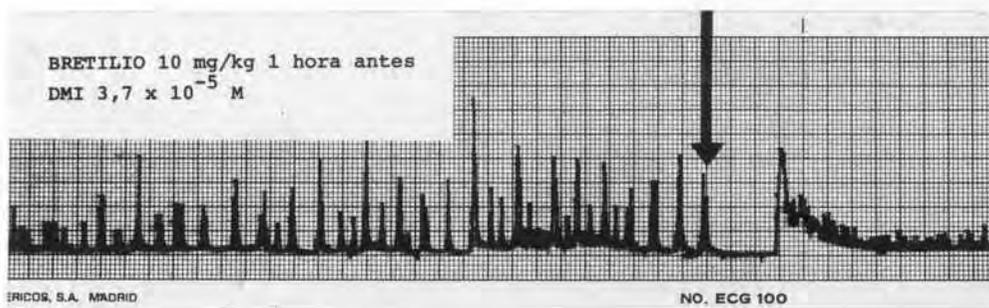


Fig. 47.- Inhibición producida por la Desipramina ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) sobre las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., 1 hora antes del sacrificio del animal), en el conducto deferente aislado de rata. (registro térmico).

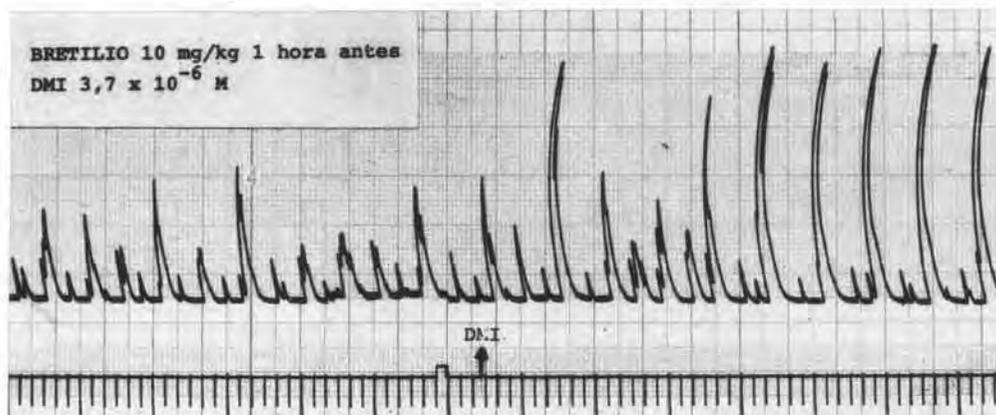


Fig. 48.- Potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., 1 hora antes del sacrificio del animal) en el conducto deferente aislado de rata, por la acción de la Desipramina ( $3,7 \times 10^{-6}$  M).

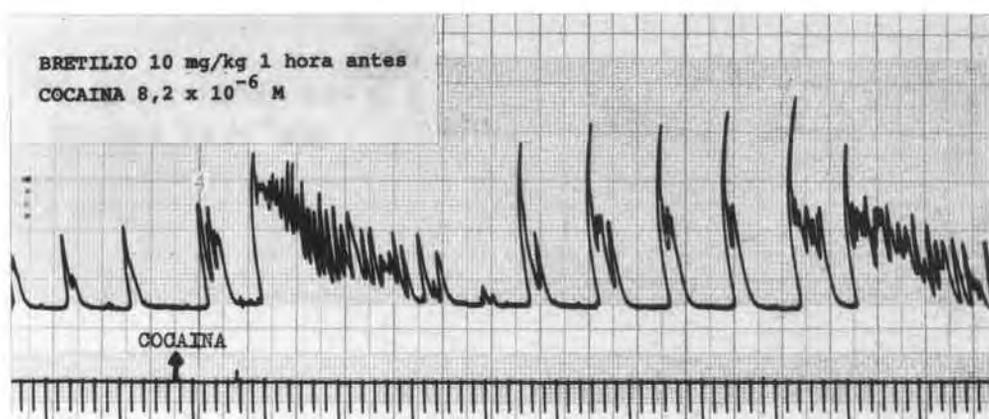


Fig. 49.- Potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., 1 hora antes del sacrificio del animal) en el conducto deferente aislado de rata, por la acción de la cocaína ( $8,2 \times 10^{-6}$  M).

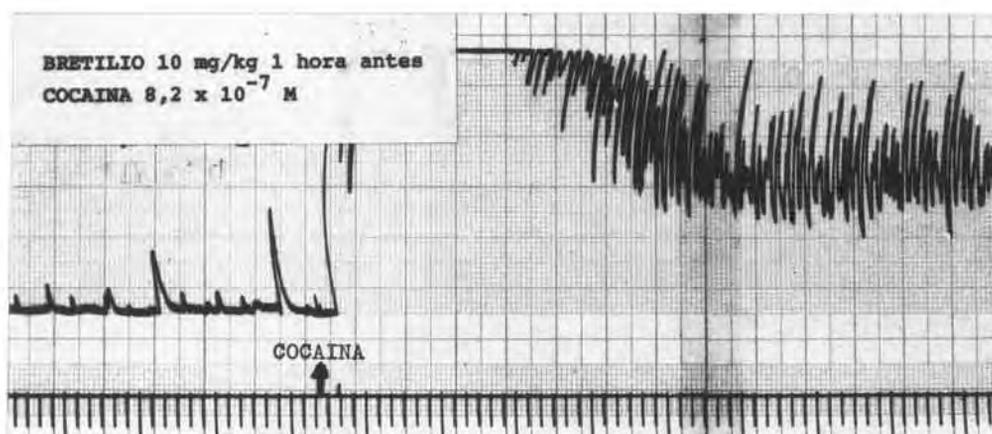


Fig. 50.- Potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio (10 mg/kg i.p., 1 hora antes del sacrificio del animal) en el conducto deferente aislado de rata, por la acción de la cocaína ( $8,2 \times 10^{-7}$  M).

De todas estas experiencias realizadas en el Conducto Deferente de Rata "in vitro", podemos concluir los siguientes hechos, que comentaremos posteriormente en la Discusión.

1.- El bretilio adicionado directamente al baño de órgano aislado, a concentraciones de:  $1,2 \times 10^{-5}$  M y  $1,2 \times 10^{-4}$  M, provoca la aparición, al cabo de unos 5 a 10 minutos de unas contracciones del conducto deferente aislado de rata, frecuentes, intensas y de larga duración (fig. 12 y 13).

2.- La altura de estas contracciones, es mayor, durante el transcurso de la experiencia, para la concentración de bretilio de  $1,2 \times 10^{-5}$  M (figura 14).

3.- La altura de estas contracciones, va aumentando durante el transcurso de la experiencia, para ambas concentraciones de bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M y  $1,2 \times 10^{-4}$  M) fig. 14

4.- La frecuencia de las contracciones es mayor durante todo el transcurso de la experiencia, para la concentración de bretilio  $1,2 \times 10^{-5}$  M. (figura 15).

5.- La frecuencia de las contracciones, para las dos concentraciones utilizadas de bretilio, se mantiene prácticamente constante, durante el transcurso de la experiencia (figura 15)

6.- La adición de bloqueantes alfa (fentolamina  $1,7 \times 10^{-7}$  M y fenoxibenzamina  $1,6 \times 10^{-7}$  M) provoca la desaparición de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figuras 16 y 17).

7.- La adición de propranolol ( $1,9 \times 10^{-7}$  a  $3,8 \times 10^{-6}$  M) no produce alteración alguna de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figura 18)

8.- La adición de reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M) provoca una disminución, sin llegar a la total desaparición de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M).

9.- La reserpinización previa de los animales con 5 y 10 mg/kg por vía intravenosa, 24 y 48 horas antes de su sacrificio, impide la aparición de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M). Sin embargo, si se realiza 72 horas antes, si que aparecen las contracciones, tras la adición de bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M).

10.- La adición de DMI ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) provoca la desaparición de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M). (figura 19). La adición de esta misma sustancia ( $3,7 \times 10^{-6}$  M) potencia las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M). La adición de DMI ( $3,7 \times 10^{-7}$  M ;  $3,7 \times 10^{-8}$  M y  $3,7 \times 10^{-9}$  M) no induce modificación alguna de las contracciones provocadas por el bretilio.

11.- La adición de cocaína ( $8,2 \times 10^{-6}$  M,  $8,2 \times 10^{-7}$  y  $8,2 \times 10^{-8}$  M) induce un aumento de las contracciones provocadas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figuras 20 y 21).

12.- La adición, tanto de atropina ( $1,7 \times 10^{-4}$  y  $1,7 \times 10^{-7}$  M) (figuras 22 y 23) como de antazolina ( $1,8 \times 10^{-4}$  y  $1,8 \times 10^{-7}$  M) (figuras 24 y 25) o de cimetidina ( $2,1 \times 10^{-4}$  y  $2,1 \times 10^{-7}$  M) (figuras 26 y 27) no produce alteración alguna de las contracciones inducidas por el bretilio.

13.- La administración de 10 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, a los animales, tanto 1, como 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio (figuras, 28, 29, 30 y 31) induce también la aparición de unas contracciones semejantes a las obtenidas al adicionar el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) directamente al baño.

14.- La altura inicial máxima de las contracciones inducidas en el conducto deferente de rata, por la administración de 10 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal (figura 36) antes del sacrificio de los animales, corresponde al intervalo de tiempo de 2 horas, transcurridas entre dicha administración de bretilio y el sacrificio de los animales. Existiendo diferencias estadísticamente muy significativas, entre el intervalo de 2 horas y los otros intervalos estudiados (1, 4 y 8 horas).

15.- Cuando los animales se sacrifican a las 2 horas, de la administración del bretilio, las alturas de las contracciones obtenidas son las mayores durante todo el transcurso de la experiencia, en relación con las obtenidas cuando los animales son sacrificados a los otros intervalos de tiempo estudiados (1, 4 y 8 horas).

16.- Las alturas de las contracciones obtenidas al sacrificar a los animales al cabo de 1, 2, 4 u 8 horas de la administración de 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, van aumentando, aunque de forma no significativa estadísticamente, durante todo el transcurso de la experiencia (figura 37).

17.- La frecuencia inicial máxima de las contracciones inducidas en el conducto deferente de rata por la administración de 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, antes del sacrificio de los animales, corresponde al intervalo de tiempo de 2 horas transcurridas entre dicha administración de bretilio y el sacrificio de los animales. Existiendo diferencias significativas estadísticamente entre los intervalos de 1 y 2 horas.

18.- Las frecuencias van disminuyendo, aunque de forma estadísticamente no significativa, durante el transcurso de toda la experiencia, cuando los animales, se sacrifican a los distintos intervalos de tiempo estudiados (1, 2, 4 u 8 horas) tras la administración del bretilio (10 mg/kg, por vía intraperitoneal) (figura 39)

19.- La administración de 20 mg/kg, por vía intraperitoneal de bretilio, a los animales, tanto, 1, como 2, 4 u 8 horas antes de su sacrificio (figuras, 32, 33, 34 y 35) induce también, la aparición de unas contracciones semejantes a las obtenidas al adicionar el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) directamente al baño.

20.- La altura inicial máxima de las contracciones inducidas en el conducto deferente de rata, por la administración de 20 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, antes del sacrificio de los animales (figura 40) corresponde al intervalo de tiempo de 2 horas transcurridas entre dicha administración y el sacrificio de los animales. Existiendo diferencias estadísticamente muy significativas, entre el intervalo de 2 horas y los otros intervalos estudiados (1, 4 y 8 horas).

21.- Estas alturas iniciales obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio, son menores, para todos los intervalos de tiempo estudiados (1, 2, 4 u 8 horas) que las obtenidas administrando 10 mg/kg de bretilio.

22.- Cuando los animales se sacrifican a las 2 horas de la administración de 20 mg/kg de bretilio, las alturas de las contracciones obtenidas, son las mayores durante todo el transcurso de la experiencia, en relación a las obtenidas cuando los animales son sacrificados a los otros intervalos de tiempo estudiados (1, 4 y 8 horas) (figura 41)

23.- Las alturas van aumentando de forma estadísticamente muy significativa, cuando los animales se sacrifican a las 2, y 4 horas de la administración de 20 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal. No sucediendo así cuando, - los animales se sacrifican al cabo de 1 y 8 horas de la administración de dicha concentración de bretilio.

24.- Las frecuencias iniciales de las contracciones obtenidas al administrar 20 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal, 1, 2, o 4 horas antes del sacrificio de los animales (figura 42) no muestran diferencias estadísticamente significativas, en cambio, si la hay para el caso del intervalo de 8 horas, que además es cuando se obtienen las frecuencias más bajas.

25.- Por lo tanto, con la dosis de 10 mg/kg de bretilio obtenemos las contracciones más altas y más frecuentes durante todo el transcurso de la experiencia. Siendo el intervalo de 2 horas entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales, el óptimo.

26.- Al igual que en las contracciones obtenidas al adicionar bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño, también sobre las contracciones obtenidas al administrar 10 mg/kg de bretilio 1 hora antes del sacrificio de los animales, los bloqueantes alfa, beta, presinápticos, y de la recaptación, - ejercen el mismo efecto (figuras, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50).

#### IV.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA MONOAMINO

##### OXIDASA

Hemos realizado una serie de experiencias para determinar la posible actividad del bretilio como inhibidor de la monoamino oxidasa.

En primer lugar, hemos utilizado hígado de rata, por ser uno de los órganos más ricos en dicho enzima. Hemos empleado ratas macho Sprague-Dawley, de peso comprendido entre  $250 \pm 10$  gr, y tal como se indica en el apartado de Material y Métodos, se ha seguido el método de Krajl (1965) para determinar la actividad de la monoamino oxidasa.

Al valor obtenido con hígado de ratas sin tratamiento alguno, lo denominaremos valor control, y le daremos una actividad de la monoamino oxidasa correspondiente a un 100%.

Posteriormente, hemos determinado la actividad de la MAO, en hígados de ratas previamente tratadas con 10 mg/kg, o 20 mg/kg de bretilio por vía intraperitoneal.

Con la dosis de 10 mg/kg, no obtenemos inhibición alguna de la actividad de la MAO, y con la dosis de 20 mg/kg, se obtiene un 25% de inhibición con respecto al valor control.

Seguidamente, realizamos estas determinaciones utilizando conducto deferente de rata. También en este caso, determinamos el valor control con ratas sin tratar.

De forma similar a lo que obteníamos al trabajar con hígado, nos encontramos que al administrar 10 mg/kg de bretilio, no se observa inhibición alguna de la actividad de

la monoamino oxidasa. En cambio, si administramos 20 mg/kg de bretilio, se obtiene una inhibición de un 9% con respecto al valor control.

De los anteriores resultados, podemos deducir, que a las dosis empleadas por nosotros, en nuestras experiencias (10 y 20 mg/kg) el bretilio no inhibe, de forma significativa, la acción de la monoamino oxidasa (MAO) en el conducto deferente de rata.

## V.- ESTUDIOS DE FIJACION

La fijación de bretilio a membranas de conducto deferente de rata, a 37°C, en función del tiempo de incubación, se representa en la figura (51). Se considera inespecífica, la diferencia entre la fijación obtenida según los métodos expuestos y la resultante de desplazar con bretilio frío - (no radiactivo) a una concentración 1000 veces superior.

Como puede observarse, el equilibrio se alcanza con gran rapidez (aproximadamente a los 5 minutos) y la incubación con concentraciones de bretilio frío 1000 veces superiores, conduce a valores de fijación inferiores, tal como se observa en la figura (52). El bretilio radiactivo fijado es desplazado por adición de bretilio frío. La velocidad de desplazamiento es proporcional a la concentración de bretilio frío. (figura 52).

En la figura 53, se representa la cantidad de bretilio radiactivo fijado, en función de la concentración de bretilio, también radiactivo, en el incubado, una vez alcanzado el equilibrio.

De estos resultados, y utilizando el método de Scatchard, se deduce la posible existencia de dos afinidades distintas:

$$N_1 = 1.84 \times 10^{-7} \text{ moles bretilio/gr. protefina}$$
$$K_1 = 2.1 \times 10^{-8} \text{ moles}^{-1}.$$

$$N_2 = 4.76 \times 10^{-7} \text{ moles bretilio/gr. protefina}$$
$$K_2 = 5.9 \times 10^{-6} \text{ moles}^{-1}.$$

una de ellas se manifiesta sólo a altas concentraciones de bretilio en el incubado, ver figura (54)

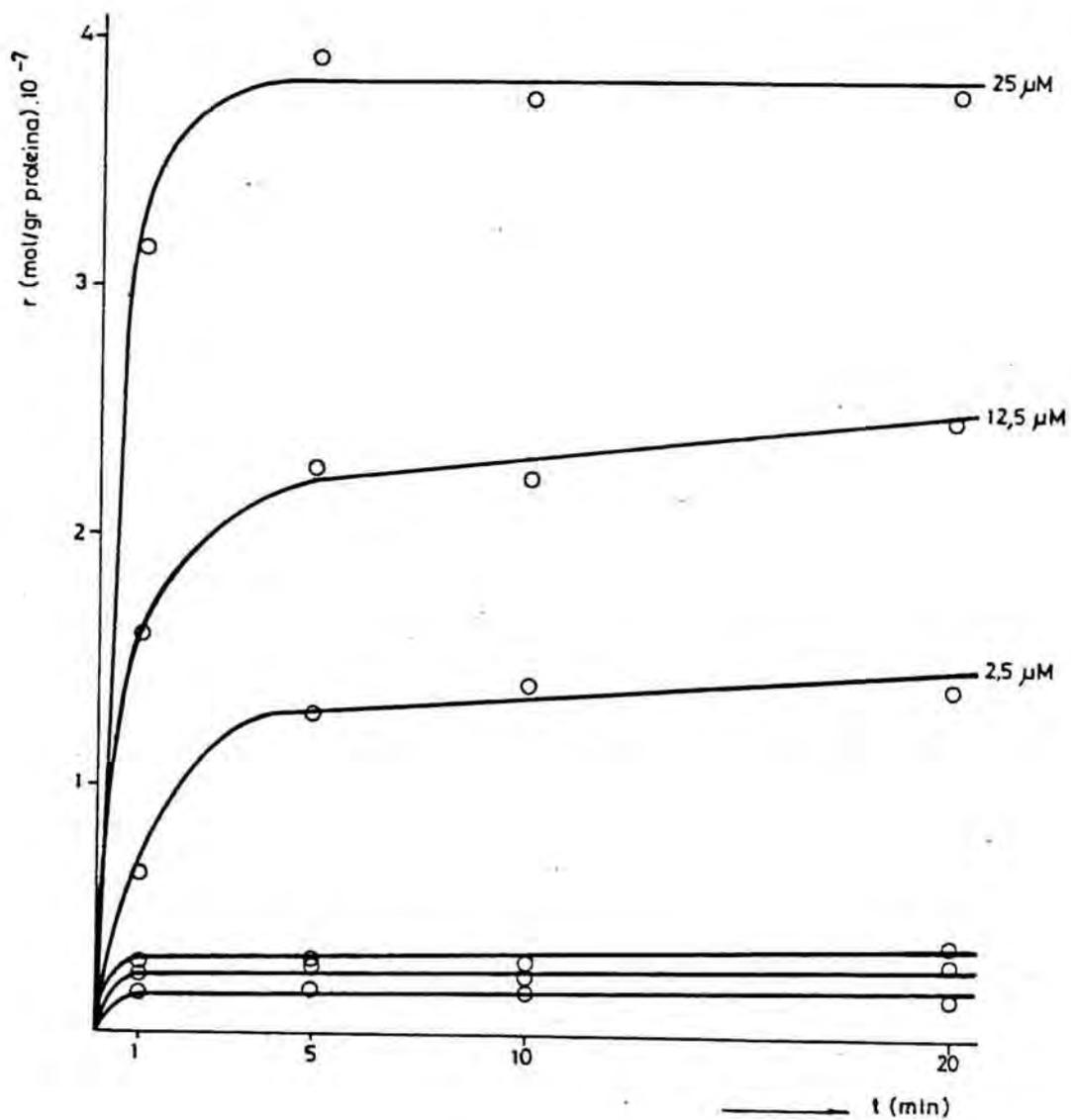


Fig. 51.- Fijación de bretilio (2.5  $\mu\text{M}$ , 12.5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  (ordenadas) a membranas de conducto deferente, en función del tiempo de incubación (abcisas).

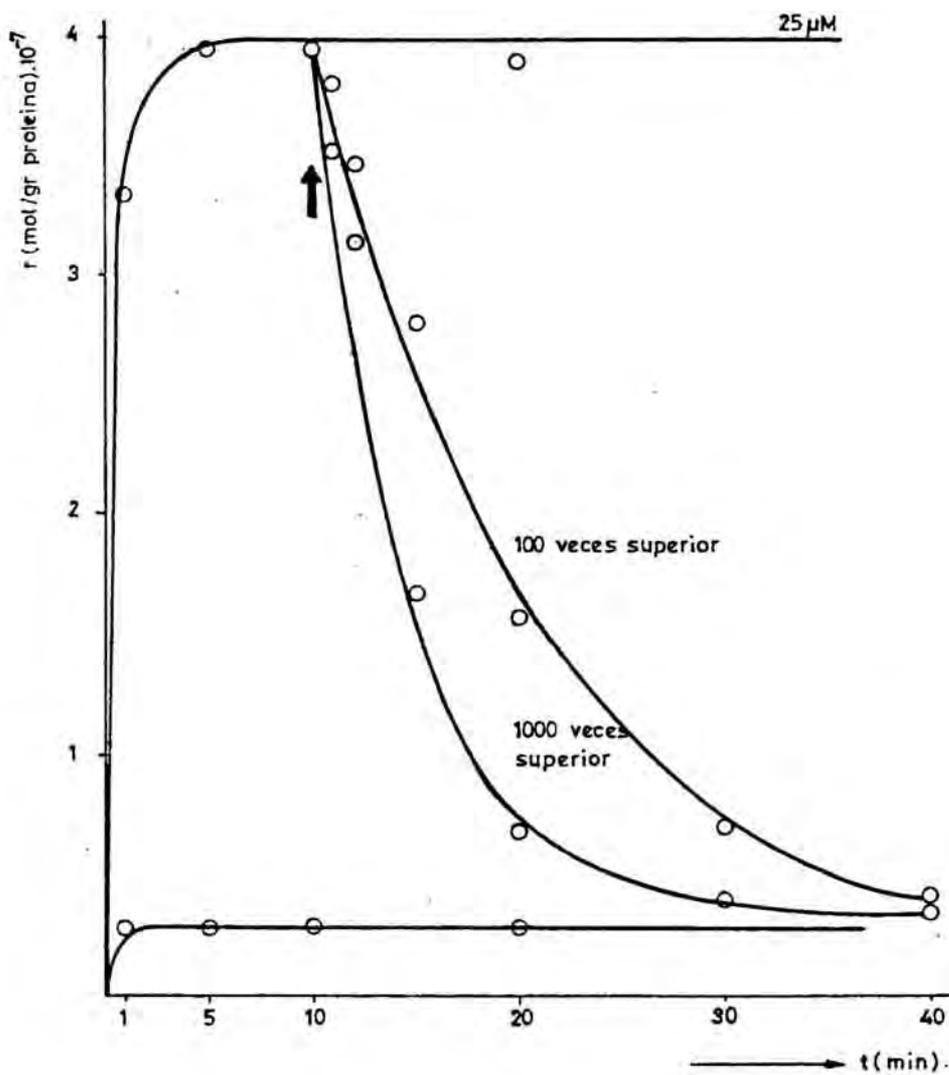


Fig. 52.- Desplazamiento del bretilio radiactivo fijado, por adición al incubado, de concentraciones de bretilio frío 100 y 1000 veces superiores, después - de 10 min. de incubación con bretilio tritiado.

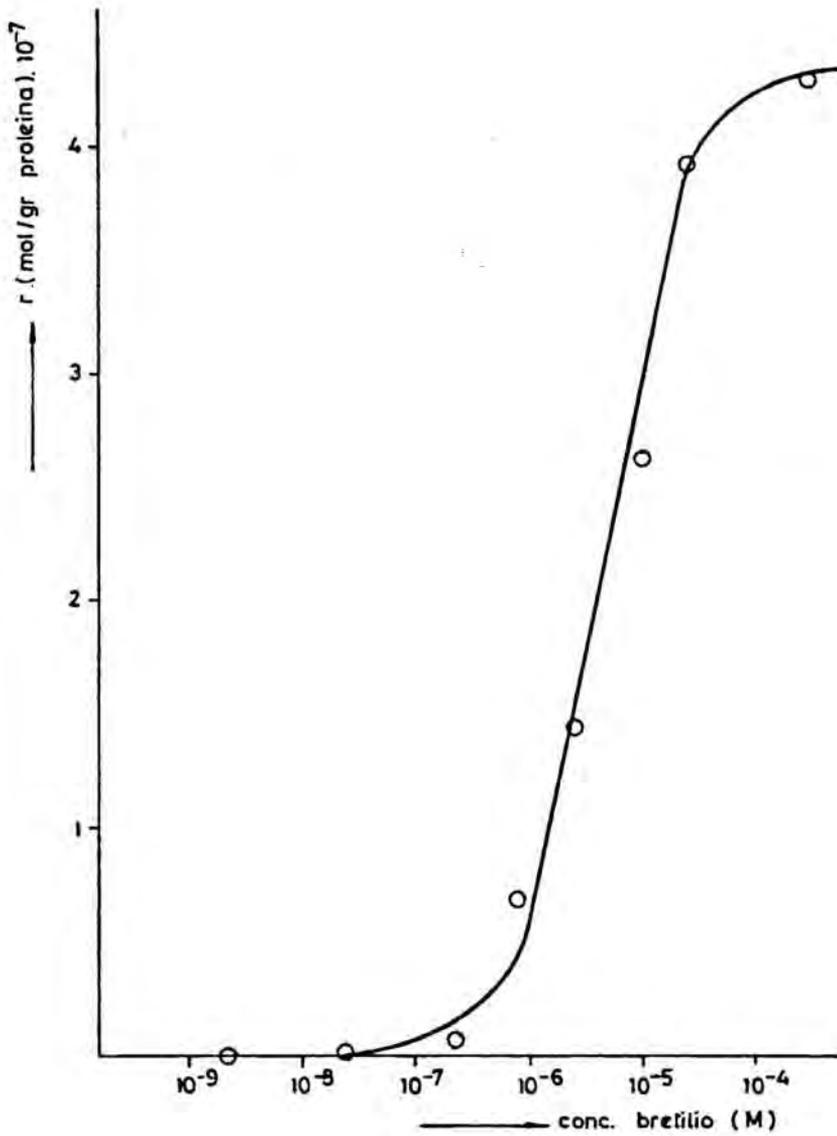


Fig. 53.- Curva de cantidad de bromio fijado respecto a la concentración de bromio tritiao, en el rango de concentraciones de  $2,5 \times 10^{-9}$  M a,  $2,5 \times 10^{-4}$  M.

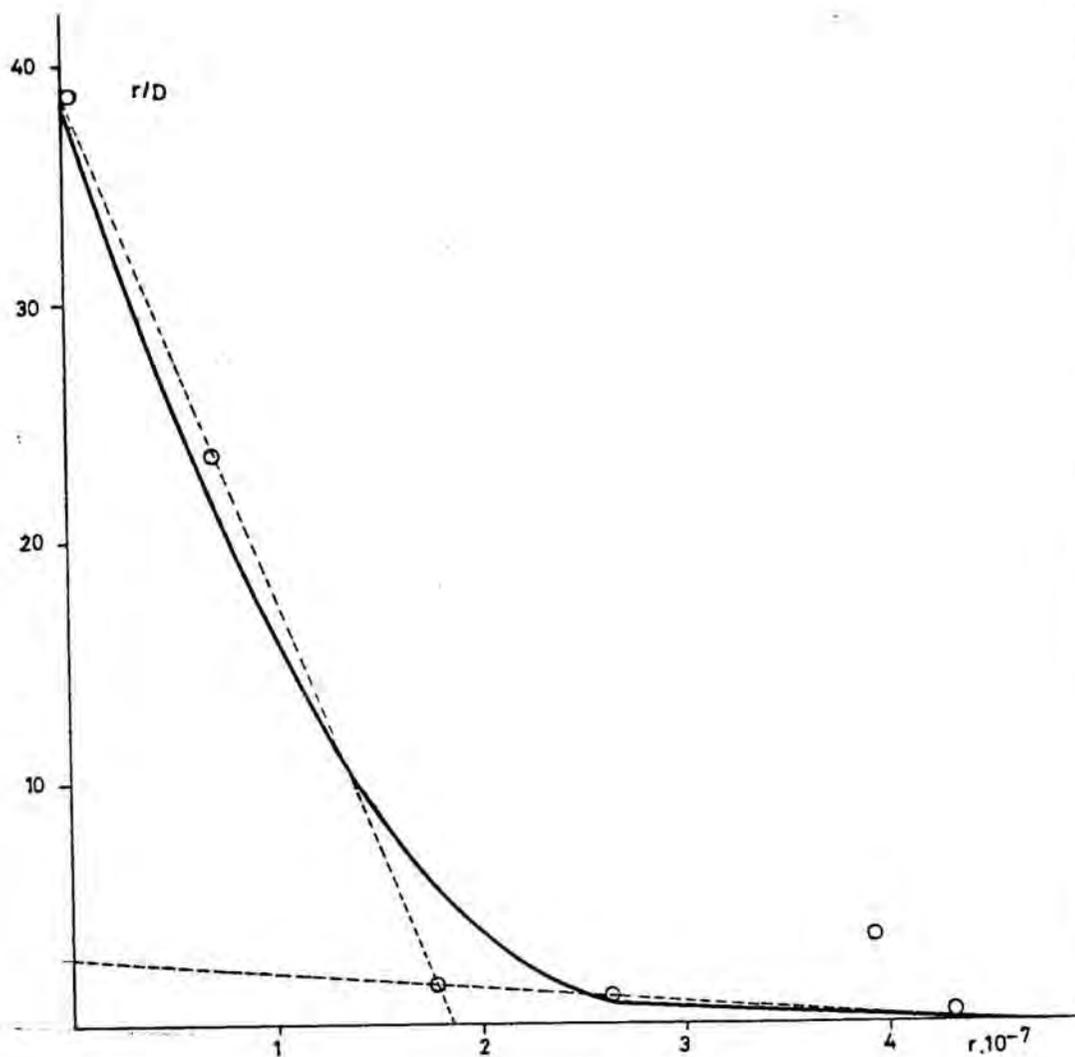


Fig. 54.- Representación de Scatchard.

$r$  = moles de bretilio tritiado/gr. de proteína.

$D$  = concentración molar de bretilio tritiado libre.

El contenido medio en proteínas de las fracciones de membrana de conducto deferente de rata, utilizadas para la obtención de estos resultados, fué de  $1.43 \pm 0.11$  mgrs. de proteína por ml. de suspensión.

El tratamiento crónico con 6-hidroxi-dopamina, durante una o dos semanas, de ratas macho jóvenes (100 gramos), conduce a una simpatectomía química (Dosis: 50-100 mg/kg - vía intraperitoneal, en ácido ascórbico al 5%).

Las membranas obtenidas a partir de los conductos deferentes de los animales así tratados, se incubaron con diversas concentraciones de bretilio tritiado a  $37^{\circ}\text{C}$ , no observándose fijación específica del bretilio a dicha fracción.

Una vez caracterizada la fijación del bretilio a membranas de conducto deferente de rata, se intentó el posible desplazamiento del bretilio de su "locus" de unión por acción de diversas sustancias (agonistas y antagonistas adrenérgicos). Como puede observarse en la figura 55, no hay disminución de la fijación al añadir: adrenalina, noradrenalina o anfetamina, después de haber incubado 5 minutos con bretilio.

Este hecho, no desplazamiento del bretilio fijado, por una serie de agonistas adrenérgicos, induce a ensayar dos variantes:

a) preincubando con los diferentes agonistas durante 60 minutos, transcurridos los cuales, se añade bretilio y se da por terminada la incubación a los 5, 10 y 20 minutos.

Los resultados pueden observarse en la figura 56, en la que puede notarse que la noradrenalina produce un desplazamiento del 35% aproximadamente, la adrenalina del 20% y la anfetamina, no lo produce.

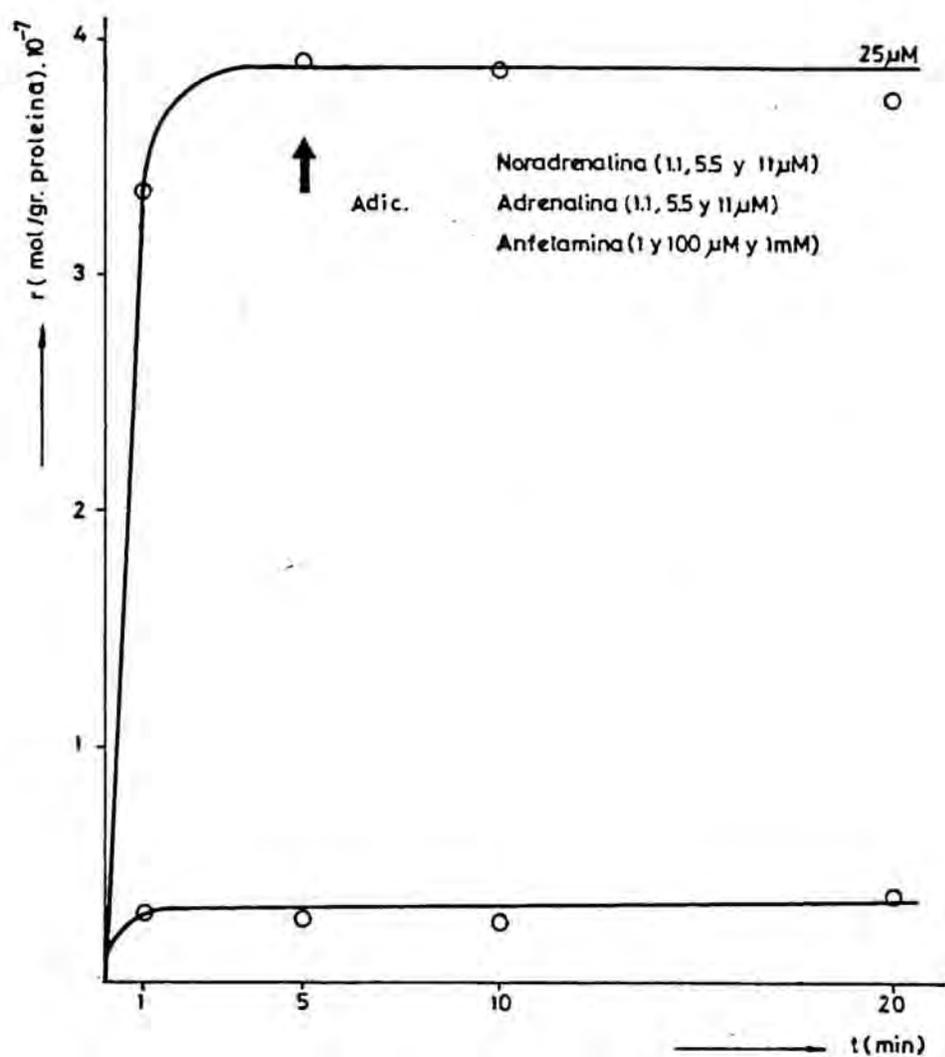


Fig. 55.- Esta figura muestra, como la adición al incubado de cantidades variables de NA, A y anfetamina, tras haberse alcanzado el equilibrio de fijación (5 min.) del bretilio, no desplazan a dicho bretilio ya fijado.

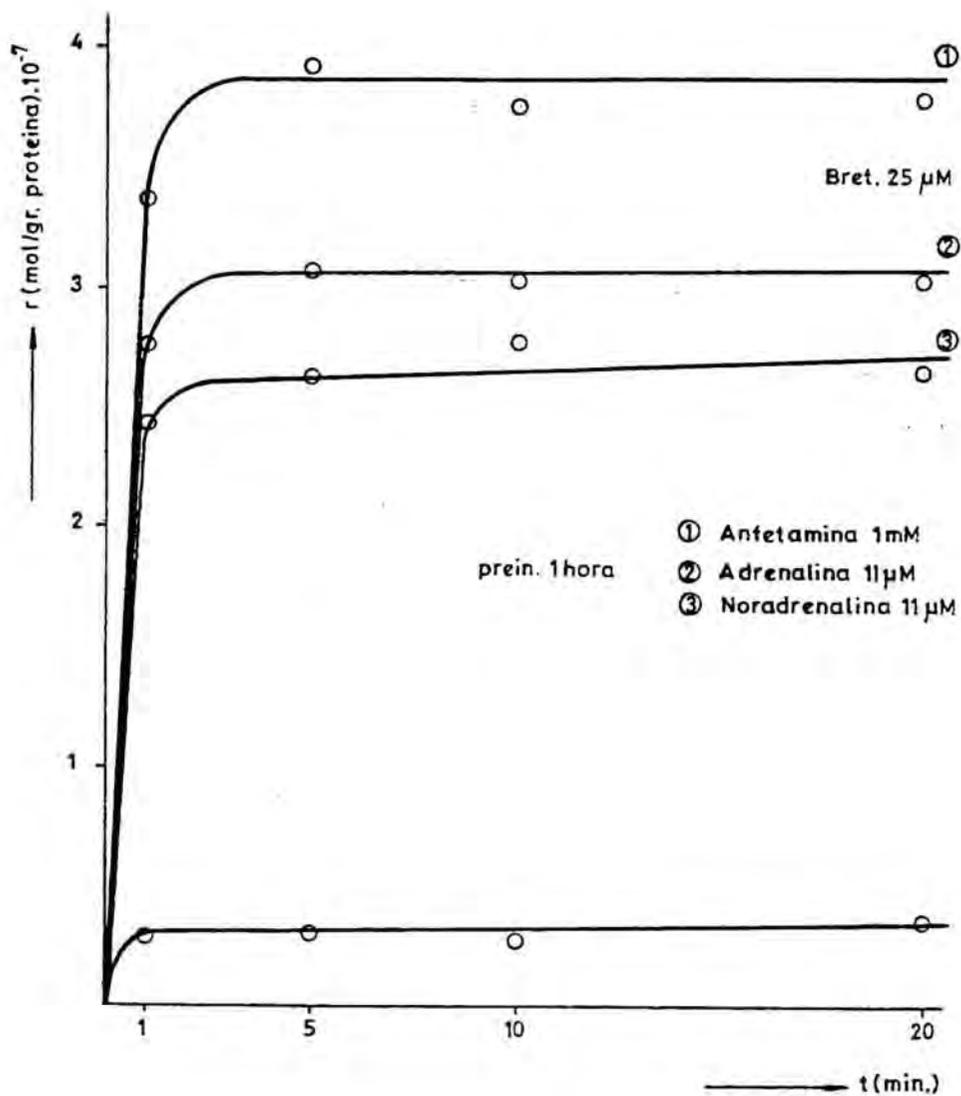


Fig. 56.- Esta figura muestra, como la preincubación con anfetamina, A y NA, 1 hora antes de añadir el - bretilio al incubado, provoca por parte sólo, de la A y NA, un cierto desplazamiento del bretilio.

b) incubando bretilio y el agonista adrenérgico juntos a 37°C y durante, 5, 10 y 20 minutos. Los resultados muestran que la noradrenalina produce un desplazamiento máximo del 50%, a unas concentraciones de 11  $\mu$ M de noradrenalina y 25  $\mu$ M de bretilio, desplazamiento que se reduce al 25% a unas concentraciones de 11  $\mu$ M de noradrenalina y 12,5 de bretilio, y que apenas es perceptible a unas concentraciones de 11  $\mu$ M de noradrenalina y 2,5  $\mu$ M de bretilio.

Algo análogo ocurre con la adrenalina a las mismas concentraciones, y el desplazamiento es del 20% a unas concentraciones de 11  $\mu$ M de adrenalina y 25  $\mu$ M de bretilio, y del 8% a unas concentraciones de 11  $\mu$ M de adrenalina y 12,5 de bretilio, y es imperceptible a 11  $\mu$ M de adrenalina y 2,5  $\mu$ M de bretilio.

En el caso de la anfetamina, el desplazamiento es imperceptible en los márgenes ensayados (0 a 10  $\mu$ M).

Tampoco se observa disminución en la fijación, al añadir fenoxibenzamina, fentolamina, yohimbina y propranolol, después de haber incubado 5 minutos con bretilio, tal como puede observarse en la figura (57).

Tampoco hay disminución en la fijación preincubando previamente con fenoxibenzamina, fentolamina y yohimibina, o propranolol, durante 60 minutos, transcurridos los cuales se añade bretilio, dándose por terminada la incubación a los 5, 10 y 20 minutos, realizando la incubación con bretilio y los bloqueantes antes citados, simultáneamente.

El margen de concentraciones utilizado ha sido:

- fenoxibenzamina (1  $\mu$ M a 10mM)
- fentolamina (1  $\mu$ M a 10mM)
- yohimibina (1  $\mu$ M a 10mM)
- propranolol (1  $\mu$ M a 10mM)

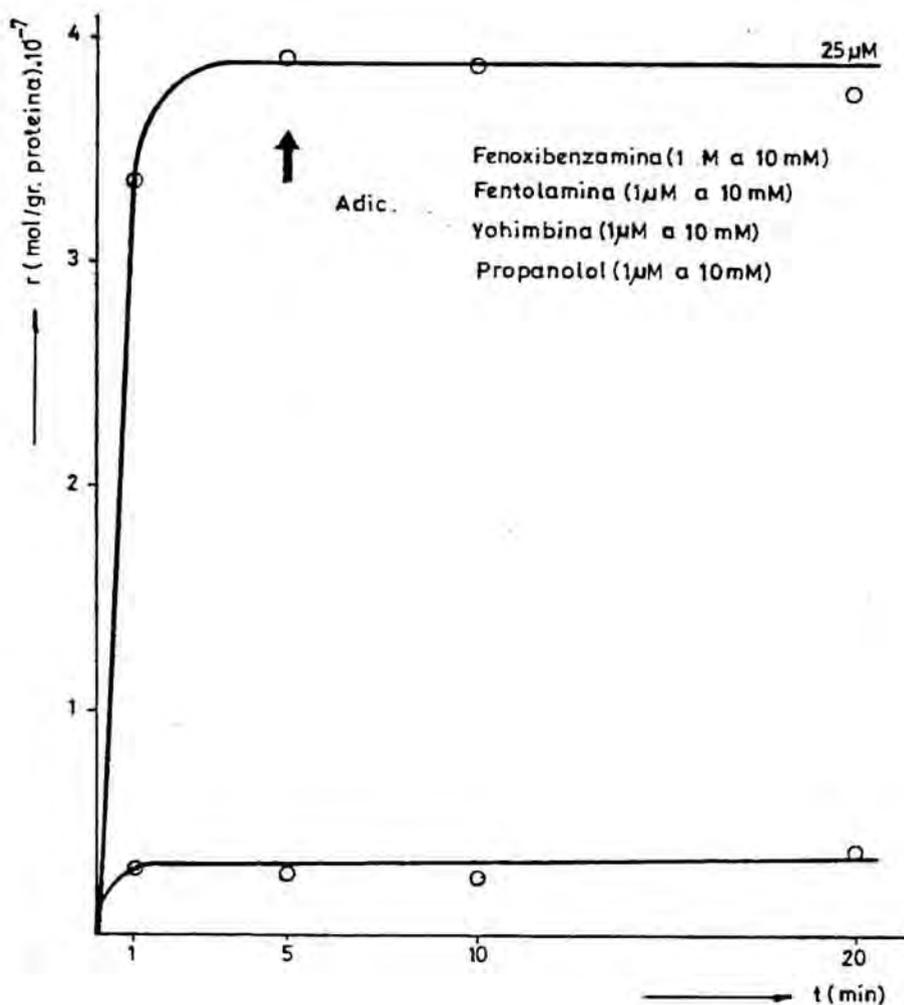


Fig. 57.- Esta figura muestra, como la adición al incubado de cantidades variables de fenoxibenzamina, fentolamina, yohimbina y propranolol, tras haberse alcanzado el equilibrio de fijación (5 min.) del bretilio, no desplazan a dicho bretilio ya fijado.

La DMI y la guanetidina, no desplazan al bretilio de su lugar de fijación, una vez alcanzado el equilibrio, tal como puede observarse en la figura 58.

Análogamente a lo realizado con los agonistas adrenérgicos, se ensayan las dos vías de preincubación e incubación simultánea, con los resultados que mostramos en las tablas 7 y 8. Puede apreciarse, de la observación de dichas tablas que, si bien hay disminución de fijación de bretilio a membranas de conducto deferente, ésta se manifiesta a concentraciones de DMI y guanetidina muy superiores a la del bretilio.

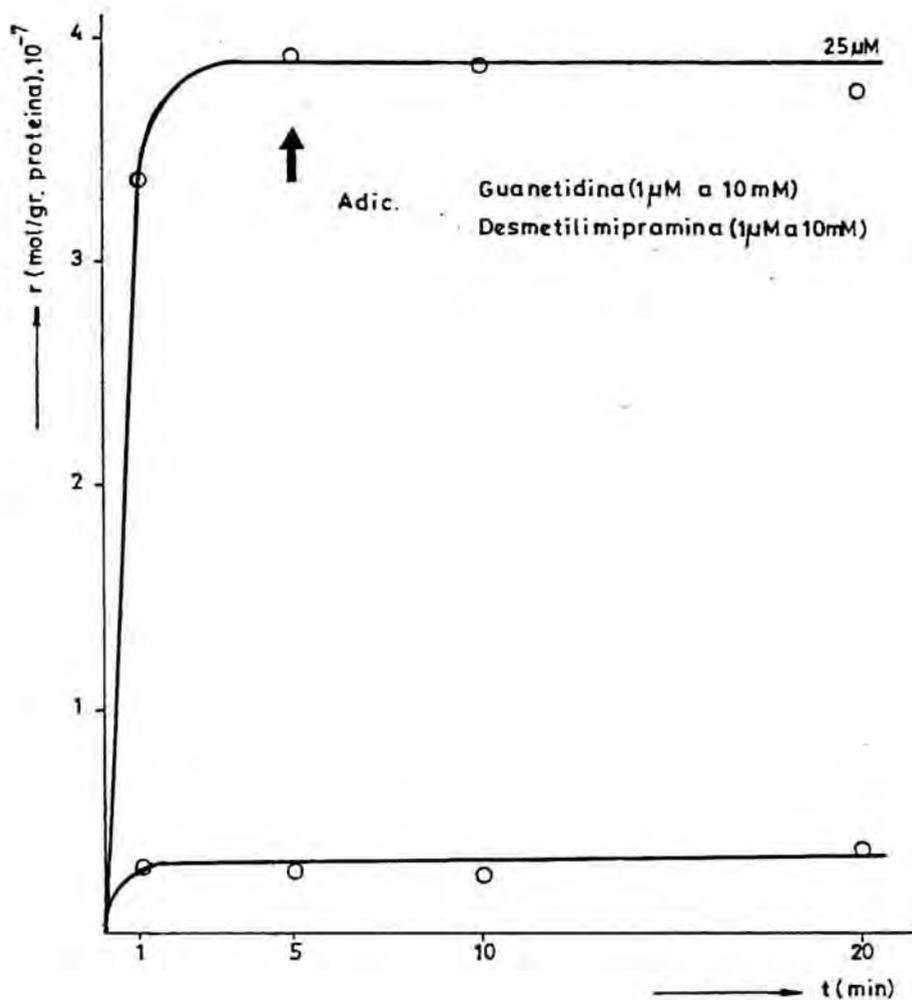


Fig. 58.- Esta figura muestra, como la adición al incubado de cantidades variables de DMI y guanetidina, tras haberse alcanzado el equilibrio de fijación (5 min.) del bretilio, no desplazan a dicho bretilio, ya fijado.

PREINCUBACION CON DESMETILIMIPRAMINA Y POSTERIOR  
ADICION DE BRETILIO.

Concentración de bretilio 25  $\mu$ M

Temperatura 37°C

Tiempo de la preincubación 30 minutos.

Tiempo de la incubación con bretilio 20 minutos.

Conc. Desmetilimipramina	Disminución de la fijación en %
1 mM	13.0
10 mM	24.0

PREINCUBACION CON GUANETIDINA Y POSTERIOR  
ADICION DE BRETILIO.

Concentración de bretilio 25  $\mu$ M

Temperatura 37 °C

Tiempo de la preincubación 30 minutos.

Tiempo de la incubación con bretilio 20 minutos.

Conc. Guanetidina	Disminución de la fijación en %
1 mM	16.0
28 mM	33.0
45 mM	48.0

Tabla 7.-

INCUBACION SIMULTANEA DE BRETILIO Y  
DESMETILIMIPRAMINA.

Concentración de bretilio 25  $\mu$ M

Temperatura 37 °C

Tiempo 20 minutos.

Conc. Desmetilimipramina	Desplazamiento (%)
1 mM	13.0
10 mM	18.1

INCUBACION SIMULTANEA DE BRETILIO Y  
GUANETIDINA.

Concentración de bretilio 25  $\mu$ M

Temperatura 37 °C

Tiempo 20 minutos.

Conc. Guanetidina	Desplazamiento (%)
1 mM	12.5
28 mM	20.0
45 mM	23.2

Tabla 8.-

D I S C U S S I O N

Desde los trabajos de Boura y Green (1959), se sabe, que el bretilio produce una marcada disminución de las respuestas nerviosas inducidas por estimulación eléctrica. Este efecto de bloqueo de las neuronas adrenérgicas, va precedido por unos efectos simpaticomiméticos indirectos, ligeros y poco duraderos (Furchgott, 1960; Kirpekar y Furchgott, 1960; Abbs, 1966).

Las experiencias que describimos en esta Tesis, aportan según nuestro juicio, nuevos datos que permiten interpretar de forma más completa la acción del bretilio en la terminación neuronal y sugieren, incluso, el locus de actuación de este fármaco. Vamos a considerar separadamente, nuestros datos, según los test utilizados.

#### Resultados en bazo de gato perfundido "in situ"

En nuestras experiencias en bazo de gato perfundido "in situ" con bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M), se observa, que tras la administración de esta substancia, se produce, aún sin estimulación del nervio esplénico, una liberación continua de noradrenalina, que aparece en el perfusado. Es sugestivo considerar que esta liberación es concordante con el efecto simpaticomimético inicial descrito para el bretilio.

Como se puede observar en la figura (9), cuando perfundimos el bazo con reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M) sin la presencia anterior de bretilio, se produce una liberación de noradrenalina muy manifiesta e inmediata. Así mismo observamos, que cuando tras la perfusión con bretilio se inicia la perfusión con reserpina, este alcaloide, no produce el aumento de liberación de NA que cabría esperar, sobre la producida por el bretilio solo.

Vemos pues, que cuando la reserpina actúa sola, se produce una gran liberación de noradrenalina, y que esta liberación se ve frenada, cuando el bretilio es administrado previamente al alcaloide.

Desde hace ya algunos años, se sabe que la reserpina, produce una depleción o vaciado duradero de las catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina) y de la serotonina, tanto del cerebro como de los tejidos periféricos (Holzbauer y Vogt, 1956; Carlsson y cols, 1957). Esta depleción, puede llegar a ser total aún con dosis pequeñas de reserpina (0,1 mg/kg, en la rata), pero a pesar de la intensidad de este efecto, su aparición es lenta, no alcanzándose el vaciado total de los depósitos de las terminaciones nerviosas hasta transcurridas de 12 a 24 horas. La recuperación es aún más lenta y no se obtiene el nivel normal de catecolaminas hasta transcurridos de 7 a 14 días (Carlsson y cols. 1957).

La transmisión nerviosa se recupera tanto en el sistema nervioso central (Haggendal y Lindqvist, 1964), como periférico (Anden y cols, 1964; Anden y Henning, 1966), al cabo solamente, de dos o tres días de la administración de reserpina, cuando los niveles de NA se mantienen aún bajos.

Anden y Lundberg (1970) intentaron explicar este hecho demostrando que el factor más importante para la recuperación de la función es la formación de nuevas vesículas sinápticas, por parte de los cuerpos celulares, y su subsiguiente transporte hasta las terminaciones nerviosas (transporte axónico) aunque probablemente también contribuya la recuperación de las vesículas antiguas.

La reserpina es captada por el cerebro en una proporción relativamente pequeña, sobre todo en comparación con otros órganos, y la pequeña cantidad que penetra en este

órgano, desaparece aparentemente a las 2-3 horas de su administración, es decir antes de que se alcance el efecto farmacológico máximo. Por ello se pensó, que las prolongadas acciones de la reserpina estarían más relacionadas con la depleción de los depósitos de aminas que con la presencia del fármaco en el cerebro.

Al producirse la depleción total de catecolaminas queda inhibida la transmisión nerviosa y además los tejidos no responden al estímulo provocado por los fármacos de acción simpaticomimética indirecta (aquellas sustancias que actúan como simpaticomiméticos no por su propio efecto, sino por liberar catecolaminas de las terminaciones nerviosas) tales como la tiramina y la cocaína.

Hace ya algunos años se demostró (Muscholl, 1960; Axelord y cols. 1961; Hertting y cols, 1961) que la adrenalina y la noradrenalina administradas exógenamente, no se fijaban en los tejidos de los animales reserpinizados. Anteriormente, se había llegado a la conclusión (Dengler y cols 1961) de que este efecto era debido a que la reserpina inhibía la recaptación de las catecolaminas administradas. Poco después (Lindmar y Muscholl, 1964) se pudo demostrar, por medio de perfusión de noradrenalina a través de corazón aislado de rata, que la recaptación de la noradrenalina se producía con igual intensidad en los tejidos normales, que en los procedentes de animales reserpinizados. Sin embargo, en los corazones de animales pretratados con reserpina, la amina aunque recaptada en la misma proporción no podía acumularse en los tejidos.

La recaptación de catecolaminas por las terminaciones nerviosas simpáticas, de tejidos de animales reserpinizados se puede incluso demostrar simplemente (Burn y Rand, 1958, 1960; Jané, 1970) poniendo en contacto dichos tejidos con una cantidad determinada de noradrenalina, transcurrido un

cierto tiempo (15 a 30 minutos), al estimular el tejido con una sustancia de tipo simpaticomimético indirecto, se observa que el tejido responde a dicho estímulo.

Si relacionamos todos estos datos con los obtenidos - en el bazo de gato perfundido "in situ", se nos plantea el dilema de decidir, si la presencia de bretilio impide la acción de la reserpina, o si lo que hace es impedir la salida de noradrenalina procedente de la terminación nerviosa.

En la figura 9, vemos que la noradrenalina liberada - por la reserpina, cuando previamente se ha perfundido el bazo con bretilio, va en disminución, lo que en principio, apoya la idea de que el bretilio actúa inhibiendo la salida de noradrenalina procedente de la terminación nerviosa, y no impidiendo la acción de la reserpina.

Podemos distinguir para el bretilio, dos acciones bien diferenciadas:

- por una parte, la liberación continua de noradrenalina que obtenemos en el perfusado de bazo de gato, y por otra

- la inhibición de la salida de noradrenalina, que provoca la reserpina.

Para complementar nuestras hipótesis, vamos a considerar a continuación nuestros resultados obtenidos con

#### Conducto Deferente de rata "in vivo"

En estas experiencias, pudimos observar (figura 10), - que cuando administramos bretilio (10 mg/kg por vía intraperitoneal) a lotes de ratas, 30 minutos, 1, 2, 4 y 8 horas - antes del sacrificio de los animales, no se obtiene modifi-

cación en el contenido en noradrenalina del conducto deferente (determinado por el método de Chang, 1964) respecto a los animales control. A pesar de que aparentemente no existe paralelismo entre la liberación de noradrenalina por el bazo de gato perfundido con bretilio, y el hecho de que el bretilio no produzca modificación alguna en la concentración de noradrenalina en el conducto deferente de rata, se podría explicar dado que el bretilio no afecta a las vesículas sinápticas, y por lo tanto al utilizar el conducto deferente de rata "in vivo", se mantiene su capacidad de síntesis y recaptación, por lo que el recambio es rápido y el contenido en noradrenalina permanece más o menos constante.

No obstante, cuando pretratamos otros lotes de ratas, con bretilio (10 mg/kg, por vía intraperitoneal) y 1 hora después les administramos reserpina (2,5 mg/kg, por vía intravenosa) observamos que el bretilio retrasa la acción depletores de noradrenalina provocada por la reserpina sola, pero no la impide.

Esta interacción del bretilio con la reserpina, en el conducto deferente de rata "in vivo", aclara nuestros resultados obtenidos en el bazo de gato. Evidentemente, el bretilio no impide el efecto depletorio de la reserpina en las vesículas sinápticas, pero bioquímicamente la curva de disminución se hace menos inclinada. Se puede sugerir, que este efecto, es consecuencia del bloqueo de salida de las catecolaminas de la terminación neuronal a los líquidos hísticos, por lo que dichas catecolaminas quedarían retenidas y sólo se eliminarían por la MAO intraneuronal. Este bloqueo de la difusión a los líquidos hísticos "in vivo", explicaría la mayor lentitud de desaparición de las catecolaminas en presencia de bretilio, producida por la reserpina. Sin bretilio, la desaparición es más rápida porque además de la acción de la MAO, contribuye la difusión a los líquidos perineuronales

y por ello a su eliminación hemática.

En consecuencia, en los animales "naive" la reserpina, al destruir las vesículas y liberar noradrenalina, hace que ésta se elimine a través de los dos mecanismos conocidos oxidación a través de la MAO y difusión con los líquidos - hísticos. Por el contrario, en el animal tratado con bretilio, la salida está disminuida, lo que implica un retraso - en la disminución del contenido. Más adelante, comentaremos nuestros resultados respecto a la acción del bretilio como posible inhibidor de la MAO.

De nuevo, con estos resultados, comprobamos la acción inhibidora del bretilio sobre la salida de noradrenalina - que provoca la reserpina.

Llegados a este punto, se nos planteó la cuestión de si esta noradrenalina liberada por el bretilio tenía o no , función fisiológica. Para intentar encontrar una respuesta a dicha cuestión, pensamos en utilizar el conducto deferente aislado de rata, ya que al ser un órgano densamente inervado por el simpático, posee un gran número de terminaciones adrenérgicas, y por tanto, un elevado contenido en noradrenalina y también, porqué al ser colocado en un baño de órgano aislado, se muestra sensible a concentraciones muy - pequeñas de simpaticomiméticos y bloqueantes adrenérgicos, a la vez que se mantiene en condiciones óptimas de respuesta, durante largo tiempo.

#### Conducto Deferente de rata "in vitro"

En las primeras experiencias que realizamos con este órgano, pudimos comprobar, al igual que ya se había hecho -

con anterioridad en nuestro Departamento por Jané (1970), - que el conducto deferente de rata, en las condiciones experimentales explicadas en el apartado correspondiente de Material y Métodos, no muestra, actividad espontánea alguna, - manteniendo constante la línea basal de registro (fig. 11).

Seguidamente, continuando nuestras experiencias, adicionamos bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño de órgano aislado, tras haber dejado estabilizar el conducto deferente de rata durante unos 20 minutos. Con gran sorpresa por nuestra parte, pudimos observar, que tras un intervalo de 5 a 10 minutos, después de la adición del bretilio, aparecían unas contracciones del conducto deferente, frecuentes, intensas y - de larga duración, que pudimos seguir durante todo el experimento (unas 8 horas) (figura 12).

A continuación, en otra serie de experiencias en las que adicionamos bretilio a dos concentraciones, una superior a la ya citada ( $1,2 \times 10^{-4}$  M) y otra inferior ( $1,2 \times 10^{-6}$  M). Pudimos observar (figura 13) con la concentración primera, que se inducía la aparición de contracciones del mismo tipo que las obtenidas con la concentración de  $1,2 \times 10^{-5}$  M pero, más frecuentes y de menor altura. En el caso de la adición de la concentración 10 veces inferior ( $1,2 \times 10^{-6}$  M) no obtuvimos respuesta alguna.

Del estudio realizado comparando la altura en (mm.) y la frecuencia (contracciones/minuto) de las contracciones - obtenidas al adicionar bretilio a las concentraciones de -  $1,2 \times 10^{-5}$  M y  $1,2 \times 10^{-4}$  M, podemos deducir que:

- 1.- La altura de las contracciones, es mayor, durante el transcurso de la experiencia, para la concentración de bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figura 14). Para ambas concentraciones ( $1,2 \times 10^{-5}$  M y  $1,2 \times 10^{-4}$  M) la altura de las - contracciones va aumentando durante el transcurso de la experiencia.

-2.- La frecuencia de las contracciones, es mayor, durante el transcurso de la experiencia, para la concentración de bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M). Para ambas concentraciones ( $1,2 \times 10^{-5}$  M y  $1,2 \times 10^{-4}$  M) la frecuencia de las contracciones obtenidas se mantiene prácticamente constante durante el transcurso de la experiencia (figura 15).

A la vista de estas contracciones obtenidas en el conducto deferente aislado de rata, por la adición de bretilio, se nos planteó de nuevo la cuestión de cual podría ser la causa de la aparición de dichas contracciones.

Creímos, en primer lugar, que estas contracciones serían debidas a la liberación de noradrenalina causada por el bretilio, en concordancia con nuestros resultados anteriores. Para corroborar esta hipótesis, realizamos un segundo grupo de experiencias, con el conducto deferente de rata "in vitro", en el que estudiamos el efecto, sobre estas contracciones de distintas sustancias;

a) bloqueantes alfa: fentolamina y fenoxibenzamina. Como podemos observar en las figuras (16 y 17), las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) disminuyen, en intensidad y frecuencia, hasta prácticamente desaparecer tanto con fentolamina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M), como con fenoxibenzamina ( $1,6 \times 10^{-7}$  M).

b) bloqueantes beta: propranolol. La adición de propranolol ( $1,9 \times 10^{-7}$  M a  $3,8 \times 10^{-6}$  M), no provoca alteración alguna en las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figura 18).

c) bloqueantes presinápticos: reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M). La adición de esta sustancia al baño, produce una disminu-

ción progresiva de las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) en el transcurso de 9 a 10 minutos, sin desaparecer por completo.

En cuanto a las experiencias realizadas reserpinizando con 5 y 10 mg/kg a las ratas, 24, 48 y 72 horas antes de su sacrificio, podemos ver, que para ambas dosis utilizadas si la reserpinización se ha realizado, 24 o 48 horas antes del sacrificio, la posterior adición de bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño, no provoca la aparición de las contracciones, en cambio, estas contracciones empiezan a manifestarse, cuando la reserpinización se ha llevado a cabo 72 horas antes.

Estos resultados concuerdan una vez más con el modo de acción de la reserpina, anteriormente comentado, del cual destacábamos que la transmisión nerviosa se recupera tanto en el sistema nervioso central (Daggendal y Lindqvist, 1963 1964) como periférico (Anden y cols, 1964) al cabo de 2 o 3 días solamente de la administración de reserpina, cuando los niveles de noradrenalina se mantienen aún bajos.

d) bloqueantes de la recaptación: la adición de DMI ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) provoca una inhibición de las contracciones inducidas por el bretilio (figura 19). En cambio, cuando esta misma substancia, se adiciona a una concentración de  $3,7 \times 10^{-6}$  M, provoca una potenciación de dichas contracciones, y al adicionarla a concentraciones desde  $3,7 \times 10^{-7}$  a  $3,7 \times 10^{-9}$  M, no provoca modificación alguna de las mismas.

Estos resultados, concuerdan con lo expuesto ya en 1965 y 1967, por Cuenca y Valdecasas, referente a que la DMI a concentraciones muy pequeñas, actúa como inhibidora de la recaptación, en cambio a dosis mayores ( $3,7 \times 10^{-5}$  M) actúa como bloqueante presináptico adrenérgico.

La cocaína, el otro bloqueante de la recaptación estudiado, a todas las concentraciones utilizadas ( $8,2 \times 10^{-6}$  M,  $8,2 \times 10^{-7}$  M,  $8,2 \times 10^{-8}$  M) (figuras 20 y 21) provoca una potenciación de las contracciones inducidas por la adición de bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño.

Por otra parte, tampoco podíamos descartar la posibilidad de que las contracciones inducidas por el bretilio, fueran provocadas por una liberación de acetilcolina o histamina, hipótesis poco probable, puesto que en nuestro Departamento se había demostrado, que el conducto deferente de rata, es escasamente sensible a la acción de la acetilcolina y de la histamina (Jané, 1970).

Por este motivo, realizamos la siguiente serie de experiencias con:

a) bloqueantes muscarínicos: atropina ( $1,7 \times 10^{-7}$  M y  $1,7 \times 10^{-4}$  M). La adición de esta sustancia no produce alteración alguna en las contracciones inducidas por el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figuras 22 y 23).

b) antihistamínicos  $H_1$ : antazolina ( $1,8 \times 10^{-7}$  M y  $1,8 \times 10^{-4}$  M) y antihistamínicos  $H_2$ : cimetidina ( $2,1 \times 10^{-7}$  M y  $2,1 \times 10^{-4}$  M). La adición de estas sustancias, tampoco produce alteración alguna en las contracciones obtenidas por la acción del bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) (figuras 24, 25, 26 y 27).

En consecuencia, de acuerdo con estos últimos resultados comentados, parece demostrado que las contracciones inducidas por el bretilio en el conducto deferente de rata,

se deben a la liberación de catecolaminas (noradrenalina lo más probable) actuando sobre receptores alfa, puesto que:

1) Se bloquean por bloqueantes alfa (fentolamina y fenoxibenzamina).

2) No se modifican por bloqueantes beta (propranolol)

3) Se inhiben al vaciarse los depósitos neuronales de catecolaminas (acción de la reserpina),

4) Se potencian con las concentraciones adecuadas de bloqueantes adrenérgicos (DMI y cocaína).

5) Se bloquean con dosis elevadas de DMI. Substancia, que a dicha concentración bloquea la salida de catecolamina

6) No se modifican por los bloqueantes muscarínicos - (atropina).

7) No se modifican por bloqueantes antihistamínicos  $H_1$  (antazolina) ni por bloqueantes  $H_2$  (cimetidina)

Llegados a este punto, nos pareció interesante estudiar, si la administración de bretilio a los animales, antes de su sacrificio, inducía también, la aparición de las contracciones anteriormente descritas, puesto que conocíamos - de las experiencias de Kuntzman y cols (1970), que en la rata el bretilio no es metabolizado, y el 63% de la dosis es excretado de forma inalterada por la orina, y el 31% es excretada por las heces, durante los 4 días siguientes a su administración.

## Conducto Deferente de rata "in vitro", tras la administración de bretilio "in vivo"

Para realizar este grupo de experiencias, procedimos en primer lugar a inyectar bretilio (10 mg/kg por vía intraperitoneal) 1 hora antes del sacrificio de los animales (según la dosis utilizada en nuestras anteriores experiencias bioquímicas).

En este caso pudimos observar (figura 28), que tras la colocación del conducto deferente de la rata en el baño de órgano aislado, aparecían de forma inmediata, unas contracciones similares a las obtenidas en el caso de que el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) fuera adicionado al baño.

De forma paralela a como habíamos realizado en el apartado anterior de experiencias, también en esta ocasión, hemos procedido a administrar una dosis inferior (5 mg/kg por vía intraperitoneal) y otra superior (20 mg/kg, por vía intraperitoneal) de bretilio.

En el caso de administrar 5 mg/kg de bretilio, no se obtiene respuesta alguna. En cambio, si se observa la aparición de las contracciones, cuando se administran 20 mg/kg de bretilio, 1 hora antes del sacrificio de los animales - figura (32).

Por lo tanto, parecía evidente una relación entre dosis y efecto, lo cual nos sugirió que debíamos estudiar con más detalle este proceso, ya que era de presumir una relación paralela a la observada con las experiencias "in vitro" para ello, variamos sistemáticamente, los dos parámetros que podían influir:

- dosis

- lapso de tiempo transcurrido entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales. Los intervalos

de tiempo estudiados, entre la administración del bretilio y el sacrificio de los animales fueron de 1,2,4 y 8 horas.

Como hemos podido observar en las figuras correspondientes (28, 29, 30, 31 y 32, 33, 34, 35), al administrar - tanto 10, como 20 mg/kg de bretilio, por via intraperitoneal, 1, 2, 4 u 8 horas antes del sacrificio de los animales, se obtienen, de forma inmediata, las contracciones del conducto deferente.

Por lo tanto, aparece, aquí bien visible, la acción - liberadora de noradrenalina, que posee el bretilio, acción que ya destacábamos, al comentar los resultados de la perfusión del bazo de gato "in situ".

Por otra parte debemos señalar, que no hemos podido - observar una correlación entre los resultados obtenidos con la dosis de 10 mg/kg, respecto a los obtenidos con la de 20 mg/kg, ya que prácticamente en todos los casos analizados - las contracciones son más altas y más frecuentes, con la dosis de 10 mg/kg.

De nuevo comprobamos, en este grupo de experiencias, la acción de los bloqueantes alfa (fentolamina y fenoxibenzamina), bloqueantes presinápticos (reserpina) y bloqueantes de la recaptación (DMI y cocaína) sobre las contracciones inducidas en el conducto deferente de rata, por la administración de 10 mg/kg, por via intraperitoneal, de bretilio 1 hora antes del sacrificio de los animales.

Los bloqueantes alfa (fentolamina:  $1,7 \times 10^{-7}$  M y fenoxibenzamina:  $1,6 \times 10^{-7}$  M) adicionados al baño, una vez - instauradas las contracciones inducidas por el bretilio, - provocan también, en esta ocasión, una disminución, tanto -

en la intensidad, como en la frecuencia de dichas contracciones, hasta prácticamente su desaparición (figuras 44 y 45)

La reserpina ( $4,1 \times 10^{-5}$  M) adicionada al baño, provoca una disminución de las contracciones, sin llegar a su total desaparición (figura 46).

Asimismo, con los bloqueantes de la recaptación (DMI, y cocaína) obtenemos también los mismos resultados que en el caso de que las contracciones se deban a la adición directa del bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) al baño (figuras, 47, 48 49 y 50).

De todas las experiencias descritas hasta aquí, tanto "in vivo" como "in vitro", podemos concluir que:

1) el bretilio produce una liberación de catecolamina y no de otro neurotransmisor, tanto "in vivo" como "in vitro", ya que la atropina, la antazolina, o la cimetidina, no provocan alteración alguna en las contracciones obtenidas por acción del bretilio.

2) esta noradrenalina (catecolamina) liberada, tiene una acción fisiológica, bien manifiesta, en la inducción de las contracciones en el conducto deferente de rata.

3) esta acción fisiológica es mediada por receptores alfa postsinápticos, ya que el propranolol (bloqueante beta no afecta para nada a las contracciones inducidas por el bretilio, y sin embargo, los antagonistas alfa (fentolamina y fenoxibenzamina) provocan la desaparición de las mismas, - así como también provoca dicha desaparición la adición de

de DMI a una concentración de  $3,7 \times 10^{-5}$  M, a la que la DMI actúa como bloqueante presináptico.

4) la DMI y la cocaína, al actuar como inhibidores de la recaptación, aumentan la cantidad de noradrenalina que actúa sobre el receptor, provocando de esta forma una potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio.

5) la reserpina inhibe las contracciones, ya sea administrada "in vivo" o adicionada al baño.

Así pues, todos estos resultados son concordantes con los expuestos anteriormente y evidencian de nuevo, que el efecto analizado del bretilio se debe a la liberación de noradrenalina que induce este fármaco.

Descritas pues, todas las acciones del bretilio observadas por nosotros, se nos planteó la cuestión, de cómo lleva a término su acción dicha substancia, o sea, como podríamos explicar, en base a nuestros resultados, el mecanismo de acción del bretilio. Pensamos, que el efecto fuera debido a la inhibición de la MAO por el bretilio, por lo que realizamos las experiencias de

#### Determinación de la actividad de la MAO

Para intentar solucionar la cuestión planteada, y pensando que el bretilio podría actuar como inhibidor de la MAO, ya que Furchgott y cols (1971) observaron, en sus experiencias, que el bretilio ( $5,7 \times 10^{-7}$  M) actúa como inhibidor de la MAO de las terminaciones nerviosas adrenérgicas de la aurícula izquierda de cobaya (inhibición de naturaleza

competitiva), hemos realizado una serie de experiencias con conducto deferente de rata, y administrando las mismas dosis de bretilio que las empleadas en nuestras experiencias anteriores (10 mg/kg, por via intraperitoneal, a unos lotes de animales, y a otros lotes 20 mg/kg, también por via intraperitoneal) determinamos, por comparación con un grupo control de animales, la actividad de la MAO (Krajl, 1965) tanto en los grupos de animales tratados, como en los control.

Hemos podido observar, que en estas condiciones, no se obtiene una inhibición significativa de la actividad de la MAO en el conducto deferente aislado de rata, por lo que concluimos que la inhibición de la MAO, no es la causa de los efectos observados, ni sobre la motilidad del citado órgano, ni sobre la liberación de catecolaminas.

De todo lo expuesto hasta aquí, podemos concluir que el bretilio, para ejercer su acción:

- no altera las vesículas sinápticas.
- no impide la síntesis de catecolaminas.
- no impide la metabolización de las catecolaminas intraneuronales, ya que no inhibe a la MAO, en nuestras condiciones experimentales.
- bloquea parcial o totalmente, el disparo de noradrenalina producido por el impulso nervioso.

Todo esto nos llevó a pensar, si el efecto del bretilio observado, se correspondería con su fijación en las membranas celulares, por lo que realizamos nuestros

### Estudios de Fijación

Estas experiencias iban encaminadas a caracterizar, en lo posible, el tipo de fijación que tiene lugar entre el bretilio y la terminación nerviosa adrenérgica, empleando para ello, fracción de membranas de conducto deferente de rata.

En estas experiencias, hemos observado que:

- el bretilio tiene una gran capacidad para fijarse en la fracción de membrana obtenida a partir de un homogeneizado de conducto deferente de rata. (figura 51).

- el tiempo en que se alcanza el equilibrio de fijación es muy corto (2'-3'), lo que implica una gran velocidad de fijación (figura 51).

- esta fijación obtenida, es reversible, siendo desplazado el bretilio radiactivo fijado por bretilio frío, ver la figura 52.

- al ensayar diversas concentraciones de bretilio, utilizando posteriormente el método de Scatchard para determinar el tipo de afinidad, nos encontramos con una afinidad con  $N=1.84 \times 10^{-7}$  moles/gr. de proteína y  $K=2,1 \times 10^{-8} \text{ mol}^{-1}$  (ver figura 54).

Por lo tanto, estos datos parecen demostrar que hay una estructura en la sinapsis adrenérgica, que es capaz de

fijar el bretilio. Podría por ello pensarse, que el bretilio desplazara a las catecolaminas de su lugar de fijación y que ésta fuera asimismo la causa de los efectos observados.

Hemos estudiado, por ello, el posible desplazamiento del bretilio de su lugar de fijación, por una serie de agonistas y antagonistas adrenérgicos: noradrenalina, adrenalina, anfetamina (figura 55), fentolamina, fenoxibenzamina, yohimbina y propranolol (figura 57), guanetidina y DMI (figura 58), y hemos encontrado que, al introducir en el incubado, transcurrido el tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio, cantidades diversas de dichas sustancias, estas sustancias, no desplazan al bretilio de su lugar de fijación, lo que indica gran afinidad de esta sustancia por este "locus", cosa concordante con la larga duración del efecto del bretilio.

Por otra parte, incubando previamente durante 60 minutos, la fracción de membranas con estas sustancias, y añadiendo posteriormente, el bretilio tritiado, se observa en algunos casos, una ligera disminución en la fijación, al igual que en el caso de incubar la fracción de membrana con bretilio y una de estas sustancias simultáneamente. En los casos en que se observa disminución en la fijación, ésta es dependiente de la concentración de bretilio, lo que indica la posible existencia de una competencia por ese lugar de fijación.

C O N C L U S I O N E S

1) El bretilio produce, aún sin estimulación eléctrica del nervio esplénico, una liberación continua de noradrenalina, apreciable bioquímicamente en el perfusado de bazo de gato. Este dato confirma las experiencias de Abbs (1965) en las que demostraron que tras una inyección de bretilio - hay un aumento inmediato de la concentración de catecolaminas en la sangre venosa esplénica del gato. Sugerimos que esta liberación es la causa del efecto simpaticomimético inicial descrito para el bretilio.

2) La perfusión del bazo de gato con reserpina, produce una liberación de noradrenalina muy manifiesta e inmediata.

3) El bretilio perfundido antes que la reserpina, bloquea la gran liberación de noradrenalina provocada por dicho alcaloide.

4) Cuando administramos bretilio "in vivo" a lotes de ratas y luego se sacrifican a distintos tiempos, no se observa modificación en el contenido en noradrenalina del conducto deferente, respecto a los animales control.

5) La falta de paralelismo entre la liberación de noradrenalina por el bazo de gato perfundido con bretilio, y el hecho de que el bretilio no produzca modificación alguna en la concentración de noradrenalina en el conducto deferente de rata, se puede explicar porque el bretilio no afecta las vesículas sinápticas (Brodie y cols, 1965; Ross y Gosztonyi, 1975) y por lo tanto se mantiene su capacidad de síntesis y recaptación, por lo que el recambio es rápido y el contenido en noradrenalina permanece más o menos constante, en los tejidos, como comprobamos nosotros, en el conducto deferente de rata.

6) En lotes de rata, que se les pretrata con bretilio "in vivo" y 1 hora después se les administra reserpina, se observa que el bretilio retrasa la acción depletora de la noradrenalina provocada por la reserpina, pero no la impide

7) Esta interacción del bretilio con la reserpina, en el conducto deferente de rata "in vivo", concuerda con la obtenida en el bazo de gato perfundido "in situ". Se trata de dos órganos ricos en catecolaminas, y en los que a pesar de ser diferente su estructura anatomofisiológica, se obtienen resultados similares. Se debe interpretar que el bretilio, en ambos casos, impide la difusión de la noradrenalina de las vesículas destruidas por la reserpina a los líquidos intercelulares. Se anula así un factor importante en la eliminación de la noradrenalina que sólo desaparecerá del tejido por la acción de la MAO intraneuronal.

8) Cuando ponemos en contacto el conducto deferente de rata aislado "in vitro" con bretilio a la concentración de  $1,2 \times 10^{-5}$  M, observamos, la aparición, tras un intervalo de 5 a 10 minutos, de unas contracciones frecuentes, intensas y de larga duración, que no se presentan de forma espontánea, es decir, cuando el conducto deferente se encuentra en condiciones basales.

9) Al adicionar bretilio, a mayor concentración ( $1,2 \times 10^{-4}$  M) en las mismas condiciones expresadas en el punto anterior, observamos también, la aparición de unas contracciones del mismo tipo, aunque más frecuentes, pero de menor altura. La adición de  $1,2 \times 10^{-6}$  M de bretilio, no induce respuesta alguna.

10) La altura y la frecuencia de estas contracciones obtenidas en el conducto deferente de rata, al adicionar el

bretilio al baño de órgano aislado, es siempre mayor, para la concentración de  $1,2 \times 10^{-5}$  M.

11) Para ambas concentraciones, la altura de las contracciones va aumentando, durante el transcurso de la experiencia, en cambio, la frecuencia se mantiene prácticamente constante.

12) Demostramos que, las contracciones observadas inducidas por el bretilio en el conducto deferente de rata, se deben a la liberación de noradrenalina, y que, ésta noradrenalina, actúa sobre receptores alfa, por los siguientes motivos:

a) se bloquean por la adición al baño de bloqueantes alfa (fentolamina y fenoxibenzamina).

b) no se modifican por bloqueantes beta (propranolol)

c) se inhiben al vaciarse los depósitos neuronales de catecolaminas, por acción de la reserpina.

d) se potencian con las concentraciones adecuadas de bloqueantes de la recaptación (DMI y cocaína).

e) se bloquean con dosis elevadas de DMI, substancia que a dichas dosis bloquea la salida de catecolaminas.

f) no se modifican por los bloqueantes muscarínicos - (atropina).

g) no se modifican por antihistamínicos  $H_1$ : antazolina ni antihistamínicos  $H_2$ : cimetidina.

13) El conducto deferente aislado "in vitro" procedente de rata pretratada con 5 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal, 1 hora antes de su sacrificio, no presenta respuesta alguna.

14) Si el conducto deferente aislado "in vitro" procede de rata pretratada con 10 mg/kg de bretilio, por vía intraperitoneal 1, 2, 4 y 8 horas antes de su sacrificio, muestra de forma inmediata unas contracciones similares a las obtenidas en el caso de que el bretilio ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) sea adicionado al baño, contracciones que van aumentando en altura pero no en frecuencia con el transcurso del tiempo.

15) Si la dosis que hemos administrado de bretilio es 20 mg/kg, las contracciones se producen de forma semejante, no habiendo diferencia ni en cuanto a altura ni en cuanto a frecuencia de las contracciones producidas.

De la observación de las gráficas, se tiene la impresión, de que en los plazos más largos, entre inyección y sacrificio del animal (4 y 8 horas), los movimientos tienden a disminuir con el transcurso del tiempo de forma más acentuada en los animales a los que se les administró una dosis inferior (10 mg/kg).

16) No se ha observado una correlación estrecha entre las contracciones obtenidas, y la magnitud de las dosis, ya que prácticamente, en todos los casos analizados las contracciones son más altas y más frecuentes para la dosis de 10 mg/kg, que para la de 20 mg/kg. Sin embargo, cuando la dosis es mínima (5 mg/kg) no se manifiesta acción alguna.

17) Igualmente que "in vitro", el bretilio administrado previamente "in vivo", produce liberación de noradrenalina, pues los resultados obtenidos con los bloqueantes selectivos son idénticos en ambos casos.

18) Se ha de aceptar que las contracciones del conducto deferente de rata, provocadas por el bretilio, están mediadas por receptores alfa postsinápticos (anulación por los antagonistas alfa: fentolamina y fenoxibenzamina), y que no intervienen los receptores beta (ausencia de efecto de los bloqueantes específicos). Son concordantes los resultados "in vivo" e "in vitro".

19) Los inhibidores de la recaptación (DMI y cocaína) aumentan la cantidad de noradrenalina que actúa sobre el receptor, provocando, de esta forma, una potenciación de las contracciones inducidas por el bretilio, tanto adicionado al baño, como administrado previamente al animal antes de su sacrificio.

20) La reserpina inhibe las contracciones, ya sea adicionada al baño, o administrada "in vivo". Esto indica que la noradrenalina neuronal es imprescindible para el efecto del bretilio que estudiamos.

21) El bretilio a las dosis y condiciones experimentales utilizadas por nosotros, no inhibe la acción de la MAO. Por lo tanto, esta no es la explicación de los efectos observados, ni sobre la motilidad del citado órgano, ni sobre la liberación de catecolaminas.

22) El bretilio pues:

a) no altera las vesículas sinápticas.

b) no impide la síntesis de catecolaminas.

c) no impide la metabolización de las catecolaminas intraneuronales, ya que no inhibe la MAO en nuestras condiciones experimentales.

d) bloquea total o parcialmente el disparo de noradrenalina producido por el impulso nervioso.

23) El bretilio se fija a la fracción de membrana obtenida a partir de un homogeneizado de conducto deferente, de una forma muy rápida, ya que el tiempo en que se alcanza el equilibrio es muy corto (2" - 3").

24) Esta fijación es reversible, siendo desplazado el bretilio radiactivo fijado, por bretilio frío.

25) Si la fracción de membrana de conducto deferente, se obtiene de ratas tratadas con 6-OH-dopamina, no se observa fijación específica del bretilio a dicha fracción. Este dato concuerda con las experiencias de Ross (1976) y Ross y Gozstonyi (1975) en las que vieron que el pretratamiento de ratas con 6-OH-dopamina, reduce de forma muy marcada la recaptación de bretilio en el conducto deferente, indicando esto que las terminaciones nerviosas son las responsables de esta recaptación.

26) Una vez el bretilio está fijado a su "locus" de unión, no es desplazado del mismo por adición de adrenalina noradrenalina o anfetamina.

27) Tampoco se logra desplazar al bretilio de su locus, tras la adición de fentolamina, fenoxibenzamina, propranolol, yohimbina, guanetidina y DMI.

28) En el caso de incubar previamente durante 1 hora la fracción de membrana con estas sustancias citadas en el punto anterior, y añadiendo luego el bretilio tritiado, se observa una disminución de la fijación del bretilio, al igual, que en el caso de incubar la fracción de membrana con bretilio y una de estas sustancias simultáneamente. En caso de observar disminución de la fijación, ésta es dependiente de la concentración de bretilio.

29) Estos datos sugieren que hay una estructura, en la sinapsis adrenérgica, que es capaz de fijar el bretilio. Pensamos que esta estructura debe ser importante en el mecanismo de difusión de la noradrenalina a través de la membrana presináptica, pues de esta forma habría una única explicación, tanto para los dos fenómenos demostrados en esta Tesis, como para el anteriormente conocido, a saber:

a) liberación de noradrenalina en el perfusado de gato y efecto simpaticomimético en general, y en especial en el deferente de rata.

b) bloqueo de la difusión al perfusado de la noradrenalina liberada por la reserpina.

c) estimulación alfa-adrenérgica de la motilidad del conducto deferente y

d) bloqueo del efecto de la estimulación del simpático.

En los cuatro casos, está involucrado el paso de la noradrenalina a través de la membrana, en un sentido o en el otro. Sugerimos que el "locus de fijación" del bretilio podría ser el mismo (o espacialmente próximo) al de la fijación de la noradrenalina, y que esta fijación de la noradrenalina, en la membrana, fuera el eslabón intermedio necesario para el paso de la noradrenalina a través de la membrana en cualquiera que fuera la dirección en que lo hiciera.

B I B L I O G R A F I A

ABBS, E.T.

Catecholamine release by xylocholine, bretylium and guanethidine.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 25, 285-290, (1965)

ABBS, E.T.

The release of catecholamines by choline, 2,6,xylyl ether, and guanethidine.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 26, 162-171, (1966)

ABBS, E.T.; PYCOCK, C.J.

The dual effect of bretylium on cardiac stores of noradrenaline in relation to its adrenergic neuron blocking action.

J. Pharmac. Paris 2, 206-207, (1971)

ABBS, E.T.; PYCOCK, C.J.

The effects of bretylium on the subcellular distribution of noradrenaline and on adrenergic nerve function in rat heart

Br. J. Pharmacol. 49, 11-12, (1973)

ABBS, E.T.; ROBERTSON, M.I.

Selective depletion of noradrenaline: a proposed mechanism of the adrenergic neuron blocking action of bretylium.

Br. J. Pharmacol. 38, 776-791, (1970)

ADLER-GRASCHINSKY, F.; LANGER, S.Z.

Possible role of a beta-adrenoceptor in the regulation of noradrenaline release by nerve stimulation through a positive feed-back mechanism.

Br. J. Pharmacol. 53, 43-50, (1975)

ALLEN, J.D.; ZAIDI, S.A.; SHANKS, R.G.; PANTRIDGE, J.F.

The effects of bretylium on experimental cardiac dysrhythmias.

Am. J. Cardiol. 29, 641-649, (1972)

ALLES, G.A.; HEEGARD, E.V.

Substrate specificity of amine oxidase.

J. Biol. Chem. 147, 487-494, (1943)

ANDEN, N.E.; CARLSSON, A.; WALDECK, B.

Reserpine-resistant uptake mechanisms of noradrenaline in ti  
ssues.

Life Sci. 2, 889-894 (1963)

ANDEN, N.E.; HENNING, G.M.

Adrenergic nerve function, noradrenaline level and noradre -  
naline uptake in cat nictitating membrane after reserpine -  
treatment.

Acta Physiol. Scand. 67, 498-504, (1966)

ANDEN, N.E.; LUNBORG, P.

Recovery of the amine uptake-storage mechanism in nerve gra  
nules after reserpine treatment: inhibition by axotomy.

J. Pharm. Pharmac. 22, 233-235, (1970)

ANDEN, N.E.; MAGNUSSON, T.; WALDECK, B.

Correlation between noradrenaline uptake and adrenergic ner  
ve function after reserpine treatment.

Life Sci. 3, 19-25, (1964)

ANGELETTI, P.V.; LEVI-MONTALCINI, R.

Growth inhibition of symapthetic cells by some adrenergic -  
blocking agents.

Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 86-90, (1972)

AXELROD, J.

The metabolism, storage and release of catecholamines.

Recent Progr. Hormone Res. 21, 597-619, (1965)

AXELROD, J.

Dopamine-beta-hydroxylase: Regulation of its synthesis and release from nerve terminals.

Pharmacol. Rev. 24, 233-243, (1972)

AXELROD, J.; WHITBY, L.G.; HERTTING, G.

Effect of psychotropic drugs on the uptake of H<sup>3</sup>-norepinephrine by tissues.

Science 133, 383-384, (1961)

BACANER, M.B.

Quantitative comparison of bretylium with other antifibrillatory drugs.

Am. J. Cardiol. 21, 504-512, (1968)

BACK, I.J.; HASSLER, R.; KIM, J.S.

Differential monoamine depletion by oxipertine in nerve terminals. Granulated synaptic vesicles in relation to depletion of norepinephrine, dopamine and serotonin.

Z. Zellforsch. 101, 448-462, (1969)

BACQ, Z.M.; FISCHER, P.

Nature de la substance sympathicomimétique extraite des nerfs ou des tissus des mammifères.

Arch. Int. Physiol. 55, 73-91 (1947)

BAKER, D.C.

Multiple forms of monoamine oxidase in developing xenopus.

Experientia (Basel) 27, 243-246, (1971)

BALDESSARINI, R.J.

"Release of catecholamines"

Biochemistry of biogenic amines. Handbook of psychopharmacology. vol 3, 37-114, (1975) Plenum Press. New York.

BALDESSARINI, R.J.; KAROBATH, M.

Biochemical physiology of central synapses.

Ann. Re. Physiol. 35, 273-304, (1973)

BARBATO, L.M.; ABOOD, L.G.

Purification and properties of monoamine oxidase.

Biochem. Biophys. Acta. 67, 531-534, (1963)

BARGER, G.; DALE, H. H.

Chemical structure and sympathomimetic action of amines.

J. Physiol (Lond) 41, 19-59, (1950)

BELLEAU, B.

Relationships between agonists, antagonists and receptor sites.

Ciba Foundation Symposium on "Adrenergic mechanisms".

223-245, J.A. Churchill. London (1960)

BERL, S.; PUSZKIN, J.; NICKLAS, W.

Actomyosin-like protein in brain.

Science, 179, 441-446, (1973).

BIGGER, J. T.Jr.; JAFFE, C.C.

The effect of bretylium tosylate on the electrophysiologic properties of ventricular muscle and Purkinje fibres.

Am. J. Cardiol. 27, 82-92, (1971)

BIRMINGHAM, A.T.

Postganglionic denervation of the rat vas deferens.

J. Physiol. 197, 37-38, (1958)

BIRMINGHAM, A.T.; IVERSEN, L.L.

Uptake and metabolism of <sup>3</sup>H-noradrenaline, by normal and by denervated vasa deferentia of guinea-pig and rats.

Br. J. Pharmacol. 35, 356-358, (1969)

BISBY, M.A.; FILLENZ, M.

Isolation of two types of vesicles containing endogenous NA in sympathetic nerve terminals.

J. Physiol (Lond) 210, 49-50, (1970)

BISBY, M.A.; FILLENZ, M.

The storage of endogenous NA in sympathetic nerve terminals.

J. Physiol (Lond) 215, 163-179, (1971)

BISBY, M.A.; FILLENZ, M.; SMITH, A.

Evidence for the presence of dopamine-beta-hydroxylase in both populations of NA storage vesicles in sympathetic nerve terminals of the rat vas deferens.

J. Neurochem. 20, 245-248, (1973)

BLASCHKO, H.

The specific action of l-dopa decarboxylase.

J. Physiol (Lond) 96, 50-51, (1939)

BLASCHKO, H.; WELCH, A.D.

Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla.

Naunyn. Schiemedebergs. Arch. Exp. Pathol Pharmakol 219, 17-22, (1953)

BLASCHKO, H.; FIREMARK, H.; SMITH, A.; WINKLER, H.

Lipids of the adrenal medulla: Lysolecithin, a characteristic constituent of chromaffin granules.

Biochem. J. 104, 545-549, (1967)

BOGDANSKI, D.F.; BRODIE, B.B.

The effects of inorganic ions on the storage and uptake of <sup>3</sup>H-norepinephrine by rat heart slices.

J. Pharmac. Exp. Ther. 165, 181-189, (1969)

BOGDANSKI, D.F.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S.

Distribution of serotonin, 5-hydroxy-tryptophandecarboxylase, amine oxidase in brain.

J. Neurochem. 1, 272-278, (1957)

BOURA, A.L.A.; GREEN, F.

The actions of bretylium: adrenergic neurone blocking and other effects.

Br. J. Pharmacol. 14, 536-548, (1959)

BOURA, A.L.A.; COPP, F.C.; DUNCOMBE, W.G.; GREEN, F.; Mc COUBREY, A.

The selective accumulation of bretylium in sympathetic ganglia and their postganglionic nerves.

Br. J. Pharmacol. 15. 265-270. (1960)

BOURA, A.L.A.; GREEN, F.

Adrenergic neurone blocking agents.

A.Rev. Pharmac. 5, 183-212, (1965)

BRODIE, B.B.; CHANG, C.C.; COSTA, E.

On the mechanism of action of guanethidine and bretylium

Br. J. Pharmacol. Chemother. 25, 171-178. (1965)

BRODY, M.; KADOWITZ, P.J.

Prostaglandins as modulators of the autonomic nervous system.

Fed. Proc. 33, 48-60, (1974)

BROWN, G.L.; GILLESPIE, J.E.

The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat.

J. Physiol. (Lond.) 136, 81-102. (1957)

BURN, J.H.; RAND, M.J.

The action of sympathomimetic amines in animal treated with reserpine.

J. Physiol. 144, 314-336, (1958)

BURN, J.H.; RAND, M.J.

The effect of precursors of noradrenaline on the response to tyramine and sympathetic stimulation.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 15, 47-55, (1960)

BURN, J. H.; WELSCH, F.

The effect of calcium in removing the blocking action of -bretylium and guanethidine.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 31. 74-80. (1967)

CANNON; W. B.; URIDILL, J.E.

Studies on the conditions of activity in endocrine glands  
Some effects on the denervated heart of stimulating the nerves of the liver.

J. Physiol. 58, 353-354, (1921)

CARAMIA, F.; ANGELETTI, R.; LEVI-MONTALCINI, A.; CARRETELLI.

Mitochondrial lesions of developing sympathetic neurons induced by bretylium tosylate.

Brain Research 40, 237-250, (1972)

CARLSSON, A.

The occurrence, distribution, and physiological role of catecholamines in the nervous system.

Pharmac. Rev. 11, 233-566, (1959)

CARLSSON, A.

Pharmacological depletion of catecholamine stores.

Pharmac. Rev. 18, 541-549, (1966)

CARLSSON, A.; ROSEN-GREN, E.; BERTLER, A.; NILSSON, J.  
The effect of reserpine on the metabolism of catecholamines  
in:

Psychotropic Drugs. Edited by S. Garattini and V. Ghetti  
pág. 363-372, Elsevier Publ. Co. Amsterdam (1957)

COUPLAND, R.F.

Electron microscopic observations on the structures of the  
rat adrenal medulla.

J. Anat. 99, 231-254, (1965)

CROUT, J.R.; MUSKUS, A.J.; TRENDELENBURG, V.

Effect of tyramine on isolated guinea-pig atria in relation  
of their noradrenaline stores.

Br. J. Pharmacol. 18, 600-611, (1962)

CHALAZONITIS, N.

Differentiation of membranes in axonal endings in the neuro  
pil of Hélix.

"Cellular dynamics of the neuron". Academic Press, New York  
(1969)

CHANG, C.C.

A sensitive method for spectrophotofluorimetric assay of  
catecholamines.

Int. J. Neuropharmac. 3, 643-649, (1964)

CHANG, C.C.; CHEN, T.F.; CHENG, H.C.

On the mechanism of neuromuscular blocking action of brety-  
lium and guanethidine.

J. Pharmac. Exp. Ther. 158, 89-98, (1967)

CUENCA, E.; VALDECASAS, F.G.; RODRIGUEZ, L.

Modificación por DMI de la acción estimulante de A y NA so-  
bre el conducto deferente de rata y cobaya.

Actas IX Reunión Nad. Soc. Esp. Ciencias Fisiológicas. Pam-  
plona pág (159-162) (1965)

CUENCA, E.; RIVERA, P.; RODRIGUEZ, L.; VALDECASAS, F.G.  
Estudio comparativo entre la imipramina y la desmetylimipramina "in vitro". Influencia sobre la respuesta que determinan la A y la NA en el conducto deferente aislado de rata. Actas X Reunión Nac. Soc. Esp. Ciencias Fisiológicas. Valencia pág. (127-131) (1967)

DAHLOF, C.; ABLAD, D.; BORGK, O.; WALDECK, B.  
Chemical tools in catecholamine research  
II, 201-210, (1975)  
Ed. Almgreen, O.; Carlsson, A.; Engel, J. Amsterdam North Holland Publishing, Co.

D'ANZI, F.A.  
Morphological and biochemical observations on the catecholamine-storing vesicles of rat adrenomedullary cells during insulin-induced hypoglycemia.  
Am. J. Anat. 125, 381-398, (1969)

DAVIES, B.; HORTON, E.; WITHRINGTON, P.  
The occurrence of prostaglandins E<sub>2</sub> in splenic venous blood of the dog following splenic nerve stimulation.  
Br. J. Pharmacol. Chemother. 32, 127-135, (1968)

DAY, M.D.  
Effect of sympathomimetic amines on the blocking action of guanethidine, bretylium and xylocholine.  
Br. J. Pharmacol. 18, 421-439, (1962)

DAY, M.D.; RAND, M.  
Evidence for a competitive antagonism of guanethidine by -dexamphetamine.  
Br. J. Pharmacol. 20, 17-28, (1963)

DENGLER, H.J.; SPIEGEL, H.E.; TITUS, E.D.

Uptake of tritium-labeled norepinephrine in brain and other tissues of the cat in vitro.

Science. 133, 1072-1073, (1961)

DETH, R.; VAN BREEMAN, C.

Relative contribution of  $Ca^{++}$  influx and cellular  $Ca^{++}$  release during drug induced activation of the rabbit aorta.

Pflugers Arch. 348, 13-19, (1974)

DE CHAMPLAIN,; MULLER, R.A.; AXELROD, J.

Subcellular localization of monoamine oxidase in rat tissues

J. Pharmacol. Exp. Ther. 166, 339-345, (1969)

DE GANDARIAS, J.M.

Bioquimica

2°Ed. Imp. Americana. Valladolid. Salamanca (1964)

DE POTTER, W.; CHUBB, I.; DE SCHAEFDRYVER, A.

Pharmacological aspects of peripheral noradrenergic transmission.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther (Suppl.) 196, 258-285, (1972)

DE ROBERTIS, E.; VAS FERREIRA.

Electron microscope study of the excretion of catechol-containing droplets in the adrenal medulla.

Exp. Cell. Res. 12, 568-574, (1957)

DE ROBERTIS, E.

Histophysiology of synapses and neurosecretion.

Pergamon Press. New York. (1964)

DINEK, O.

L'expulsion des granules de la medullosurrénale chez le hamster.

Comp. Rend. Acad. Sci. Paris. 265, 616-619, (1967)

DOUGLAS, W.W.

Stimulus-secretion coupling: The concept and lines from chromaffin and other cells.

The First Gaddum Memorial Lecture.

Br. J. Pharmacol. 34, 451-474, (1968)

DOWLING, J.E.

Synaptic organization of the frog retina: and electron microscopic analysis comparing the retinas of frogs and primates.

Proc. Roy. Soc. Ser. B. 170, 205-228, (1968)

DOWLING, J.E.; BOYCOTT, B.B.

Organization of the primate retina electron microscopy.

Proc. Roy. Soc. Ser. B. 166, 80-111, (1966)

ECCLES, J.C.

The physiology of synapses.

Springer Verlag. New York, (1964)

ECCLES, J.C.

The understanding of the brain.

Mc. Garw-Hill Book-Co. New York, (1973)

EISENFELD, A.J.; AXELROD, J.; KRAKOFT, L.

Inhibition of the extraneuronal accumulation and metabolism of norepinephrine by adrenergic blocking agents.

J. Pharma. Exp. Ther. 156, 107-113, (1967)

ELLIOT, T.R.

The action of adrenaline.

J. Physiol. 32, 401-467, (1905)

ENERO, M.; LANGER, J.; ROTHLIN, R.; STEFANO, F.

Role of alfa-adrenoceptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation.

Br. J. Pharmacol. 44, 672-688, (1972)

EULER VON, U.S.

The presence of a substance with sympathin-E properties in spleen extracts.

Acta Physiol. Scand. 11, 168-186, (1946, a)

EULER VON, U.S.

The presence of a sympathomimetic substance in extracts of mamalian heart.

J. Physiol. 105, 38-44, (1946,b)

EULER VON, U.S.

A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relation to adrenaline and noradrenaline

Acta Physiol. Scand. 12, 73-97, (1946, c)

EULER VON, U.S.

Identification of the sympathomimetic in adrenergic nerves of cattle (sympathin-N) with levo-noradrenaline.

Acta Physiol. Scand. 16, 63-74, (1948)

EULER VON, U.S.

Noradrenaline (arterenol) adrenal medullary hormone and chemical transmitter of adrenergic nerves.

Ergebn. Physiol. 46, 261-307, (1950)

EULER VON, U.S.

Release and uptake of noradrenaline in adrenergic nerve granules.

Acta Physiol. Scand. 67, 430-440, (1966)

EULER VON, U.S.

Effect of some metabolic factors and drugs on uptake and release of catecholamines in vitro and in vivo.

"New aspects of storage and release mechanisms of catecholamines" 144-158, Ed. H. J. Schuman y Gr. Kronberg. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg (1970)

EULER VON, U.S.

Adrenergic neurotransmitters functions.

Science, 173, 202-206, (1972)

EULER VON, U. S.; HILLARP, N.A.

Evidence for the presence of NA in submicroscopic structures of adrenergic axons.

Nature 177, 44-45, (1956)

EULER VON, U.S.; LISHAJKO, F.

Dopamine in mammalian lung and spleen.

Acta Physiol. Pharmac. Neerl. 6, 295-303, (1957)

EULER VON, U.S.; LISHAJKO, F.

Effect of adenine nucleotids on catecholamine release and uptake in isolated adrenergic nerve granules.

Acta Physiol. Scand. 59, 454-461, (1963)

EULER VON, U.S., LISHAJKO, F.

Effects of some metabolic co-factors and inhibitors on transmitter release and uptake in isolated adrenergic nerve granules.

Acta Physiol. Scand. 77, 298-307, (1969)

FALCK, B.

Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamine by a fluorescence method.

Acta Physiol. Scand. 56, Suppl. 197, 1-25, (1962)

FARNEBO, L.O.; HAMBERGER, B.

Drug-induced changes in the release of ( $^3\text{H}$ -NA) from field-stimulated rat iris.

Br. J. Pharmacol. 43, 97-106, (1971, a )

FARRELL, K.E.

Fine structure of nerve fibres in smooth muscle of the vas deferens in normal and reserpinized rats.

Nature, 217, 279-281, (1968)

FILLENZ, M.

Fine structure of noradrenaline storage vesicles in nerve terminals of the rat vas deferens.

Phil. Tans. Roy. Soc. Lond. Ser. 261, 319-323, (1971)

FILLENZ, M.; HOWE, P.R.

The contribution of small and large vesicles to NA release.

J. Physiol (Lond). 212, 42-43, (1971)

FISCHER, J.; WEISE, V.; KOPIN, I.

Interactions of bretylium and acetylcholine at sympathetic nerve endings.

J. Pharmac. Exp. Ther. 153, 523-529, (1966)

FURCHGOTT, R.F.

Restoration of response to tyramine in reserpinized atria pretrated with norepinephrine: Influence of MAO inhibitors and bretylium.

Pharmacologist, 6, 205-209, (1964)

FURCHGOTT, R. F.; SANCHEZ-GARCIA, P.; ARUN, R.; WAKADE; CERVONI, P.

Interactions of bretylium and other drugs on guinea-pig atria evidence for inhibition of neuronal monoamine oxidase, by bretylium.

J. Pharmac. Exp. Ther. 179, 171-185, (1971)

GADDUM, S.H.; GOODWIN, L.G.

Experiments on liver symapthin.

J. Physiol. 105, 357-369, (1947)

GARCIA, A.G.; SANCHEZ-GARCIA, P.

Influence of cocaine and sodium on bretylium uptake by reserpine treated guinea-pig left atrium.

Br. J. Pharmacol. 53, 247-255, (1975)

GEFFEN, L.B.; LIVETT, B.G.; RUSH, R. A.

Immunohistochemical localization of protein components of catecholamine storage vesicles.

J. Physiol (Lond). 204, 593-608, (1969)

GEFFEN, L.B.; LIVETT, B.G.; RUSH, R.A.

Immunohistological localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve impulses  
Bayer Symposium. New aspects, of storage and release mechanisms of catecholamines (H. Schumann y G. Kroneberg, eds) pág. 58-72, Springer Verlag, Berlin (1970)

GEFFEN, L.B.; LIVETT, B.G.

Synaptic vesicles in sympathetic neurons.

Physiol. Rev. 51, 98-157, (1971)

GEWIRTZ, G.P.; KOPIN, I.J.

Effect of intermittent nerve stimulation on norepinephrine synthesis and mobilization in the perfused cat spleen.

J. Pharma. Exp. Ther. 175, 514-520, (1970, b)

GILMORE, J.P.; SPIEGEL, J.H.

Mechanism of the myocardial effects of bretylium.

Circulation Res. 10, 347-353, (1962)

GILLIS, C. N.; PATON, D.M.

Cation dependence of sympathetic transmitter-retention by slices of rat ventricle.

Br. J. Pharmacol. 29, 309-318, (1967)

GLYNN, I.M.

The action of cardiac glycosides on ion movement.

Pharmacol. Rev. 16, 3811-3820 (1964)

GOKHALE, S.D.; GULATI, O.D.; KELKAR, V.V.; JOSHI.

Effect of bretylium and guanethidine on some cholinergic effectors.

Arch. Int. Pharmacodyn. 145, 243-253, (1963)

GOMES, B.; IGAUE, I.; KLOEPFER, H.G.; YASUNOBU, K.T.

Amine oxidase XIV. Isolation and characterization of the - multiple beef amine oxidase components.

Archs. Biochem. Biophys. 132, 16-27, (1969,a)

GOMES, B.; NAGUWA, G.; KLOEPFER, H.G.; YASUNOBU, K.T.

Amine oxidase XV. The sulfhydryl groups of beef liver mitochondrial amine oxidase.

Arch. Biochem. Biophys. 132, 28-33, (1969, b)

GORKIN, V.Z.

Monoamine oxidase.

Pharmacol. Rev. 18, 115-120 (1966)

GORKIN, V.Z.; ROMANOVA, L.A.

Some properties of the mitochondrial monoamine oxidase of rat liver and brain.

Biochimica 24, 826-832, (1959)

GORMAN, A.L.F.; MARMOR, M.F.

Long-term effect of ouabain and sodium pump inhibition on a neuronal membran.

J. Physiol 242, 49-54, (1974)

GRAFSTEIN, B.; MC, EWEN; SHELANSKI, M.L.  
Axonal transport of neurotubule protein.  
Nature 227, 289-290, (1970)

GRAY, E.G.  
Axo-somatic and axodendritic synapses of the cerebral cortex  
an electron microscope study.  
J. Anat. (Lond). 93, 420-433, (1959)

GRAY, E.G.  
The question of relationship between Golgi vesicles and synaptic vesicles in octopus neurons.  
J. Cell. Sci. 7, 189-201, (1970)

GRAY, E.G.; GUILLERY, R.W.  
Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system.  
Int. Rev. Cytol. 19, 111-182, (1966)

GREEN, A.G.; HUGHES, K.  
Effects of adrenergic neurone blocking agents on voluntary muscle stimulated at different frequencies.  
Br. J. Pharma. Chemother. 27, 164-176, (1966)

GRILLO, M.A.  
Extracellular synaptic vesicles in the mouse heart.  
J. Cell. Bio. 47, 547-553, (1970)

GROSSMAN, A.; FURCHGOTT, R.F.  
The effects of various drugs on calcium exchange in the isolated guinea-pig auricle.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 145, 162-168, (1964)

GRYNSZPAN-WINOGRAD, O.  
Morphological aspects of exocytosis in the adrenal medulla.  
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. 261, 291-292, (1971)

HAEFELY, W.

Electrophysiology of the adrenergic neurone  
Catecholamines (H. Blaschko y E. Muscholl, eds) pág. 661-675  
Vol. 33 of Handbook of Experimental Pharmacology. Springer  
Berlin (1972)

HAEUSLER, G.; HAEFELY, W.; HUERLIMANN, A.

On the mechanism of the adrenergic nerve blocking action of  
bretylum.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmakol 265, 260-277, (1969)

HAGGENDAL, J.; LINDQVIST, M.

Disclosure of labile monoamine fractions in brain and their  
correlation to behaviour.

Acta Physiol. Scand. 60, 351-357, (1964)

HALL, D.W.; LOGAN, B.W.

Further studies on the inhibition of monoamine oxidase by  
MB 9302 (clorgyline). II. Comparison of MB 9302 inhibition  
with that of iproniazid.

Biochem. Pharmacol. 18, 1955-1959, (1969)

HAMA, K.

Some observations on the fine structure of the lateral line  
organ of the Japanese sea lampbrush *Lycoteuthis inusitata*.

J. Cell. Biol. 24, 193-210, (1965)

HAMLIN, L.M.

The fine structure of the mossy fiber endings in the hippo-  
campus of the rabbit.

J. Anat. (Lond) 96, 112-120, (1962)

HEDQVIST, P.

Studies on the effect of prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> on the -  
sympathetic neuromuscular transmission in some animal tissues

Acta. Physiol. Scand. Suppl. 345, 1-40. (1970)

HEDQVIST, P.

Prostaglandin as a tool for local control of transmitter re-  
lease from sympathetic nerves.

Brain. Res. 62, 483-488, (1973)

HERTTING, G.

Effects of drugs and sympathetic denervation on noradrenali-  
ne uptake and binding in animal tissues.

Pharmacology of cholinergic and adrenergic transmission

Ed. Douglas W.W. & Carlsson, A. pág 277-278, Oxford Per-  
gamon Press. (1965)

HERTTING, G.; AXELROD, J.; PATRICK, R.W.

Actions of bretylium and guanethidine on the uptake and re-  
lease of  $^3\text{H}$ -NA.

Br. J. Pharmacol. 18, 161-166, (1962)

HERTTING, G.; AXELROD, J.; WHITBY, L.G.

Effect of drugs on the uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -NA.

J. Pharmac. Exp. Ther. 134, 146-153, (1961)

HILLARP, N.A.; FUXE, K.; DAHLSTROM, A.

Demonstration and mapping of central neurons containing dopami-  
ne, NA and 5-hydroxytryptamine and their reactions to psycho-  
pharmacology.

Pharmac. Rev. 18, 727-741 (1966)

HILLARP, N.A.; LAGERSTEDT, S.; NILSON, B.

The isolation of a granular fraction from the suprarenal me-  
dulla, containing the sympathomimetic catecholamines.

Acta. Physiol. Scand. 29, 251-263, (1953)

HIRSCH, J.G.

Cinemicrophotographic observations on granule lysis in poly-  
morphonuclear leucocytes during phagocytosis.

J. Exp. Med. 116, 827-834, (1962)

HÖKFELT, T.

On the ultrastructural localization of NA in the C.N.S.  
Z. Zellforsch. 79, 110-117, (1967)

HÖKFELT, T.

Distribution of noradrenaline storing particles in peripheral adrenergic neurons as revealed by electron microscopy.  
Acta Physiol. Scand. 76, 427-440, (1969)

HOLTZ, P.; CREDNER, K.; KRONEBERG, G.

Über das sympathicomimetische pressorische Prinzip des Harns (Urosympathin).

Arch. Exp. Phat. Pharmak. 204, 228-243 (1947)

HOLZBAUER, M.; VOGT, M.

Depression by reserpine of the noradrenaline concentration in hypothalamus of the cat.

J. Neurochem. 1, 8-11, (1956)

HPFNER, L.; CAULET, T.; ADNET, J.

Etude ultrastructurale du neurone sympathique de l'homme age. Activité phosphataseque acides des pigments, anomalies mitochondriales á presence de corps lamellaires.

Virchows. Arch. Abt. B. Zellpath. 5, 326-335, (1970)

HORITA, A.; MC. GRATH, W.R.

Specific liver and brain monoamine oxidase inhibition by alkylhydrazines and arylalkylhydrazines.

Proc. Soc. Exp. Biol. 103, 753-757, (1960)

HORNYKIEWICZ, O.

Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function.

Pharmac. Rev. 18, 925-964, (1966)

HORST, W.D.; KOPIN, I.J.; RAMEY, E.R.

Influence of sodium and calcium on NA uptake by isolated perfused rat heart.

Am. J. Physiol. 215, 817-822, (1968)

HOSOTANI, T.; MISU, Y.

Sodium sensitive active transport of bretylium into adrenergic neurons for the development of blockade in rabbit.  
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 226, 235-245, (1977)

HOWELL, I.J. & LUCY, J.A.

Cell fusion induced by lysolycitihin.  
Febs. Letters, 4, 147-150, (1969)

HUBBARD, J.I.; WILLIS, W.D.

Mobilization of transmitter by hyperpolarization.  
Nature, 193, 174-175, (1962)

HIDGINS, P.M.; WEISS, G.B.

Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by NA, histamine and potassium.  
J. Pharmac. Exp. Ther. 159, 91-98, (1968)

HUKÖVIC, J.; MUSCHOLL, E.

Die noradrenalin-Abgabe aus dem isolierten Kaninchenherzen bei sympathischer Nervenreizung und three pharmacologische Beeinflussung.  
Naunyn Schiemedeborgs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 244, 81-96, (1962)

IVERSEN, L. L.

The inhibition of noradrenaline uptake by drugs.  
Adv. Drug. Res. 2, 5-23, (1965)

IVERSEN, L.L.; KRAVITZ, E.A.

Sodium dependence of transmitter uptake ad adrenergic nerve terminals.  
Molec. Pharmacol. 2, 360-362, (1966)

IVERSEN, L.L.; LANGER, S.Z.

Effect of phenoxybenzamine on the uptake and metabolism of NA in the rat heart and vas deferens.

Br. J. Pharmacol. 37, 627-637, (1969)

JAANUS, J.D.; RUBIN, R.P.

Analysis of the role of cyclic adenosine, 3'-5'-monophosphate in catecholamine release.

J. Physiol. 237, 465-476, (1974)

JANE, F.

El conducto deferente como reactivo farmacológico.

Tesis Doctoral. Barcelona 1970

JANE, F.; PLANAS, M.E.; BONACCORSI, A.

The action of desipramine on noradrenaline depletion by reserpine in the vas deferens of the rat "in vivo".

J. Pharmac. Pharmac. 22, 381-383, (1970)

JANE, F.; PLANAS, M.E.; CUENCA, E.; VALDECASAS, F.G.

Influence of amphetamine on the NA depleting effect of reserpine in the rat.

VII Reunion Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum. Praga (1970)

JARRO, T.B.

Occurrence and properties of monoamine oxidase in adrenergic neurons.

J. Neurochem. 18, 7-16, (1971)

JOHNSTON, J.P.

Some observations upon a new inhibition of monoamine oxidase in brain tissue.

Biochem. Pharmacol. 17, 1285-1297, (1968)

JORDAN, S.W.; PHILLIP, N.D.; AHLQVIST, J.

Early ultrastructural effects of ionising radiation.

I. Mitochondrial and nuclear changes. *Lab. Invest.* 27 (b)  
538-541 (1972)

JUUL, P.

Effects of various antihypertensive guanidine derivatives on the adult rat superior cervical ganglion: histology, ultrastructures, and cholinesterase histochemistry.

*Acta Pharmacol. Toxicol.* 32, 500-510, (1973)

KASUYA, Y.; GOTO, K.; HASHIMOTO, H.; WATANABE, H.; MUNAKATA  
WATANABE, M.

Nonspecific denervation supersensitivity in the rat vas deferens "in vitro".

*European J. Pharmacol.* 8, 177-184, (1969)

KIM, H.C.; D'IORIO, A.

Possible isoenzymes of monoamine oxidase in rat tissues.

*Can. J. Biochem.* 46, 295-297, (1968)

KIRPEKAR, S.M.; FURCHGOTT, R.F.

The sympathomimetic action of bretylium on isolated atria and aortic smooth muscle.

*J. Pharmac. Exp. Ther.* 143, 64-76, (1964)

KIRPEKAR, S.M.; FURCHGOTT, R.F.; WAKADE, A.K.; PRAT, J.C.

Inhibition by sympathomimetic amines of the release of NA evoked by nerve stimulation in the cat spleen.

*J. Pharmac. Exp. Ther.* 187, 529-538, (1973)

KIRPEKAR, S.M.; MISU, Y.

Release of NA by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium.

*J. Physiol (Lond)* 188, 219-235, (1967)

KIRPEKAR, S.M.; PUIG, M.

Effect of flow-stop on NA release from normal spleens treated with cocaine, phentolamine or phenoxybenzamine.

Br. J. Pharmacol. 43, 359-369, (1971)

KIRPEKAR, S.M.; WAKADE, A.R.

Factors influencing NA uptake by the perfused spleen of the cat.

J. Physiol. (Lond) 194, 609-626, (1968, b)

KIRPEKAR, S.M.; YAMAMOTO, H.

Release of NA and dopamine by nerve stimulation in the cat spleen perfused with <sup>3</sup>H-dopamine.

Br. J. Pharmacol. 43, 86-96, (1971)

KNIFFEN, F.J.; LOMAS, T.E.; COUNSELL, R.E.; LUCCHESI, B.R.

The antiarrhythmic and antifibrillatory actions of bretylium and its o-iodobenzyl trimethylammonium analog. UM-360.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 192, 120-128, (1975)

KOPIN, I.J.; BREESE, G.R.; KRAUSS, K.R.; WEISSE, U.K.

Selective release of newly synthesised NA from the cat spleen during sympathetic nerve stimulation.

J. Pharmac. Exp. Ther. 161, 271-278, (1968)

KOPIN, I. J.; GORDON, E.K.

Metabolism of NA-H<sup>3</sup> released by tyramine and reserpine.

J. Pharmac. Exp. Ther. 138, 351-359, (1962)

KRAJL, M.

A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase

Biochem. Pharmacol. 14, 1684-1686, (1965)

KUNTZMAN, R.; JACOBSON, M.

Monoamine oxidase inhibition by a series of compounds structurally related to bretylium and guanethidine.

J. Pharma. Exp. Ther. 141, 166-172, (1963)

KUNTZMAN, R.; TSAI, I.; CHANG, R.; CONNEY, A.; TUCKAHOE, N.  
Disposition of bretylium in man and rat. A sensitive chemical method for its estimation in plasma and urine.  
Clinical Pharmac. and Ther. 11, 829-836, (1970)

LACY, P.E.

The pancreatic beta cell.

N. Engl. J. Med. 276, 187-195, (1967)

LAGERCRANTZ, H.

Isolation and characterization of sympathetic nerve trunk vesicles.

Acta Physiol. Scand. Suppl. 366 1-44, (1971)

LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; MC AULIFF, J.P.; LUDUENA, F.P.;  
BROWN, R.G. Jr.

Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines.

Natures (Lond) 214, 597-598, (1967)

LANGER, S.Z.

The role of alfa and beta-presynaptic receptors in the regulation of NA release elicited by nerve stimulation.

Clin. Sci. Mol. Med. 51, 423-426, (1976)

LANGER, S.Z.

Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release.

Br. J. Pharmacol. 60, 481-497, (1977)

LANGER, S.Z.; ADLER-GRASCHINSKY, F.; ENERO, M.A.

Positive feed-back mechanism for the regulation of NA released by nerve stimulation.

XXVith Int. Congress of Physiological Sciences. Jerusalem (1974)

LANGER, S.Z.; ENERO, M.A.; ADLER-GRASCHINSKY, F.; STEFANO, F.  
The role of the alfa-receptor in the regulations of transmi  
tter overflow elicited by stimulation.

Vth Int. Congress Pharmacology. San Francisco (1972)

LANGLEY, J.N.

Observations on the physiological action of extracts of the  
suprarrenal bodies.

J. Physiol (Lond) 27, 237-256, (1901)

LARRAMENDI, L.M.

Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of the mouse.

"Neurobiology of cerebellar evolution and development"

pág. 803-844, Ed. R. Linás. Am. Med. Ass. Chicago, (1969)

LEVY, J.

Amine-oxidases

Thérapie, 25, 1003-1036, (1968)

LEWANDOWSKY, M.

Ueber eine Wirkung des Nebennieren extractes auf das Auge.

Zent. Bl. Physiol. 12, 599-600, (1898)

LINDMAR, R.; MUSCHOLL, E.

Die Wirkung von Pharmaka and die der Perfusionsflussigkeit  
und die Noradrenaline-Aufnahme in das isoliertz Herz.

Arch. Exp. Pathol. Pharmak. 247, 469-492, (1964)

LOEWI, O.

Ober humorale hebertragbarkeit der Herznervenwirkung.

Arch. ges. Physiol. 189, 239-242, (1921)

LOVENBERG, W.; LEVINE, R.J.; SJOERDSMA, A.

A sensitive assay of monoamine oxidase activity "in vitro"

Aplication to heart and sympathetic ganglia.

J. Pharmac. Exp. Ther. 135, 7-10, (1962)

MAITRE, L.; STAEHELIN, M.

Enhancement of  $H^3$ -NA accumulation in rat vas deferens by cocaine, imipramine and desmethylinipramine.

Experientia, 24, 671-672, (1968)

MALMFORMS, T.

Studies on adrenergic nerves.

Acta Physiol. Scand. 64 Suppl. 248, 1-93, (1965)

MALMQUIST, J.; OATES, J.A.

Effects of adrenergic neuron-blocking guanidine derivatives on mitochondrial metabolism.

Biochem. Pharmacol. 17, 1845-1850, (1968)

MANN, M.; WEST, G.B.

The nature of hepatic androsplenic sympathin.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 5, 173-177, (1950)

MANN, M.; WEST, G.B.

The nature of uterine and intestinal sympathin.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 6, 79-82, (1951)

MARLEY, E.; STEPHENSON, J.D.

Central actions of catecholamines.

Catecholamines (Blaschko, H, and Muscholl, E. eds)

Handbook expl Pharmac vols 33, pág 186-230. Springer Verlag Berlin. (1972)

MILHAUD, M.; PAPPAS, G.D.

The fine structure of neurons and synapses of the habenula of the cat with special reference to sub-junctional bodies

Brain. Res. 3, 158-173, (1966)

MILHAUD, M.; PAPPAS, G.D.

Post-synaptic bodies in the habenula and interpeduncular nuclei of the cat.

J. Cell. Biol. 30, 437-442, (1966)

MOLINOFF, P.B.; AXELROD, J.

Biochemistry of catecholamines.

Ann. Rev. Biochem. 465-500, (1971)

MURDOCH, S.D.; EVANS, B.K. HEATH, J.W.

Effects of chronic bretylium treatment on the sympathetic neuron and the smooth muscle of the rat.

Eur. J. Pharmacol. 43, 225-235, (1977)

MUSCHOLL, E.

Die Hemmung der Noradrenaline-Aufnahme des Herzens durch Reserpin und die Wirkung von Tyramine.

Arch. Exp. Path. Pharmacol. 240, 234-241, (1960)

NAGATSU, T.; NAKANO, G.; MIZUTANI, K.; HARADA, M.

Purification and properties of amine oxidases in brain and connective tissue (dental pup).

Ad. Biochem. Psychopharmacol. 5, 25-34, (1972)

NAMM, D.H.; WANG, C.M.; EL SAYAD, S.

Effects of bretylium on rat cardiac muscle. The electrophysiological effects and its uptake and binding in normal and immunosympathectomized rat hearts.

J. Pharmac. Exp. Ther. 193, 194-208, (1975)

NEEF, N.H.; GORIDIS, C.

Neuronal monoamine oxidase: specific enzyme types and their rates of formation.

Adv. Biochem. Psychopharmacol. 5, 307-323, (1972)

NICKLAS, W.; PUSZKIN, S.; BERL, S.

Effect of vinblastine and colchicine on uptake and release of putative neurotransmitters by synaptosomes and on brain actomyosin-like protein.

J. Neurochem. 20, 109-121, (1973)

NORBERG, K.A.

Transmitter histochemistry of the sympathetic adrenergic nervous system.

Brain Res. 5, 125-170, (1967)

OTSCHOORN, A.S.; VOGT, M.

The nature of cardiac sympathin in the dog.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 7, 319-324, (1952)

OWMAN, CH.; SJOSTRAND, D.O.

Short adrenergic neurons and catecholamine-containing cells in vas deferens and accessory male genital glands of different mammals.

Z. Zellforsch. 66, 300-320 (1965)

PALAY, S.L.; PALADE, G.E.

The fine structure of neurons.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 69-88, (1955)

PAPP, J.G.; VAUGHAN WILLIAMS, E.M.

The effect of bretylium on intracellular cardiac action potentials in relation to its antiarrhythmic and local anesthetic activity.

Br. J. Pharmacol. 37, 380-390, (1969)

PAPPAS, G.D.; PURPURA, D.P.

Structure and function of synapses.

Raven Press. New York. (1972)

PEART, W.S.

The nature of splenic sympathin.

J. Physiol. 108, 491-501, (1949)

PETERS, A.; VAUGHN, J.E.

Microtubules and filaments in axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves.

J. Cell. Biol. 32, 113-119, (1967)

PLANAS, M.E.

Interacciones farmacológicas a nivel presináptico.

Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. (1972)

PLANAS, M.E.; GASCON, P.; VALDECASAS, F.G.

Interacció reserpina-simpaticomimetics en la melsa de gat "in situ".

Annals de Medicina vol. LXIII n°9, 1457-1464, (1977)

POTTER, L.T.

Storage of NA in sympathetic nerves.

Pharmacol. Rev. 18, 439-451, (1966)

POTTER, L.T.

Role of intraneuronal vesicles in the synthesis, storage, and release of NA.

Circ. Res. 21, 13-24 (Suppl. 3) (1967)

POTTER, L.T.; AXELROD, J.

Subcellular localization of catecholamines in tissues of the rat.

J. Pharmac. Exp. Ther. 142, 291-298, (1963)

POTTER, L.T.; AXELROD, J.

Properties of NA storage particles of the rat heart.

J. Pharmac. Exp. Ther. 142, 299-305, (1963)

PYCOCK, C.J.

Some effects of bretylium on adrenergic nerve function in rat heart.

Ph. D. Thesis. Council for National Academic Awards (1972)

RAJAN, K.; DAVIS, J.; COLBURN, R.

Metal chelates in the storage and transport of neurotransmitters: interactions of  $\text{Cu}^{++}$  with ATP and biogenic amines.

J. Neurochem. 22, 137-147, (1974)

RAMWELL, P.W.; SHAW, J.E.

Spontaneous and evoked release of prostaglandins from cerebral cortex of anaesthetized rats.

Am. J. Physiol. 211, 124-134, (1966)

RAND, M.J.; MC CULLOCH, M.W.; STORY, D.F.

Central action of drugs in blood pressure regulation.

Ed. Davies D.S. & Reid J.L. pág. 94-132. London Pitman Medical (1975)

RICHARDSON, K.C.

The fine structure of autonomic nerve endings in smooth muscle of the rat vas deferens.

J. Anat. 96, 427-442 (1962)

RICHARDSON, K.C.

The fine structure of the albino rabbit iris with special reference to the identification of adrenergic and cholinergic and nerve endings in its intrinsic muscles.

Am. J. Anat. 114, 173-206, (1964)

ROBINSON, D.S.; LOVENBERG, W.; KEISER, H.; SJOERDSMA, A.

Effects of drugs on human blood platelet and plasma amine oxidase activity "in vitro" and "in vivo".

Biochem. Pharmacol. 17, 109-119 (1968)

ROSENBLUTH, J.

Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane.

J. Cell. Biol. 13, 405-422, (1962)

ROSS, S.B.

Structural requirements for uptake into catecholamines neurons.

"The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines". Ed. D.M. Paton pág. 67-93, Raven Press New York, (1976)

ROSS, S.B.; GOSZTONYI, T.

On the mechanism of the accumulation of sup <sup>3</sup>H-bretylium in peripheral sympathetic nerves.

Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol. 288, 283-293, (1975)

ROSS, S.B.; KELDER, D.

Effect of veratridine on the fluxes of sup <sup>3</sup>H-NA and sup <sup>3</sup>H-bretylium in the rat vas deferens in vitro.

Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol. 295, 183-189, (1976)

ROSS, S.B.; KELDER, D.

Active transport of sup <sup>3</sup>H-bretylium in the rat vas deferens "in vitro".

Acta Physiol. Scand. 97, 209-221, (1976)

ROTH, R.H.; STJARNE, L.; BLOOM, R.E.; GIARMAN, N.J.

Light and heavy norepinephrine storage particles in the rat heart and in bovine splenic nerve.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 162, 203-212, (1968)

ROTHBALLER, A.B.

The effects of catecholamines on the central nervous system

Pharmac. Rev. 11, 494-457, (1959)

SACHS, H.

Neurosecretion.

Handbook of neurochemistry, vol. IV pág. 373-428 (A. Lajtha. Ed). Plenum Press. New York, (1970)

SALMOIRAGHI, G.C.

Central adrenergic synapses.

Pharmac. Rev. 18, 717-726, (1966)

SATAKE, K.; SAKIUNO.; KOSOKAZU.

4, 39, 1955: cited by Okumoro

J. Bull. Osaka. Med. Sch. 6, 58-64, (1960)

SHELLEMBERGER, M.K.; GORDON, J.H.

A rapid simplified procedure for simultaneous assay of NA, Dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas  
Analyt. Biochem. 39, 356-372, (1971)

SCHMITT, F.J.

Fibrous proteins and neuronal dynamics.

"Cellular dynamics of the neuron"

Academic Pres. New York pág. 95-114, (1969)

SCHMITERLOW, C.E.

The nature and occurrence of pressor and depressor substances in extracts from blood vessels.

Acta Physiol. Scand. 16, Suppl. 56 (1948)

SCHNAITMAN, G.; ERWIN, V.G.; GREENWALT, J.W.

Submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria.

J. Cell. Biol. 32, 719-735, (1967)

SCHÜMANN, H.; STARKE, K.; WERNER, J.

Interactions of inhibitors of noradrenaline uptake and angiotensine on the sympathetic nerves of the isolated rabbit heart.

Br. J. Pharmacol. 39, 390-397, (1970)

SCHÜMANN, H.

Effect of angiotensin on noradrenaline release of the isolated rabbit heart.

Bayer Symposium II: New aspects of storage and release mechanisms of catecholamines (H. Schumann and G. Kroneberg, eds.) pág. 202-209. Springer. Berlín. (1970)

SHEA, S.M.; KARNOWSKY, M.H.; BOSSERT, W.H.

Vesicular transport across endothelium: simulation of a diffusion model.

J. Theoret. Biol. 24, 30-42, (1969)

SHIH, J.H.C.; EIDUSON, J.

Multiple forms of monoamine oxidase in developing brain.

Nature (London). 224, 1039-1310, (1969)

SHIMIZU, N.; MORIKAWA, N.; OKAWA, M.

Histochemical studies of MAO of the brain of rodents.

Z. Zellforsch. 49, 389-394, (1959)

SHORE, P.A.; MEAD, J.A.; KUNTZMAN, R.G.; SPECTOR, S.; BRODIE, B.B.

Physiological significance of monoamine oxidase in brain.

Science, 126, 1063-1064, (1957)

SJOSTRAND, E.S.

Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea-pig eye as revealed by threedimensional reconstructions from serial sections.

J. Ultrast. Res. 2, 122-170, (1958)

SJÖSTRAND, N.O.

The adrenergic innervation of the vas deferens and the accessory male genital glands.

Acta Physiol. Scand. 65, Suppl. 257 (1965)

SJÖSTRAND, N.O.; SWEDIN, G.

Effect of chronic hypogastric denervation on the NA content of the vas deferens and the accessory male reproductive glands of the rat.

Experientia, 23, 817-820, (1967)

SMITH, B.

MAO in pineal neurohypophysis and brain of the albino rat.

J. Anat. (Lond). 97, 81-86, (1963)

SMITH, C.A.; SJOSTRAND, E.J.

Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea-pit cochlea as studied by serial sections.

J. Ultrastr. Res. 5, 523-556, (1961)

SMITH, A.; WINKLER, H.

Fundamental mechanisms in the release of catecholaminrd

"Catecholamines" (H. Blaschko and E. Muscholl, eds)

pág. 538-617, Vol 33 of Handbook of Experimental Pharmacology, Springer. Berlín. (1972)

SMITH, D.J.; VAN ORDER, L.S.

Ultrastructural evidence for increased incidence of exocytosis in the stimulated adrenal medulla of the cat.

Neuropharmacology 12, 875-883, (1973)

SORIMACHI, M.; OESCH, F.; THOENEN, H.

Effects of colchicine and cytochalasin B on the release of <sup>3</sup>H-NA from guinea-pig atria evoked by high potassium, nicotine and tyramine.

Naunyn. Schiemed. Arch Pharmakol 276, 1-12, (1973)

SPANO, P.F.; MAZZUCATO, P.; TAGLIAMONTE, A.; VARGIU, L.;  
CAMBA, R.; GESSA, L.

Attività catechol-O-metil-transferasica, monoamino ossida-  
sica, decarbossilasica del vas deferens di ratto.

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 44, 419-420, (1968)

STARKE, K.

Action of angiotensin on uptake, release and metabolism of  
<sup>14</sup>C-NA by isolated rabbit heart.

Eur. J. Pharmacol. 14, 112-123, (1971)

STARKE, K.

Influence of extracellular noradrenaline on the stimulation  
evoked secretion of NA from sympathetic nerves: Evidence  
for an alfa-receptor-mediated feed-back inhibition of NA  
release.

Naunyn. Schimied. Arch. Pharmakol. 275, 11-23, (1972)

STARKE, K.; MONTEL, H.

Alpha-receptor mediated modulation of transmitter release  
from central noradrenergic neurones.

Naunyn. Schimied. Arch. Pharmakol. 279, 53-60, (1973)

STARKE, K.; SCHUMANN, H.J.

Interactions of angiotensin, phenoxybenzamine and proprano-  
lol on noradrenaline release during sympathetic nerve stimu-  
lation.

Eur. J. Pharmacol. 18, 27-30, (1972)

STARKE, K.; ENDO, T.; TAUBE, H.D.

Relative pre and postsynaptic potencies of alfa-adrenocep-  
tor agonists in the rabbit pulmonary artery.

Naunyn. Schimied. Arch. Pharmakol. 291, 55-78, (1975)

STARKE, K.; MONTEL, H.; SCHUMANN, H.

Influence of cocaine and phenoxybenzamine on NA uptake and release.

Naunyn. Schimied. Arch. Pharmakol. 270, 210-214, (1971,a)

STARKE, K.; MONTEL, H.; WAGNER, J.

Effect of phentolamine on noradrenaline uptake and release.

Naunyn. Schimied. Arch. Pharmakol. 271, 181-192, (1971,b)

STJÄRNE, L.

Studies of catecholamines uptake, storage and release mechanisms.

Acta Physiol. Scand. 62, Suppl. 228, (1964)

STJÄRNE, L.

Storage particles in noradrenergic tissues.

Pharmacol. Rev. 18, 425-433, (1966)

STJÄRNE, L.; BRUNDIN, J.

Dual adrenoceptor mediated control of noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves: Facilitation by beta-receptors and inhibiting by alfa-receptors.

Acta Physiol. Scand. 94, 139-141, (1975)

STJÄRNE, L.; BRUNDIN, J.

Beta<sub>2</sub>-adrenoceptors facilitating noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves.

Acta Physiol. Scand. 97, 88-93, (1976)

STJÄRNE, L.; WENNMALM, A.

Preferential secretion of newly formed NA in the perfused rabbit heart.

Acta Physiol. Scand. 80, 428-429, (1970)

SWEDIN, G.

Studies on neurotransmission mechanisms in the rat and guinea pig vas deferens.

Acta Physiol. Scand. Suppl. 369, 1-34, (1971)

TAKEUCHI, A.

Electrical changes in pre and post synaptic axons of the giant synapse of Loligo.

J. Gen. Physiol. 45, 1181-1193, (1962)

THOA, N.; WOOTEN, G.; AXELROD, J.; KOPIN, I.

Inhibition of release of dopamine-beta-hydroxylase and NA from sympathetic nerves by colchicine, vinblastine or cytochalasin-B.

Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 520-522, (1972)

TRENDELENBURG, U.

Modification of the effect of tyramine by various agents and procedures.

J. Pharmac. Exp. Ther. 134, 8-17, (1961)

TRENDELENBURG, U.

Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines.

Pharmacol. Rev. 15, 225-276, (1963)

VALDECASAS, F.G. Y COLS.

Mecanismos adrenérgicos presinápticos. Estudio de la liberación de los transmisores adrenérgicos.

Memoria Final Ayuda Investigación F.J. March. Barcelona Junio (1976)

VALDECASAS, F.G.; BARTOLOME, M.; Y COLS.

Mediadores adrenérgicos en sus aspectos bioquímico, fisiológico y farmacológico.

X Reunión. Soc. Esp. Cienc. Fisiol. Valencia (1967)

VALDECASAS, F.G.; LAPORTE, J.; JANE, F.

Interacciones entre reserpina y simpaticomiméticos en conducto deferente.

Actas X Reunión. Nac. Soc. Esp. Cienc. Fisiolog. Valencia (1967)

VALDECASAS, F.G.; PUIG, M.; PLANAS, M.E.

The interaction of amphetamine-reserpine in perfused cat spleen "in situ".

Abstr. 6th. Int. Congr. Pharmacol. nº1519, 626 Helsinki University, (1975)

VALDECASAS, F.G.; PUIG, M.; PLANAS, M.E.

Interaction amphetamine-reserpine dans la rate perfusée du chat.

Résumé. Rapp. Comm. 13<sup>ème</sup>. Congr. Int. Therap. Varna (1975)

VALDECASAS, F.G.; SALVA, J.A.

Action of reserpine on the spinal cat.

Arch. Int. Pharmacodyn. 140, 581-591, (1962)

VAN BREEMAN, C.; FARINMS, B.F.; CASTEELS, P. GERBA, F.;

NUYTACK, F.; DETH, R.

Factors controlling cytoplasmic Ca<sup>++</sup> concentration.

Phil. Tans. Roy. Soc. London. B 265, 57-67, (1973)

VOHRA, M.M.

The responses of the rat and guinea-pig vas deferens to cocaine.

Canadian. J. Physiol. Pharmacol. 47, 469-476, (1969,a)

VOHRA, M.M.

Evidence for the release of an endogenous catecholamines by tetracaine.

Life Sci. 8, 25-31, (1969,b)

WACHTEL, A.W.; SZAMIER, R.B.

Special cutaneous receptor organs of fish: the tuberous organ of Eigenmannia.

J. Morphol. 119, 51-80, (1966)

WAKADE, A. R.; CERVONI, P.; FURCHGOTT, R.F.

Development and reversal of tyramine tachyphylaxis and the interactions of tyramine and bretylium in the guinea-pig isolated left atrium.

Pharmacologist, 6, 205-210, (1964)

WAXMAN, S.G.; PAPPAS, G.D.

Pynocytosis at postsynaptic membranes: electron microscopic evidence.

Brain. Res. 14, 240-244, (1969)

WAXMAN, M.B.; WALLACE, A.G.

Electrophysiologic effects of bretylium tosylate on the heart.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 264-274, (1972)

WEEKS, J.K.

Prostaglandins.

Ann. Rev. Pharmacol. 12, 317-336, (1972)

WEINER, N.; JARDETZKY, O.

A study of catecholamine nucleotide complexes by nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Naunyn. Schimied. Arch. Pharmakol. 248, 308-318, (1964)

WEISSBACH, H.; LOVENBERG, W.; REDFIELD, B.G.; UDENFRIEND, J.  
"in vivo" metabolism of serotonin and tryptamine: effect of  
monoamine oxidase inhibition.

J. Pharmacol. 131, 26-30, (1961)

WEISSBACH, H.; SMITH, T.E.; DALY, J.W.; WITKOP, B.; UDEN -  
FRIEND, J.

A rapid spectrophotometric assay of amonoamine oxidase ba-  
sed on the rate of disappearance of Kynuramine.

J. Biol. Chem. 235, 1160-1163 (1960)

WENNMALM, A.

Studies on mechanisms controlling the secretion of neuro -  
transmitters in the rabbit heart.

Acta Physiol. Scand. Suppl. 365, 1-36, (1971)

WESTFALL, D.P.

Non-specific supersensitivity of the guinea-pig vas defe -  
rens produced by decentralisation and reserpine treatment.

Br. J. Pharmacol. 39, 110-114, (1970)

WHITBY, L.G.; AXELROD, J.; WEILNALHERBE, H.

The fate of <sup>3</sup>H-NA in animals.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 132, 193-201, (1961)

WHITTAKER, U.P.

The use of synaptosomes in the study of synaptic and neuro-  
nal membrane function.

Structure and function of synapses. Raven Press New York  
(1972)

WILSON, L.; BAMBURG, J.; MIZEL, J.; GRISHAM, L.; CRESWELL, K.

Interaction of drugs with microtubular proteins.

Fed. Proc. 33, 158-166, (1974)

WILLIAMS, L.T.; LEFKOWITZ, R.J.

Alpha-adrenergic receptor identification by (<sup>3</sup>H)Dihydroergocryptine binding.

Science, N.Y. 192, 791-793, (1976)

WIT, A.L.; STEINER, C.; DANATO, A.N.

Electrophysiologic effects of bretylium tosylate on single fibers of the canine specialized conducting system and ventricle.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 173, 344-356, (1970)

WOLFE, D.E.; POTTER, L.T.; RICHARDSON, K.C.; AXELROD, J.

Localizing tritiated NA in sympathetic axons by electron microscopic autoradiography.

Science, 138, 440-445, (1962)

WOOTEN, F.; THOA, N., KOPIN, I.; AXELROD, J.

Enhanced release of dopamine-beta-hydroxylase and NA from sympathetic nerves, by dibutiril cyclic adenosine 3'-5' - monophosphate and theophylline.

Mol. Pharmacol. 9, 178-183 (1973)

WUERKER, R.B.; PALAY, S.L.

Neurofilaments and microtubules in anterior horn cells of the rat.

Tissue and Cell. 1, 387-402, (1969)

YELNOWSKY, J.; MORTIMER, L.C.

A brief study of the sympathomimetic cardiovascular effects of bretylium.

Arch. Int. Pharmacodyn. 130, 200-206, (1961)

YODIN, M.B.H.; SANDLER, M.

Isoenzymes of soluble monoamine oxidase from human placental and rat liver mitochondria.

Biochem. J. 105, 43-50, (1967)

YOU DIN, M.B.H.; SOURKES, T.L.

The effect of heart, inhibitors and riboflavin deficiency on monoamine oxidase.

Can. J. Biochem. 43, 1305-1318, (1965)

ZELLER, E.A.

Monoamine and polyamine analogues.

Ed. by Hochster, R.M. and Quastel J. H. Academic Press  
New York and London. 2, 53-78. (1968,a)

ZELLER, E.A.

A new approach to the analysis of the interaction between monoamine oxidase and its substrates and inhibitors.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 107, 811-823, (1963, b)

ZELLER, E.A.

Eutopic and dystopic substrate complexes of MAO XX Amine oxidase.

Biochim. Z. 339, 13-22, (1963, c)