

## Tesis de Posgrado

# Neurotransmisión en el bazo perfundido de gato : Mecanismos regulatorios y caminos metabólicos

Dubocovich, Margarita L.

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Dubocovich, Margarita L.. (1975). Neurotransmisión en el bazo perfundido de gato : Mecanismos regulatorios y caminos metabólicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1501\\_Dubocovich.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1501_Dubocovich.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Dubocovich, Margarita L.. "Neurotransmisión en el bazo perfundido de gato : Mecanismos regulatorios y caminos metabólicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1501\\_Dubocovich.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1501_Dubocovich.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

NEUROTRANSMISION EN EL BAZO PERFUNDIDO  
DE GATO : MECANISMOS REGULATORIOS Y  
CAMINOS METABOLICOS

por

Margarita L. Dubocovich

Tesis presentada para optar al titulo de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Director de tesis : Dr Salomon Z. Langer

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLOGICAS (CONICET)

Buenos Aires , Noviembre 1975

A MIS PADRES

AL Dr SALOMON Z.LANGER

Mi más sincero agradecimiento por sus valiosas enseñanzas que determinaron mi formación en el campo de la investigación científica y por su constante guía en la planificación, el desarrollo y la discusión de los trabajos realizados.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento a todas las Instituciones y personas que de una u otra forma permitieron llevar a cabo este trabajo de tesis y en particular:

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que al concederme las becas de Iniciación y Perfeccionamiento posibilitó la realización de este trabajo de tesis.
- A la Dra. Josefina María Tomio, mi Consejera de Estudios.
- A los señores Hugo Roitvan y Mario Viggiano por su colaboración en el desarrollo técnico.
- A la Dra. Edda Adler de Grashinsky, por su valiosa colaboración en la corrección de los manuscritos.
- Al personal de secretaría del Instituto de Investigaciones Farmacológicas y en particular a las señoritas Irma Pozzoli y Aída Charnapolsky, quienes realizaron el trabajo dactilográfico de esta tesis.
- A mis compañeros de trabajo y a todo el personal de Instituto de Investigaciones Farmacológicas, que de una u otra forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

## OBJETIVOS

El objeto de estos estudios fue analizar en el bazo perfundido de gato varios aspectos relacionados con la neurotransmisión adrenérgica cubriendo los siguientes tópicos:

I) El metabolismo de la noradrenalina liberada espontáneamente y por estímulo nervioso, se debe a la actividad de las enzimas pre y postsinápticas. Estudios realizados en distintos tejidos revelaron que una gran porción del neurotransmisor adrenérgico liberado en condiciones de reposo y por estímulo nervioso, se recogía metabolizado (Langer, 1970; Su y Bevan, 1970; Roffer-Tarlov y Langer, 1971; Langer, Enero y Stefano, 1972; Adler-Graschinsky, Langer y Rubio, 1972; Graefe, Stefano y Langer, 1973; Langer, 1974a).

Fue de nuestro interés, analizar en el bazo perfundido de gato, el metabolismo de la noradrenalina en condiciones de reposo y cuando se induce la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso. Con el objeto de determinar si los metabolitos se forman en el terminal nervioso o en el tejido efector, se utilizaron drogas que inhiben la captación neuronal y extraneuronal de noradrenalina.

Se estudió el metabolismo del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias, dado que Langer (1970) sugirió que el metabolismo de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa era inversamente proporcional a la frecuencia de estimulación aplicada. En adición, para cada frecuencia de estimulación nerviosa, se analizó el metabolismo de la noradrenalina liberada durante y después del período de estimulación, en condiciones controles, con inhibición de la captación neuronal y extraneuronal y con bloqueo de los receptores alfa pre y postsináptico.

En un órgano perfundido, un aumento (Hertting, 1964) o una disminución (Kirpekar y Puig, 1971) del flujo, pueden modificar la captación y la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa. Por lo cual, se analizó la influencia de la interrupción de la perfusión del bazo, sobre la liberación y metabolismo del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa.

II) Se han postulado recientemente que la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa es regulada por dos mecanismos de retroinformación presinápticos. El primero mediado por receptores beta, sería activado por concentraciones bajas de noradrenalina, originando un aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado por estímulo nervioso (Adler-Graschinsky y Langer, 1975). El segundo mediado a través de receptores adrenérgicos alfa, actuaría cuando se alcanzan concentraciones altas de noradrenalina en el espacio sináptico originando una inhibición del neurotransmisor liberado por estímulo nervioso (Langer, 1974b).

En relación al mecanismo de retroinformación positiva, estudiamos en el bazo perfundido de gato, los efectos sobre la neurotransmisión adrenérgica de un agonista de receptores beta, el isoproterenol y de un bloqueante beta, el propranolol.

Una observación experimental que ha llamado la atención desde que aparecieran los trabajos de Brown y Gillespie (1957) es que los bloqueantes de receptores alfa, como la fenoxibenzamina, aumenten menos la liberación del neurotransmisor adrenérgico inducido por estimulación nerviosa cuando se aplican frecuencias altas (30 Hz). Dado que este efecto no puede ser atribuido a la inhibición de la captación neuronal por fenoxibenzamina, se pensó que podría estar relacionado con los valores altos de liberación por shock obtenidos a frecuencias altas, en ausencia de droga. Al despolarizar los nervios adrenérgicos a frecuencias altas, entraría una mayor cantidad de calcio (Cubeddu y Weiner, 1975b) al terminal nervioso, lo cual podría desensibilizar el mecanismo de retroinformación negativa que regula la liberación de noradrenalina. Con el objeto de explorar esta posibilidad se estudió el efecto de la activación por el agonista exógeno, noradrenalina y del bloqueo por fenoxibenzamina de los receptores alfa presinápticos que regulan la liberación del transmisor por estimulación nerviosa a distintas frecuencias. En estos experimentos se utilizaron distintas concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

En el bazo perfundido de gato, las respuestas del órgano efector son mediadas a través de receptores de tipo alfa. Si los receptores alfa del terminal adrenérgico y la célula efectora fueran idénticos y si se estipula que para igual ocupación de los receptores, las respuestas son idénticas, se debería requerir la misma concentración de noradrenalina para activar los receptores alfa pre y postsinápticos. Bajo

estas condiciones en los tejidos en los cuales las respuestas del órgano efector son mediadas a través de receptores alfa, la autoinhibición del transmisor liberado, reduciría la disponibilidad de noradrenalina para generar una respuesta del órgano efector. Esto reduciría la eficiencia de la neurotransmisión.

Una segunda posibilidad es que los receptores alfa pre y postsinápticos no sean idénticos y que la afinidad de la noradrenalina para estos dos receptores difiera.

Esta hipótesis diferencial entre los receptores alfa pre y postsinápticos podría reflejarse en la diferencia de potencia de un antagonista alfa irreversible, para bloquear los receptores presinápticos o postsinápticos. Se investigó esta posibilidad usando concentraciones bajas de fenoxibenzamina en el bazo perfundido de gato y se comparó la potencia relativa de esta droga para bloquear las respuestas del órgano efector y aumentar la liberación del transmisor por estimulación nerviosa.

III) Las prostaglandinas exógenas de la serie E inhiben la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa en órganos de diferentes especies (Hedqvist, 1970a, 1973, 1974; Stjarne, 1972, 1973a,b,c,d,e). Se ha postulado que las prostaglandinas, liberadas por estimulación nerviosa, podrían mediar un mecanismo endógeno de retroinformación inhibitorio que regularía la liberación de noradrenalina (Hedqvist, 1970a,b, 1973, 1974; Stjarne, 1972, 1973a,b,c).

Si existe un mecanismo endógeno de retroinformación negativo mediado por prostaglandinas, debería aumentar la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa cuando la síntesis de prostaglandinas se inhibe por drogas. No obstante, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por drogas da lugar a pequeños aumentos (Fredholm y Hedqvist, 1973; Starke y Montel, 1973; Stjarne, 1973 a,b,c) o no se obtienen aumentos (Hoszowska y Panczenko, 1974) en la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa.

En publicaciones recientes se sugirió que las prostaglandinas reducirían la disponibilidad del calcio necesario para la liberación del transmisor por estimulación nerviosa, lo que aumentaría el efecto inhibitorio de las prostaglandinas sobre la neurotransmisión (Stjarne, 1973 d,e; Hedqvist, 1973). En consecuencia, en este trabajo, estudiamos en el bazo perfundido de gato, los efectos sobre la neurotrans-



misión adrenérgica de la prostaglandina de la serie  $E_2$  y de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por indometacina en presencia de diferentes concentraciones de calcio. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando dos frecuencias de estimulación nerviosa, 5 y 30 Hz.

# INTRODUCCION

## INTRODUCCION

- A - SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO
- B - SINTESIS, ALMACENAMIENTO, LIBERACION POR ESTIMULACION NERVIOSA Y CAPTACION DE LA NORADRENALINA.
- C - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA
- D - REGULACION DE LA LIBERACION DE NORADRENALINA POR ESTIMULACION NERVIOSA
- E - INHIBICION DE LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN PRESENCIA DE DIFERENTES COMPUESTOS.

## INTRODUCCION

### A - SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO

El sistema nervioso autónomo, llamado también visceral, vegetativo o sistema nervioso involuntario, está constituido por centros nerviosos, plexos y ganglios que proveen la inervación del corazón, vasos sanguíneos, vísceras y músculos lisos.

El sistema nervioso autónomo formado por una porción central y otra periférica, regula muchas funciones internas del organismo que no están bajo el control voluntario y se halla dividido anatómica, fisiológica y farmacológicamente en dos partes: el simpático y el parasimpático.

En el sistema nervioso central existen centros a nivel espinal, bulbar, hipotálamico y de la corteza cerebral, coordinadores de las funciones viscerales, cuyos impulsos actúan sobre las células conectoras del sistema nervioso autónomo.

El centro de integración más importante del sistema nervioso autónomo es el hipotálamo, principalmente en lo que concierne a la regulación de la temperatura corporal, balance hídrico, secreción gástrica, metabolismo de lípidos, presión sanguínea.

El sistema nervioso autónomo regula la frecuencia y fuerza de contracción del corazón, el calibre de los vasos sanguíneos, la contracción o relajación del músculo liso del intestino, vejiga y bronquiolos, la acomodación visual y el diámetro pupilar, la secreción de las glándulas exócrinas y otras.

En general, los dos sistemas son fisiológicamente antagónicos, de forma que si uno de ellos estimula una cierta función el otro la inhibe; la mayoría de las vísceras (órganos efectores) están inervados por ambos sistemas, y el nivel de actividad en cualquier momento es la suma algebraica de las dos influencias.

Los trabajos de Gaskell (1916), conjuntamente con los de Langley (1921) dieron el conocimiento definitivo de la arquitectura anátomo-fisiológica del sistema nervioso autónomo.

A principios del siglo XIX varios investigadores describieron que ciertas sustancias químicas producían acciones sobre las células efectoras y que esas acciones tenían características similares a las respuestas producidas por estimulación del sistema nervioso autónomo. Se observó que cuando se inyectaba extracto de glándulas adrenales, se producían efectos que mimetizaban la estimulación nerviosa simpática (Langley, 1901). Posteriormente, en estudios realizados por Dixon (1907) se encontró que la muscarina y la pilocarpina mimetizaban la estimulación de los nervios parasimpáticos. Gracias a estas observaciones y al mapeo de las fibras pre y postganglionares del sistema nervioso autónomo realizados por Langley y Dickson (1889), utilizando nicotina, que producía estimulación y posterior bloqueo de los ganglios, Langley (1921) llegó a dos conclusiones importantes: 1) Que existen dos divisiones dentro del sistema nervioso autónomo: el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático. 2) Que en ambas divisiones la primera neurona (preganglionar) se origina dentro del sistema nervioso central y hace sinapsis con una segunda neurona (postganglionar) fuera del sistema nervioso central.

La primera sugestión que los impulsos nerviosos se transmitían de una célula a otra a través de mediadores químicos fue dada por Dubois-Reymond (1860). Varios años más tarde, cuando ya se conocían las acciones de los extractos de médula adrenal sobre los nervios del sistema nervioso autónomo, Elliott (1905) y posteriormente, Dixon y Hamill (1909) sugirieron que el sistema nervioso autónomo actuaba liberando

adrenalina de las terminaciones postganglionares.

Simultáneamente en 1907, Dixon concluyó de sus datos experimentales con muscarina y con pilocarpina que la excitación de los nervios inducía la liberación local de una hormona, la cual causaba una actividad específica por combinación con algunos constituyentes del órgano efector, músculo o glándula. En ese mismo año Hunt anunció sus estudios sobre acetilcolina y otros ésteres de la colina. En 1914, Dale reinvestigando los efectos de las propiedades farmacológicas de la acetilcolina, fue impresionado por la fidelidad con que esta droga reproducía los efectos de la estimulación de los nervios parasimpáticos, e introdujo el término "parasimpátomimético" para caracterizar estos efectos. Fue Dale también quien observó el efecto fugaz de la acetilcolina y sugirió que debía existir una esterasa en los tejidos que hidrolizaba a la acetilcolina en ácido acético y en colina. La primera confirmación experimental de la hipótesis que los impulsos nerviosos se transmitían por sustancias químicas fue obtenida por Loewi (1921) y simultáneamente por Cannon y Uridil (1921).

Los brillantes experimentos de Loewi, comenzados en 1921, se basaban en la estimulación del nervio vago del corazón de rana perfundido (dador). El líquido de perfusión del dador se utilizaba para perfundir un segundo corazón de rana (receptor). Una sustancia que se liberaba del primer corazón, disminuía la frecuencia del corazón receptor. Loewi llamó a esta sustancia "Vagusstoff" (sustancia vagal). Posteriormente Loewi y Navratil (1926) identificaron esta sustancia como acetilcolina. Loewi también descubrió que se liberaba al líquido de perfusión una sustancia aceleradora, similar a la adrenalina, cuando el efecto de las fibras simpáticas del vago de rana predominaba sobre aquel de las fibras inhibitoras. No obstante, los resultados de Loewi no fueron corroborados inmediatamente debido a dificultades técnicas. En 1927, Rylant, utilizando corazón de conejo y posteriormente Felderg y Krayner (1933) en gatos y en perros intactos, con diseños similares al utilizado por Loewi, confirmaron que por estimulación vagal se liberaba acetilcolina.

Otros investigadores, establecieron luego definitivamente que el transmisor químico en los tejidos inervados por el sistema nervioso parasimpático era la acetilcolina, la que daba lugar a una respuesta característica en el órgano efector.

Dado la similitud entre los efectos de la estimulación de los nervios simpáticos y aquellos obtenidos por la adrenalina, se pensaba que el transmisor liberado por las terminaciones simpáticas era la adrenalina, concepto que fue aceptado hasta el año 1945 y que dio lugar a cierta confusión dentro del campo de la neurotransmisión adrenérgica.

La noradrenalina fue sintetizada en 1904 por Stolz, quien demostró que era menos tóxica que la adrenalina y que ambas tenían igual potencia como sustancias presoras. Si bien estas propiedades fueron corroboradas por Biberfeld (1906), se le dio poca atención en esa época a la posibilidad que la noradrenalina pudiera tener un papel fisiológico dentro de la neurotransmisión adrenérgica.

No obstante, surgieron discrepancias inherentes al concepto que la adrenalina fuera el transmisor adrenérgico. Barger y Dale (1910) encontraron el bien conocido efecto reversible de las respuestas presoras a la adrenalina luego del bloqueo de los receptores adrenérgicos con ergotamina. Sin embargo este efecto no pudo ser demostrado ni para la noradrenalina, ni para la estimulación de las fibras nerviosas simpáticas. Las diferencias encontradas por Cannon y Rosenblueth (1933) entre las acciones del transmisor liberado por estimulación nerviosa simpática y de la adrenalina, dio lugar a la teoría de las dos simpatinas. Cannon y Rosenblueth sugirieron que se liberaba un mediador común (M) de los nervios simpáticos, que al combinarse con las sustancias E ó I de la célula efectora formaba los compuestos simpatina E o simpatina I, los cuales tenían efectos excitatorios e inhibitorios respectivamente.

Bacq (1934) y posteriormente Stehle y Ellsworth (1937) sugirieron que la noradrenalina podría ser equivalente a la simpatina E de Cannon y Rosenblueth (1933). Posteriormente Bacq (1935) modificó su teoría y sugirió que la simpatina E no era noradrenalina sino una forma parcialmente oxidada de la adrenalina.

Otra teoría que prescindió de las sustancias intermedias E e I del tejido efector fue la propuesta por Greer, Pinkston, Baxter y Brannon (1938) quienes sugirieron que las terminaciones nerviosas simpáticas podían liberar los dos transmisores y que estos tendrían una acción directa sobre la célula efectora. Sugirieron a la noradrenalina, como transmisor excitatorio y a la adrenalina como inhibitorio.

Otra serie de evidencias que llevaron el reconocimiento final de la noradrenalina como sustancia de importancia fisiológica fue el descubrimiento de la enzima l-DOPA descarboxilasa en tejidos de mamíferos por Holz, Heise y Lüdtke (1938). Dichos autores encontraron que esta enzima convertía la 3-4 dihidroxifenilalanina en dopamina, la cual difería de la noradrenalina por la ausencia de un grupo OH en posición beta. Blaschko (1939) sugirió que la noradrenalina podría formarse como un intermediario en la síntesis de adrenalina a partir de 3-4 dihidroxifenilalanina (DOPA).

Posteriormente fue confirmada la presencia de noradrenalina en distintos tejidos y nervios (Bacq y Fisher, 1947; Holtz, Credner y Kroneberg, 1947; Schmitterlöw, 1948). La noradrenalina fue resuelta en sus isómeros ópticos por Tuller (1948) y Euler (1948) la aisló del nervio esplénico, y la identificó como el isómero L.

La evidencia que la noradrenalina es la catecolamina predominante en tejidos periféricos y en nervios adrenérgicos se debe a los trabajos de Euler (Euler, 1946, a, b, c, 1948, 1950; Euler y Lishajko, 1957), quien comparó las propiedades de la adrenalina con la de extractos de nervio esplénico, bazo e hígado de mamífero, encontrando gran número de diferencias. Euler concluyó que la noradrenalina era el neurotransmisor predominante en el sistema nervioso simpático y que debía haber dos sustancias transmisoras que propuso llamarlas simpatina A (adrenalina) y simpatina N (noradrenalina).

A pesar de toda la evidencia en favor de la identidad de la noradrenalina con el neurotransmisor simpático, el concepto no fue aceptado inmediatamente. En 1948, Alhquist postuló que la adrenalina era el único transmisor y que su acción dependía de la presencia de dos tipos de receptores que llamó alfa y beta.



Luego que fuera demostrado que la l-noradrenalina estaba presente en órganos inervados por el sistema nervioso simpático, se tuvieron las primeras evidencias que la noradrenalina se liberaba de tales órganos por estimulación de las fibras postganglionares simpáticas (Peart, 1949; West, 1950; Mann y West, 1950, 1951; Outschoorn y Vogt, 1952; Outschoorn, 1952).

La evidencia concluyente en favor del hecho que la noradrenalina era el único transmisor fue dado por los trabajos de Euler (1951, 1956, 1959). Los términos simpatina N y simpatina A no son usados actualmente y se acepta que la noradrenalina es el único transmisor en los tejidos adrenérgicos periféricos de mamíferos y que las trazas de adrenalina encontradas en muchos tejidos periféricos no están conectadas con la neurotransmisión adrenérgica (Euler, 1959).

Los estudios de Falck, (1962) demostraron la presencia de noradrenalina en los terminales simpáticos por primera vez mediante métodos de fluorescencia histoquímica.

Estos estudios llevaron al conocimiento del sistema nervioso autónomo que se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático. Ambos sistemas tienen su nacimiento en células del sistema nervioso central, desde donde salen los axones que van a hacer sinapsis en los ganglios periféricos. De cada ganglio salen a su vez neuronas que van a inervar los órganos efectores. Mientras que las neuronas pre y postganglionares del sistema parasimpático son colinérgicas, sólo las neuronas preganglionares del sistema simpático son de este tipo. Las neuronas postganglionares del sistema simpático son adrenérgicas. Con pocas excepciones la mayor parte de los órganos poseen inervación del sistema nervioso simpático y parasimpático, que tienen acciones opuestas sobre dicho órgano.

En el sistema nervioso autónomo, los impulsos son transmitidos en algunas sinapsis por la acetilcolina (nervios colinérgicos) y en otras por la noradrenalina (nervios adrenérgicos).

La transmisión sináptica ocurre por sustancias químicas específicas (sustancias transmisoras) que son liberadas por impulso nervioso desde las terminaciones nerviosas

al espacio sináptico para dar lugar a una respuesta postsináptica por combinación con receptores específicos en la membrana de la célula efectora (Bacq, 1934; Cannon, 1939; Eccles, 1964).

En 1948, Ahlquist describió un método para clasificar los agentes adrenérgicos e introdujo el concepto que existen dos tipos de receptores adrenérgicos, a los que denominó alfa y beta. No obstante, este concepto fue aceptado recién en 1957, después del desarrollo del dicloisoproterenol, que bloquea selectivamente los receptores beta (Powell y Slater, 1958).

Los receptores adrenérgicos son clasificados como de tipo alfa y de tipo beta. La noradrenalina y la dibenamina son los ejemplos típicos de activador y de bloqueante respectivamente de los receptores alfa adrenérgicos. El isoproterenol y el dicloro isoproterenol son los ejemplos típicos de agentes activadores y bloqueantes respectivamente de los receptores beta.

La noradrenalina, transmisor químico del sistema nervioso simpático, se encuentra localizada en las vesículas sinápticas de las células nerviosas adrenérgicas. La adrenalina, que es otra catecolamina importante, se encuentra en concentración alta en la médula adrenal y en otras células cromafínicas, mientras que la dopamina, un precursor de la noradrenalina se encuentra en las terminaciones nerviosas simpáticas y en algunas áreas del sistema nervioso central.

Del concepto de neurotransmisión por sustancias químicas surge que ciertas drogas pueden actuar en las sinapsis causando cambios en los eventos presinápticos (síntesis, almacenamiento y liberación de los neurotransmisores), alterando la interacción entre el neurotransmisor y la membrana postsináptica (mimetizando, aumentando o previniendo la combinación del transmisor con la membrana postsináptica) o modificando la eliminación del transmisor del espacio sináptico.

#### B - SÍNTESIS, ALMACENAMIENTO, LIBERACIÓN POR ESTIMULACIÓN NERVIOSA Y CAPTACIÓN DE LA NORADRENALINA.

Poco después que fuera descubierta la enzima l-DOPA decarboxilasa, por Holtz, Hei-

se y Lüdtke (1938), Blaschko (1939) propuso una serie de reacciones hipotéticas para la síntesis de adrenalina y noradrenalina a partir de tirosina, "in vivo". Las primeras evidencias de la síntesis de catecolaminas se obtuvieron a partir de los estudios en médula adrenal, tanto "in vivo" como "in vitro" usando los precursores marcados tirosina o 3-4 dihidroxifenilalanina (DOPA) (Demis, Blaschko y Welch, 1955; Hagen, 1956; Pellerin y D'Iorio, 1957, Kirshner y Goodall, 1956; Masuoka, Schott, Akawie y Clark, 1956; Udenfriend y Wyngaarden, 1956).

Con el advenimiento de nuevas técnicas cromatográficas para la separación de la noradrenalina, de sus precursores y de sus metabolitos, y con la disponibilidad de precursores marcados de alta actividad específica, se pudo demostrar la biosíntesis de noradrenalina en otros tejidos, como nervios simpáticos y ganglios (Goodall y Kirshner, 1958), cortes de cerebro de rata y de gato (Masuoka, Clark y Schott, 1961; Masuoka, Schott y Petriello, 1963), en el corazón perfundido de cobayo, (Spector, Sjoerdsma, Zaltman-Nirenberg, Levitt y Udenfriend, 1963), en el corazón perfundido de perro (Chidsey, Kaiser y Braunwald, 1963) y en el corazón perfundido de conejo, (Musacchio y Goldstein, 1963).

El camino biosintético de las catecolaminas comienza con la conversión de la l-tirosina en 1-3-4 dihidroxifenilalanina (l-DOPA) por acción de la enzima tirosina hidroxilasa. Posteriormente la l-DOPA es decarboxilada por la DOPA-decarboxilasa a dopamina. El paso final en la biosíntesis de la noradrenalina involucra la beta hidroxilación de la dopamina por acción de la enzima dopamina beta hidroxilasa. Tanto en la médula adrenal (Kirshner, 1959) como en tejidos periféricos (Potter y Axelrod, 1963), la enzima dopamina beta hidroxilasa (DBH) se encuentra localizada en la fracción celular particulada, lo que indica su localización en los gránulos de almacenamiento, junto con la noradrenalina.

En la médula adrenal la conversión de noradrenalina a adrenalina es catalizada por la enzima feniletanolamina-N-metil transferasa (Axelrod, 1962, 1966).

Gran parte de la evidencia directa del papel de la noradrenalina como neurotransmisor adrenérgico proviene de experimentos en los cuales la noradrenalina se detecta en el efluente venoso de órganos perfundidos durante la estimulación nerviosa simpática. Este fue el diseño utilizado por Loewi (1921) en su demostración clásica de liberación de adrenalina del corazón aislado de rana. Estudios similares se llevaron a cabo con una variedad de órganos aislados: intestino (Finkleman, 1930), oreja perfundida de conejo (Gaddum y Kwiatkowski, 1939) bazo de buey (Eliasson, Euler y Stjärne, 1955). No obstante recién a partir de los trabajos de Brown y Gillespie, 1957, se comenzaron a detectar cantidades precisas de noradrenalina en respuesta a la estimulación nerviosa simpática, en órganos perfundidos como el bazo de gato (Brown, 1960, 1965, Brown, Davies y Ferry, 1961; Thoenen, Hürlimann y Haefely, 1963, 1964a).

Una innovación fue la introducción de la noradrenalina marcada, de actividad específica suficientemente alta para la marcación de los depósitos endógenos de los tejidos a estudiar, de forma tal que permitió detectar la noradrenalina marcada liberada en respuesta a la estimulación nerviosa (Hertting y Axelrod, 1961; Rosell, Kopin y Axelrod, 1963; Hertting, 1965; Gillespie y Kirpekar, 1965).

El mecanismo por el cual la noradrenalina se libera al espacio sináptico por estimulación nerviosa, parece ser similar al sugerido para la liberación de acetilcolina por Katz (1962). Ambos procesos implican la liberación del transmisor como consecuencia de la despolarización del terminal nervioso luego de la llegada del impulso, lo que implica un cambio en las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana del terminal nervioso. Ambos procesos dependen de la concentración de calcio externa y la liberación del transmisor puede ser desencadenada por concentraciones despolarizantes de potasio extracelular (Douglas y Rubin, 1963).

La identificación de los componentes específicos de los gránulos cromafines de la médula adrenal llevó a determinar cuál era el mecanismo subcelular involucrado en la liberación de catecolaminas por la médula adrenal. Se ha encontrado que de los gránulos cromafines de la médula adrenal se liberan proteínas solubles (cromograminas)

sin una concomitante liberación de enzimas citoplasmáticas (Kirshner, Sage, Smith y Kirshner, 1966; Kirshner, Sage y Smith, 1967), ni de componentes lipídicos de la membrana del gránulo (Poisner, Trifaró y Douglas; Malamed, Poisner, Trifaró y Douglas, 1968; Schneider, Smith y Winkler, 1967), ni de dopamina beta hidroxilasa unida a membrana (Viveros, Arqueros y Kirshner, 1969). Viveros, Arqueros y Kirshner (1968) demostraron que el cociente noradrenalina/DBH soluble liberadas por estimulación de la médula adrenal por acetilcolina, era similar al cociente de estas sustancias en la fracción soluble de los gránulos cromafines.

Estas observaciones bioquímicas, junto con las evidencias obtenidas por microscopía electrónica (Diner, 1967) apoyan la hipótesis que la liberación de catecolaminas ocurre por exocitosis en la médula adrenal. En este proceso, los gránulos cromafines descargan la porción soluble de su contenido (noradrenalina, adenosín-trifosfato, cromagramina A y dopamina- $\beta$ -hidroxilasa) al exterior de la célula, presumiblemente por apertura de la membrana de la célula (Douglas, 1968). Mediante diseños experimentales análogos, se ha demostrado que por un mecanismo similar se liberaría noradrenalina de los terminales nerviosos adrenérgicos.

Varios autores han medido la liberación de dopamina beta hidroxilasa después de la estimulación nerviosa adrenérgica (Geffen, Livett y Rush, 1969; Smith, De Potter, Moerman y De Schaepdryver, 1970; Gewirtz y Kopin, 1970; Weinshilboum, Thoa, Johnson, Kopin y Axelrod, 1971; De Potter, Chubb, Put y De Schaepdryver, 1971; De Potter, Chubb y De Schaepdryver, 1972). Si bien se obtuvo una liberación proporcional de dopamina-beta-hidroxilasa y de noradrenalina en el conducto deferente del cobayo (Weinshilboum, Thoa, Johnson, Kopin y Axelrod, 1971) y en el bazo aislado de ternero (Smith, De Potter, Moerman y De Schaepdryver, 1970), estos resultados fueron obtenidos por estimulación de los nervios adrenérgicos utilizando frecuencias altas de estimulación. Sin embargo, recientemente y utilizando un rango de frecuencias fisiológico para la estimulación nerviosa, se encontró una liberación proporcional de noradrenalina, dopamina beta hidroxilasa,  $^3\text{H}$ -total y  $^3\text{H}$ -noradrenalina en el bazo perfundido de gato (Cubeddu,

Barnes, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). Puede concluirse que la liberación de noradrenalina de los nervios simpáticos inducida por estimulación nerviosa ocurre por un proceso de exocitosis similar al descrito para la médula adrenal.

La noradrenalina, al igual que otras aminas de estructura similar, es captada por las fibras postganglionares simpáticas por un proceso eficiente que es capaz de mantener un influjo de aminas contra un gradiente de concentración tejido/medio que puede ser tan alto como 1000/1 (Iversen, 1967). Este es un proceso estereoespecífico, donde las velocidades iniciales de captación de noradrenalina para concentraciones externas variables de la amina pueden ser descritas por la cinética de Michaelis-Menten, lo que indica que es un mecanismo saturable. Esto sugiere que las catecolaminas son captadas mediante un mecanismo de transporte activo localizado en la membrana axonal de las neuronas postganglionares simpáticas (Iversen, 1963, 1967). Este mecanismo puede ser inhibido por gran cantidad de drogas, como cocaína, bloqueantes alfa adrenérgicos y aminas simpatomiméticas. (Iversen, 1967).

En adición al proceso de captación neuronal, existe un proceso de captación extraneuronal para el transmisor adrenérgico descrito por Iversen (1965). Este mecanismo de captación extraneuronal permite el acceso del transmisor a las enzimas metabolizantes postsinápticas, y puede ser inhibido por fenoxibenzamina (Iversen, 1967, Eisenfeld, Axelrod y Krakoff, 1967; Iversen y Langer, 1969, Lightam y Iversen, 1969), drogas como metanefrina y la normetanefrina (Iversen, 1965) y algunos esteroides como corticosterona, testosterona, progesterona y  $\beta$ -estradiol (Salt, 1972; Salt e Iversen, 1972).

#### C - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA

Existen dos enzimas: la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que están presentes en las sinapsis neuroefectoras simpáticas, en los ganglios simpáticos y en varias regiones del sistema nervioso central. Varios autores han demostrado que la MAO está presente tanto en el terminal nervioso adrenérgico como en la célula efectora (Kopin, 1964; Malmfors, 1965; Jarrot, 1971a; Jarrot y Langer, 1971;

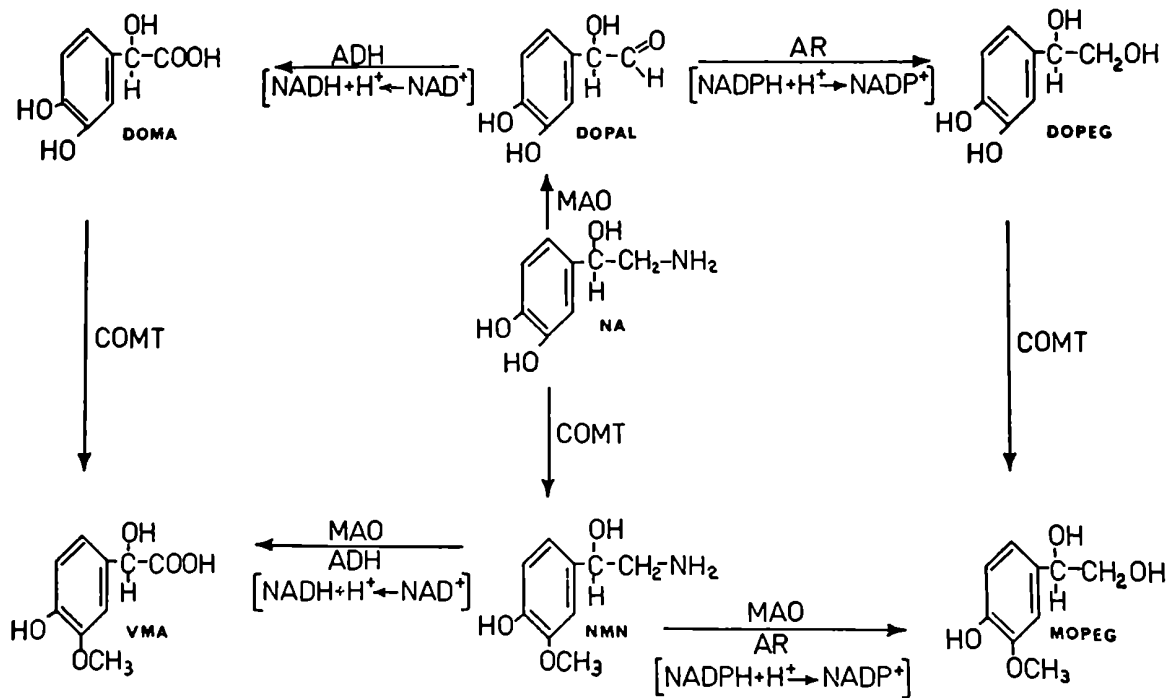


Figura 1: Camino metabólico de la noradrenalina

MAO: monoamino oxidasa      COMT: catecol O-metil transferasa  
 AR: aldehido reductasa      ADH: aldehido dehidrogenasa  
 NAD: nicotinamida adenina dinucleótido  
 NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NA: noradrenalina      DOPEG: 3,4-dihidroxifenilglicol  
 DOMA: ácido 3,4-dihidroximandélico  
 DOPAL: aldehido 3,4-dihidroxifenilglicólico  
 NMN: normetanefrina  
 MOPEG: 3-metoxi 4-hidroxifenilglicol  
 VMA: ácido 3-metoxi 4-hidroximandélico

Snyder, Fisher y Axelrod, 1965). La mayor parte de la actividad de COMT aparentemente se encuentra localizada en los tejidos extraneuronales (Axelrod, 1966; Waltman y Sears 1964). Sin embargo, en estudios recientes se ha encontrado COMT en los terminales nerviosos adrenérgicos (Jarrot, 1971b; Jarrot y Langer, 1971; Langer, Stefano y Enero, 1972). En el metabolismo del neurotransmisor adrenérgico la noradrenalina, (Fig.1), intervienen la MAO y la COMT, además de dos enzimas adicionales que están involucradas en la reducción u oxidación del aldehído de la noradrenalina (DOPAL: aldehído 3,4-dihidroxi-fenilglicólico), el cual es formado a través de la actividad de la monoaminoxidasa (Langer 1974a). Estas enzimas adicionales son la aldehído reductasa, que es una enzima NADPH-dependiente (Tabakoff, Anderson y Spyridon, 1973; Tabakoff y Erwin, 1970) y la aldehído dehidrogenasa, que es  $\text{NAD}^+$  dependiente.

De los cinco metabolitos de la noradrenalina (Fig.1), uno es O-metilado: la normetanefrina (NMN) y dos son deaminados: el 3,4-dihidroxi-fenilglicol (DOPEG) y el ácido 3,4 dihidroximandélico (DOMA). Los otros dos metabolitos son deaminados y O-metilados: el 3-metoxi 4-hidroxi-fenilglicol (MOPEG) y el ácido 3-metoxi 4-hidroxi-mandélico (VMA).

La mayor parte de los estudios sobre metabolismo del neurotransmisor adrenérgico se han llevado a cabo usando noradrenalina tritiada y empleando procesos elaborados para separar al transmisor de sus metabolitos (Crawford, 1951; Dengler, Michaelson, Spiegel y Titus, 1962; Goldstein, Friedhoff y Simmons, 1959; Langer, 1970; Rutledge y Jonason, 1967; Rutledge y Weiner, 1967; Whitby, Axelrod y Weil-Malherbe, 1961). Cabe mencionar que en la mayoría de estos estudios se encontraron problemas como a) no se lograba una separación eficiente de los metabolitos de la noradrenalina y tampoco había correspondencia entre la suma de las fracciones metabólicas y la radiactividad total; b) las recuperaciones de las fracciones eran bajas o no conocidas; c) no se conocía el grado de contaminación entre las fracciones. Recientemente, Graefe, Stefano y Langer (1973) publicaron un método para la separación de los metabolitos de la noradrenalina por cromatografía en columna que permite conocer la recuperación de cada fracción aislada. Con



este método se reduce al mínimo la contaminación cruzada y se pueden separar las siguientes fracciones metabólicas: noradrenalina, DOPEG, DOMA, NMN y metabolitos O-metilados deaminados (OMDA: suma de MOPEG y VMA).

#### D - REGULACION DE LA LIBERACION DE LA NORADRENALINA POR ESTIMULACION NERVIOSA

A pesar de estar bien establecido desde hace varios años que la noradrenalina es el neurotransmisor adrenérgico periférico, y de conocerse su camino biosintético, los procesos de captación neuronal y extraneuronal y su metabolismo, recién en los últimos años se comenzó el estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la liberación del transmisor adrenérgico por estimulación nerviosa.

Cuando se estudia la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa es importante distinguir la cantidad total de transmisor liberado al espacio sináptico de la cantidad de transmisor liberado que se recoge en el efluente. En la Figura 2A, se representa con el número 1 la cantidad total de transmisor liberado por estimulación nerviosa, y con el número 5 la cantidad de noradrenalina, por sobre los valores basales, que se recoge en el efluente venoso de un órgano perfundido o en el baño de incubación de un órgano aislado durante y después del período de estimulación nerviosa. Como se muestra en la Figura 2A, los principales sitios de pérdida para la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa son: a) recaptación neuronal del transmisor liberado; b) captación extraneuronal de la noradrenalina; c) enzimas metabolizantes, catecol-O-metiltransferasa y monoaminoxidasa y d) unión a los receptores u otros sitios de pérdida.

En condiciones normales (por ej.: cuando ni los sitios de pérdida, ni las enzimas están inhibidas) el transmisor liberado que se mide representa una subestimación de la cantidad total de transmisor liberado por estimulación nerviosa (Fig.2A). Cuando uno o varios sitios de pérdida están inhibidos, aumenta la cantidad del neurotransmisor re cogido sin que haya cambios en la cantidad total de transmisor liberado (Fig.2B). En

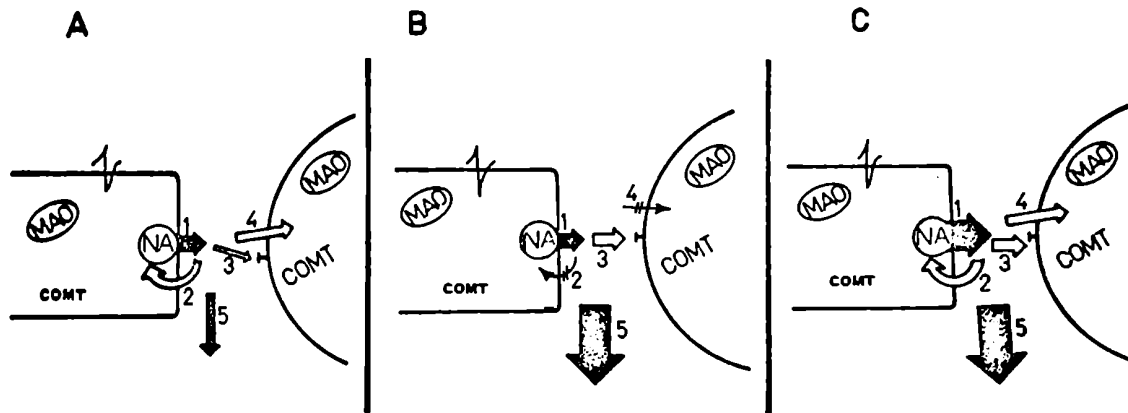


Figura 2.: Representación esquemática que distingue la cantidad total de neurotransmisor liberado al espacio sináptico por estimulación nerviosa (liberación) de la cantidad de neurotransmisor liberado que se recoge en el efluente (eflujo).

A: Normal

B: Condición en que aumenta la cantidad de transmisor que se recoge debido a la inhibición de sitios de pérdida, sin cambios en la cantidad real de transmisor liberado.

C: Condición en que aumenta la cantidad de transmisor que se recoge, debido a un aumento real en el transmisor liberado por estimulación nerviosa, sin inhibición de sitios de pérdida.

1: Cantidad de transmisor liberado por estimulación nerviosa.

2: Noradrenalina recaptada, por el terminal nervioso que puede ser almacenada en las vesículas o deaminada.

3: Fracción de la noradrenalina, disponible para la activación de los receptores del órgano efector.

4: Noradrenalina captada por los sitios extraneuronales y posteriormente metabolizada en su mayor parte por la COMT.

5: Noradrenalina que se recoge durante y después del período de estimulación nerviosa.

NA: noradrenalina MAO: monoamino oxidasa.

COMT: catecol O-metiltransferasa.

este caso el aumento en la cantidad de transmisor que se mide, es sólo debido al bloqueo de uno o más sitios de pérdida.

Un aumento en la cantidad total del transmisor que se mide se puede obtener cuando aumenta la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, sin estar inhibidos los sitios de pérdida (Fig.2C). Como será discutido más adelante se puede obtener un aumento en la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa mediante drogas que interfieren con el mecanismo que regula la liberación del transmisor.

Desde hace varios años, se ha observado que los bloqueantes alfa como la fenoxibenzamina y la fentolamina, aumentan la liberación del neurotransmisor inducida por estimulación nerviosa (Brown y Gillespie, 1957; Brown, Davies y Ferry, 1961; Kirpekar y Cervoni, 1963; Thoenen, Hürlimann y Haefely, 1964a, b; Haefely, Hürlimann y Thoenen, 1965). Inicialmente estos hallazgos fueron interpretados asumiendo que los receptores alfa del órgano efector eran un sitio importante de pérdida para el transmisor liberado. De acuerdo con esta hipótesis cuando los receptores alfa del órgano efector son ocupados por el agente bloqueante alfa, el transmisor liberado no se combinaría con los receptores y entonces aumentaría la cantidad recogida en el efluente sin cambios en la cantidad total del neurotransmisor liberado. Esta hipótesis fue discutida por varios autores dado que la fenoxibenzamina, en adición al bloqueo de los receptores alfa, es un potente inhibidor de la captación neuronal de noradrenalina. Thoenen, Hürlimann y Haefely, (1964a) concluyeron que el aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa, en presencia de fenoxibenzamina, no estaba relacionado con la habilidad de esta droga para bloquear los receptores alfa y que se debía a la inhibición de la captación neuronal de noradrenalina. Sin embargo, se encontró que en condiciones de inhibición de la captación neuronal por cocaína o desipramina, agentes que no bloquean los receptores alfa, los aumentos obtenidos en el transmisor liberado por estimulación nerviosa, no se observaban o eran muy pequeños (Blakely, Brown y Ferry, 1963; Geffen, 1965; Boullin, Costa y Brodie, 1967).

Dado que fenoxibenzamina previene el acceso del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa a las enzimas metabolizantes postsinápticas, se postuló a la captación extraneuronal como otro factor que contribuiría al aumento en la liberación del transmisor, obtenido en presencia de la droga (Langer, 1970; Langer y Vogt, 1971). Cuando se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa en presencia del bloqueante alfa adrenérgico fenoxibenzamina, se concluyó que, en adición a la inhibición de la captación neuronal y extraneuronal de noradrenalina, la fenoxibenzamina aumenta realmente la liberación del transmisor total liberado por estimulación nerviosa (Langer, 1970). A una conclusión similar llegaron Starke, Montel y Schllmann, (1971) quienes encontraron que los bloqueantes alfa adrenérgicos fenoxibenzamina y fentolamina, aumentaban la liberación del transmisor inducida por estimulación nerviosa en concentraciones que no inhibían la captación neuronal, ni extraneuronal de noradrenalina. Además De Potter, Chubb, Put y Schaepdryver, 1971, encontraron que en presencia de fenoxibenzamina, aumentaba la liberación de dopamina beta hidroxilasa por estimulación nerviosa, lo cual confirmaría que hay un aumento real en la liberación del transmisor en presencia del bloqueante alfa, dado que la dopamina beta hidroxilasa no es captada por el terminal adrenérgico.

El aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa en presencia de fenoxibenzamina se observó en un rango de concentraciones que bloquea los receptores alfa postsinápticos (Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972). No obstante, puede excluirse una relación causal entre el bloqueo de las respuestas del órgano efector por la fenoxibenzamina y el aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa, ya que se obtuvieron resultados similares en aurículas aisladas de cobayo (Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971) y en el corazón perfundido de conejo (Starke, Montel y Schllmann, 1971) donde los receptores que median la respuesta del órgano efector son del tipo beta. Esto llevó a varios autores a postular que la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, regularía su propia liberación por un mecanismo de retroinformación negativo, a

través de receptores alfa de localización presináptica que jugarían un papel fisiológico dentro de la neurotransmisión adrenérgica (Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Farnebo y Hamberger, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Enero y Langer, 1973; Langer, 1973, 1974b; Rand, Story, Allen, Glover y Mc Culloch, 1973; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Farah y Langer, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). De acuerdo con esta hipótesis el neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa inhibiría su propia liberación desencadenando un mecanismo de retroinformación negativa el cual llevaría a una disminución en la liberación del transmisor.

En apoyo de esta hipótesis se ha demostrado que la estimulación de los receptores presinápticos por agonistas alfa reduce la liberación del transmisor (Farnebo y Hamberger, 1971; Starke, 1971, 1972b; Langer, Enero, Adler-Graschinsky y Stefano, 1972; Kirpekar, Furchgott, Wakade y Prat, 1973; Langer, 1973; Starke, Montel, Gayle y Merker 1974). Por otra parte, el bloqueo de los receptores alfa presinápticos aumenta la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa (Brown y Gillespie, 1957; Langer, 1970; Langer, Enero, Stefano y Rothlin, 1970; Farnebo y Hamberger, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Starke, Montel y Schumann, 1971; Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Farah y Langer, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a).

En adición, ha sido postulado recientemente que receptores del tipo beta y de localización presináptica estarían involucrados en un mecanismo de retroinformación positivo, regulatorio de la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa (Langer, Adler-Graschinsky y Enero, 1974; Adler-Graschinsky y Langer, 1975). En consecuencia, existirían dos mecanismos presinápticos involucrados en la regulación de la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa. El primero, mediado por receptores beta, sería activado por concentraciones bajas de noradrenalina, originando un aumento en la liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa. El segundo, mediado a través de receptores adrenérgicos alfa, actuaría cuando se alcanzan concentraciones altas de noradrenalina en el espacio sináptico, dando lugar a una inhibición del transmisor li-

berado por estimulación nerviosa.

E -INHIBICION DE LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN PRESENCIA DE DIFERENTES COMPUESTOS.

La liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa en el sistema nervioso periférico, puede ser inhibida por un gran número de compuestos, tales como noradrenalina, dopamina, acetilcolina y prostaglandinas de la serie E. Este efecto sobre la neurotransmisión adrenérgica es debido a las acciones presinápticas de dichos agentes y aparentemente es mediado a través de sitios localizados en la membrana de los terminales nerviosos.

La inhibición de la liberación del transmisor adrenérgico por noradrenalina es mediada a través de receptores alfa presinápticos (Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Starke, 1972a, Kirpekar, Furchgott, Wakade y Prat, 1973; Langer, 1973; Langer 1974b; Starke, Montel, Gayk y Merker, 1974). Por otra parte, la inhibición de la liberación de noradrenalina inducida por dopamina es debida a la activación de receptores dopaminérgicos, los cuales son diferentes de los receptores alfa presinápticos (Langer, 1973; Mc Culloch, Rand y Story, 1973; Enero y Langer, 1975; Long, Heintz, Cannon y Kim, 1975).

La inhibición de la liberación de noradrenalina por acetilcolina es mediada a través de receptores muscarínicos (Loffelholz y Muscholl, 1969).

Las prostaglandinas de la serie E inhiben la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa en órganos de diferentes especies (Medqvist, 1970a, 1973, 1974; Wennmalm, 1971; Stjarne, 1972, 1973 a,b,c,d,e). Este efecto inhibitorio de las prostaglandinas aparentemente se debe a la reducción de la disponibilidad de calcio, necesaria para el acople eléctrico secretorio (Medqvist, 1973; Stjarne, 1973d) y no ha sido relacionado con receptores específicos.

La inhibición de la neurotransmisión adrenérgica por sustancias que normalmente pueden estar presentes en las sinapsis, puede reflejar un mecanismo regulatorio endógeno. Alternativamente estos efectos pueden ser de naturaleza farmacológica, sólo demostrables bajo ciertas condiciones experimentales.

Las evidencias experimentales indican que el bloqueo de los receptores alfa pre sinápticos aumentan la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa por un mecanismo regulatorio endógeno (Langer, 1970; Langer, Enero, Stefano y Rothlin, 1970; Farnebo y Hamberger, 1971; Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Starke, Montel y Wagner, 1971; Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Farah y Langer, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). En contraste con estos resultados, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos por pimozide (Enero y Langer, 1975) o de los receptores muscarínicos por atropina (Loffelholz y Muscholl, 1969) o la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por indometacina (Hoszowska y Panczenko, 1974) no aumenta la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa y reflejaría efectos de naturaleza farmacológica.

# METODOS



## METODOS

- A - DISECCION Y PERFUSION DEL BAZO DE GATO.
- B - PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y EL TEJIDO.
- C - SEPARACION POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LA NORADRENALINA Y SUS METABOLITOS.
- D - DETERMINACION FLUOROMETRICA DE LA NORADRENALINA.
- E - CURVAS DE DOSIS RESPUESTA A LA (-)-NORADRENALINA.
  - 1 - Controles
  - 2 - En presencia de distintas concentraciones de fenoxibenzamina
  - 3 - En presencia de prostaglandinas de la serie E<sub>2</sub>
- F - CURVAS DE FRECUENCIA RESPUESTA.
- G - DETECCION DE PROSTAGLANDINAS EN EL EFLUENTE VENOSO DEL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.
- II - DISEÑOS EXPERIMENTALES, correspondientes a los capítulos:
  - I - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.
  - II - MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.
  - III - EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA.
- I - CALCULOS
  - a) Determinación fluorométrica de noradrenalina.
  - b) Cálculo de la radiactividad presente en cada muestra.
  - c) Liberación fraccional por shock.
  - d) Definición de términos usados en el texto.

## MÉTODOS

El bazo perfundido de gato ha sido muy utilizado, para estudios sobre captación, liberación y metabolismo del neurotransmisor adrenérgico (Brown y Gillespie, 1957; Haefely, Hürlimann y Thoenen, 1965; Gillespie y Kirpekar, 1966; Kirpekar y Puig, 1971; Cubeddu, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). En un órgano perfundido el acceso de drogas al tejido y la liberación de sustancias tiene lugar a través de la circulación. En cambio en un órgano o tejido incubado "in vitro" las sustancias liberadas deben atravesar varias capas de tejido antes de llegar a la solución que la rodea. En un tejido perfundido el acceso del neurotransmisor liberado a los capilares sanguíneos es mucho más rápido y los resultados obtenidos pueden compararse mejor con las condiciones fisiológicas del tejido "in vivo" de allí que hallamos elegido el bazo perfundido, para realizar estos estudios.

### A. DISECCION Y PERFUSION DEL BAZO DE GATO.

Se usaron gatos de ambos sexos, cuyo peso estuvo comprendido entre 1.5 y 2.5 kg.

A los animales se les administró 0.5 mg de atropina (i.p.) en solución acuosa y luego se los anestesió con éter. Se les canalizó la vena femoral derecha y se realizó la traqueotomía. Se ligaron las carótidas, para reducir el flujo sanguíneo cerebral y en estas condiciones se expuso y seccionó la médula espinal, a la altura de la segunda vértebra cervical, luego de lo cual se procedió a la destrucción de la masa encefálica de acuerdo al método descrito por Burn (1952). Se mantuvo a los animales con respiración artificial por el resto de la operación.

Se abrió el abdomen y se resecaron las asas intestinales desde el duodeno medio hasta el recto. El bazo fue aislado, ligando y seccionando las conexiones vasculares que este órgano tiene con el estómago y se disecaron la arteria esplénica y la vena mesen-

térica superior. Se administró al animal 1.000 unidades de heparina por kg de peso (i.v.) con el objeto de evitar la formación de coágulos y luego de 10 minutos se ligaron y cortaron la arteria esplénica y la vena mesentérica superior. Dichos vasos fueron canulados y se colocó un par de electrodos de platino alrededor de la arteria esplénica con el objeto de estimular los nervios esplénicos que la inervan.

El bazo aislado y con sus vasos canulados se colocó en una cámara pletismográfica y se cubrió con vaselina. La temperatura de la preparación se mantuvo a 37°C, por medio de un termorregulador. El bazo se perfundió a volumen constante (7.5 ml/min) mediante una bomba de perfusión con solución de Krebs a 37°C. Los cambios de presión de perfusión fueron registrados a través de un manómetro de mercurio en un quimógrafo (Fig 3).

La composición de la solución de Krebs fue la siguiente (concentraciones milimolares): NaCl, 118.0; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.6; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0; glucosa, 11.1; Na<sub>2</sub>EDTA, 0.004 y ácido ascórbico 0.11. La solución se burbujeó continuamente con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> y se mantuvo a 37°C. En algunos grupos experimentales la concentración de calcio de la solución de Krebs se redujo a 0.65 ó 0.26 milimolar, sin realizar otros cambios en la composición de la solución.

Las estimulaciones se llevaron a cabo con un estimulador Grass S-44. Se aplicaron pulsos cuadrados de 0.1 msec de duración y con voltaje supramáximo.

En los casos que el diseño experimental lo requirió, luego del voltaje supramáximo, se marcaron los depósitos endógenos del bazo con una infusión de (-)-7-<sup>3</sup>H-noradrenalina (New England Nuclear Corporation, Boston; Mass; actividad específica 4.24 Ci/mM) durante 10 minutos, infundiendo a razón de 6 uCi/min (total perfundido: 60 uCi), luego se esperaron 80 minutos antes de comenzar con la recolección de muestras, con el objeto de lograr la estabilización de la salida espontánea de productos radiactivos.

#### B. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y EL TEJIDO.

El efluente venoso del bazo se recogió en tubos cónicos graduados, que se mantu-

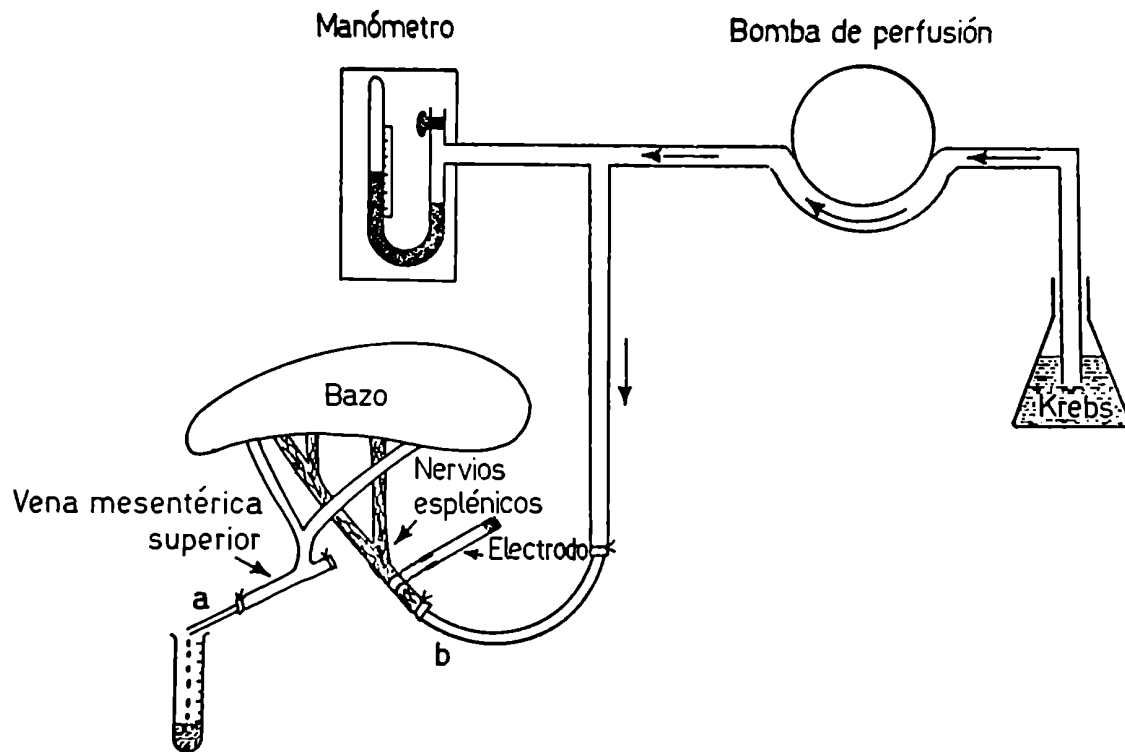


Figura 3: Representación esquemática del sistema de perfusión del bazo de gato.

El bazo aislado y con sus vasos canulados se perfundió en una cámara pletismográfica con solución de Krebs a 37°C y con burbujeo constante de oxígeno 95% y CO<sub>2</sub> 5%.

El bazo se perfundió a volumen constante 7.5 ml/min por medio de una bomba de perfusión.

Los cambios de presión de perfusión fueron registrados a través de una manómetro de mercurio en un quimógrafo.

Alrededor de la arteria esplénica se colocó un par de electrodos de platino, que fueron conectados a un estimulador Grass S44.

Cuando se interrumpió la perfusión del bazo, se impidió el paso del líquido de perfusión por medio de pinzas de Kocher que se colocaron en las cánulas a y b en forma simultánea. Al mismo tiempo se detuvo la bomba de perfusión.

vieron en frío. Se midió el volumen de cada muestra y luego se centrifugaron a aproximadamente 1.000 g durante 10 minutos con el objeto de separar los glóbulos rojos. Se tomó una muestra de 0.5 ml de cada tubo para determinar la radiactividad total de cada muestra, en los casos que el bazo había sido marcado con noradrenalina tritiada.

Para determinar el contenido de noradrenalina,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos se tomó 6 ml del sobrenadante de cada muestra y se le agregó 0.25 ml de HCl 1N, 0.1 ml de EDTA 10% y 0.1 ml de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  12.5%. Se las mantuvo a 0°C hasta su procesamiento.

Al final del experimento, el bazo se secó con papel de filtro, se pesó y se homogeneizó en 10 ml de ácido perclórico (0.4N) por gramo de peso. Esta solución contenía 1 mg de EDTA y 1.25 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  por mililitro. El homogenato se guardó a 4°C durante una hora y luego se centrifugó a aproximadamente 1.000 g durante 15 minutos. Una fracción del sobrenadante se usó para determinar el contenido total de radiactividad si el bazo había sido marcado con noradrenalina tritiada y otra fracción para determinar el contenido de noradrenalina y metabolitos.

#### C. SEPARACION POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LA NORADRENALINA Y SUS METABOLITOS

El método utilizado para la separación de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y sus  $^3\text{H}$ -metabolitos se basó en el uso sucesivo de columnas de alúmina y Dowex 50Wx4, según el método descrito por Graefe, Stefano y Langer (1973).

La alúmina (Merck A.G.) se preparó de acuerdo a lo descrito por Crout (1961) para lo cual se la trató dos veces en caliente (100°C) con HCl 2N. Se eliminó el ácido por sucesivos lavados con agua bidestilada y luego se realizó un último lavado con acetato de sodio 0.2N (pH 8.2). Posteriormente la alúmina se secó en estufa (80°C) y se la activó a 120°C durante una hora. La resina Dowex 50W x 4 (200-400 mesh) se lavó varias veces con NaOH 2N (1% de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) a 50°C hasta la desaparición del color amarillo del sobrenadante. Luego se la lavó sucesivamente con agua bidestilada, HCl 2N, agua bidestilada y finalmente fue equilibrada con HCl 0.01N (pH 2) .

Para la cromatografía se usaron columnas de 0.5 cm de diámetro que se cargaron con 200 mg de alúmina o con Dowex 50W x 4, hasta una altura de 1.5 cm.

Las columnas de alúmina se lavaron con 5 ml de acetato de sodio 0.2M (ajustado a pH 8.2) y las de resina con 2 ml de agua bidestilada antes de usarlas.

Las columnas de resina se reusaron. Para recuperarlas se las lavó sucesivamente con 10 ml de HCl 6N/etanol (v/v), 20 ml de HCl 2N, 20 ml de agua bidestilada y finalmente con 20 ml de HCl 0.01N.

La alúmina retiene compuestos catecólicos, por lo tanto se la usó para separar estos compuestos de los metabolitos O-metilados. La resina de intercambio catiónico, Dowex 50W x 4, fue utilizada para separar las bases (noradrenalina y normetanefrina) de los compuestos ácidos o neutros.

Una alícuota de la muestra a analizar se llevó a pH 8.2, por el agregado de buffer Tris-HCl (0.5M). La muestra ajustada a pH se pasó por la columna de alúmina. Posteriormente la columna fue lavada sucesivamente con 1 ml y luego 2 ml de agua bidestilada. El efluente de alúmina y los sucesivos lavados, que contienen los metabolitos O-metilados de la noradrenalina (NA): (NMN: normetanefrina; MOPEG: 3-metoxi 4-hidroxifenilglicol y VMA: ácido 3-metoxi 4-hidroximandélico) se dejó gotear sobre una columna de resina Dowex 50Wx4 equilibrada a pH 2. Los metabolitos O-metilados deaminados (MOPEG y VMA) no son retenidos por la resina y se recogieron junto con el lavado de la misma con 2 ml de agua destilada. Esta fracción se llamó ONDA (metabolitos O-metilados deaminados). Como la NMN queda retenida en la resina Dowex, se la eluyó con 2 porciones de 1 ml de una mezcla de etanol 6N HCl (v/v 1:1).

La noradrenalina (NA) y el 3,4-dihidroxifenilglicol (DOPEG) fueron eluidos de la columna de alúmina con 3 ml de ácido acético 0.2N, agregados en porciones de 1 ml. Dos mililitros de este eluato se pasaron por una columna de Dowex, 50W x 4 en la que quedó retenida la NA, mientras que el DOPEG se recogió en el efluente y en los 2 ml de agua de lavado. Se lavó la columna con 2 ml de agua que se descartaron y luego se eluyó la NA retenida con 2 ml de HCl 2N, que se agregaron en porciones de 1 ml por vez.

Las columnas de alúmina se lavaron con 4 ml de ácido acético 0.5N. Estos lavados eluyen aproximadamente un 5% de noradrenalina y un 5% de DOPEG y se descartaron con el objeto de minimizar la contaminación por estos dos catecoles, de la fracción de DOMA (ácido 3-4 dihidroximandélico). Finalmente el ácido deaminado, DOMA, se eluyó de la columna de alúmina por adición de 2 ml de HCl 0.2N, agregados en porciones de 1 ml.

Dos mililitros de cada fracción: NA, DOPEG, OMDA, NMN y DOMA fueron agregados a 12 ml de líquido centellador de la siguiente composición: 2-5 difeniloxazol (PPO), 5 g; 1-4 bis 2 (5 fenil-oxazolil) benceno (POPOP), 0.1 g; tolueno, 600 ml; tritón X 100, 300 ml y alcohol absoluto, 100 ml. La radiactividad de cada muestra se leyó en un contador de centelleo líquido, Packard.

El método empleado permitió la medición de noradrenalina y sus metabolitos con alta recuperación y reproducibilidad. La recuperación de cada fracción se determinó por la adición de 50 ug de cada metabolito a la muestra y se determinó la fluorescencia nativa (280/300 nm) de las fracciones correspondientes (Graefe, Stefano y Langer, 1973). Las recuperaciones obtenidas fueron las siguientes: NA:  $75.70 \pm 1.30\%$  (n=6); DOPEG:  $87.20 \pm 1.38\%$  (n=8); DOMA:  $88.70 \pm 1.31\%$  (n=6); NMN:  $96.00 \pm 1.46\%$  (n=6); MOPEG:  $96.00 \pm 1.05\%$  (n=6); VMA:  $91.30 \pm 1.09\%$  (n=4). Los resultados fueron corregidos por recuperación. No se practicó corrección sobre la fracción de OMDA ya que las recuperaciones individuales de los metabolitos que la forman son casi 100%. Se encontró una pequeña contaminación en la fracción de DOMA por noradrenalina ( $3.3 \pm 0.3\%$ , n=7) y por DOPEG ( $4.5 \pm 0.4\%$ , n=7). Por lo tanto los resultados de DOMA fueron corregidos por contaminación cruzada.

#### D. DETERMINACION FLUOROMETRICA DE LA NORADRENALINA

El contenido endógeno de noradrenalina en el tejido y líquido de perfusión se determinó sobre el eluato de alúmina (ácido acético 0.2N), para ello se utilizó el método de Laverty y Taylor (1968).

Una alícuota de 1 ml de eluato de alúmina (ácido acético 0.2N) se llevó a pH 6.5, con 0.2 ml de fosfato trisódico 0.5M. Posteriormente la muestra se oxidó durante 3 minutos con 50 ul de solución de iodo ( $I_2$ , 0.5 g%; IK, 5.5 g%). Se detuvo la oxidación con el agregado de 0.5 ml de una solución que contenía: HONa, 3N;  $Na_2SO_3$ , 12.5%; EDTA 10% (8:1:1 v/v). En este paso se produce la tautomerización de la noradrenalina. Luego de 5 minutos del agregado de la solución básica se llevó la muestra a un pH final de 4.8 agregando 0.2 ml de ácido acético glacial. En estas condiciones la fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman, entre las siguientes longitudes de onda: excitación 380 nm, emisión 480 nm.

En cada caso se realizó una curva de patrones internos (Pi) para lo cual se corrieron paralelamente y en iguales condiciones columnas con cantidades conocidas de noradrenalina. Las curvas de unidades de fluorescencia en función de los nanogramos de noradrenalina agregados a la columna fueron lineales en un rango comprendido entre 20 y 250 ng. Se determinó además la fluorescencia desarrollada por oxidación de muestras patrones (Pe) de noradrenalina que no habían sido pasadas por columnas, que se llamaron patrones externos (Pe). De esta forma se determinó la recuperación para la noradrenalina separada por columnas de alúmina:  $Pi/Pe \times 100$  que fue de  $86.7 \pm 1.9$  (n=5).

Los blancos correspondientes se realizaron sobre una alícuota de cada muestra, a la cual se le agregaron los mismos reactivos, pero para evitar la oxidación de la noradrenalina la solución de iodo se adicionó al final. A las unidades de fluorescencia de cada muestra, se les restó el blanco correspondiente y estos valores se transformaron en ng de noradrenalina utilizando los valores de recuperación de noradrenalina obtenidos en cada experimento.

#### E. CURVAS DE DOSIS RESPUESTA A LA (-)-NORADRENALINA

El bazo aislado sin electrodos se colocó en el pletismógrafo y se perfundió con solución de Krebs como ya se describió en la parte A de la sección métodos.



Una hora después del comienzo de la perfusión del bazo se determinó la curva de dosis respuesta a la (-)-noradrenalina, inyectando la droga a través de la cánula arterial. Esto se realizó por inyecciones secuenciales de dosis de noradrenalina, las que se aumentaron por un factor cercano a 3 hasta que se llegó al máximo de la curva. El intervalo entre cada inyección, fue el necesario para permitir que la presión de perfusión retorne al nivel que tenía antes de la inyección. De esta forma se realizaron curvas de dosis respuesta a la (-)-noradrenalina en las siguientes condiciones:

1) Controles. Luego de perfundir el bazo durante una hora se comenzó la curva de dosis respuesta a la (-) noradrenalina. En este grupo se realizaron dos curvas controles consecutivas separadas por un intervalo de 20 minutos. No se encontraron diferencias significativas entre la primera y la segunda curva de dosis respuesta a la (-) noradrenalina.

2) En presencia de distintas concentraciones de fenoxibenzamina. En este grupo se realizó una primera curva de dosis respuesta control a la (-) noradrenalina y una segunda, en presencia de fenoxibenzamina. La droga en la concentración requerida se agregó a la solución de Krebs 20 minutos antes de comenzar la segunda curva, y se mantuvo hasta el final del experimento.

3) En presencia de prostaglandina de la serie E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Cuando las curvas de dosis respuesta a la (-) noradrenalina se realizaron en presencia de prostaglandina E<sub>2</sub>, esta droga se agregó 10 minutos antes de comenzar la curva de dosis respuesta y se mantuvo hasta el final del experimento. En este grupo sólo se realizó una curva de dosis respuesta a la (-) noradrenalina en presencia de PGE<sub>2</sub>.

Las curvas de dosis respuesta a la (-) noradrenalina en presencia de PGE<sub>2</sub> se repitieron para dos concentraciones de calcio distintas: 0.26 y 2.6 mM. Se realizaron curvas de dosis respuestas controles en presencia de las mismas concentraciones de calcio.

Antes de realizar las curvas de dosis respuesta, el bazo fue perfundido durante 1 hora con solución de Krebs que contenía la concentración de calcio correspondiente.

#### F. CURVAS DE FRECUENCIA-RESPUESTA

El bazo aislado, con sus vasos canulados y los electrodos colocados sobre la arteria, se colocó en el pletismógrafo y se perfundió con solución de Krebs como ya se describió en la parte A de la sección Métodos. La curva de frecuencia-respuesta se comenzaba una hora después de determinado el voltaje supramáximo. Los nervios fueron estimulados con frecuencias crecientes. Se comenzaba con 0.25 Hz y se aumentaba la frecuencia por un factor de 2, hasta que dos frecuencias distintas dieron igual respuesta. Para cada frecuencia de estimulación aplicada se registraron las respuestas presoras. Se estimuló el tiempo necesario para alcanzar el máximo de respuesta a cada frecuencia. Entre dos estimulaciones se esperaba que la presión de perfusión retornara al nivel basal.

#### G. DETECCION DE PROSTAGLANDINAS EN EL EFLUENTE VENOSO DEL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

Las prostaglandinas presentes en el efluente venoso del bazo perfundido de gato, se determinaron por ensayo biológico sobre espirales de fundus gástrico de rata. Los espirales fueron disecados según el método descrito por Vane (1957). Luego se fijaron al fondo de un baño de órgano aislado de 10 ml. Se conectó la parte superior de los espirales a un transductor de fuerza (Grass FT03) y la tensión desarrollada por el músculo se registró en un polígrafo Grass.

La tensión de reposo del músculo fue repetidamente ajustada a 1.5 g y se llegó a estabilizar luego de 30 a 40 min. Los espirales de estómago de rata se insensibilizaron a la acetilcolina, 5 hidroxitriptamina y catecolaminas por exposición a una solución de Krebs que contenía los siguientes antagonistas (concentración micromolar): bromhidrato de escopolamina, 0.26; maleato de metisergide, 0.41, clorhidrato de propranolol, 33.0 y fenoxibenzamina, 2.9. Esta solución contenía además indometacina (0.9  $\mu$ M) que se agregó con el objeto de inhibir la liberación de prostaglandinas del tejido. La temperatura de la solución de Krebs que contenía los bloqueantes se mantuvo a 37°C y se burbujeó con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. En estas condiciones se ensayaron, las muestras provenientes del efluente venoso del bazo de gato, para determinar el contenido de prostaglandinas.

El bazo de gato se aisló y se perfundió con solución de Krebs como se describió en la parte A de la sección Métodos. Una hora después de determinado el voltaje supramáximo, se contraía el bazo cada 30 minutos por (-)noradrenalina exógena (3 ug) inyectada a través de la cánula arterial o por estimulación nerviosa a 5 Hz durante 60 segundos.

Se recogieron muestras de dos minutos del efluente venoso del bazo antes, durante y después de la contracción esplénica. Las muestras fueron centrifugadas con el objeto de separar los glóbulos rojos a 1000 g durante 10 minutos y se mantuvieron a 37°C hasta el momento en que fueron ensayadas sobre los espirales de estómago de rata, para determinar el contenido de prostaglandinas. La tensión desarrollada por los espirales de estómago de rata en respuesta a las prostaglandinas contenidas en las muestras fueron comparadas con las respuestas obtenidas por concentraciones patrones de prostaglandinas de la serie E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>. Estos resultados se obtuvieron interpolando el valor de tensión desarrollada por la muestra incognita entre los valores obtenidos por dos concentraciones de prostaglandinas de la serie E<sub>1</sub> o E<sub>2</sub>.

## H. DISEÑOS EXPERIMENTALES

### I - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

Para realizar estos experimentos el bazo fue aislado y se marcaron sus depósitos endógenos con (-)-7-<sup>3</sup>H-NA, según se describió en la parte A de la sección Métodos.

Una vez estabilizada la liberación basal de productos radiactivos (80 minutos) se comenzaba con el experimento:

IA - Metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada espontáneamente y retenida en el tejido. Se tomaron muestras de 1 minuto del eflujo basal de radiactividad antes de cada período de estimulación nerviosa, en las que se determinó el contenido de no-

radrenalina,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos, según se describió en las partes B, C y D de la sección Métodos.

Sobre una alícuota del homogeneizado del tejido se determinó la cantidad de noradrenalina,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos retenidos.

IB - Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en el bazo perfundido de gato. En el grupo control los nervios fueron estimulados a distintas frecuencias (0.5, 1, 2, 5, 10 y 30 Hz) durante el tiempo necesario para completar 300 estímulos por período de estimulación. Entre el final del período de estimulación a una frecuencia y el comienzo del período de estimulación a la frecuencia siguiente, hubo un intervalo de 16 minutos.

Se estudió el efecto de drogas: cocaína, fentolamina y fenoxibenzamina. En este grupo se realizaron 3 estimulaciones controles a 1, 5 y 30 Hz separadas por un intervalo de 16 minutos. Luego se repitieron las estimulaciones en presencia de la droga en estudio. La droga se disolvió en Krebs y se perfundió desde 21 minutos antes del comienzo de las estimulaciones hasta el final del experimento.

Antes de cada estimulación se recogió una muestra de un minuto del efluente venoso que se tomó como liberación basal. También se recogieron muestras de un minuto durante y después del período de estimulación nerviosa.

Se determinó el contenido de noradrenalina,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y metabolitos en cada muestra según se describió en las partes B, C y D de la sección Métodos.

Se registraron, además, los cambios en presión de perfusión como medida de la vasoconstricción durante la estimulación nerviosa.

IC - Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. En estos experimentos los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos o a 10 Hz durante 30 segundos, completando en ambos casos un total de 300 pulsos por período de estimulación.

Luego de la primera estimulación control  $S_1$  se realizó otra estimulación ( $S_2$ ) durante la cual la perfusión del bazo fue interrumpida durante 60 segundos. Esto se lle

vó a cabo ocluyendo la cánula arterial y la venosa (ver Fig.3 a, b) durante 1 minuto desde el comienzo de la estimulación. Los períodos de estimulación  $S_1$  y  $S_2$  estuvieron separados por 20 minutos.

En iguales condiciones se realizaron experimentos en presencia de cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ), droga que fue agregada a la solución de Krebs desde 15 minutos antes de  $S_1$  y se mantuvo hasta el final del experimento.

En algunos experimentos controles se realizaron los períodos de estimulación control a 5 Hz ó 10 Hz, sin agregado de drogas.

Se recogieron muestras de 1 minuto antes, durante y después del período de estimulación nerviosa hasta que la liberación de radiactividad retornó a los valores basales.

Se determinó el contenido de noradrenalina,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos en cada muestra según se describió en la parte B, C y D de la sección Métodos.

Se registraron los cambios en presión de perfusión como medida de la vasoconstricción durante la estimulación nerviosa.

## II - MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

En estos experimentos, cuando fue necesario se marcaron los depósitos endógenos del bazo con (-)-7- $^3\text{H}$ -NA, según se describió en la parte A de la sección Métodos.

Estabilizada la liberación basal de productos radiactivos (80 minutos) se comenzaba con el experimento:

IIA - Mecanismo de retroinformación positiva mediado a través de receptores beta de localización presináptica. En este grupo los nervios fueron estimulados cada 31 minutos a 1 Hz durante 120 segundos, completando un total de 120 estímulos por período de estimulación. Se realizaron siete períodos de estimulación en cada experimento ( $S_1$  a  $S_7$ ) sin el agregado de drogas a la solución de Krebs.

Cuando se estudió el efecto del (-) isoproterenol, sobre la liberación de noreadrenalina inducida por estimulación nerviosa, la droga se adicionó a la solución de Krebs 10 minutos antes de realizar las estimulaciones  $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$  para dar una concentración final de 0.14, 1.4 y 14 nM respectivamente. Las estimulaciones  $S_1$ ,  $S_2$  fueron los controles y  $S_6$ ,  $S_7$  los lavados dentro de cada experimento.

Cuando se estudió el efecto del (-) propranolol (0.1  $\mu$ M), esta droga se agregó a la solución de Krebs 22 minutos antes de  $S_2$  y se mantuvo hasta el final del experimento ( $S_7$ ). La estimulación  $S_1$  fue el control dentro de cada experimento.

Se estudió, además, el efecto del isoproterenol, en condiciones en las cuales se bloquearon los receptores beta, con (-) propranolol (0.1  $\mu$ M). En estos experimentos, luego de la primera estimulación control ( $S_1$ ), se agregó propranolol a la solución de Krebs, desde 22 minutos antes de  $S_2$  y se mantuvo hasta el final del experimento ( $S_7$ ). Se estudió el efecto de 0.14, 1.4 y 14 nM de isoproterenol, agregando la droga en la concentración requerida a la solución de Krebs 10 minutos antes de  $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$  respectivamente.

Se recogieron muestras de 1 minuto, antes, durante y después de la estimulación nerviosa hasta que la liberación de radiactividad retornó a los valores basales. En estos experimentos se determinó la radiactividad total de cada muestra y la retenida en el tejido al final del experimento, según se describe en la sección B de Métodos.

IIB - Mecanismos de retroinformación negativa mediado a través de receptores alfa de localización presináptica. Influencia de la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada. Luego de la marcación del bazo, los nervios esplénicos fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos ( $S_5$ ) y 23 minutos más tarde a 30 Hz durante 10 segundos ( $S_{30}$ ). Se aplicaron un total de 300 estímulos por período de estimulación. Luego de estos dos períodos de estimulación se agregó fenoxibenzamina (2.9  $\mu$ M) al medio de perfusión y se mantuvo hasta el final del experimento. Veintidos minutos después de iniciada la perfusión con la droga, se repitieron los dos períodos de estimulación nerviosa a 5 Hz ( $S'_5$ ) y a 30 Hz ( $S'_{30}$ ) con igual intervalo de tiempo que en el

período control. Se realizaron experimentos controles en los cuales los 4 períodos de estimulación se repitieron sin agregado de droga al medio de perfusión.

Experimentos similares se llevaron a cabo en presencia de noradrenalina exógena (0.18  $\mu$ M). La noradrenalina se adicionaba al medio de perfusión 10 minutos antes de los períodos de estimulación nerviosa a 5 Hz ( $S'_5$ ) ó 30 Hz ( $S'_{30}$ ). Se realizaron además experimentos con igual diseño, pero donde los nervios fueron estimulados primero a 1 Hz durante 300 segundos y luego a 2 Hz durante 150 segundos. En los controles los 4 períodos de estimulación se repitieron sin agregado de drogas.

Los experimentos con fenoxibenzamina o noradrenalina se llevaron a cabo en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión (2.6 y 0.26 mM). Cuando los experimentos se realizaron con 0.26 mM de calcio, la solución de Krebs con dicha concentración de calcio se perfundió desde una hora antes de la primera estimulación y se mantuvo hasta el final del experimento.

Se recogieron muestras de 1 minuto del efluente venoso antes, durante y después de cada período de estimulación nerviosa, hasta que los niveles de radiactividad retornaron a valores basales. En estos experimentos se determinó la radiactividad de cada muestra y la retenida en el tejido al final del experimento, según se describe en la sección B de Métodos.

IIC - Diferencia en la potencia bloqueante de la fenoxibenzamina sobre los receptores alfa adrenérgicos pre y postsinápticos. Treinta minutos después de realizado el voltaje supramáximo los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos ( $S_5$ ) y 21 minutos más tarde a 30 Hz durante 10 segundos ( $S_{30}$ ). Se aplicó un total de 300 estímulos en cada período de estimulación nerviosa. Después de los dos períodos de estimulación control, se adicionó fenoxibenzamina al medio de perfusión y se la mantuvo hasta el final del experimento. Veintiun minutos después del comienzo de la perfusión con fenoxibenzamina se aplicaron dos períodos de estimulación nerviosa a 5 Hz ( $S'_5$ ) y a 30 Hz ( $S'_{30}$ ) con el mismo intervalo de tiempo que en los controles. En cinco experimentos se repitieron los cuatro períodos de estimulación sin adición de drogas al medio de perfusión.

Se recogieron muestras de un minuto del efluente venoso antes, durante y después de los períodos de estimulación nerviosa hasta que la liberación de noradrenalina retornó a los niveles basales.

Se determinó el contenido de noradrenalina en cada muestra para lo cual fueron procesadas según se describe en la parte B, C y D de la sección Métodos.

Se registraron los cambios de presión de perfusión como una medida de la vasoconstricción durante la estimulación nerviosa.

### III - EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA.

El bazo fue preparado y perfundido según se describió en la parte A de la sección Métodos.

El primer período de estimulación ( $S_5$ ) se aplicó 120 min después de comenzada la perfusión del bazo. Una hora después de realizado el voltaje supramáximo los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos ( $S_5$ ) y 21 minutos más tarde a 30 Hz durante 10 segundos ( $S_{30}$ ). Se aplicó un total de 300 shocks por período de estimulación.

Después de los dos períodos de estimulación control, se adicionó indometacina al medio de perfusión y se la mantuvo hasta el final del experimento. Veintifun minutos después del comienzo de la perfusión con indometacina, se aplicaron dos períodos de estimulación a 5 Hz ( $S'_5$ ) y a 30 Hz ( $S'_{30}$ ), que fueron repetidos con igual intervalo de tiempo que en los períodos controles. Se realizaron experimentos donde los cuatro períodos de estimulación se repitieron sin agregado de drogas al medio de perfusión.

Experimentos similares se llevaron a cabo en presencia de prostaglandina  $E_2$  (0.28  $\mu$ M). La prostaglandina  $E_2$  se adicionó al medio de perfusión 11 minutos antes de que los nervios fueran estimulados a 5 Hz ( $S'_5$ ) o a 30 Hz ( $S'_{30}$ ). Los experimentos con indometacina o prostaglandina  $E_2$  se repitieron en presencia de distintas concentraciones de calcio (2.6, 0.65 y 0.26 mM) en el medio de perfusión. Cuando se usó 0.65 ó 0.26 mM de calcio, la solución de Krebs con la correspondiente concentración de calcio se perfundió desde una hora antes del primer período de estimulación nerviosa ( $S_5$ ) y



y se mantuvo hasta el final del experimento.

En otro grupo de experimentos, se aplicaron los cuatro períodos de estimulación nerviosa después de perfundir el bazo por dos horas adicionales con solución de Krebs que contenía la concentración de calcio normal (2.6 mM). En estos experimentos el primer período de estimulación ( $S_5$ ) se aplicó 240 minutos después de comenzada la perfusión del bazo con la solución de Krebs. En estas condiciones se estudió el efecto de la indometacina sobre la liberación del transmisor inducida por estimulación nerviosa.

Se recogieron muestras de un minuto antes, durante y después del período de estimulación nerviosa, hasta que los niveles de noradrenalina retornaron a los valores basales. En cada muestra se determinó el contenido endógeno de noradrenalina como se describió en la parte B, C y D de la sección Métodos.

Con el objeto de estudiar, el efecto de diferentes concentraciones de indometacina, sobre la liberación de tritio total y noradrenalina se realizó un grupo de experimentos donde se marcaron los depósitos endógenos del bazo con (-)-7- $^3\text{H}$ -NA según se describió en la parte A de la sección Métodos. Una vez estabilizada la liberación basal de radiactividad (80 minutos) los nervios fueron estimulados cada 28 minutos a 5 Hz durante 60 segundos, completando un total de siete períodos de estimulación consecutivos ( $S_1 - S_7$ ). En el grupo control todos los períodos de estimulación se llevaron a cabo, sin la adición de drogas al medio de perfusión. En un segundo grupo de experimentos, luego de los dos períodos de estimulación control ( $S_1$  y  $S_2$ ), se adicionaron concentraciones crecientes de indometacina al medio de perfusión. La droga se adicionó a la solución de Krebs 2 minutos antes de la estimulación  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$  y  $S_6$ , dando una concentración final de 2.8, 8.4, 28 y 84  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Se recogieron muestras de un minuto antes, durante y después de la estimulación nerviosa hasta que la liberación de radiactividad retornó a los valores basales. En estos experimentos se determinó el contenido de  $^3\text{H}$ -total y noradrenalina, en las muestras y en el tejido al final del experimento. Las muestras fueron procesadas según se describió en la parte B, C y D de la sección Métodos.

Se registraron los cambios de presión de perfusión como una medida de la vasoconstricción durante la estimulación nerviosa.

## I. CALCULOS

### a) Determinación fluorométrica de noradrenalina.

Se determinaron las unidades de fluorescencia de las muestras incógnitas, de los patrones internos y externos y de los blancos. Aplicando la siguiente fórmula se obtienen los nanogramos de noradrenalina, presentes en cada muestra incógnita.

$$\text{ng de NA en cada muestra: } \frac{\text{VM (ml)} \times (\text{UF}_M - \text{UF}_B) \times \text{Pi (ng)}}{\text{VC (ml)} (\text{UF}_{Pi} - \text{UF}_{Pe})}$$

$$\% \text{ de Recuperación de la columna: } \frac{(\text{UF}_{Pi} - \text{UF}_B)}{(\text{UF}_{Pe} - \text{UF}_B)} \times 100$$

VM: Volumen de la muestra

VC: Volumen de la muestra que se pasó por la columna

UF<sub>M</sub>: unidades de fluorescencia de la muestra incógnita

UF<sub>B</sub>: unidades de fluorescencia del blanco

UF<sub>Pi</sub>: unidades de fluorescencia del patrón interno

UF<sub>Pe</sub>: unidades de fluorescencia del patrón externo

Pi (ng): Cantidad patrón de noradrenalina agregada a la columna.

### b) Cálculo de la radiactividad presente en cada muestra.

La cantidad de radiactividad presente en una muestra se especifica utilizando la unidad denominada "Curie". El Curie se define como la cantidad de material radiactivo en la que se producen  $2.22 \times 10^{12}$  desintegraciones por minuto (dpm).

La radiactividad presente en cada muestra, se midió en un contador de centelleo, cuya unidad de medida son las cuentas por minuto. Se transformó las cuentas por minuto en valores absolutos de radiactividad (nCi), para lo cual se utilizó la eficiencia de lectura. La eficiencia con que fueron leídas las muestras se determinó midiendo la radiactividad de una cantidad de agua tritiada de actividad absoluta conocida en iguales condiciones que la muestra cuya radiactividad se quería conocer.

$$\text{Eficiencia \% (Ef)}: \frac{\text{cpm}}{\text{nCi } ^3\text{H}_2\text{O}} \times 100$$

cpm: cuentas por minuto

nCi  $^3\text{H}_2\text{O}$ : nanocuries presentes en la cantidad de agua tritiada utilizada para determinar la eficiencia.

$$\text{Radiactividad en cada muestra (nCi)}: \frac{(\text{cpm}) \times \text{Vm (ml)} \times 100}{\text{Ef} \left( \frac{\text{cpm}}{\text{nCi}} \right) \text{VL (ml)}}$$

VM: Volumen de cada muestra

VL: Volumen utilizado para medir la radiactividad

Para calcular la radiactividad en cada una de las fracciones metabólicas, se tuvo en cuenta: el volumen de cada muestra (VM), el volumen pasado por columna (VC), el volumen total de cada fracción metabólica (VF), el Volumen utilizado para medir radiactividad (VL), la eficiencia de medida de radiactividad para cada fracción ( $\text{Ef}_f$ ) y los valores de recuperación para cada fracción. Cuando fue necesario se corrigió por contaminación cruzada.

c) Liberación fraccional por shock.

Quando la radiactividad total liberada, se expresa como liberación fraccional por shock, se debe conocer la cantidad total de nCi liberados desde el comienzo del experi

mento y los retenidos por el tejido al final del experimento.

Para determinar la liberación fraccional por shock, se calculó la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, a la que se le sustrajo la liberación espontánea de radiactividad asumiendo que durante y después de la estimulación nerviosa, hay eflujo espontáneo de radiactividad. El valor de liberación espontánea que se sustrajo a las muestras de estimulación y postestimulación fue el valor de radiactividad espontánea obtenida en la muestra recogida inmediatamente antes de comenzar el período de estimulación nerviosa. La liberación total de radiactividad fue expresada como la fracción de radiactividad total remanente en el tejido:  $^3\text{H}$ -total liberado por shock dividido por el  $^3\text{H}$ -total remanente en el tejido en el momento de la estimulación. La radiactividad total remanente en el tejido en el momento de la estimulación fue determinada en cada experimento, sumando la radiactividad remanente en el tejido al final del experimento a la radiactividad recogida en todas las muestras desde el comienzo de cada estimulación hasta el final del período de recolección de muestras.

d) Definición de términos usados en el texto

Noradrenalina liberada por estimulación nerviosa: Suma del incremento obtenido por sobre los valores basales, en las muestras recogidas durante y después de la estimulación nerviosa.

Radiactividad del eflujo espontáneo: nCi liberados en condiciones de reposo nervioso.

Radiactividad total liberada por estimulación nerviosa: Suma del incremento en radiactividad (nCi) por sobre los valores basales en las muestras recogidas durante y después de la estimulación nerviosa, hasta que el eflujo de radiactividad retornó a valores basales.

Radiactividad liberada "durante" la estimulación nerviosa: Suma del incremento en radiactividad (nCi) por sobre los valores basales, en las muestras recogidas "durante" la estimulación nerviosa.

Radiactividad liberada "después" de la estimulación nerviosa: Suma del incremento en radiactividad (nCi) por sobre los valores basales en las muestras recogidas "después" del período de estimulación nerviosa.

En todos los casos, se asumió que durante y después de la estimulación nerviosa el eflujo espontáneo de noradrenalina y metabolitos no se modificó. Por ello se sustrajo el valor de liberación espontánea a las muestras obtenidas durante y después del período de estimulación nerviosa. Las definiciones enunciadas son válidas tanto para la liberación de radiactividad total,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos.

Los cálculos estadísticos fueron realizados de acuerdo a los procedimientos convencionales (Snedecor y Cochran, 1967).

# CAPITULO I

METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.\_

RESULTADOS

DISCUSION

I - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

IA - Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada espontáneamente y retenida en el tejido.

Resultados

Discusión

IB - Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Resultados

- 1.- Respuestas vasculares y liberación fraccional por shock como una función de la frecuencia de estimulación.
- 2.- Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada del bazo perfundido de gato a diferentes frecuencias de estimulación nerviosa.
- 3.- Secuencia temporal del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada a diferentes frecuencias de estimulación nerviosa.
- 4.- Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.
- 5.- Efecto de fentolamina y fenoxibenzamina sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Discusión

IC - Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Resultados

- 1.- Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 5 y 10 Hz en condiciones controles.
- 2.- Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa durante la interrupción de la perfusión.

Discusión

I - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

INTRODUCCION

El metabolismo de la noradrenalina tritiada liberada espontáneamente y por estímulo nervioso en tejidos que han sido previamente marcados con el neurotransmisor tritiado, se debe a la actividad de las enzimas pre y postsinápticas.

Tanto en preparaciones de órganos incubados "in vitro" (Langer, 1970; Su y Bevan, 1970; Roffler-Tarlov y Langer, 1971; Langer, Enero y Stefano, 1972; Adler-Graschinsky, Langer y Rubio, 1972; Levin, 1972; Graefe, Stefano y Langer, 1973; Langer, 1974a; Langer y Enero, 1974; Stefano, Pereg y Tumilasci, 1974; Luchelli-Fortis y Langer, 1974, 1975; Langer, Adler-Graschinsky, Almeida y Diniz, 1975) como en preparaciones de órganos perfundidos (Starke, Montel y Schümann; 1971; Cubeddu, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974) una gran proporción de la noradrenalina liberada espontáneamente o por estímulo nervioso se recoge en forma de metabolitos del neurotransmisor.

El glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG ( $^3\text{H}$ - 3,4 dihidroxifenilglicol) es el principal metabolito del eflujo espontáneo en la mayor parte de los tejidos adrenérgicos periféricos y se debe a la actividad de las enzimas presinápticas, sobre la  $^3\text{H}$ -noradrenalina que se pierde desde los gránulos al citoplasma neuronal (Graefe, Stefano y Langer, 1973; Langer 1974a; Cubeddu, Langer y Weiner, 1974; Enero y Langer, 1974; Stefano, Pereg y Tumilasci, 1974; Luchelli-Fortis y Langer, 1974, 1975). Por otra parte, durante la estimulación nerviosa, la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG se debe a la actividad presináptica de la monoamino oxidasa y aldehído reductasa, sobre el transmisor liberado que ha sido recaptada por el terminal nervioso adrenérgico (Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Langer y Enero, 1974).

Langer (1970) sugirió que el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa podría ser inversamente proporcional a la frecuencia de



estimulación nerviosa. Por lo tanto, nosotros estudiamos la influencia de la frecuencia de estimulación sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. En adición, para cada frecuencia de estimulación nerviosa, se analizó el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada durante y después del período de estimulación, en condiciones controles, con inhibición de la captación neuronal y extraneuronal y con bloqueo de los receptores alfa pre y postsinápticos.

En un órgano perfundido, un aumento (Hertting, 1964) o una disminución (Kirpekar y Puig, 1971) del flujo, pueden modificar la captación y la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa. Por lo cual, se analizó la influencia de la interrupción de la perfusión del bazo sobre la liberación y metabolismo del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa.

IA - Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada espontáneamente y retenida en el tejido.

Resultados

En el bazo perfundido de gato, el  $5.97 \pm 0.59\%$  (n=14) del eflujo espontáneo de radiactividad le correspondió a la noradrenalina, mientras que el 94% restante estuvo formado por los metabolitos del neurotransmisor. El metabolito más importante liberado espontáneamente, fue  $^3\text{H}$ -3,4 dihidroxifenilglicol ( $^3\text{H}$ -DOPEG) que contribuyó con el 65%, mientras que a la  $^3\text{H}$ -normetanefrina y a los  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados, les correspondió el  $6.29 \pm 0.55\%$  (n=14) y  $19.85 \pm 0.93$  (n=14) respectivamente (Tabla 1). El metabolismo vía el metabolito ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA) fue menor del 2%.

Cuando se usó cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ), en una concentración que inhibe la captación neuronal de noradrenalina del bazo perfundido en un 70% (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) aumentó significativamente la proporción de noradrenalina liberada en el eflujo espontáneo, pero no se modificó el metabolismo del neurotransmisor en presencia de la droga (Tabla 1).

En presencia de fentolamina (3.1  $\mu\text{M}$ ), que no modifica la captación neuronal de noradrenalina (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974), no se encontraron cambios en la proporción de metabolitos liberados espontáneamente.

Por otra parte en presencia de fenoxibenzamina, 29  $\mu\text{M}$ , que inhibe tanto la captación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974), como extraneuronal de noradrenalina (Gillespie, Hamilton y Hosie, 1970) tampoco se modificó el metabolismo del neurotransmisor liberado espontáneamente.

En la Tabla 2, se muestran los porcentajes para la noradrenalina y los metabolitos retenidos en el tejido. A pesar de la baja proporción de noradrenalina liberada espontáneamente, de la radiactividad total retenida en el tejido más del 90% le correspondió a la  $^3\text{H}$ -noradrenalina. De los metabolitos retenidos el más importante es el  $^3\text{H}$ -ácido 3,4-dihidroxi mandélico. Como ha sido observado en otros tejidos, en el bazo perfundido, se retiene preferentemente el metabolito ácido,  $^3\text{H}$ -DOMA.

Liberación espontánea (a)	n	Porcentaje de la radiactividad total				
		NA %	ONDA %	NMN %	DOMA %	DOPEG %
Controles	14	5.97 ± 0.59	19.85 ± 0.93	6.29 ± 0.55	1.90 ± 0.22	65.98 ± 1.10
COC (2.9 µM)	3	10.23 ± 2.05*	17.00 ± 0.85	5.03 ± 0.38	1.20 ± 0.25	66.47 ± 2.08
FENT (3.1 µM)	3	4.73 ± 0.61	20.10 ± 3.50	6.25 ± 0.77	0.54 ± 0.39	68.30 ± 4.31
FBA (29 µM)	3	8.13 ± 1.01	18.17 ± 0.67	6.23 ± 0.34	0.67 ± 0.27	66.77 ± 1.17

Tabla 1. Metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada espontáneamente en el bazo perfundido de gato.

a) Se muestran los valores de cada fracción, como porcentaje de la radiactividad total liberada espontáneamente.

ONDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina.

DOMA: <sup>3</sup>H-ácido 3,4-dihidroximandélico DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina

COC: cocaína FENT: fentolamina FBA: fenoxibenzamina

n: número de observaciones por grupo.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\* p < 0.025 cuando se compara con el control correspondiente.

Tejido (a)		Porcentaje de la radiactividad total				
		NA %	OMDA %	NNN %	DONA %	DOPEG %
Controles	4	91.1 ± 1.3	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	3.2 ± 1.0	0.7 ± 0.2
COC (2.9 µM)	3	93.4 ± 0.4	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.3
FENT (3.1 µM)	3	93.4 ± 1.5	2.6 ± 0.7	1.9 ± 0.5	1.5 ± 0.8	0.8 ± 0.3
FBA (29 µM)	3	92.4 ± 1.3	2.2 ± 0.2	3.2 ± 0.7	1.2 ± 1.1	1.3 ± 0.2

Tabla 2 Distribución porcentual de la <sup>3</sup>H-noradrenalina y sus metabolitos en el tejido al final del experimento.

a) Se muestran los valores de cada fracción metabólica como porcentaje de la radiactividad total retenida en el tejido al final del experimento.

OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados      NNN: <sup>3</sup>H-normetanefrina

DONA: <sup>3</sup>H-ácido 3,4-dihidroxi mandélico      DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxi fenilglicol      NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina

COC: cocaína      FENT: fentolamina      FBA: fenoxibenzamina

n: número de observaciones por grupo.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

### Discusión

Cuando se perfunde el bazo con cantidades trazadoras de noradrenalina tritida, un 70% de la amina es captada por los terminales nerviosos y se retiene selectivamente en las vesículas sinápticas (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974). Al terminar la marcación del tejido, luego de un período durante el cual el eflujo de productos radiactivos es rápido, se llega a un estado de equilibrio durante el cual el eflujo de radiactividad es lento y se mantiene por varias horas. Se asume que el eflujo de radiactividad durante la fase lenta representa el metabolismo espontáneo de la amina que ha sido captada y retenida en los gránulos de almacenamiento y por lo tanto reflejaría el metabolismo endógeno de la noradrenalina en condiciones de reposo (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974).

Aproximadamente, el 94% del eflujo espontáneo de tritio durante la fase lenta, es imputable a metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina. Como ha sido descrito para otros tejidos adrenérgicos, en el bazo perfundido de gato menos del 6% de la radiactividad liberada durante el eflujo espontáneo, se debe a la  $^3\text{H}$ -noradrenalina.

Cuando se analizó el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina en el eflujo espontáneo, se encontró que el glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG, representó más del 60% de la radiactividad liberada. Este metabolito es el principal camino metabólico del neurotransmisor que se libera espontáneamente en el bazo perfundido de gato (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974), en el conducto deferente de rata (Langer, 1970; Graefe, Stefano y Langer, 1973), en las aurículas aisladas de cobayo (Adler-Graschinsky, Langer y Rubio, 1972; Luchelli-Fortis y Langer, 1974, 1975; Langer, Adler-Graschinsky, Almeida y Diniz, 1975), en aurículas aisladas de rata (Roffler-Tarlov y Langer, 1971), en glándulas submaxilares de rata (Stefano, Perek y Tumilasci, 1974), en la membrana nictitante aislada de gato (Langer y Enero, 1974) y en el corazón perfundido de gato (Langer, 1974a).

Concentraciones de cocaína y fenoxibenzamina que inhiben la recaptación neuronal de noradrenalina, no modificaron la proporción del glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG, liberado espontáneamente. Estos resultados indicarían que el  $^3\text{H}$ -DOPEG liberado en el eflujo espontáneo, se originaría a nivel presináptico, por la actividad de la monoamino oxidasa y de la aldehído reductasa, sobre la  $^3\text{H}$ -noradrenalina que se pierde de los gránulos de almacenamiento y pasa al citoplasma del terminal nervioso. En apoyo de estos resultados Adler-Graschinsky, Langer y Rubio (1972) encontraron que la inhibición selectiva de la monoamino oxidasa presináptica con bretilio, reduce significativamente el eflujo espontáneo de  $^3\text{H}$ -DOPEG, en las aurículas aisladas de cobayo. En adición, dichos autores encontraron que la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada, por exposición de las aurículas de cobayo al agente tipo reserpínico Ro4-1284 fue metabolizada selectivamente a  $^3\text{H}$ -DOPEG.

Mientras que el  $^3\text{H}$ -DOPEG fue el principal metabolito del eflujo espontáneo, al catecol ácido,  $^3\text{H}$ -DOMA, le correspondió menos del 2% del total liberado.

En el bazo perfundido de gato y en nuestras condiciones experimentales la fracción de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados representó aproximadamente el 20% de la radiactividad del eflujo espontáneo, mientras que la normetanefrina contribuyó con menos del 7%. Cuando se utilizó fenoxibenzamina en una concentración que inhibe la captación neuronal y extraneuronal de noradrenalina, los valores de liberación espontánea para la  $^3\text{H}$ -normetanefrina y los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados no difirieron significativamente de los valores obtenidos en condiciones controles.

De nuestros resultados podemos concluir que los metabolitos liberados espontáneamente en el bazo perfundido de gato se formarían a nivel presináptico por la acción combinada de las enzimas monoamino oxidasa, catecol O-metiltransferasa, aldehído reductasa y aldehído dehidrogenasa (Fig 21). En apoyo de nuestros resultados, los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada espontáneamente serían también de origen presináptico, en la membrana nictitante de gato y en el conducto deferente de rata (Langer, 1974a). Sin embargo, en un trabajo reciente, realizado en el

bazo perfundido de gato, se concluye que los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados y la  $^3\text{H}$ -normetanefrina liberados espontáneamente se formarían principalmente por la actividad de las enzimas extraneuronales (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974).

En el bazo perfundido de gato la  $^3\text{H}$ -noradrenalina representó más del 90% de la radiactividad retenida en el tejido, lo cual indicaría que los metabolitos no se retienen. Si bien el  $^3\text{H}$ -DOPEG representó más del 60% del eflujo espontáneo de radiactividad, este metabolito representó menos del 1% de la radiactividad retenida en el tejido. Por otra parte, el metabolito ácido  $^3\text{H}$ -DOMA que fue la fracción menos importante del eflujo espontáneo, fue el principal metabolito retenido en el tejido. El tratamiento previo del tejido con cocaína, fentolamina o fenoxibenzamina no modificó significativamente la proporción de  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos retenidos en el tejido respecto de los controles. Estos resultados enfatizan el hecho que la medición del metabolismo en el tejido, no refleja el camino metabólico de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada espontáneamente.

IB - Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Resultados

1.- Respuestas vasculares y liberación fraccional por shock, como una función de la frecuencia de estimulación. En la Figura 4 se muestra una curva de frecuencia respuesta a la estimulación nerviosa que fue obtenida estimulando a cada frecuencia hasta obtener una meseta, según se describe en la parte F de la sección Métodos. Entre el rango de frecuencias comprendido entre 1 y 16 Hz se observa una relación lineal entre las respuestas vasculares y la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada.

Cuando los nervios esplénicos fueron estimulados con frecuencias crecientes, en condiciones en que se mantuvo constante el número de estímulos aplicados (300 shocks), hubo un aumento marcado en las respuestas vasculares a la estimulación nerviosa, cuando la frecuencia varió entre 1 y 5 Hz (Fig 5A). Bajo estas condiciones experimentales no se encontraron diferencias significativas en los valores de liberación fraccional por shock para las frecuencias de estimulación nerviosa, comprendidas entre 0.5 y 10 Hz. No obstante, dentro de este rango de frecuencias, la liberación de  $^3\text{H}$ -total, mostró una tendencia a aumentar, a medida que se aumentó la frecuencia, aunque las diferencias no fueron significativas. Cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz, la liberación fraccional por shock fue significativamente mayor que la obtenida para frecuencias menores (Fig 5B, Tabla 3).

La inhibición de la captación neuronal por cocaína, 2.9  $\mu\text{M}$  (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) no modificó significativamente la liberación fraccional por shock a ninguna de las frecuencias utilizadas, 1, 5 y 30 Hz. No obstante, cuando se comparó estos valores, con los obtenidos en los controles, se observó que la liberación de  $^3\text{H}$ -total inducida por estimulación nerviosa a 30 Hz, fue menor que en los controles (Tabla 3).



En presencia de 3.1  $\mu\text{M}$  de fentolamina, aumentó significativamente la liberación fraccional por shock, con respecto a los controles, para las tres frecuencias de estimulación (Tabla 3). Si bien el aumento en el  $^3\text{H}$ -total liberado fue  $7.94 \pm 1.48$  veces a 1 Hz (n=3) y  $8.28 \pm 1.09$  veces a 5 Hz (n=3), cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz, el aumento obtenido en presencia de fentolamina fue solo de  $2.82 \pm 0.30$  veces (n=3).

La concentración de fenoxibenzamina empleada, 29  $\mu\text{M}$ , inhibe la captación neuronal de noradrenalina, además de bloquear los receptores alfa (Cubeddu, Langer, y Weiner, 1974). La exposición a esta concentración de fenoxibenzamina incrementó significativamente la liberación del transmisor a las tres frecuencias de estimulación empleadas (Tabla 3). Como ha sido observado para la fentolamina, el aumento en el  $^3\text{H}$ -total inducido por estimulación nerviosa, en presencia de fenoxibenzamina fue más pronunciado a 1 y 5 Hz, que a 30 Hz (Tabla 3).

2.- Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada del bazo perfundido de gato a diferentes frecuencias de estimulación nerviosa. La  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada sin metabolizar representó entre un 50 y un 60% del aumento total en radiactividad, inducido por estimulación nerviosa por sobre los valores basales (Fig 6) para un rango amplio de frecuencias (0.5 a 30 Hz). El glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG fue el principal metabolito de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa para todas las frecuencias estudiadas. Los  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados y la  $^3\text{H}$ -normetanefrina representaron una pequeña fracción del aumento total en radiactividad inducido por estimulación nerviosa (Fig 6). En estas condiciones (es decir: cuando el aumento en radiactividad obtenido durante y después del período de estimulación nerviosa fueron considerados conjuntamente) no hubo diferencias significativas en el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada, cuando se compararon las diferentes frecuencias de estimulación (Fig 6).

Una imagen diferente surge cuando se analiza separadamente el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada durante y después del período de estimulación nerviosa. Como se observa en la Figura 7, el porcentaje del transmisor liberado que fue recogido como  $^3\text{H}$ -metabolitos durante el período de estimulación nerviosa disminuyó progresivamente cuando se aumentó la frecuencia de estimulación de 0.5 a 5 Hz. Para las frecuencias de estimulación mayores que 5 Hz, más del 90% de la radiactividad liberada durante el período de estimulación fue  $^3\text{H}$ -noradrenalina (Fig 7). En contraste con estos resultados el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina recogida después del período de estimulación nerviosa, no se modificó en función de la frecuencia de estimulación aplicada en el período previo (Fig 8). De la radiactividad liberada después de la estimulación nerviosa la mayor parte se debió a los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina. El glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG fue el principal metabolito formado, correspondiéndole más del 50% de la radiactividad total recogida en ese período (Fig 8). Bajo estas condiciones experimentales, la  $^3\text{H}$ -noradrenalina representó entre el 10 y el 20% de la radiactividad liberada después del período de estimulación nerviosa mientras que el remanente estuvo formado por la fracción de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados y en menor extensión por la  $^3\text{H}$ -normetanefrina. (Fig. 8).

3.- Secuencia temporal del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada a diferentes frecuencias de estimulación nerviosa. Como se ha mostrado en los párrafos anteriores, hay una diferencia notable entre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en las muestras recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa (Comparar Figs. 7 y 8). El análisis de la secuencia temporal del metabolismo de la noradrenalina tritiada liberada por estimulación nerviosa se llevó a cabo midiendo la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos presentes en muestras de un minuto del efluente venoso, recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa a diferentes frecuencias.

Como se muestra en la Tabla 4, la fracción de la radiactividad total recogida después del período de estimulación nerviosa aumentó progresivamente, cuando la frecuencia de estimulación se incrementó de 0.5 Hz a 5 Hz. Cuando los nervios fueron estimulados a 10 ó 30 Hz la fracción de la radiactividad total recogida después de la estimulación nerviosa fue similar o menor que la obtenida a 5 Hz (Tabla 4). No obstante, debe hacerse notar que cuando la estimulación nerviosa se llevó a cabo a 10 ó 30 Hz, la primer muestra de un minuto, recogida desde el comienzo de la estimulación incluyó 30 y 50 segundos del período posterior a la estimulación, respectivamente. En consecuencia, en nuestras condiciones experimentales, solo se obtuvo una relación válida entre la frecuencia de estimulación y la proporción del  $^3\text{H}$ -total liberado que se recogió después de la estimulación para las frecuencias de estimulación comprendidas entre 0.5 y 5 Hz.

En la Figura 9 se muestra la distribución porcentual de los compuestos tritados ( $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos) liberados durante y después de la estimulación nerviosa, a 0.5 Hz. Durante los 10 minutos de estimulación nerviosa, la  $^3\text{H}$ -noradrenalina no metabolizada representó aproximadamente el 50% de la radiactividad total, mientras que el  $^3\text{H}$ -DOPEG contribuyó con el 25% de la radiactividad. En contraposición con este resultado, en las muestras recogidas después de la estimulación, hubo un rápido incremento en la proporción del glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG, mientras que la fracción de  $^3\text{H}$ -noradrenalina declinó rápidamente (Fig 9). La contribución de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados y  $^3\text{H}$ -normetanefrina, a la radiactividad liberada por estimulación nerviosa fue pequeña en las muestras recogidas durante y después de la estimulación a 0.5 Hz (Fig 9).

Cuando se realizaron estudios similares bajo condiciones en las cuales los nervios fueron estimulados a 1 ó 2 Hz, se encontró que durante el período de estimulación nerviosa la  $^3\text{H}$ -noradrenalina representó entre el 75 y el 90% de la radiactividad total (Fig 10). Como ya ha sido observado para 0.5 Hz, aquí también incrementó la proporción de  $^3\text{H}$ -DOPEG en las muestras obtenidas después de la estimulación (Fig 10). En adición, tanto a 1 Hz como a 2 Hz hubo un aumento marcado

en la fracción de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados después de la estimulación nerviosa. El aumento en la fracción de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados fue posterior al aumento observado para la fracción de  $^3\text{H}$ -DOPEG. Por otra parte fue muy pequeña la contribución de la  $^3\text{H}$ -normetanefrina en las muestras recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa (Fig 10).

Cuando los nervios fueron estimulados a 5, 10 ó 30 Hz, de la radiactividad liberada durante el primer minuto le correspondió a la  $^3\text{H}$ -noradrenalina más del 90% (Fig 11). Por otra parte, en las muestras obtenidas después de la estimulación el  $^3\text{H}$ -DOPEG, representó la principal fracción, correspondiéndole el 50% de la radiactividad total liberada en este período (Fig 11). Como fue observado para las frecuencias de estimulación menores, en las muestras obtenidas después de la estimulación aumentó la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados, los que aparecieron después que la fracción de  $^3\text{H}$ -DOPEG (Fig 10 y 11).

Es de interés hacer notar que el aumento en la proporción de  $^3\text{H}$ -DOPEG en las muestras recogidas después de la estimulación, fue observado en valores porcentuales y en valores absolutos (Fig 12). El aumento en el  $^3\text{H}$ -DOPEG liberado después de la estimulación fue más pronunciado cuando se aplicaron frecuencias altas de estimulación nerviosa en el período previo. En adición, aún para la tercera muestra recogida después de terminado el período de estimulación nerviosa, los valores para el glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG, permanecieron sobre los niveles basales obtenidos para este metabolito antes de la estimulación (Fig 12). Estos resultados indicarían que en nuestras condiciones experimentales, la contribución del glicol deaminado, a la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa fue ligeramente subestimada.

En la Figura 13 se muestran los valores absolutos para la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados obtenida antes, durante y después de los períodos de estimulación nerviosa a diferentes frecuencias. Como ha sido mostrado para el  $^3\text{H}$ -DOPEG, en las muestras obtenidas después de la estimulación aumentaron los nCi de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados liberados y estos valores absolutos se mantuvieron sobre los niveles basales, aún en la tercera muestra posterior a la estimulación. En consecuencia, la contribución de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-meti-

lados deaminados a la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, fue también subestimada particularmente para las frecuencias mayores de 2 Hz (Fig 13).

4.- Efectos de la cocaína sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. La concentración de cocaína empleada en estos experimentos, 2.9  $\mu\text{M}$ , inhibe casi completamente la captación neuronal de  $^3\text{H}$ -noradrenalina en el bazo perfundido de gato (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974). Como se muestra en la Figura 14, en presencia de cocaína, se inhibió completamente la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG, a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 1, 5 y 30 Hz. Bajo estas condiciones experimentales, se redujo la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados, reducción que fue significativa a 5 Hz. Además se observó un pequeño incremento en la  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir del transmisor tritiado liberado por estimulación nerviosa que no llegó a ser significativa (Fig 14 y Tabla 5). En la Tabla 5, se observa que en presencia de cocaína 2.9  $\mu\text{M}$  aumentó significativamente la proporción de  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Cuando se analizó la distribución porcentual de la radiactividad liberada durante el período de estimulación nerviosa, en presencia de cocaína, se observó que la  $^3\text{H}$ -normetanefrina fue el único metabolito que contribuyó a la radiactividad liberada por estimulación nerviosa (Fig 15A). Cuando la estimulación nerviosa se llevó a cabo a 1 Hz, la exposición a la cocaína aumentó significativamente la proporción de  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada sin metabolizar, dado que la droga previno la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG durante la estimulación nerviosa (Fig 15A). Después de la estimulación nerviosa la cocaína también previno la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG y redujo la formación de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados. Por otra parte hubo un pequeño incremento en la cantidad de  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada (Fig 15B).

La secuencia temporal del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 1, 5 y 30 Hz en presencia de 2.9  $\mu\text{M}$  de cocaína se muestra en la Figura 16. La  $^3\text{H}$ -noradrenalina sin metabolizar representó casi el 100% de la radiactividad liberada durante el período de estimulación nerviosa y permaneció

como la fracción principal después de la estimulación, para las tres frecuencias utilizadas. La proporción de  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa aumentó progresivamente después de la estimulación, mientras que la contribución de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados fue muy pequeña excepto cuando la estimulación se llevó a cabo a 1 Hz (Fig 16). Es de interés hacer notar que en presencia de cocaína, 2.9  $\mu\text{M}$ , la liberación fraccional de radiactividad no se modificó con respecto a los controles sin droga (Tabla 3).

La prevención por cocaína, de la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa fue demostrada recientemente en el bazo perfundido de gato (Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974) y en la membrana nictitante aislada de gato (Langer y Enero, 1974).

La contribución de los  $^3\text{H}$ -metabolitos a la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa fue calculada substrayendo a cada fracción, la liberación basal de radiactividad obtenida en el período anterior a la estimulación nerviosa. Justificando esta metodología, en la Figura 17, se puede observar que en presencia de cocaína y durante la estimulación nerviosa a 1 Hz y 5 Hz, la liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -DOPEG no se redujo, a pesar que en estas condiciones experimentales, se previno completamente la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Resultados similares fueron obtenidos para la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados, es decir, no se observó disminución durante la estimulación nerviosa y sólo hubo un pequeño incremento en las muestras obtenidas después de la estimulación.

5.- Efectos de fentolamina y fenoxibenzamina sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. La contribución porcentual de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y sus  $^3\text{H}$ -metabolitos a la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa en presencia de 3.1  $\mu\text{M}$  de fentolamina ó 29  $\mu\text{M}$  de fenoxibenzamina se muestra en la Figura 18. En presencia de 3.1  $\mu\text{M}$  de fentolamina, el

$^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa aumentó 8 veces a 1 y 5 Hz y casi 3 veces a 30 Hz (Tabla 3). Bajo estas condiciones experimentales, hubo una pequeña reducción en la contribución porcentual, de los  $^3\text{H}$ -metabolitos a la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa a 1, 5 y 30 Hz (Fig. 18). El análisis estadístico de experimentos pareados, en los cuales se estudió el efecto de 3.1  $\mu\text{M}$  de fentolamina, sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, se muestra en la Tabla 6. Se observó un incremento significativo en la fracción de  $^3\text{H}$ -noradrenalina, en presencia de fentolamina, para las tres frecuencias de estimulación estudiadas. Simultáneamente, la contribución de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados se redujo significativamente (Tabla 6). En estos experimentos la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa se redujo significativamente, cuando los nervios fueron estimulados a 5 Hz en presencia de fentolamina. Cuando la estimulación se llevó a cabo a 1 Hz, la fentolamina no redujo la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG, mientras que a 30 Hz la reducción no alcanzó a ser significativa (Tabla 6). Es de interés recalcar que durante la exposición a fentolamina hubo un incremento significativo en la fracción de radiactividad recogida durante la estimulación nerviosa a 1, 5 y 30 Hz (Tabla 8). No obstante, el aumento en el transmisor liberado durante el período de estimulación fue más pronunciado a 5 Hz. Es posible que haya una correlación entre la disminución de la fracción de radiactividad en las muestras recogidas después de la estimulación a 5 Hz y la reducción en la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG que se obtuvo en estas condiciones (Comparar Tablas 6 y 8).

Es de interés hacer notar, que en presencia de fentolamina los valores absolutos del  $^3\text{H}$ -DOPEG liberado durante la estimulación nerviosa a 1 Hz fueron mayores que aquellos observados en el grupo control correspondiente (Comparar Figs. 12 y 19). Un aumento similar fue obtenido para los valores absolutos de la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados durante la estimulación nerviosa a 1 Hz en presencia de fentolamina (Comparar Figs 13 y 19). A pesar

del aumento de 3 veces en la radiactividad total liberada a 30 Hz en presencia de fenoxibenzamina (Tabla 3) los valores absolutos del  $^3\text{H}$ -DOPEG y de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados obtenidos durante y después de la estimulación nerviosa fueron menores que aquellos obtenidos en el grupo control (Comparar Figs. 12, 13 y 19).

La secuencia temporal del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 1, 5 y 30 Hz, en presencia de fentolamina, se muestra en la Figura 19. A pesar del aumento marcado observado en el  $^3\text{H}$ -total liberado en presencia de fentolamina (Tabla 3), la distribución porcentual de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y del  $^3\text{H}$ -DOPEG en las muestras obtenidas después de la estimulación nerviosa fue similar a la observada en el grupo control para las tres frecuencias de estimulación aplicadas: 1, 5 y 30 Hz (Fig 20). Es de interés, hacer notar que el incremento rápido en la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG después de la estimulación fue observado también en presencia de fentolamina (Comparar Figs. 9, 10, 11 y 20).

En los experimentos llevados a cabo en presencia de 29  $\mu\text{M}$  de fenoxibenzamina se observó una inhibición casi completa en el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa (Fig. 18). En estas condiciones experimentales el aumento en el  $^3\text{H}$ -total liberado fue similar al obtenido en presencia de 3.1  $\mu\text{M}$  de fentolamina (Tabla 3). El análisis estadístico de experimentos pareados llevados a cabo en presencia de 29  $\mu\text{M}$  de fenoxibenzamina, concentración que inhibe la captación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) y extraneuronal de noradrenalina (Gillespie, Hamilton y Hosie, 1970), se muestran en la Tabla 7, Se observó un incremento significativo en la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, a 1, 5 y 30 Hz, que representó el 97% de la radiactividad total liberada (Tabla 7). Simultáneamente se redujo marcadamente, la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados aunque la reducción sólo fue significativa cuando la estimulación se llevó a cabo a 30 Hz. Tanto la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG, como la de  $^3\text{H}$ -normetanefrina se redujo significativamente con respecto a los controles, para las tres frecuencias analizadas.



La actividad específica del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa a 5 Hz, fue  $3.58 \pm 0.60$  nCi/ng (n=4) y  $2.82 \pm 0.93$  nCi/ng (n=4) en la primera y última estimulación nerviosa respectivamente, en experimentos donde se realizaron seis estimulaciones sucesivas. Dichos valores no difirieron significativamente del obtenido en el tejido al final del experimento  $2.08 \pm 0.77$  nCi/ng (n=4) (Langer y Dubocovich, observaciones no publicadas). El hecho que la actividad específica del neurotransmisor retenido en el tejido y del liberado por estimulación nerviosa no difieran significativamente reflejaría una marcación homogénea de los depósitos endógenos de noradrenalina, por el neurotransmisor tritiado.

Estos resultados justificarían la metodología utilizada en este trabajo donde se determinó el metabolismo del neurotransmisor liberado espontáneamente y por estímulo nervioso, de la noradrenalina tritiada almacenada en el tejido. Se asumió por lo tanto, que el camino metabólico del neurotransmisor tritiado refleja el de la noradrenalina fría, almacenada en las vesículas sinápticas.

Grupo Experimental		Liberación fraccional por shock ( $\times 10^{-5}$ ) (a)		
		1 Hz	5 Hz	30 Hz
Controles	14	6.31 $\pm$ 0.88	9.04 $\pm$ 1.45	18.55 $\pm$ 2.92 <sup><math>\gamma</math></sup>
COC (2.9 $\mu$ f)	3	6.08 $\pm$ 0.07	6.57 $\pm$ 2.34	12.86 $\pm$ 2.10
FENT (3.1 $\mu$ M)	3	43.46 $\pm$ 2.23 <sup><math>\beta</math></sup>	73.67 $\pm$ 7.31 <sup><math>\beta\delta</math></sup>	50.09 $\pm$ 8.72 <sup><math>\beta</math></sup>
FBA (29 $\mu$ M)	3	67.01 $\pm$ 8.74 <sup><math>\beta</math></sup>	66.00 $\pm$ 10.19 <sup><math>\beta</math></sup>	36.85 $\pm$ 9.66 <sup><math>\alpha</math></sup>

Tabla 3 : Efectos de cocaína, fentolamina y fenoxibenzamina sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

a) Radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, expresada como la fracción de radiactividad tisular liberada por shock ( $\times 10^{-5}$ ). Para detalles, ver Métodos.

Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

COC: cocaína FENT: fentolamina FBA: fenoxibenzamina

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

$\alpha$   $p < 0.05$ ;  $\beta$   $p < 0.001$  cuando se compara con el control correspondiente.

$\gamma$   $p < 0.01$ ;  $\delta$   $p < 0.025$  cuando se compara con el valor obtenido en el período de estimulación anterior, dentro del mismo grupo.

Frecuencia de estimulación (Hz) (a)	n	Porcentaje de la radiactividad total liberada	
		Durante la estimulación nerviosa (b)	Después de la estimulación nerviosa (c)
0.5	3	87.41 ± 1.15	12.59 ± 1.15
1	14	79.52 ± 1.94	20.38 ± 1.94
2	6	67.32 ± 2.56	32.67 ± 2.56
5	14	46.17 ± 2.06	53.82 ± 2.06
10	3	48.41 ± 2.80	51.58 ± 2.80
30	14	69.24 ± 2.16	30.75 ± 2.16

Tabla 4: Porcentaje de la radiactividad total liberada en las muestras recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa a diferentes frecuencias

a) Frecuencia de estimulación aplicada, expresada en Hz. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación (0.1 msec, voltaje supramáximo).

El tiempo de estimulación fue de 10 minutos para la frecuencia de 0.5 Hz y de 10 segundos para la frecuencia de 30 Hz.

b) Porcentaje de la radiactividad total liberada en las muestras recogidas durante el período de estimulación nerviosa.

c) Porcentaje de la radiactividad total liberada en las muestras recogidas después del período de estimulación nerviosa.

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

Frecuencia de estimulación (a)	Grupo Experimental	Porcentaje de la radiactividad total (b)			
		NA	ONDA	NMN	DOPEG
1 Hz	CONT	73.5 ± 1.6	5.0 ± 1.1	4.6 ± 0.4	17.1 ± 2.5
	COC	92.3 ± 1.2***	2.4 ± 0.9	5.3 ± 0.3	0
5 Hz	CONT	63.2 ± 2.7	6.0 ± 0.1	4.9 ± 1.1	24.5 ± 2.7
	COC	90.7 ± 0.7***	1.4 ± 0.7**	7.7 ± 0.9	0
30 Hz	CONT	69.3 ± 5.1	5.8 ± 1.2	5.5 ± 0.8	18.5 ± 4.4
	COC	89.5 ± 3.1*	2.4 ± 1.8	7.9 ± 1.4	0

Tabla 5 : Efecto de la cocaína sobre el metabolismo del transmisor liberado por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias.

a) Frecuencia de estimulación aplicada en cada período. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

b) <sup>3</sup>H-noradrenalina y <sup>3</sup>H-metabolitos liberados por estimulación nerviosa, expresado como porcentaje de la radiactividad total liberada.

NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina ONDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina

DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol. Los valores obtenidos para el ácido 3,4-dihidroximandélico (DOMA) fueron menores del 1%.

CONT: controles (n=3); COC: cocaína, 2.9 μM (n=3). La droga fue adicionada 21 minutos antes de la estimulación nerviosa y se mantuvo hasta el final del experimento.

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

Frecuencia de estimulación (a)	Grupo Experimental	Porcentaje de la radiactividad total (b)				
		NA	OMDA	NMN	DOPEG	
1 Hz	CONT	71.8 ± 0.5	8.2 ± 1.0	5.7 ± 1.4	14.0 ± 2.4	
	FENT	78.3 ± 1.5*	3.3 ± 0.1**	2.9 ± 0.2	14.8 ± 1.5	
5 Hz	CONT	56.5 ± 2.3	9.8 ± 0.8	4.7 ± 0.7	26.5 ± 0.5	
	FENT	85.5 ± 1.1***	3.3 ± 0.5**	3.0 ± 0.7	7.7 ± 0.5***	
30 Hz	CONT	77.6 ± 2.4	5.8 ± 0.8	4.2 ± 0.8	11.4 ± 2.0	
	FENT	88.1 ± 0.9**	2.1 ± 0.3**	3.4 ± 1.1	5.8 ± 0.6	

Tabla 6 : Efecto de la fentolamina sobre el metabolismo del transmisor liberado por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias.

a) Frecuencia de estimulación aplicada en cada período. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

b) <sup>3</sup>H-noradrenalina y <sup>3</sup>H-metabolitos liberados por estimulación nerviosa, expresado como porcentaje de la radiactividad total liberada.

NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados NMN: <sup>3</sup>H-norretanefrina

DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol. Los valores obtenidos para el ácido 3,4-dihidroximandélico (DOMA) fueron menores del 1%.

CONT: controles (n=3); FENT: fentolamina 3.1 μM (n=3). La droga fue adicionada 21 minutos antes de la estimulación nerviosa y se mantuvo hasta el final del experimento.

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media. \*p < 0.025; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.005; \*\*\*\*p < 0.001 cuando se compare con el control correspondiente.

Frecuencia de estimulación (a)	Grupo Experimental	Porcentaje de la radiactividad total (b)				
		NA	ONDA	NIN	DOPEG	
1 Hz	CONT	70.9 ± 1.9	5.8 ± 1.8	4.9 ± 0.9	18.2 ± 1.4	
	FBA	96.6 ± 1.0****	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2*	1.1 ± 0.8****	
5 Hz	CONT	62.9 ± 4.3	7.8 ± 2.7	4.4 ± 0.6	23.3 ± 2.3	
	FBA	98.3 ± 0.4****	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1***	0.5 ± 0.1****	
30 Hz	CONT	73.8 ± 4.4	5.3 ± 0.7	6.1 ± 0.5	14.2 ± 3.4	
	FBA	97.2 ± 1.0**	0.7 ± 0.1***	0.5 ± 0.1****	0.5 ± 0.2*	

Tabla 7 : Efecto de la fenoxibenzamina sobre el metabolismo del transmisor liberado por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias.

a) Frecuencia de estimulación aplicada en cada período. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

b) <sup>3</sup>H-noradrenalina y <sup>3</sup>H-metabolitos liberados por estimulación nerviosa, expresado como porcentaje de la radiactividad total liberada.

NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina ONDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados NIN: <sup>3</sup>H-normetanefrina

DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxiifenilglicol. Los valores obtenidos para el ácido 3,4-dihidroxi mandélico fueron menores del 1% .

CONT: controles (n=3) FBA: fenoxibenzamina 29 uM (n=3). La droga fue adicionada 21 minutos antes de la estimulación nerviosa y se mantuvo hasta el final del experimento.

n; número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.025; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.005; \*\*\*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

Grupo Experimental		% de la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa a)					
		1 Hz		5 Hz		30 Hz	
		Durante	Después	Durante	Después	Durante	Después
Control	3	77.46 ± 2.16	22.54 ± 2.16	40.69 ± 1.81	59.30 ± 1.81	74.87 ± 2.47	25.12 ± 2.47
FENT 3.1 uM	3	85.99 ± 1.02*	14.01 ± 1.02*	71.39 ± 0.81**	28.61 ± 0.81**	86.12 ± 0.46*	13.87 ± 0.46*

Tabla 8 : Efecto de la fentolamina sobre el porcentaje de la radiactividad total liberada en las muestras recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa.

a) Porcentaje de la radiactividad total en las muestras recogidas durante y después de los períodos de estimulación nerviosa, para las distintas frecuencias de estimulación aplicadas. Los nervios fueron estimulados a 1 Hz durante 300 seg, 5 Hz durante 60 seg, 30 Hz durante 10 seg (0.1 mseg, volteje supramáximo).

FENT : fentolamina (3.1 uM). La droga se adicionó 21 minutos antes del período de estimulación nerviosa y permaneció presente hasta el final del experimento.

n: número de experimentos. Se muestran valores medios ± el error standard de la media.

\*p < 0.025; \*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

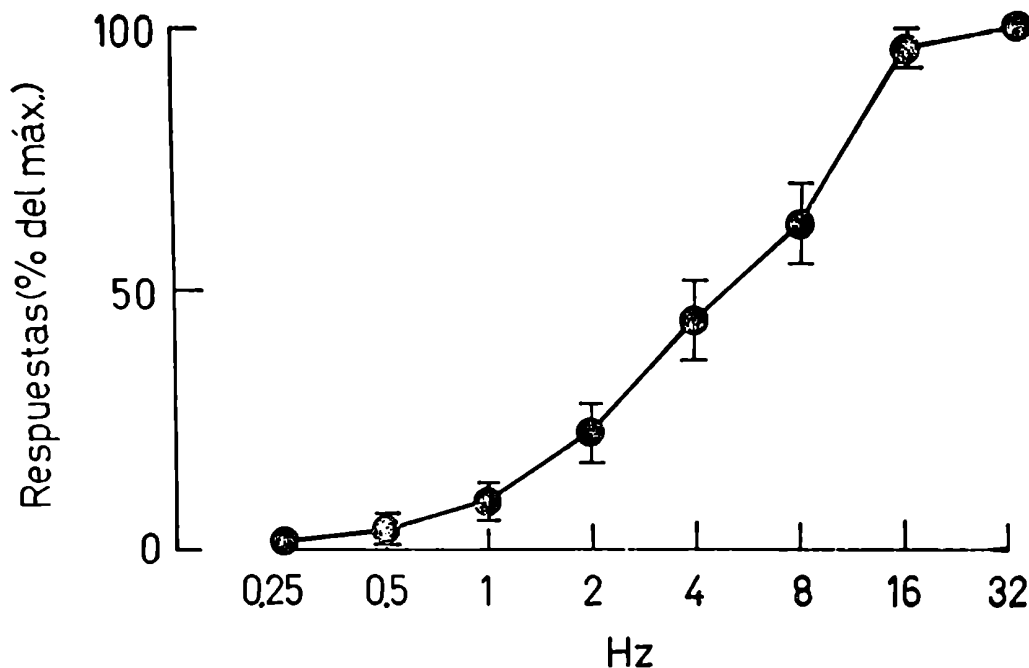


Figura 4: Efecto de la frecuencia de estimulación nerviosa sobre las respuestas presoras en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: aumentos en la presión de perfusión expresados como porcentaje de la respuesta máxima obtenida en cada experimento. El valor máximo obtenido a 10 Hz fue de  $99.6 \pm 21.8$  (n=10) mm de Hg.

Abscisa: frecuencia (Hz) de estimulación nerviosa empleada (0.1 mseg, voltaje supra máximo). Los nervios se estimularon a cada frecuencia hasta que se obtuvo una meseta. Para detalles ver Métodos.

n: número de experimentos por grupo.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 10 experimentos por grupo.



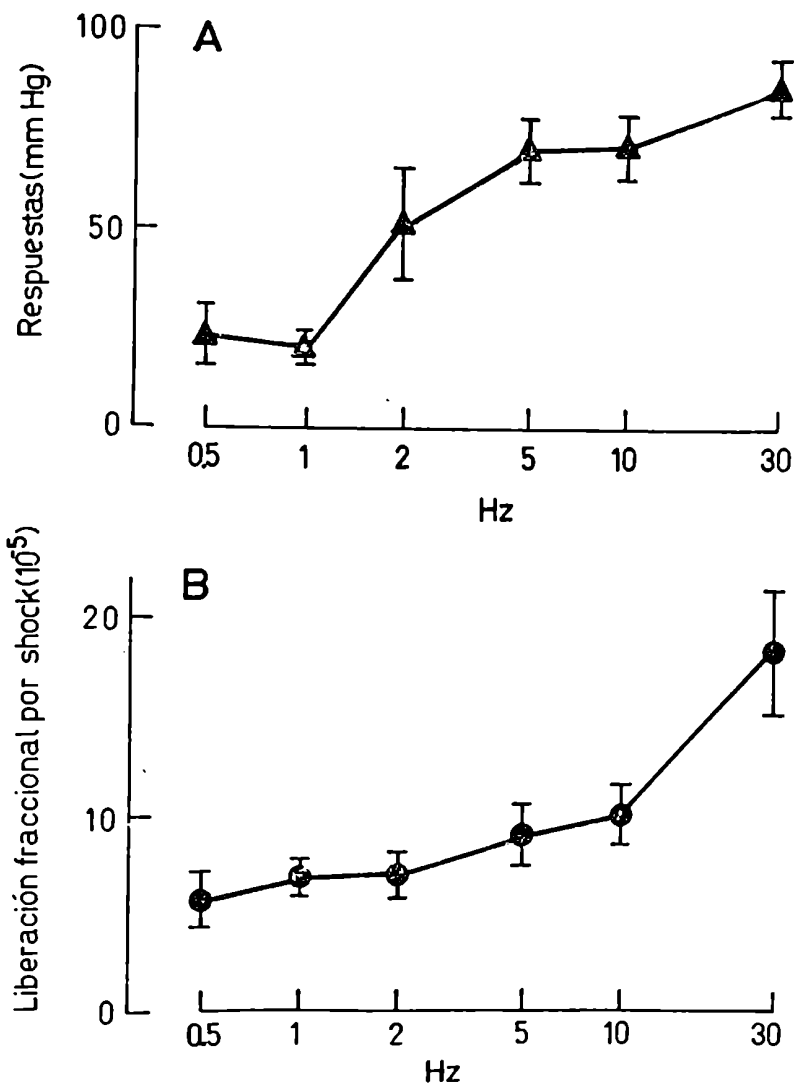


Figura 5: Efecto de la frecuencia de estimulación nerviosa sobre las respuestas y sobre el <sup>3</sup>H-total liberado en el bazo perfundido de gato.

Ordenada A: Representa el incremento en presión de perfusión expresada en mm de Hg.

Ordenada B: Radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, expresada como la fracción de radiactividad tisular liberada por shock ( $\times 10^{-5}$ ). Para detalles ver Métodos.

Abscisa: Frecuencia de estimulación empleada (Hz). Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 a 14 experimentos por grupo.

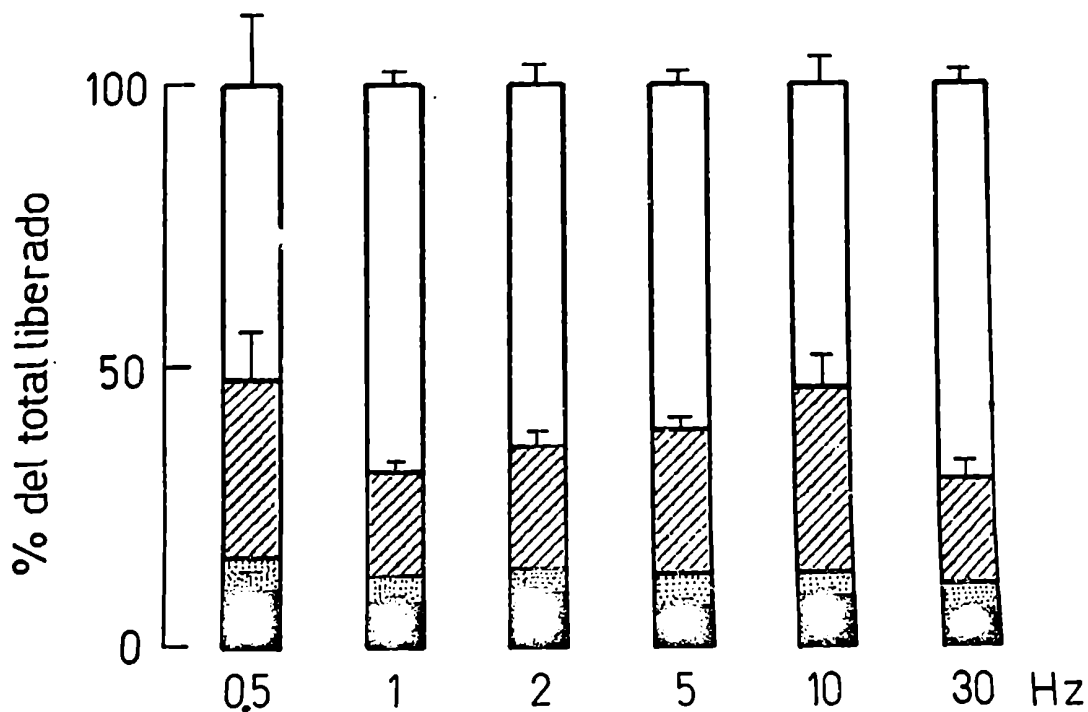


Figura 6: Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: porcentaje del aumento total en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa para cada metabolito. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación. Debajo de cada columna se indica la frecuencia (Hz) utilizada.

- NA:  $^3\text{H}$ -noradrenalina
- DOPEG:  $^3\text{H}$ -3,4-dihidroxifenilglicol
- NNN:  $^3\text{H}$ -normetanefrina
- ONDA:  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 a 14 experimentos por grupo.

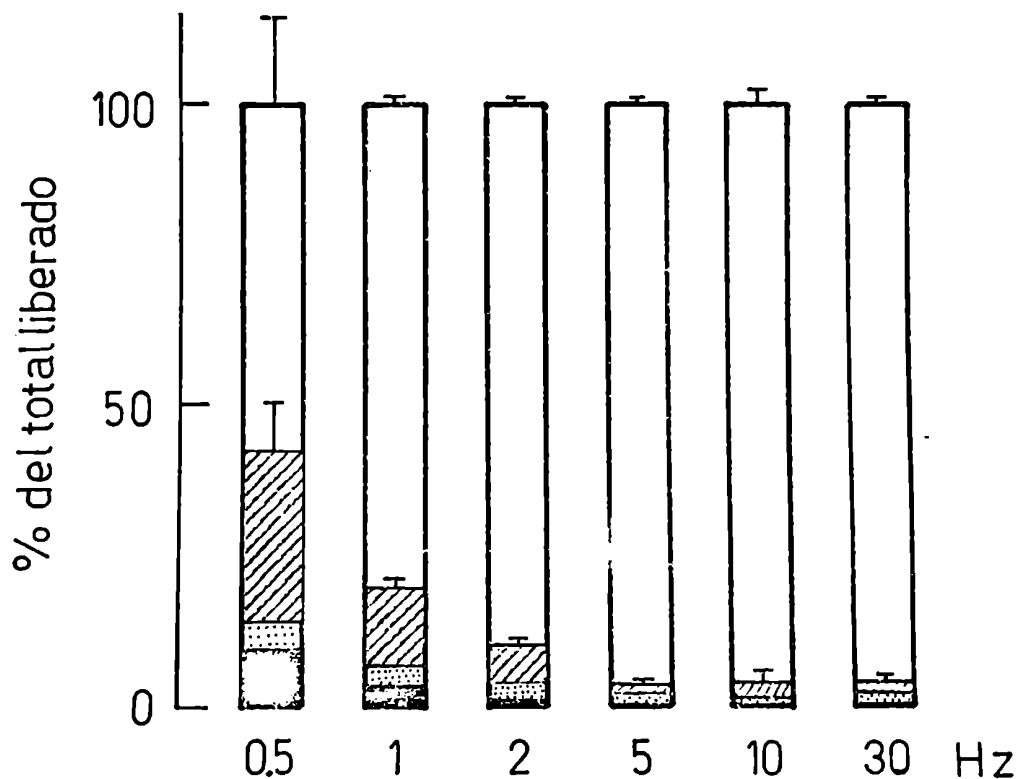






Figura 7: Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina en las muestras recogidas durante el período de estimulación nerviosa a diferentes frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales para cada metabolito en las muestras recogidas durante el período de estimulación nerviosa. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación. Debajo de cada columna se indica la frecuencia (Hz) utilizada.

-  NA:  $^3\text{H}$ -noradrenalina
-  DOPEG:  $^3\text{H}$ -3,4-dihidroxifenilglicol
-  NMN:  $^3\text{H}$ -normetanefrina
-  OMDA:  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados.,

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 a 14 experimentos por grupo.

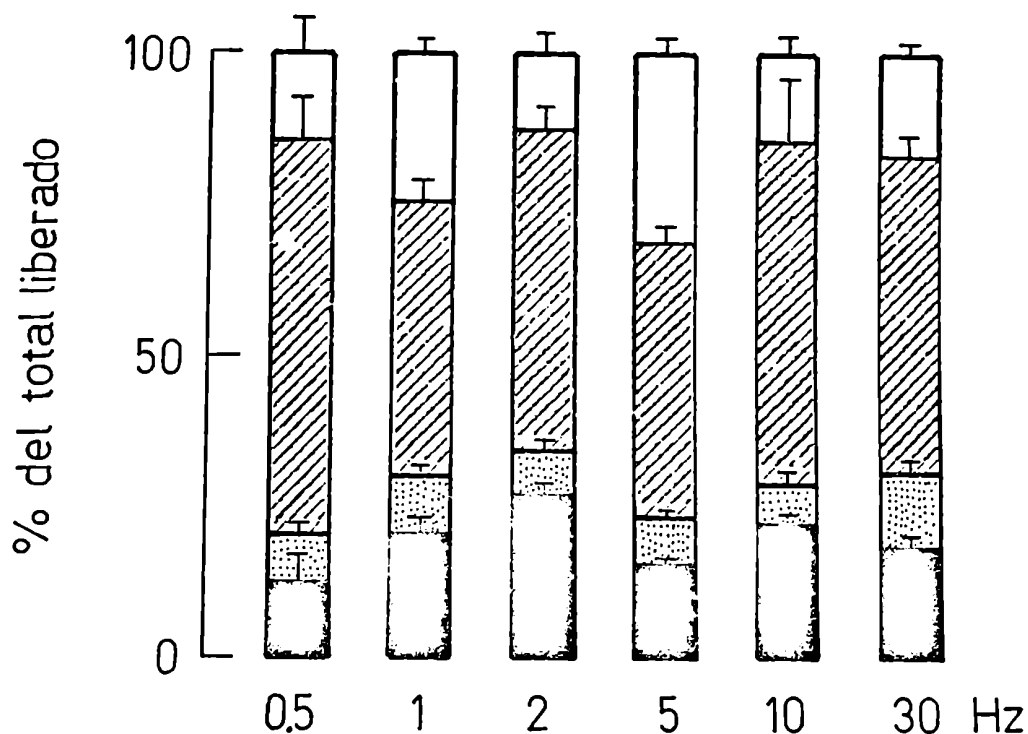






Figura 8 : Metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina en las muestras recogidas después del período de estimulación nerviosa.

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, para cada metabolito, en las muestras recogidas después del período de estimulación nerviosa.

Debajo de cada columna se indica la frecuencia (Hz) de estimulación que se aplicó antes de recoger las muestras.

-  NA:  $^3\text{H}$ -noradrenalina
-  DOPEG:  $^3\text{H}$ -3,4-dihidroxifenilglicol
-  NMN:  $^3\text{H}$ -normetanefrina
-  OMDA:  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 a 14 experimentos por grupo.

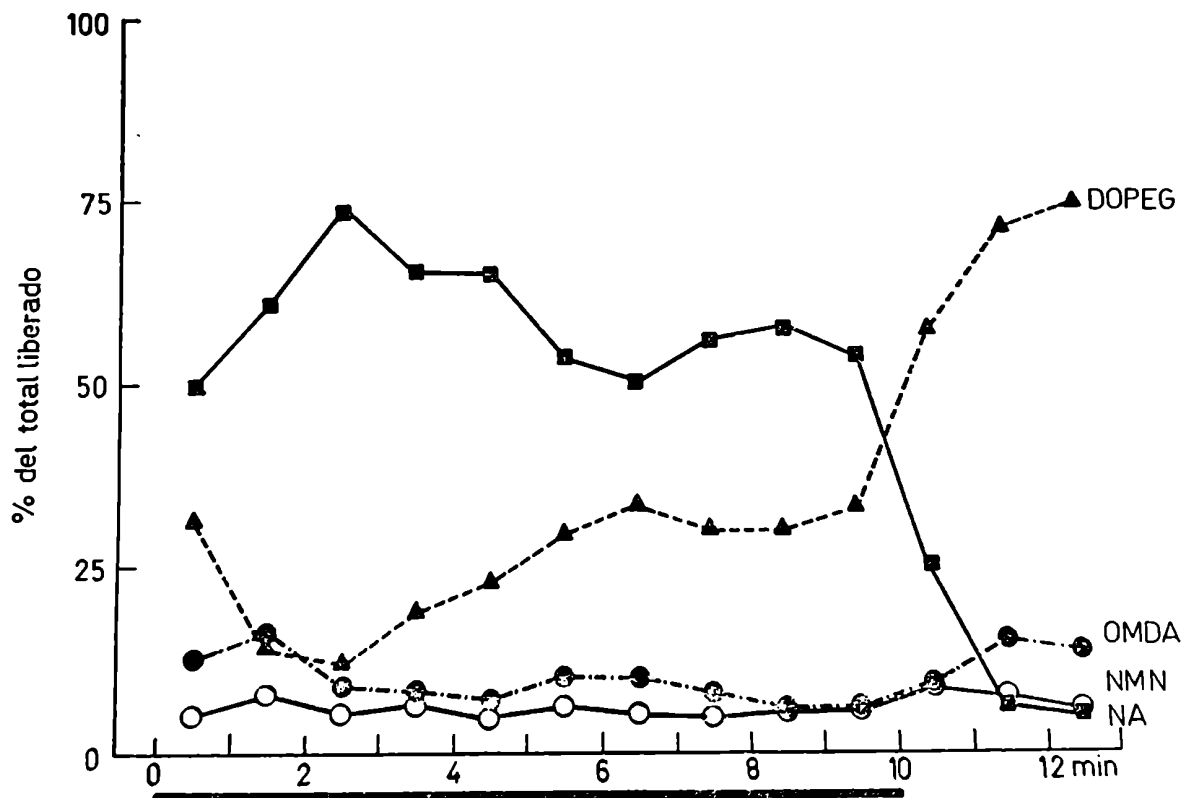


Figura 9 : Distribución porcentual de los compuestos tritiados (noradrenalina y metabolitos) liberados por estimulación nerviosa, en cada una de las muestras recogidas

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa, para la noradrenalina y sus metabolitos en cada muestra recogida.

Abscisa: tiempo en minutos.

El rectángulo negro debajo de la abscisa indica el período de estimulación nerviosa a: 0.5 Hz durante 10 min. (0.1 msec, voltaje supramáximo).

- — ■ NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
- ▲ — ▲ DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
- — ● OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados.
- — ○ NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina.

Cada valor corresponde a la media de 3 experimentos.

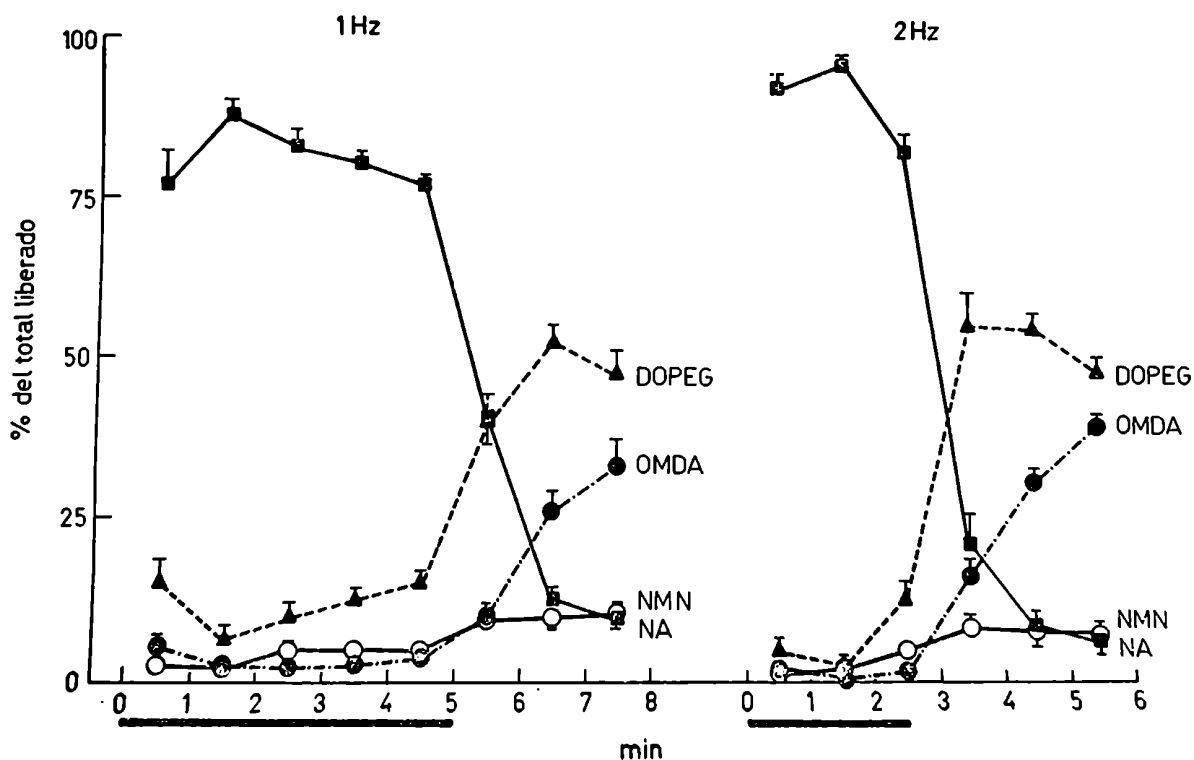


Figura 10: Distribución porcentual de los compuestos tritiados (noradrenalina y metabolitos) liberados por estimulación nerviosa en cada una de las muestras recogidas

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa, para la noradrenalina y sus metabolitos en cada muestra recogida.

Abscisa: tiempo en minutos.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa a: 1 Hz durante 300 seg (n=14) y 2 Hz durante 150 seg (n=6) (0.1 msec, voltaje supramáximo)

- — ■ NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
- ▲ — — ▲ DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
- — — ● OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados.
- — ○ NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

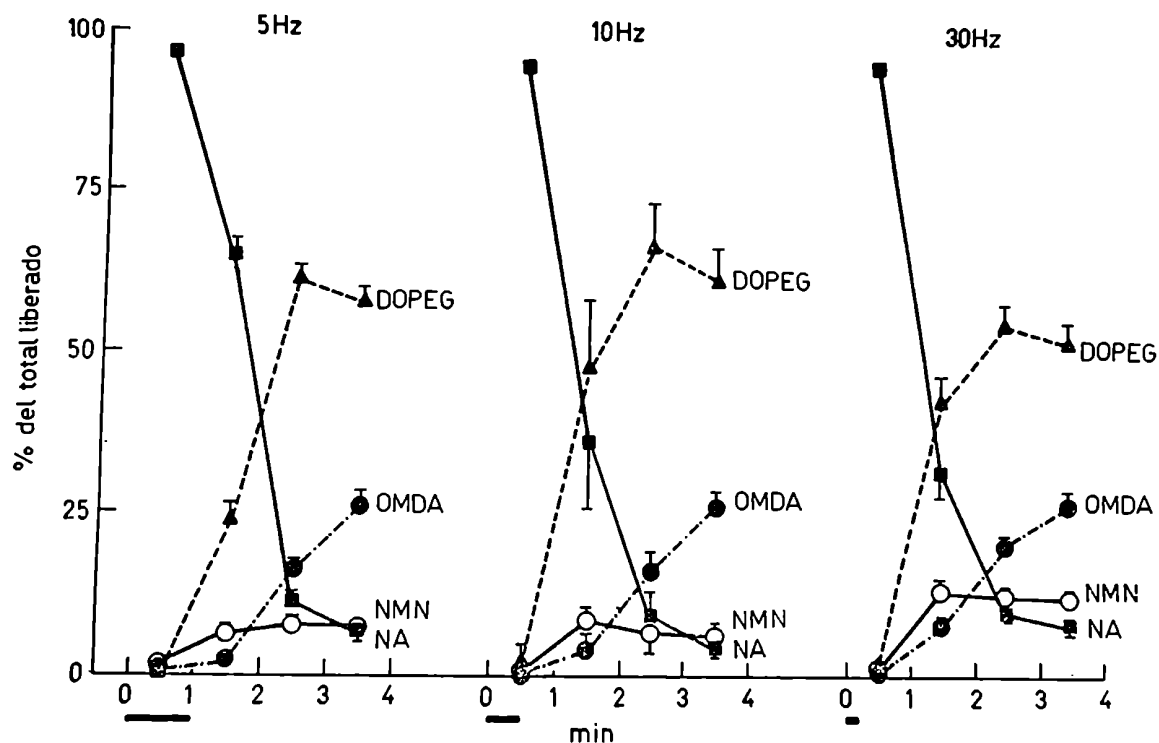


Figura 11: Distribución porcentual de los compuestos tritiados (noradrenalina y metabolitos) liberados por estimulación nerviosa en cada una de las muestras recogidas

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa, para la noradrenalina y sus metabolitos en cada muestra recogida.

Abscisa: tiempo en minutos.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa a: 5 Hz durante 60 seg (n=14), 10 Hz durante 30 seg (n=3) y 30 Hz durante 10 seg (n=14) (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

- — ■ NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
- ▲ — — ▲ DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
- — — ● OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados
- — — ○ NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina

n: número de experimentos por grupo.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

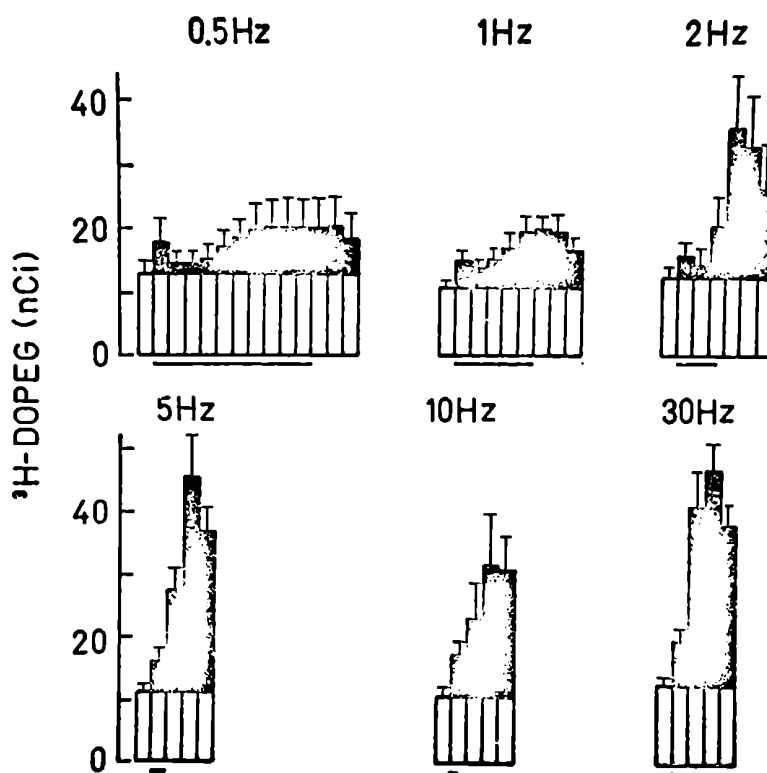


Figura 12: Efecto de la frecuencia de estimulación nerviosa sobre el  $^3\text{H-DOPEG}$  formado a expensas de la  $^3\text{H-noradrenalina}$  liberada en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: Representa los nCi de  $^3\text{H-DOPEG}$ , presentes en cada muestra de 1 minuto. Las barras blancas representan el flujo espontáneo de  $^3\text{H-DOPEG}$  en cada muestra. Las barras negras representan el aumento en radiactividad sobre los valores basales del  $^3\text{H-DOPEG}$ , inducido por estimulación nerviosa.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa, para las distintas frecuencias. Se aplicaron un total de 300 estímulos para cada frecuencia.

$^3\text{H-DOPEG}$ :  $^3\text{H-3,4-dihidroxifenilglicol}$ .

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 a 14 experimentos por grupo.



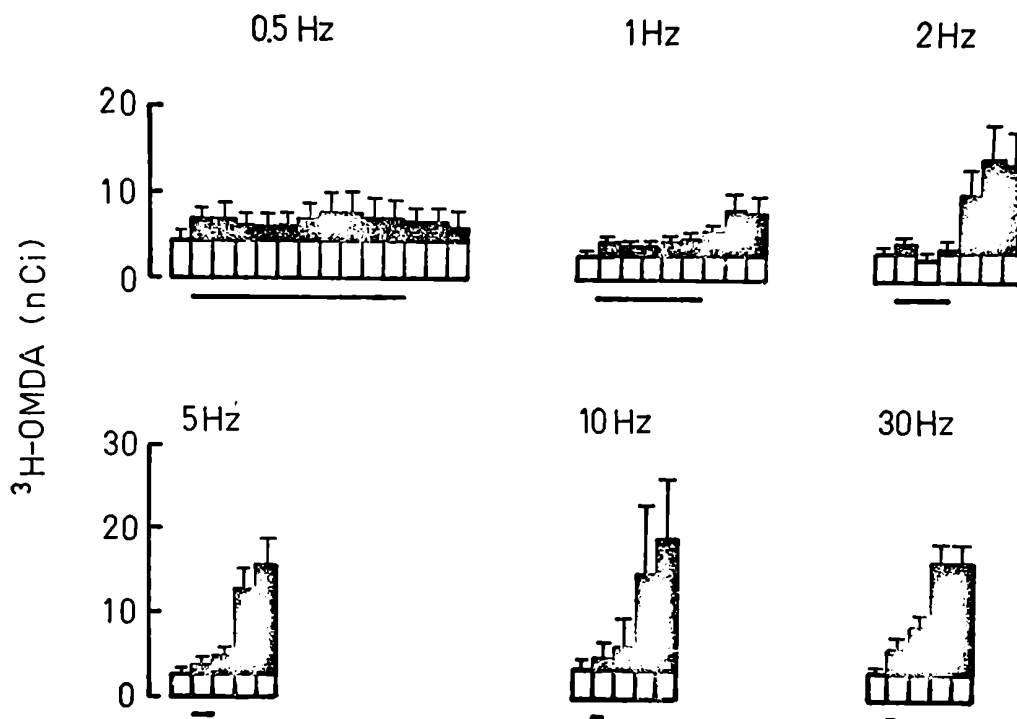


Figura 13: Efecto de la frecuencia de estimulación nerviosa sobre los  $^3\text{H-OMDA}$  formados a expensas de la  $^3\text{H-noradrenalina}$  liberada en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: Representa los nCi de  $^3\text{H-OMDA}$  presentes en cada muestra de 1 minuto. Las barras blancas representan el flujo espontáneo de  $^3\text{H-OMDA}$  en cada muestra. Las barras negras representan el aumento en radiactividad sobre los valores basales de los  $^3\text{H-OMDA}$ , inducido por estimulación nerviosa.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa, para las distintas frecuencias. Se aplicaron un total de 300 estímulos para cada frecuencia.

$^3\text{H-OMDA}$ :  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 a 14 experimentos por grupo.

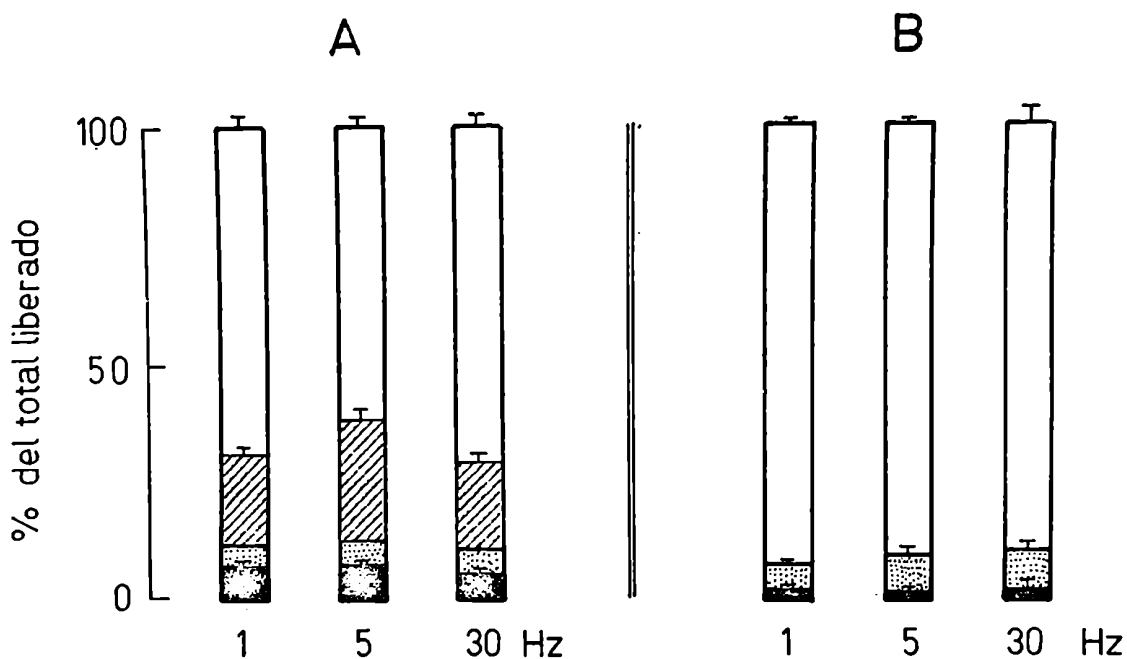


Figura 14: Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: porcentaje del aumento total en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa, para cada metabolito.

Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación. Debajo de cada columna se indica la frecuencia (Hz) utilizada.

A: controles (n=14)      B: cocaína 2.9 uM (n=3)

- NA:  $^3\text{H}$ -noradrenalina
- DOPEG:  $^3\text{H}$ -3,4-dihidroxifenilglicol
- NMN:  $^3\text{H}$ -normetanefrina
- OMDA:  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados.

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

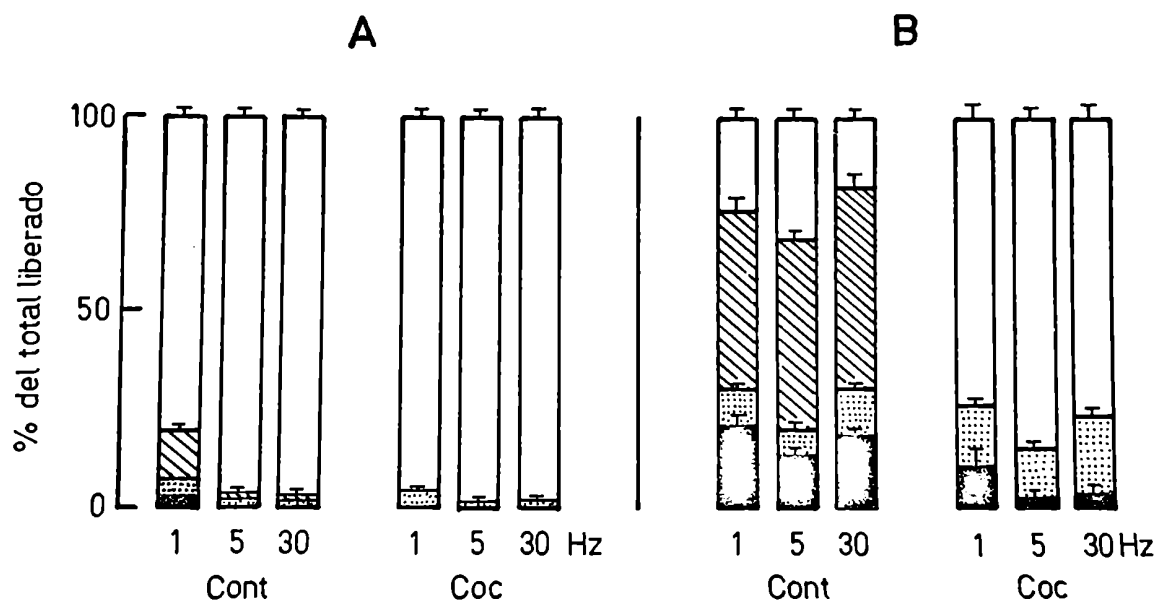
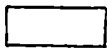
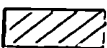

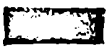


Figura 15: Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en las muestras recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa.

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, para cada metabolito, en las muestras recogidas durante (A) y después (B) del período de estimulación nerviosa.

Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación. Debajo de cada columna se indica la frecuencia (Hz) utilizada.

CONT: controles (n=14)      COC: cocaína 2.9 uM (n=3)

-  NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
-  DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
-  NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina
-  OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados.

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

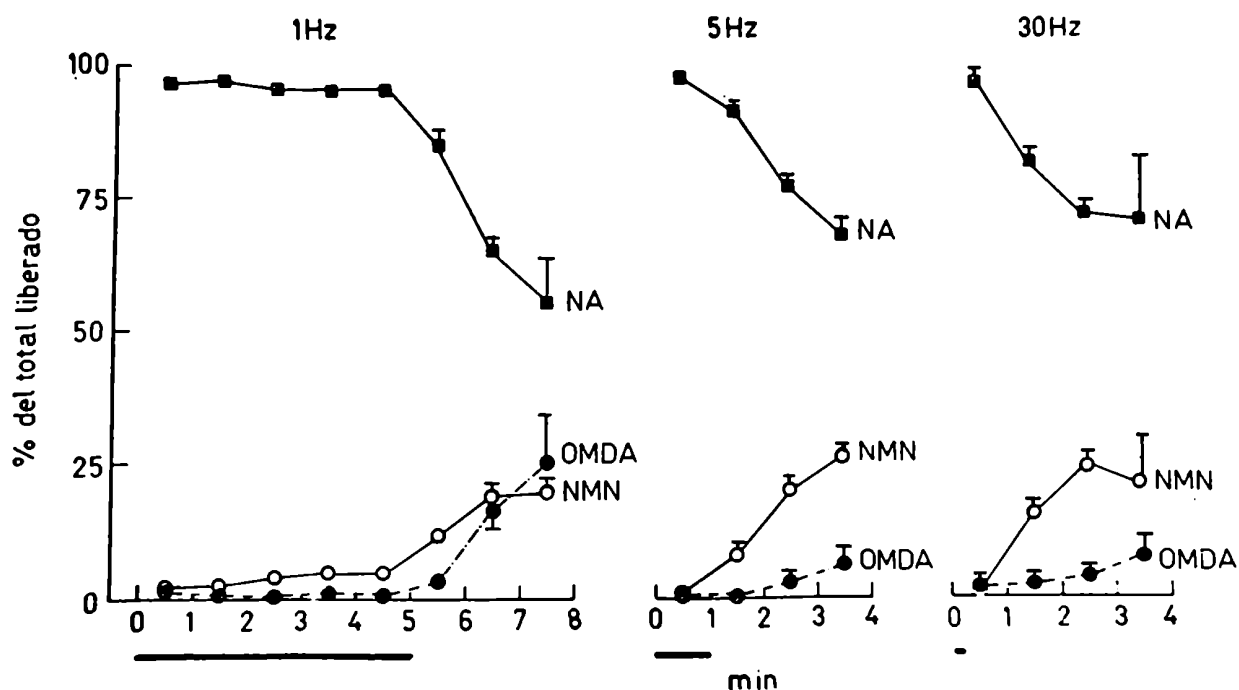


Figura 16: Efecto de la cocaína sobre la distribución porcentual de los compuestos tritiados (noradrenalina y metabolitos) liberados por estimulación nerviosa en cada una de las muestras recogidas.

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa, para la noradrenalina y sus metabolitos en cada muestra recogida.

Abscisa: tiempo en minutos.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa a: 1 Hz durante 300 seg, 5 Hz durante 60 seg y 30 Hz durante 10 seg. (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

Todas las estimulaciones se realizaron en presencia de cocaína, 2.9  $\mu$ M.

- — ■ NA:  $^3$ H-noradrenalina
- — ● OMDA:  $^3$ H-metabolitos O-metilados deaminados.
- — ○ NMN:  $^3$ H-normetanefrina.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error estándar de la media de 3 experimentos.

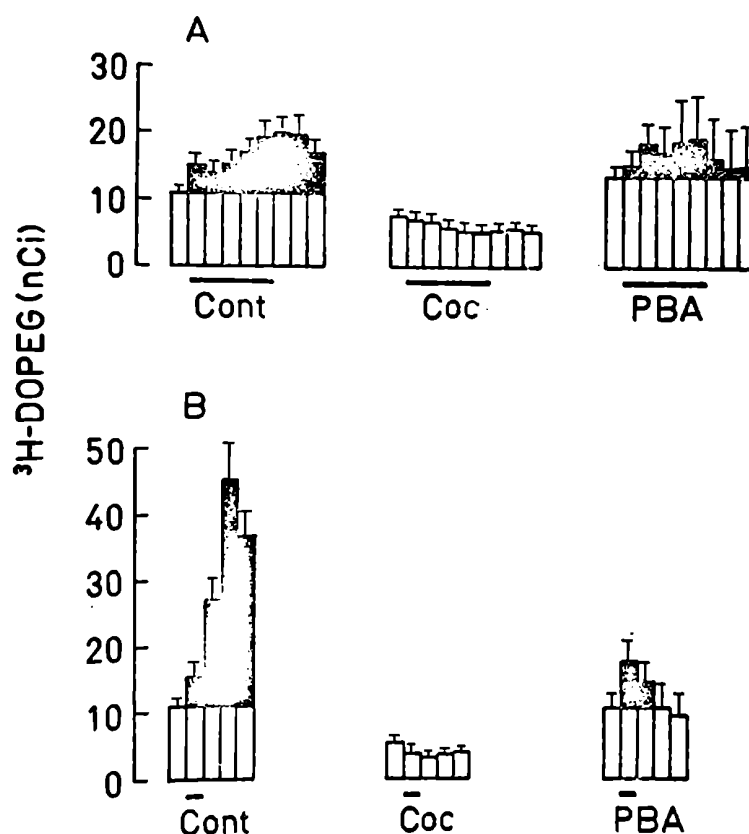


Figura 17: Efecto de la cocaína y de la fenoxibenzamina sobre el  $^3\text{H}$ -DOPEG formado a expensas de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: indica los nCi de  $^3\text{H}$ -DOPEG presentes en cada muestra de 1 minuto. Las barras blancas representan el flujo espontáneo de  $^3\text{H}$ -DOPEG en cada muestra. Las barras negras representan el aumento en radiactividad sobre los valores basales del  $^3\text{H}$ -DOPEG, inducido por estimulación nerviosa.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa, para las distintas frecuencias.

A: Los nervios fueron estimulados a 1 Hz durante 300 seg.

B: Los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg.

$^3\text{H}$ -DOPEG:  $^3\text{H}$ -3,4-dihidroxifenilglicol

CONT: controles (n=14) COC: cocaína 2.9  $\mu\text{M}$  (n=3) FBA: fenoxibenzamina 29  $\mu\text{M}$  (n=3)

n: número de experimentos

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

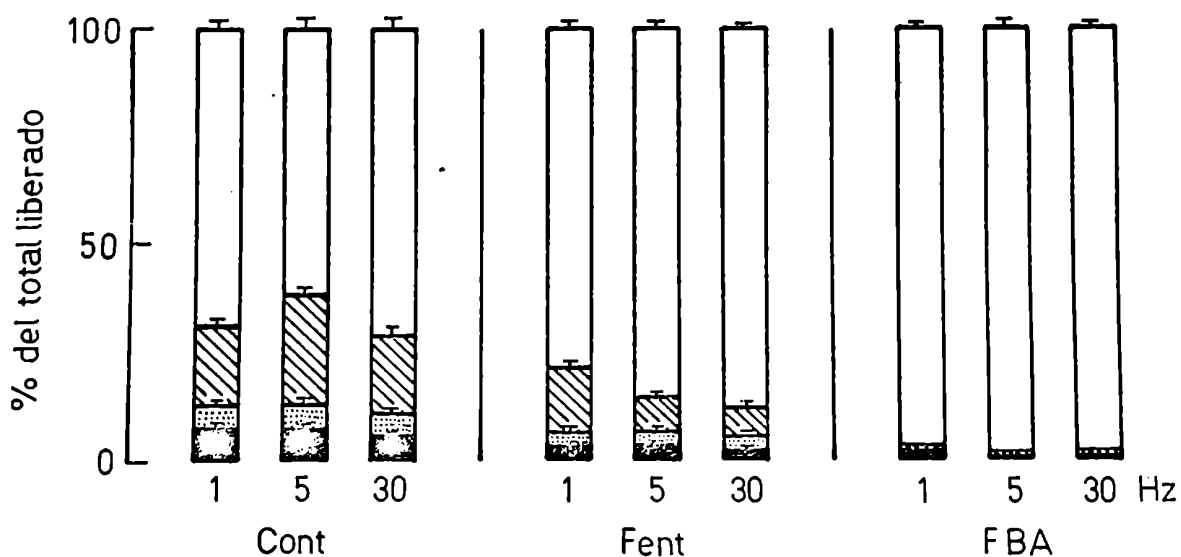


Figura 18: Efecto de la fentolamina y de la fenoxibenzamina sobre el metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: porcentaje del aumento total en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa para cada metabolito.

Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación. Debajo de cada columna se indica la frecuencia (Hz) utilizada.

CONT: controles (n=14)      FENT: fentolamina 3.1 uM (n=3)

FBA: fenoxibenzamina 29 uM (n=3).

- NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
- DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
- NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina
- OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

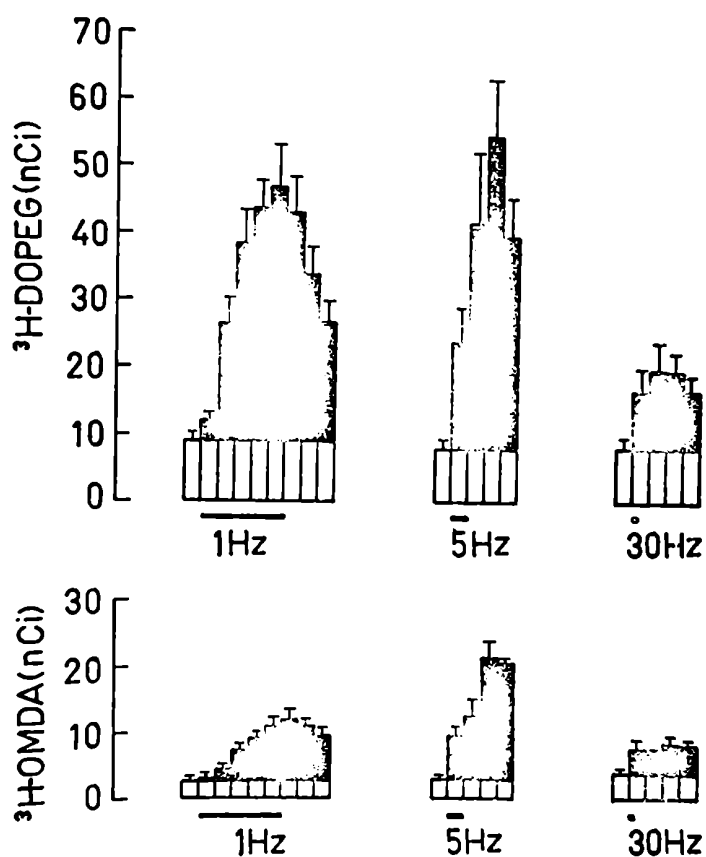


Figura 19: Efecto de la fentolamina sobre los metabolitos <sup>3</sup>H-DOPEG y <sup>3</sup>H-OMDA, formados a expensas de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a diferentes frecuencias en el bazo perfundido de gata.

Ordenadas: representan los nCi de <sup>3</sup>H-DOPEG ó <sup>3</sup>H-OMDA presentes en cada muestra de un minuto. Las barras blancas representan el eflujo espontáneo en cada muestra. Las barras negras representan el aumento en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa. Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa, para las distintas frecuencias. Se aplicaron un total de 300 estímulos para cada frecuencia.

<sup>3</sup>H-DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol.

<sup>3</sup>H-OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados.

Todas las estimulaciones se realizaron en presencia de fentolamina 3.1 uM.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de 3 experimentos.

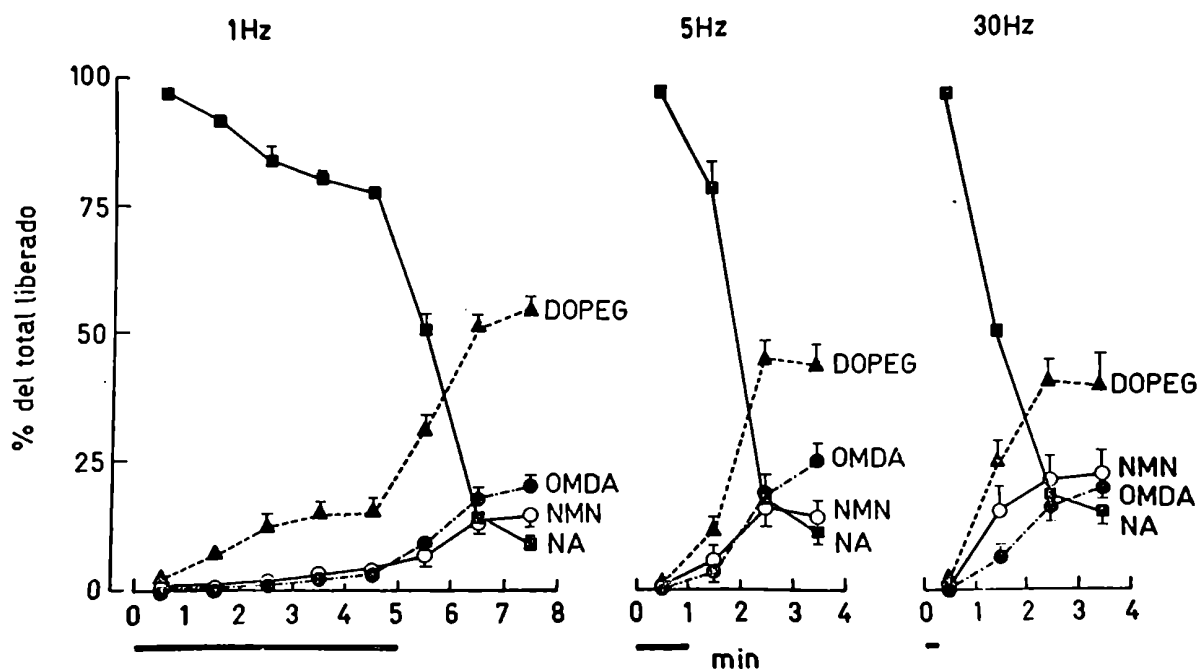


Figura 20. Efecto de la fentolamina sobre la distribución porcentual de los compuestos tritiados (noradrenalina v metabolitos) liberados por estimulación nerviosa en cada una de las muestras recogidas.

Ordenada: porcentaje del aumento en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa, para la noradrenalina y sus metabolitos en cada muestra recogida.

Abscisa: tiempo en minutos.

Los rectángulos negros debajo de la abscisa indican los períodos de estimulación nerviosa a 1 Hz durante 300 seg, 5 Hz durante 60 seg y 30 Hz durante 10 seg. (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

Todas las estimulaciones se realizaron en presencia de fentolamina, 3.1 uM.

- — ■ NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
- ▲ — ▲ DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
- — ● OMDA: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados
- — ○ NMN: <sup>3</sup>H-normetanefrina

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.



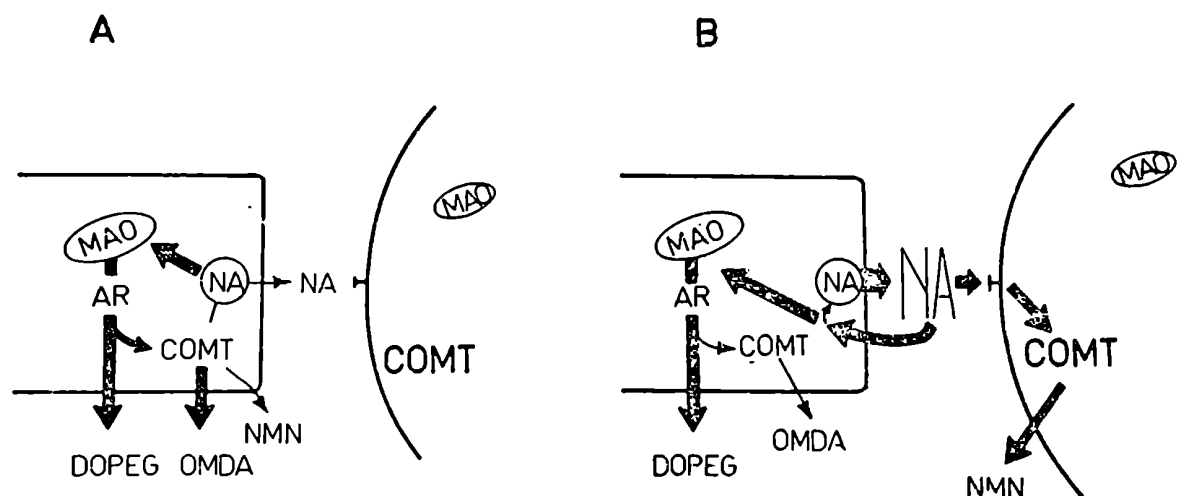


Figura 21. Representación esquemática de los caminos metabólicos de la noradrenalina liberada espontáneamente y por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

MAO: monoamino oxidasa

COMT: catecol O-metil transferasa

AR: aldehido reductasa

NA: noradrenalina

DOPEG: 3,4-dihidroxifenilglicol

NMN: normetanefrina

OMDA: metabolitos O-metilados deaminados (3-metoxi-4-hidroxifenilglicol y ácido 3-metoxi 4-hidroximandélico)

**A: Metabolismo espontáneo:** La noradrenalina retenida en los gránulos, pasa al citoplasma. El DOPEG, la NMN y los metabolitos OMDA se forman en el citoplasma antes que la NA llegue al espacio sináptico.

**B: Metabolismo por estimulación nerviosa :** La NA liberada por estimulación nerviosa es metabolizada a NMN por la COMT postsináptica. La noradrenalina liberada y recaptada por el terminal adrenergico es preferencialmente metabolizada a DOPEG por la MAO y AR. Una fracción del metabolito DOPEG, es O-metilado a nivel presináptico por la COMT.

### Discusión

La magnitud de la respuesta de un órgano efector a la estimulación nerviosa o a la noradrenalina exógena está directamente relacionada con la concentración del agonista en la vecindad de los receptores adrenérgicos. En nuestras condiciones experimentales cuando se determinó la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, las respuestas vasculares aumentaron significativamente cuando la frecuencia de estimulación se incrementó de 1 Hz a 5 Hz. La liberación fraccional por shock fue similar cuando los nervios se estimularon a 1, 2 y 5 Hz, por lo tanto la diferencia entre las respuestas vasculares obtenidas a 1 y 5 Hz se debería a diferencias en el tiempo de estimulación, considerando que el número de pulsos aplicados fue constante (5 minutos a 1 Hz y 1 minuto a 5 Hz). Dado que a 1 y 5 Hz se liberaron cantidades similares de transmisor, es de esperar que la concentración de noradrenalina en la vecindad de los receptores adrenérgicos sea mayor cuando más corto el período de estimulación nerviosa (por ej.: 5 Hz).

La respuesta máxima a la estimulación nerviosa, se obtuvo a 10 Hz y no se observó un incremento adicional cuando los nervios se estimularon a 30 Hz. En estas condiciones experimentales, el tiempo de estimulación fue menor que el empleado a 5 Hz y en adición la liberación por shock aumentó significativamente entre 10 y 30 Hz. Estos resultados, indicarían que la respuesta máxima del órgano efector se alcanza cuando los nervios se estimulan a 5 Hz durante 1 minuto. La respuesta vascular máxima obtenida en la curva de frecuencia respuesta a la estimulación nerviosa fue  $99.6 \pm 21.8$  mm de Hg (n=10), mientras que las respuestas obtenidas cuando se estimuló a 5 Hz durante 1 minuto y 30 Hz durante 10 segundos fueron  $71.0 \pm 8.0$  (n=14) y  $86.7 \pm 7.4$  (n=14) mm de Hg.

La concentración de noradrenalina que se alcanza en el espacio sináptico cuando los nervios se estimulan sería mayor a 5 Hz que a 1 Hz, siempre que se conserve el número de pulsos aplicados a cada frecuencia. En consecuencia, se esperaría una activación mayor de los receptores alfa presinápticos, cuando la estimulación se realiza a 5 Hz, asumiendo que la distribución de neurotransmisor en el espacio

sináptico es homogénea. No obstante, se ha sugerido recientemente que la concentración de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, que se alcanza en la superficie externa del terminal adrenérgico, puede diferir de aquella obtenida a nivel de los receptores adrenérgicos postsinápticos (Langer, 1974b). La captación neuronal de noradrenalina es probablemente muy efectiva en la vecindad del terminal adrenérgico y podría limitar o reducir la concentración de neurotransmisor disponible para la estimulación de los receptores alfa presinápticos (Langer, 1974b; Langer y Enero, 1974). La inhibición de la captación neuronal por cocaína aumenta la concentración de noradrenalina disponible para la estimulación de los receptores alfa presinápticos y por lo tanto aumenta la inhibición del transmisor liberado por estimulación nerviosa (Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Langer, 1974b; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974). En nuestros experimentos la cocaína no modificó significativamente la liberación del transmisor tritiado por estimulación nerviosa y además la liberación de  $^3\text{H}$ -total fue menor a medida que se aumentó la frecuencia de estimulación. Esto puede resultar de la suma algebraica de dos efectos en dirección opuesta, por un lado la inhibición de la captación neuronal, que aumentaría la liberación y por otro el aumento en la concentración de noradrenalina en el espacio sináptico que reduciría la liberación, por activar los receptores adrenérgicos alfa presinápticos.

En presencia de los agentes bloqueantes alfa, fentolamina o fenoxibenzamina, el aumento observado en el transmisor liberado por estimulación nerviosa a 1 ó 5 Hz fue de aproximadamente 8 veces, mientras que a 30 Hz el aumento fue menor de 3 veces (Tabla 3). Estas drogas aumentan la liberación del transmisor inducido por estimulación nerviosa, por bloquear los receptores alfa presinápticos que regulan la liberación de noradrenalina (Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Langer, 1974b). En adición la fenoxibenzamina en la concentración utilizada inhibe la recaptación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) y extraneuronal de noradrenalina (Gillespie, Hamilton y Hosie, 1970).

La reducción en la efectividad de los agentes bloqueantes alfa para aumentar la liberación del transmisor a frecuencias altas ha sido observada por otros autores en el bazo perfundido de gato (Brown y Gillespie, 1957; Brown, Davies y Ferry, 1961; Kirpekar y Cervoni, 1963; Haefely, Hurlimann y Thoenen, 1965). Dado que el mecanismo que regula la liberación del transmisor por estimulación nerviosa, parecería ser menos eficiente cuando se aumenta la frecuencia de estimulación nerviosa, en el capítulo II de este trabajo se analizarán algunos de los factores involucrados en la regulación de la liberación del transmisor cuando se aplican frecuencias altas.

En este trabajo, siguiendo la metodología de estudios previos sobre metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, los valores del eflujo espontáneo, obtenidos en las muestras recogidas antes de la estimulación nerviosa fueron restados de aquellos obtenidos durante y después de los períodos de estimulación nerviosa. Este procedimiento se basa en el hecho que aún cuando los nervios adrenérgicos son estimulados a diferentes frecuencias, existe eflujo espontáneo de  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos. Sin embargo, Cubeddu y Weiner (1975b) sugirieron que el eflujo espontáneo de  $^3\text{H}$ -noradrenalina y  $^3\text{H}$ -metabolitos podría estar reducido durante e inmediatamente después de la estimulación nerviosa. Si fuera así, la substracción de los valores del eflujo espontáneo daría lugar a una subestimación del metabolismo del transmisor tritiado que se libera por estimulación nerviosa. Sin embargo, cuando la recaptación neuronal de noradrenalina está inhibida por cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) o por fenoxibenzamina (29  $\mu\text{M}$ ) (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) se previene la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que ha sido recaptada por el terminal adrenérgico. En estas condiciones experimentales no disminuyó significativamente la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG durante los 5 minutos de estimulación a 1 Hz (Fig 17). Resultados similares se obtuvieron para la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados en presencia de concentraciones de cocaína o fenoxibenzamina que inhiben la captación neuronal. La persistencia en los valores espontáneos de  $^3\text{H}$ -DOPEG bajo condiciones en las cuales se previno la formación del glicol deaminado a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa

es compatible con el hecho que los valores de liberación espontánea no se suprimen durante el período de estimulación nerviosa. En consecuencia, la substracción del eflujo espontáneo en las muestras obtenidas durante y después de la estimulación nerviosa, parecería ser un método válido en la evaluación del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

En los experimentos en los cuales se determinó el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, los metabolitos del neurotransmisor representaron entre un 30 y un 40% del aumento total en radiactividad, por sobre los valores basales, para un amplio rango de frecuencias (Fig 6). El glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG fue el principal metabolito formado a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato, representando aproximadamente el 25% de la radiactividad total liberada. En la membrana nictitante de gato (Langer y Enero, 1974) se encontraron resultados similares, sin embargo en este tejido el  $^3\text{H}$ -DOPEG representa casi el 50% de la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa. La diferencia en la proporción del glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG formado a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, parecería deberse al hecho que en un órgano incubado "in vitro" el contacto entre el transmisor liberado y el tejido es más prolongado que en condiciones de perfusión. Cuanto mayor el tiempo de contacto entre el transmisor liberado y el tejido, mayor es la fracción de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina que se recoge en forma de metabolitos. En apoyo de esta hipótesis se encontró que el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa aumenta en condiciones en que se prolonga el tiempo de contacto entre el transmisor liberado y el tejido por interrupción de la perfusión (Fig 22). Otro factor que podría tener influencia en el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada sería la densidad de inervación adrenérgica. La recaptación del transmisor liberado por estimulación nerviosa y su metabolismo presináptico sería más pronunciado en tejidos con mayor inervación adrenérgica, cuando se lo compara con un órgano con menor inervación.

La inhibición de la captación neuronal con cocaína o fenoxibenzamina previno completamente la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, sin modificar el eflujo espontáneo del glicol deaminado (Figs 14 y 18). Estos resultados indicarían que el  $^3\text{H}$ -DOPEG se formaría a nivel presináptico por la actividad de la monoamino oxidasa y aldehído reductasa, a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que ha sido recaptada por el terminal adrenérgico (Fig 21). Resultados similares que apoyan nuestra hipótesis fueron encontrados en la membrana nictitante de gato (Langer y Enero, 1974) y en el bazo perfundido de gato (Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974). Sin embargo, nuestros resultados son compatibles con la posibilidad que la noradrenalina liberada que es captada por los nervios adrenérgicos desplace hacia el citoplasma del terminal nervioso la noradrenalina tritiada almacenada en las vesículas. Bajo estas condiciones el  $^3\text{H}$ -DOPEG podría formarse como resultado de la actividad de la monoamino oxidasa y aldehído reductasa intraneuronales sobre la  $^3\text{H}$ -noradrenalina desplazada de los gránulos de almacenamiento. Compatible con esta posibilidad es el hecho que en el bazo perfundido de gato marcado con  $^3\text{H}$ -noradrenalina casi el 70% del incremento total de radiactividad inducido por una inyección de 300 ng de (-) noradrenalina se recoge como  $^3\text{H}$ -DOPEG en el efluente venoso (Adler-Graschinsky, Dubocovich y Langer, observaciones no publicadas).

En presencia de 3.1  $\mu\text{M}$  de fentolamina y en condiciones experimentales en las cuales la droga no inhibe la captación neuronal de noradrenalina (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974), la proporción de  $^3\text{H}$ -DOPEG no se modificó cuando la estimulación se llevó a cabo a 1 Hz (Tabla 6). Sin embargo, cuando se aumentó la frecuencia de estimulación a 5 Hz se redujo la proporción de  $^3\text{H}$ -DOPEG. Esto podría deberse a la disminución del tiempo de contacto entre la noradrenalina que se libera por estimulación nerviosa a 5 Hz y el tejido en presencia de fentolamina, dado que en estas condiciones, la mayor parte de la radiactividad se recogió durante el minuto de estimulación a 5 Hz. Es de interés recalcar que en condiciones en que se prolongó el tiempo de contacto entre el transmisor liberado por estimulación nerviosa a 5 Hz y el tejido, por interrupción de la perfusión aumentó significativa-

mente el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina vía el glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG (Fig 22).

El aumento en la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados fue un 8%, aproximadamente, del aumento total en radiactividad inducido por estimulación nerviosa. La reducción de la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados no fue total, cuando la estimulación nerviosa se realizó en presencia de cocaína (Fig 14). Estos resultados indicarían que estos metabolitos se originarían en su mayor parte a nivel presináptico a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que ha sido recaptada por el terminal adrenérgico (Fig 21), lo cual no excluye la posibilidad que se formen además por O-metilación a nivel postsináptico de los metabolitos deaminados formados a nivel presináptico. A una conclusión similar llegaron Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner (1974), quienes observaron una reducción en la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados liberados por estimulación nerviosa cuando inhibían la captación neuronal con cocaína o fenoxibenzamina.

En la membrana nictitante de gato, cuando se inhibe la captación extraneuronal con hidrocortisona (Graefe y Trendelenburg, 1974) no se modifica la proporción de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados y  $^3\text{H}$ -DOPEG liberados por estimulación nerviosa (Luchelli-Fortis y Langer, 1975). Estos resultados refuerzan el concepto del origen presináptico de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados y del  $^3\text{H}$ -DOPEG, los cuales se formarían a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es recaptada por el terminal adrenérgico.

Cuando se inhibió la captación neuronal con cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) aumentó la cantidad de  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir del neurotransmisor tritiado liberado por estimulación nerviosa (Tabla 5). Dado que en presencia de 29  $\mu\text{M}$  de fenoxibenzamina, se redujo casi completamente la formación de  $^3\text{H}$ -normetanefrina, es razonable concluir que este metabolito se forma por la actividad de la catecol-O-metiltransferasa postsináptica, a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es captada por el órgano efector (Fig. 21). El origen postsináptico de la  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina

liberada por estimulación nerviosa fue sugerido por Langer, Enero y Stefano (1972) y por Langer y Enero (1974) en la membrana nictitante aislada de gato. En apoyo del origen postsináptico de la  $^3\text{H}$ -normetanefrina, en condiciones de actividad nerviosa, se ha encontrado que la hidrocortisona en una concentración que inhibe la captación extraneuronal de noradrenalina (Graefe y Trendelenburg, 1974) disminuye significativamente la formación de  $^3\text{H}$ -normetanefrina, a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa (Luchelli-Fortis y Langer, 1975).

Cuando se analizó el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina total liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato (es decir aumentos sobre los valores basales, obtenidos durante y después del período de estimulación nerviosa) no se pudo demostrar una correlación entre la frecuencia de estimulación aplicada y el metabolismo del neurotransmisor liberado. Esto nos llevó a analizar separadamente, los aumentos en radiactividad obtenidos durante y después del período de estimulación nerviosa, para las distintas frecuencias utilizadas.

Cuando se analizó el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina en las muestras recogidas durante el período de estimulación nerviosa, se observó una disminución progresiva en la fracción de los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina cuando, la frecuencia de estimulación se aumentó a 0.5 a 5 Hz (Fig. 7). En contraste con esta relación inversa entre la frecuencia de estimulación nerviosa y la magnitud del metabolismo del neurotransmisor, cuando se analizaron en la misma forma las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa, no se encontró una relación entre la magnitud del metabolismo y la frecuencia de estimulación aplicada en el período previo (Fig. 8). Es interesante recalcar, que los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina contribuyeron con el 80% de la radiactividad, en las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa, correspondiéndole al  $^3\text{H}$ -DOPEG aproximadamente el 50%.

De nuestros resultados surge que es esencial incluir las muestras obtenidas después de la estimulación nerviosa, con el objeto de evaluar la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa. En la Tabla 3, puede observarse que la fracción de la radiactividad total que se recoge después de la estimulación nerviosa,



es mayor cuando se aumenta la frecuencia de estimulación. Si no se incluyen las muestras obtenidas después de la estimulación nerviosa, se subestima no sólo la cantidad total de radiactividad liberada por estimulación nerviosa sino también el metabolismo del neurotransmisor particularmente cuando se utilizan frecuencias de 2 Hz o mayores. Durante el período de estimulación nerviosa la noradrenalina contribuye con el mayor aumento en radiactividad, mientras que en las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa, la fracción principal la forman los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina. Cabe mencionar, que Kirpekar y Puig (1971) concluyeron que la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en el bazo perfundido de gato, no se metabolizaba en gran extensión. El conflicto de evidencias con nuestros resultados surge, en parte, del hecho que dichos autores estudiaron el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina, solamente en las muestras recogidas durante la estimulación nerviosa.

Cuando se estudió la secuencia temporal del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa se encontró que la contribución del glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG, durante la estimulación nerviosa, era pequeña, sin embargo este metabolito representó la fracción más importante en las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa (Fig. 9, 10 y 11).

El aumento en la proporción del glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG en las muestras obtenidas después del período de estimulación nerviosa, coincidió con una disminución progresiva en la proporción de  $^3\text{H}$ -noradrenalina. Es de interés hacer notar que el aumento en la fracción de  $^3\text{H}$ -DOPEG después de la estimulación nerviosa se observó en valores porcentuales y en valores absolutos. Para las frecuencias de estimulación de 2 Hz o mayores los valores absolutos de  $^3\text{H}$ -DOPEG en las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa fueron 3 ó 4 veces los valores basales del metabolito.

Una distribución similar siguió la fracción de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados en las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa en valores porcentuales y absolutos. Es de interés destacar que después del período de estimulación nerviosa la secuencia temporal de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados, difirió ligeramente de la del glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG. En este período y para todas las frecuencias, el incremento en la fracción de  $^3\text{H}$ -DOPEG fue siempre previo al de los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados.

Como fue discutido previamente, el glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG, se formaría a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es recaptada por el terminal nervioso adrenérgico y luego metabolizada por la monoamino oxidasa y aldehído reductasa (Langer, 1974a; Langer y Enero, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974). En apoyo de este hecho, la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir del transmisor liberado por estimulación nerviosa, se previene por inhibición de la captación neuronal con cocaína o fenoxibenzamina.

La disminución progresiva en la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG durante la estimulación nerviosa, a medida que se aumenta la frecuencia de 0.5 a 5 Hz es compatible con una reducción parcial de la recaptación neuronal del transmisor durante la despolarización del terminal adrenérgico.

Es posible que la alteración de la captación neuronal durante la estimulación nerviosa esté directamente relacionada con la frecuencia de estimulación aplicada. Cuando se disminuye el intervalo entre estímulos aumentando la frecuencia de estimulación nerviosa, se producen más períodos de despolarización en una unidad de tiempo y en consecuencia se acortan los intervalos durante el cual la membrana del terminal nervioso está repolarizada. Esto llevaría a una reducción progresiva de la recaptación neuronal del transmisor liberado durante la estimulación nerviosa, cuando por aumento de la frecuencia, se acorta el intervalo entre estímulo y estímulo. Varios autores han observado una reducción en la captación neuronal de noradrenalina en condiciones de despolarización del terminal adrenérgico por estimulación nerviosa o por potasio (Haggendal y Malmfors, 1969; Palaic y Panisset, 1969; Lorenz y Vanhoutte, 1975). En adición se ha encontrado que el aumento de la concentración de potasio en el medio de incubación reduce la captación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina en sinaptosomas de cerebro de rata (Colburn, Goodwin, Murphy, Bunney y Davies, 1968). Resultados similares fueron obtenidos por Holtz y Coyle (1974) para la captación de  $^3\text{H}$ -dopamina en cerebro de rata.

No obstante, Kirpekar y Wakade (1968) encontraron en el bazo perfundido de gato, que al aumentar la concentración de potasio en el medio de perfusión a 50 mM, la cap-

tación neuronal de noradrenalina no se modificaba. En adición, Yamamoto y Kirpekar (1972) concluyeron que cuando se aplican frecuencias altas de estimulación nerviosa, no se reduce la captación neuronal de noradrenalina en el bazo perfundido de gato. Estos resultados difieren de los de Haggendal y Malmfors (1969) quienes encontraron que la captación neuronal de noradrenalina se inhibe durante la estimulación nerviosa en las glándulas salivales de rata. Es de interés, hacer notar que los estudios de captación neuronal realizados durante la estimulación nerviosa son complicados por el hecho que la  $^3\text{H}$ -noradrenalina que se capta puede ser liberada inmediatamente. Bajo estas condiciones experimentales, es difícil distinguir entre una inhibición real de la captación neuronal y una inhibición aparente debida a la liberación por estimulación nerviosa de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina recientemente captada. Las condiciones experimentales, utilizadas en este trabajo, tienen la ventaja que la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG, se utiliza como índice de la inhibición de la captación neuronal durante la estimulación nerviosa.

La disminución progresiva en la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG durante la estimulación nerviosa a frecuencias bajas e intermedias, indican que bajo estas condiciones experimentales hay una reducción progresiva de la recaptación neuronal del transmisor liberado por estimulación nerviosa. Estos resultados, indicarían que la captación de noradrenalina en condiciones de actividad nerviosa sería diferente de la captación en condiciones de reposo. Es de interés, que la concentración de cocaína requerida para prevenir la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG durante la estimulación nerviosa en la membrana nictitante de gato es considerablemente menor, que la necesaria para inhibir totalmente la captación neuronal de noradrenalina en condiciones de reposo (Langer, y Enero, 1974). Resultados similares se obtuvieron en el bazo perfundido de gato (Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974) y en el corazón perfundido de gato (Farah y Langer, comunicación personal). En consecuencia los cambios de permeabilidad a los iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) y de su concentración dentro y fuera de la membrana del terminal nervioso, durante la estimulación nerviosa, modificarían la sensibilidad de los mecanismos de captación neuronal, para la inhibición por drogas.

En las muestras recogidas después del período de estimulación nerviosa, se observó un incremento rápido en la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG, para todas las frecuencias de estimulación estudiadas. Este fenómeno puede resultar como consecuencia de varias posibilidades: 1) inhibición del mecanismo de captación neuronal de noradrenalina durante la estimulación nerviosa y una recuperación rápida una vez finalizada la estimulación; 2) aumento de la captación neuronal de noradrenalina en el período posterior a la estimulación nerviosa; 3) retraso en la salida del  $^3\text{H}$ -DOPEG formado durante el período de estimulación nerviosa.

La primera posibilidad, que involucra la recuperación rápida del mecanismo de captación neuronal una vez finalizada la estimulación nerviosa podría estar relacionada con el retorno del terminal nervioso a las condiciones de reposo, al restaurarse las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana. Es bien conocido que el mecanismo de captación neuronal está asociado al transporte de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Iversen y Kravitz, 1966; Gillis y Paton, 1967; Bogdanski, Tissari y Brodie, 1968; Colburn, Goodwin, Murphy, Bunney y Davies, 1968; Bogdanský y Brodie, 1969). En consecuencia, los aumentos de permeabilidad a estos iones y los cambios en sus concentraciones a ambos lados de la membrana del terminal durante y después de la estimulación nerviosa podrían ser responsables de la reducción de la captación neuronal durante el período de estimulación nerviosa y de su recuperación posterior.

La concentración de noradrenalina en el espacio sináptico sería otro factor que podría estar involucrado con los cambios de captación neuronal durante y después de la estimulación nerviosa. Se sabe que la captación de noradrenalina es un proceso saturable (Iversen, 1963; Colburn, Goodwin, Murphy, Bunney y Davies, 1968; Drasko~~zy~~zy y Trendelenburg, 1970; Granata, Stefano y Langer, 1974). La concentración de noradrenalina que se alcanza en el espacio sináptico por estimulación nerviosa, podría estar comprendida dentro del rango de concentraciones de sustrato que saturan el proceso de captación neuronal. En consecuencia la saturación de la captación neuronal sería mayor cuando los nervios se estimulan a frecuencias altas. En el período posterior a la estimulación nerviosa al disminuir la concentración de noradrenalina

en el espacio sináptico se desplazaría la cinética del proceso de captación desde la región de saturación hacia la región donde este proceso sigue una relación lineal con la concentración de noradrenalina presente en la sinapsis. No obstante, parecería que la saturación del mecanismo de captación de noradrenalina, no es el responsable de la reducción observada en la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG durante el período de estimulación a medida que se aumenta la frecuencia.

En los experimentos realizados en presencia de fentolamina y bajo condiciones en las cuales la liberación del transmisor aumentó 7 veces, durante los 5 minutos de estimulación nerviosa a 1 Hz, el porcentaje de  $^3\text{H}$ -DOPEG formado durante el período de estimulación nerviosa fue similar al obtenido en el grupo control. Recientemente Hughes (1972) llegó a la conclusión que el mecanismo de captación neuronal de noradrenalina no se saturaba para un rango amplio de frecuencias (2 a 16 Hz).

La segunda posibilidad implica un aumento de la captación neuronal en el período posterior a la estimulación nerviosa. En apoyo de esta hipótesis, el aumento en la fracción de  $^3\text{H}$ -DOPEG después de la estimulación nerviosa, se observó no sólo en valores porcentuales sino también en término de valores absolutos. Un aumento de la captación neuronal y retención de  $^3\text{H}$ -noradrenalina asociada a la estimulación nerviosa fue observada por otros autores (Gillis, 1963; Chang y Chiueh, 1969; Bhagat y Ziedman, 1970). Surge del análisis de estos diseños experimentales que el aumento en la captación neuronal de  $^3\text{H}$ -noradrenalina observada por algunos de estos autores (Chang y Chiueh, 1969; Bhagat y Ziedman, 1970) muy bien podría estar relacionada con un aumento del proceso de captación luego de la aplicación de cada serie de impulsos, dado que en estos estudios se empleó estimulación intermitente en lugar de estimulación nerviosa continua. En adición, Gillis (1963), observó una mayor captación y retención de  $^3\text{H}$ -noradrenalina en las aurículas de gato, luego de estimular los nervios a 20 Hz durante 30 segundos.

El aumento en la recaptación neuronal de noradrenalina, al finalizar la estimulación nerviosa puede representar un mecanismo fisiológico de inactivación del neurotransmisor liberado cuando la respuesta deseada del órgano efector ha sido alcanzada. Si bien los factores que darían lugar al aumento del transporte de noradrenalina a través de la membrana neuronal, después de la estimulación

no se estudian en este trabajo, es posible que dicho aumento esté relacionado con los cambios en las concentraciones iónicas que tienen lugar a ambos lados de la membrana neuronal desde el momento de la despolarización hasta alcanzar el estado de reposo.

La tercera posibilidad involucra la retención por el terminal nervioso adrenérgico o por el tejido del  $^3\text{H}$ -DOPEG formado durante la estimulación nerviosa. Si los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina se retienen, su salida al efluente venoso estará retrasada, por lo tanto este fenómeno podría ser el resultado de: a) cambios en la permeabilidad de la membrana del terminal nervioso durante la despolarización, b) atrapamiento mecánico debido a la contracción del órgano efector en respuesta a la estimulación nerviosa.

Si bien no hay evidencias para justificar una disminución en la permeabilidad de la membrana neuronal y en consecuencia del eflujo de los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina durante la estimulación nerviosa, Cubeddu y Weiner (1975b) sugirieron que la liberación espontánea de productos radiactivos se reduce cuando se estimula el terminal nervioso. Si bien en nuestras condiciones experimentales no se observa disminución del eflujo espontáneo durante y después del período de estimulación nerviosa, estos resultados no excluyen la posibilidad que existan cambios de permeabilidad en la membrana durante la despolarización.

Con respecto a la posibilidad, que el retraso en la salida de los  $^3\text{H}$ -metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, se deba al atrapamiento por la contracción del órgano efector, es interesante destacar que el porcentaje de radiactividad total en las muestras posteriores a la estimulación aumenta con la frecuencia (es decir, cuando las respuestas del órgano efector aumentan en magnitud y en duración). No obstante en presencia de fentolamina y bajo condiciones en las cuales las respuestas mecánicas a la estimulación nerviosa están completamente bloqueadas, hubo una disminución significativa en la fracción de radiactividad recogida después de la estimulación nerviosa, cuando se la comparó con el control correspondiente. En adición, la secuencia temporal de salida del  $^3\text{H}$ -DOPEG, liberado durante y después de la estimulación nerviosa, en presencia de fentolamina no difirió signi-

ficativamente de la obtenida en condiciones controles (Comparar Figs. 10,11 y 20). En consecuencia nuestros resultados, no apoyan la hipótesis que el atrapamiento mecánico de los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina, sea el motivo del incremento observado en la fracción del  $^3\text{H}$ -DOPEG liberado después de la estimulación nerviosa.

En nuestras condiciones experimentales la cocaína no aumentó la liberación fraccional de radiactividad por shock, en condiciones que previno la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG (Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Langer y Enero, 1974) a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. El hecho que la cocaína no aumente la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa, puede deberse en parte a un aumento de la autoinhibición, por la noradrenalina liberada a través de los receptores alfa presinápticos que regulan la liberación de noradrenalina (Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Langer, 1974b, Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974). El hecho que la inhibición de la captación neuronal por cocaína prevenga la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG y no aumente la liberación total de radiactividad por estimulación nerviosa sugiere que la fracción de radiactividad del transmisor liberado que es recaptada por el terminal nervioso y almacenado en las vesículas debe ser muy pequeña. Estos resultados son compatibles con el hecho que la mayor parte de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina que es recaptada por el terminal nervioso se metaboliza a  $^3\text{H}$ -DOPEG antes que almacenarse para su posterior reuso. A conclusiones similares llegaron Langer (1974a), Langer y Enero (1974) y Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner (1974).

De nuestros resultados podemos concluir que el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada durante el período de estimulación nerviosa difiere del observado en el período de postestimulación. En el período de estimulación nerviosa la mayor parte de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina se recoge sin metabolizar, mientras que en el período de postestimulación casi el 80% de la radiactividad la forman los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina, siendo la fracción más importante la del glicol deaminado. El aumento selectivo del  $^3\text{H}$ -DOPEG en el período de postestimulación es compatible con el hecho que la captación neuronal del transmisor liberado por estimulación nerviosa podría estar aumentada después de la estimulación nerviosa.

Con respecto al papel de la captación neuronal en la neurotransmisión adrenérgica, varios autores han postulado que la recaptación neuronal del transmisor liberado es un proceso de inactivación y mecanismo importante de ahorro y reuso de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa (Haefely, Hurlimann y Thoenen, 1965; Hedqvist y Stjärne, 1969). Sin embargo nuestros resultados, no son compatibles con la hipótesis que sugiere que la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, es posteriormente recaptada y almacenada en el terminal adrenérgico. En efecto la gran formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que ha sido recaptada por el terminal adrenérgico, sugiere que pueden existir diferencias entre el proceso de captación neuronal en condiciones de reposo y el que opera durante y después de la estimulación nerviosa.

En condiciones de reposo la captación neuronal estaría acoplada con el almacenamiento vesicular (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974), mientras que durante y después de la estimulación nerviosa la captación neuronal de noradrenalina estaría acoplada con el metabolismo presináptico a través de las enzimas monoamino oxidasa y aldehído reductasa.



IC Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Resultados

1.- Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 5 y 10 Hz en condiciones controles. En condiciones controles cuando los nervios fueron estimulados a 5 Hz ó 10 Hz no se encontraron diferencias significativas ni cuando los valores se expresaron como liberación fraccional por shock (Fig. 5B), ni cuando se expresaron como nCi liberados por gramo de tejido (Tabla 9). De la radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, un 70% aproximadamente le correspondió a la  $^3\text{H}$ -noradrenalina mientras que el 30% restante, se debe a los  $^3\text{H}$ -metabolitos de la noradrenalina (Figs. 6 y 22), para ambas frecuencias de estimulación.

En estos grupos experimentales, donde se usaron dos frecuencias de estimulación nerviosa 5 ó 10 Hz, después de un período de estimulación control, se aplicó una segunda estimulación durante la cual la perfusión del bazo fue interrumpida durante 60 segundos, ocluyendo simultáneamente la cánula arterial y venosa (para detalles ver Métodos). El período de interrupción de la perfusión comprendió, todo el período de estimulación a 5 Hz y un adicional de 30 segundos después de la estimulación a 10 Hz. Cuando se interrumpió la perfusión del bazo, se redujo la liberación total de radiactividad inducida por estimulación nerviosa. A 5 Hz, la reducción fue de  $46.5 \pm 11.2\%$  (n=4), mientras que la reducción en la liberación por interrupción de la perfusión a 10 Hz fue de  $58.9 \pm 7.0\%$  (n=3). La diferencia entre estos dos valores no es significativamente diferente, lo que indica una reducción similar para ambas frecuencias.

En estos grupos experimentales, de los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina, se separó el glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG y los  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados, (esta fracción se debe a la suma de  $^3\text{H}$ -normetanefrina,  $^3\text{H}$ -ácido 3-metoxi-4-hidroxi-

mandélico y  $^3\text{H}$ -ácido 3-metoxi 4-hidroxifenilglicól. En la Figura 22 se muestra el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en los controles y durante la interrupción de la perfusión. Para ambas frecuencias de estimulación nerviosa, 5 y 10 Hz, se observó un aumento en el metabolismo del transmisor en los grupos donde se interrumpió el flujo. En estas condiciones más del 60% de la radiactividad total liberada a 5 Hz fue debida a metabolitos de la noradrenalina, siendo el  $^3\text{H}$ -DOPEG el principal metabolito, que representó el  $40.0 \pm 5.4\%$  (n=4) del incremento total en radiactividad. Resultados similares se encontraron para la frecuencia de 10 Hz, no obstante, en este caso la contribución de los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina fue menor que la observada a 5 Hz, tanto en los controles, como en los experimentos donde se interrumpió la perfusión (Fig 21).

En la Tabla 9 se muestran los valores absolutos para la radiactividad total, la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y la noradrenalina endógena en diferentes grupos experimentales. En los controles los valores de radiactividad total, de  $^3\text{H}$ -noradrenalina y de noradrenalina endógena obtenidos por estimulación nerviosa a 5 Hz y a 10 Hz fueron similares (Tabla 9). Cuando se interrumpió la perfusión se redujo la liberación total de radiactividad,  $^3\text{H}$ -noradrenalina y noradrenalina endógena para las dos frecuencias de estimulación utilizadas.

Para minimizar la variabilidad entre los distintos bazos, se analizaron los efectos de la interrupción de la perfusión sobre la liberación del transmisor, teniendo en cuenta los cocientes obtenidos dentro de la misma preparación. La disminución en la liberación total de radiactividad, inducida por interrupción de la perfusión fue similar a 5 y 10 Hz (Tabla 10). En estas condiciones la disminución en la liberación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina fue más pronunciada que la observada para la radiactividad total. Esta diferencia se debe a que la metabolización del transmisor liberado por estimulación nerviosa, es mayor cuando se interrumpe la perfusión, que en condiciones controles. En la Tabla 10, se puede observar que la disminución en la liberación de noradrenalina y  $^3\text{H}$ -noradrenalina inducida por estimulación nerviosa durante la interrupción de la perfusión fue similar en ambos casos.

2.- Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa durante la interrupción de la perfusión. En presencia de cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) la liberación total de radiactividad, de  $^3\text{H}$ -noradrenalina y de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa a 10 Hz no difirió significativamente de los valores controles (Tabla 9). Sin embargo, cuando se analizó el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 10 Hz en presencia de cocaína, se observó, una inhibición completa en la formación del glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG, y un aumento significativo en la proporción del neurotransmisor tritiado liberado sin metabolizar (Fig. 23) con respecto a los controles. Resultados similares fueron observados a otras frecuencias (Tabla 5). Por otra parte la fracción de  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados no fue afectada por la cocaína (Fig. 23).

Durante la interrupción de la perfusión, la cocaína previno el aumento en el metabolismo del transmisor tritiado, que había sido observado en los controles (Fig. 23). Por otra parte la liberación total de radiactividad en presencia de cocaína fue reducida por la interrupción de la perfusión en mucho menor extensión que en los controles (Tabla 10).

Cuando se analizaron los cocientes obtenidos dentro del mismo experimento, para la noradrenalina endógena liberada por estimulación nerviosa, se observó que la cocaína aumentó la liberación del transmisor en el bazo perfundido de gato (Fig. 24). Este aumento en la liberación de noradrenalina, en presencia de cocaína se debió a la inhibición en la formación del DOPEG, a partir del transmisor liberado por estimulación nerviosa. En apoyo de esto, se encontró una correlación altamente significativa entre el porcentaje de noradrenalina liberada que fue recogida como  $^3\text{H}$ -DOPEG en los controles y el aumento en la noradrenalina liberada en presencia de cocaína dentro del mismo experimento ( $r=0.98$ ;  $p < 0.01$ ,  $n=4$ ).

Durante la interrupción de la perfusión, la liberación de noradrenalina endógena se redujo en  $63.1 \pm 12.3\%$  ( $n=3$ ) en los controles, mientras que en presencia de cocaína esta reducción fue sólo de  $27.5 \pm 6.9\%$  ( $n=4$ ) (Fig. 24). ( $p < 0.05$ ).

Grupo Experimental	Frecuencia de estimulación (Hz)	Radiactividad nCi/g tejido (a)	Liberación total de:	
			<sup>3</sup> H-Noradrenalina nCi/g tejido (b)	Noradrenalina ng/g tejido (c)
Controles	5	96.3 ± 20.0 (10)	54.9 ± 16.1 (10)	17.9 ± 6.1 (9)
Controles	10	92.3 ± 14.8 (8)	67.6 ± 15.8 (8)	41.1 ± 13.0 (8)
IF	5	46.7 ± 12.0 (4)	17.2 ± 4.6 (4)	6.8 ± 1.1 (3)
IF	10	40.6 ± 7.3 (3)	22.0 ± 5.4 (3)	18.4 ± 7.4 (3)
Coc 2.9 uM	10	91.0 ± 21.6 (4)	84.7 ± 20.4 (4)	43.3 ± 7.5 (4)
Coc 2.9 uM + IF	10	52.3 ± 7.3 (4)	47.1 ± 6.9 (4)	31.2 ± 6.3 (4)

Tabla 9 : Efecto de la interrupción de la perfusión y de la cocaína sobre el transmisor liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

- a) Suma del aumento total de radiactividad durante y después del período de estimulación nerviosa, expresado en nCi por gramo de tejido.
- b) Suma del aumento total en <sup>3</sup>H-noradrenalina durante y después del período de estimulación nerviosa, expresado en nCi por gramo de tejido.
- c) Aumento total en noradrenalina endógena inducido por estimulación nerviosa y determinada fluorimétricamente.

IF: interrupción de la perfusión durante 1 minuto (Para detalles ver Métodos).

Coc: cocaína, 2.9 uM, la droga se adicionó 15 minutos antes del período de estimulación nerviosa.

El número de experimentos para cada grupo, se indica con los números entre paréntesis. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

Cociente (a)	n	Frecuencia de estimulación	Liberación total de:		
			Radiactividad	<sup>3</sup> H-Noradrenalina	Noradrenalina
<u>IF</u> CONT	3	5 Hz	0.45 ± 0.10	0.23 ± 0.04	0.31 ± 0.10
	3	10 Hz	0.40 ± 0.07	0.27 ± 0.03	0.37 ± 0.10
<u>COC</u> CONT	4	10 Hz	0.94 ± 0.10	1.25 ± 0.10	1.52 ± 0.27
<u>COC + IF</u> COC	4	10 Hz	0.62 ± 0.07	0.60 ± 0.06**	0.72 ± 0.07*

Tabla 10 : Efecto de la interrupción de la perfusión y de la cocaína sobre la liberación del transmisor inducida por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

a) Cocientes entre los valores de liberación total de radiactividad, <sup>3</sup>H-noradrenalina y noradrenalina, inducido por estimulación nerviosa, bajo las condiciones experimentales descritas, obtenidos dentro del mismo experimento (para detalles ver Métodos).

IF: interrupción de la perfusión durante 1 minuto.

CONT: controles      COC: cocaína

COC + IF: Cocaína 2.9 µM e interrupción de la perfusión. La cocaína se adicionó al medio de perfusión 15 minutos antes de la estimulación nerviosa.

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.05 cuando se compara contra  $\frac{IF}{CONT}$

\*\*p < 0.01 cuando se compara contra  $\frac{IF}{CONT}$

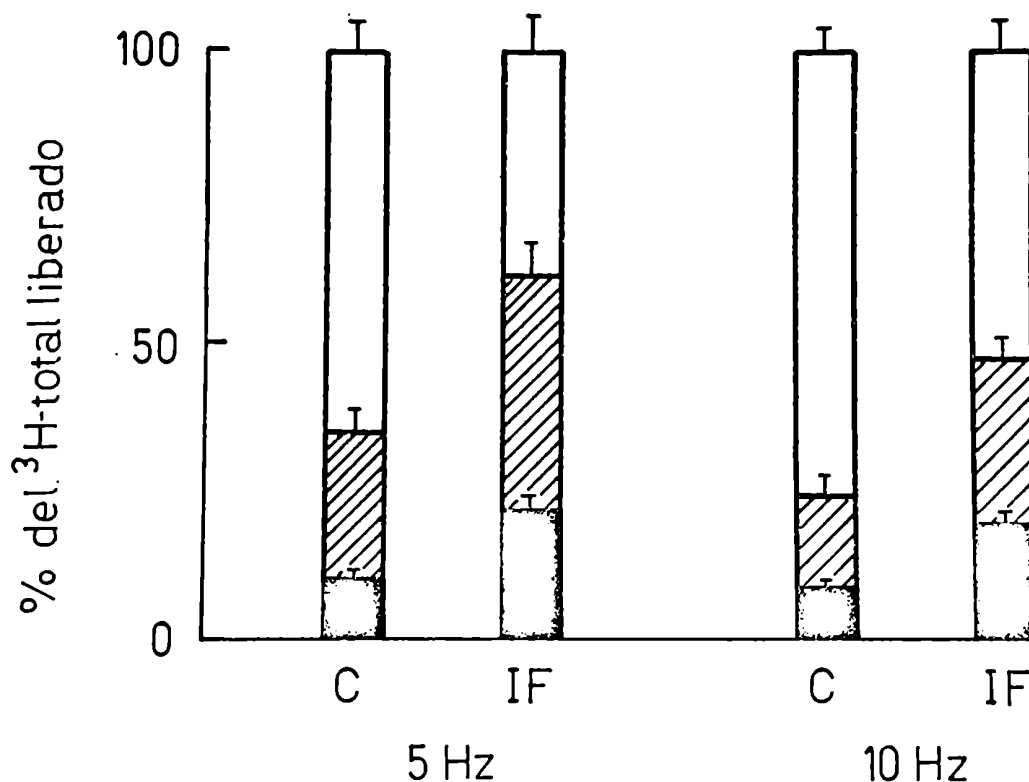





Figura 22: Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: porcentaje del aumento total en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa.

C: controles; I.F.: interrupción de la perfusión durante un minuto (para detalles ver Métodos).

-  NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina
-  DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
-  OMET: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo). C: (n=10); IF: (n=4).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 10 Hz durante 30 seg (0.1 mseg, voltaje su pramáximo). C: (n=8); IF: (n=3).

n: número de experimentos por grupo.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

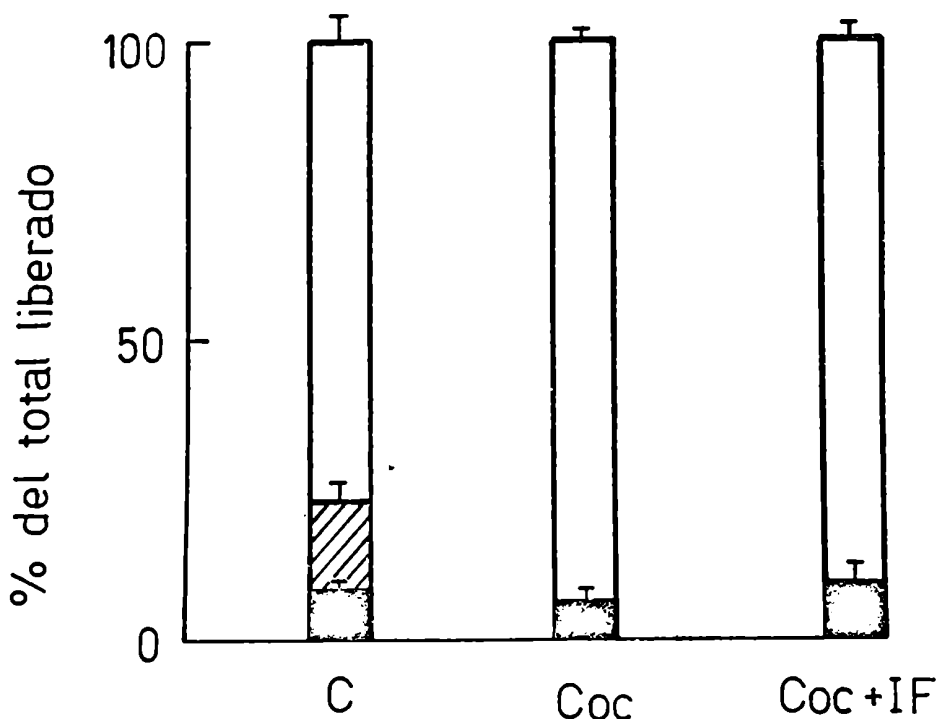





Figura 23: Efecto de la cocaína y la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido.

Ordenada: porcentaje del aumento total en radiactividad sobre los valores basales, inducido por estimulación nerviosa (10 Hz durante 30 seg, 0.1 msec, voltaje supramáximo).

C: controles (n=8); COC: cocaína 2.9  $\mu$ M (n=4); COC + IF: cocaína 2.9  $\mu$ M e interrupción de la perfusión (n=4). La cocaína se adicionó al medio de perfusión 15 minutos antes de la estimulación nerviosa.

-  NA: <sup>3</sup>H-noradrenalina.
-  DOPEG: <sup>3</sup>H-3,4-dihidroxifenilglicol
-  OMET: <sup>3</sup>H-metabolitos O-metilados deaminados.

n: número de experimentos por grupo

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

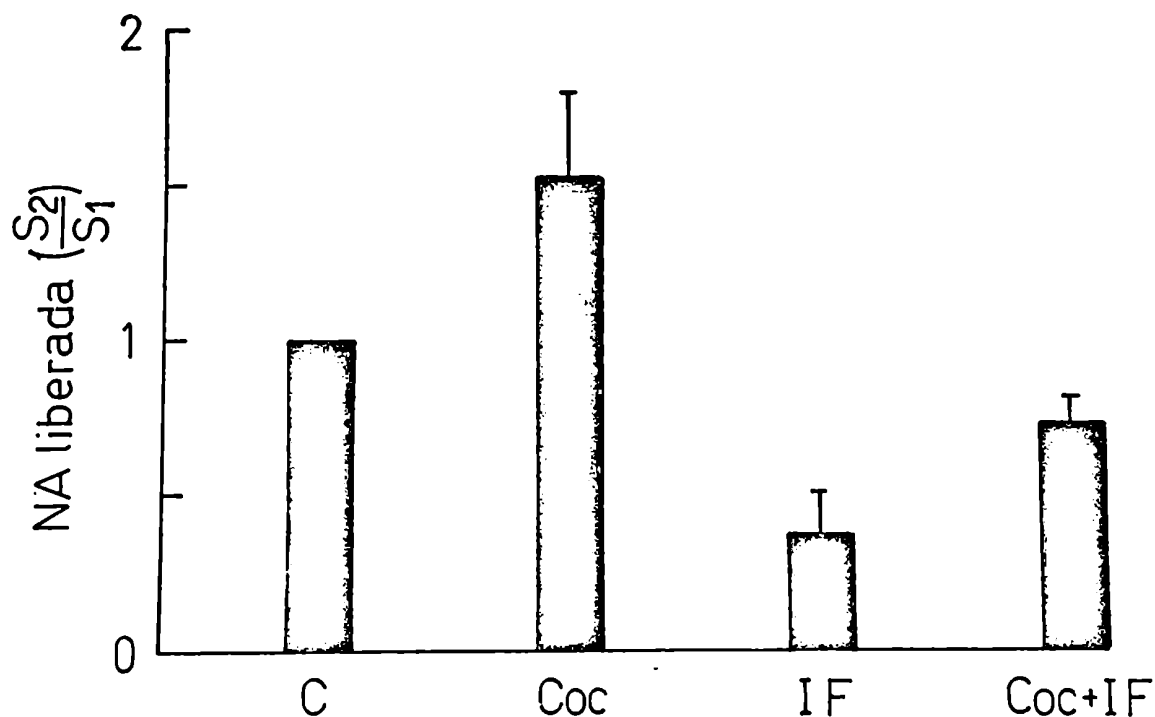


Figura 24. Efecto de la cocaína y de la interrupción de la perfusión sobre la liberación de noradrenalina endógena inducida por estimulación nerviosa en el bazo perfundido.

Ordenada: cociente del transmisor liberado (ng de NA) entre el segundo período de estimulación ( $S_2$ ) y el primero ( $S_1$ ) obtenido en la misma preparación.

Los nervios fueron estimulados a 10 Hz durante 30 seg (0.1 msec, voltaje supramáximo).

C: controles (n=2); COC: cocaína 2.9  $\mu$ l (n=4); IF: interrupción de la perfusión (n=3); COC + IF: cocaína 2.9  $\mu$ l e interrupción de la perfusión (n=4).

n: número de experimentos por grupo.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media, excepto para el grupo control que es la media de 2 experimentos.



Cuando la estimulación nerviosa se realizó durante la interrupción de la perfusión del bazo la liberación total de radiactividad y de noradrenalina endógena disminuyó para las dos frecuencias de estimulación utilizadas, 5 y 10 Hz. Esto coincide con lo encontrado por Kirpekar y Puig (1971). No obstante parte de nuestros resultados difieren de los de estos autores, ya que nosotros observamos que una proporción significativa de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa durante la interrupción de la perfusión se recoge metabolizada. Esta diferencia se debe probablemente al método empleado por Kirpekar y Puig (1971) para la separación de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y sus metabolitos. Graefe, Stefano y Langer (1973), demostraron que con el método de Anton y Sayre (1962) la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y el glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG son eluidos juntos de la columna de alúmina. Dado que en el bazo perfundido de gato el  $^3\text{H}$ -DOPEG representa el principal camino metabólico para la noradrenalina liberada por estímulo nervioso, si la  $^3\text{H}$ -noradrenalina y el  $^3\text{H}$ -DOPEG se eluyen juntos, la mayor parte del incremento en radiactividad producido por estimulación nerviosa será atribuido a la  $^3\text{H}$ -noradrenalina. Otra razón que explicaría la diferencia entre nuestros resultados y los de Kirpekar y Puig (1971) es que nosotros recolectamos muestras durante y después de la estimulación nerviosa, mientras que estos autores sólo consideraron las muestras recogidas durante el período de estimulación nerviosa. Como se muestra en la Fig 11, durante la estimulación nerviosa le corresponde a la noradrenalina la mayor parte del incremento en radiactividad, mientras que la contribución de los metabolitos de la noradrenalina se hace importante en las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa. Por lo tanto, la liberación total de radiactividad inducida por estimulación nerviosa debe incluir las muestras recogidas durante y después del período de estimulación nerviosa, cuyos valores sean superiores a los de la radiactividad de las muestras de pre-estimulación.

Cuando se aumentó el tiempo de contacto entre el transmisor liberado y el tejido por interrupción de la perfusión del bazo el metabolismo de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa fue mayor que en los controles. Paton y Gillis (1965) y Hertting (1965) demostraron que la captación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina estaba relacionada con la velocidad de flujo en el bazo perfundido de gato: es decir, que la disminución

del flujo aumentaba la retención de  $^3\text{H}$ -noradrenalina por el tejido. En nuestras condiciones experimentales aumentó la recaptación de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa y su deaminación durante la interrupción de la perfusión, ya que se incrementó la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG, en estas condiciones. Compatible con esta hipótesis es el hecho que en presencia de cocaína, la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa fue completamente anulada, tanto en los controles como durante la interrupción de la perfusión.

En estos experimentos se midió la fracción de  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados, que está constituida por  $^3\text{H}$ -normetanefrina y  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados deaminados. La fracción de  $^3\text{H}$ -metabolitos O-metilados, liberados por estimulación nerviosa aumentó durante la interrupción de la perfusión, con respecto a los controles, sin embargo, la cocaína no previno el aumento de esta fracción. Esto puede deberse a una suma algebraica de efectos, dado que la  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa es de origen extraneuronal, mientras que los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados se originarían a nivel neuronal y extraneuronal. Si bien en presencia de cocaína disminuye la formación de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados, a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, la formación de  $^3\text{H}$ -normetanefrina aumenta.

Cuando se utilizó cocaína, aumentó la cantidad de noradrenalina endógena liberada por estimulación nerviosa, pero no se modificó la radiactividad total liberada respecto de los controles. Esta diferencia se debe a la inhibición en la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en presencia de cocaína.

La disminución en la liberación del transmisor obtenida durante la interrupción de la perfusión fue parcialmente debida a un aumento en el metabolismo, dado que también se redujo la liberación total de radiactividad. En adición a esto se observó que la cocaína redujo, pero no previno enteramente la disminución del transmisor liberado por estimulación nerviosa durante la interrupción de la perfusión.

La disminución en la liberación del transmisor durante la interrupción de la perfusión puede ser parcialmente debida a una reducción en la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa. Esto se debería a la inhibición de la liberación de la noradrenalina, por una prolongada activación de los receptores alfa presinápticos que regulan la liberación del transmisor por estimulación nerviosa (Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Langer, 1974b).

# CAPITULO II

MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA  
POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.-

RESULTADOS

DISCUSION

II - MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

IIA - Mecanismo de retroinformación positiva mediado a través de receptores beta de localización presináptica.

Resultados

- 1.- Efecto del isoproterenol sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa a baja frecuencia.
- 2.- Efecto del isoproterenol sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa en presencia de propranolol.

Discusión

IIB - Mecanismo de retroinformación negativa mediado a través de receptores alfa de localización presináptica. Influencia de la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada.

Resultados

- 1.- Inhibición por noradrenalina exógena del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias.
- 2.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre la liberación del neurotransmisor inducida por estimulación nerviosa a distintas frecuencias.
- 3.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en presencia de 0.26 mM de calcio.
- 4.- Inhibición por noradrenalina exógena del  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en presencia de 0.26 mM de calcio.

Discusión

IIC - Diferencia en la potencia bloqueante de la fenoxibenzamina sobre los receptores alfa adrenérgicos pre y postsinápticos.

Resultados

- 1.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre las respuestas a la noradrenalina exógena.
- 2.- Efecto de bajas concentraciones de fenoxibenzamina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.
- 3.- Efecto de la fenoxibenzamina ( $2.9 \times 10^{-8}\text{M}$  y  $2.9 \times 10^{-7}\text{M}$ ) sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Discusión

II - MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

INTRODUCCION

La noradrenalina liberada por estimulación nerviosa regularía su propia liberación por un mecanismo de retroinformación negativo, a través de receptores alfa de localización presináptica, que jugarían un rol fisiológico dentro de la neurotransmisión adrenérgica (Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Farnebo y Hamberger, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Starke, 1972a; Enero y Langer, 1973; Langer, 1973, 1974b; Rand, Story, Allen Glover y Mc Culloch, 1973; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Farah y Langer, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). De acuerdo con esta hipótesis el neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa inhibiría su propia liberación a través de la activación de receptores alfa de localización presináptica desencadenando un mecanismo de retroinformación negativo el cual llevaría a una disminución en la liberación del transmisor.

En apoyo de esta hipótesis se ha demostrado que la estimulación de los receptores presinápticos por agonistas alfa reduce la liberación del transmisor (Farnebo y Hamberger, 1971; Starke, 1971; 1972b; Langer, Enero, Adler-Graschinsky y Stefano, 1972; Kirpekar, Furchgott, Wakade y Prat, 1973; Langer, 1973; Starke, Montel, Gayk y Merker, 1974), mientras que el bloqueo de los receptores alfa presinápticos aumenta la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa (Brown y Gillespie, 1957; Langer, 1970; Langer, Enero, Stefano y Rothlin, 1970; Farnebo y Hamberger, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Starke, Montel y Schumann, 1971; Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Farah y Langer, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). Este mecanismo es independiente de que el tipo de receptor responsable de la respuesta del órgano efector sea alfa o beta adrenérgico.

En adición, ha sido postulado recientemente que receptores de tipo beta, de localización presináptica estarían involucrados en un mecanismo de retroinformación positivo, para la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa (Langer, Adler-Graschinsky y Enero, 1974; Adler-Graschinsky y Langer, 1975). Existirían dos meca-

nismos presinápticos involucrados en la regulación de la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa. El primero, mediado por receptores beta, sería activado por bajas concentraciones de noradrenalina, originando un aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa. El segundo, mediado a través de receptores adrenérgicos alfa, actuaría cuando se alcanzan concentraciones altas de noradrenalina en el espacio sináptico dando lugar a una inhibición de la liberación del transmisor por estimulación nerviosa.

El bazo perfundido de gato es una preparación clásica para realizar estudios de liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa. Por lo tanto estudiamos los efectos de un agonista de receptores beta, el isoproterenol y de un bloqueante, el propranolol sobre el transmisor liberado por estimulación nerviosa.

Si bien los bloqueantes alfa, como la fenoxibenzamina, aumentan la liberación de noradrenalina, inducida por estimulación nerviosa, los aumentos son más pronunciados cuando se emplean frecuencias bajas de estimulación (Brown y Gillespie, 1957; Kirpekar y Cervoni, 1963; Haefely, Hurlimann y Thoenen, 1965). Estos efectos no pueden ser atribuidos a la inhibición de la captación neuronal por fenoxibenzamina (Cubeddu, Langer, Weiner, 1974), dado que la cocaína en una concentración que inhibe efectivamente la captación neuronal, no aumenta la liberación del transmisor por estimulación nerviosa. La efectividad disminuida de la fenoxibenzamina para aumentar la liberación del transmisor a 30 Hz, podría estar relacionada con los valores altos de liberación por shock obtenidos a esta frecuencia, en ausencia de drogas. Dado que esto podría estar relacionado con una mayor entrada de calcio al terminal nervioso cuando se estimula a frecuencias altas (Cubeddu y Weiner, 1975a) fue de nuestro interés explorar esta posibilidad. Para ello se estudió el mecanismo que regula la liberación de noradrenalina, a través de receptores alfa presinápticos, utilizando distintas frecuencias de estimulación nerviosa y variando la concentración de calcio en el medio de perfusión.

En el bazo perfundido de gato, las respuestas del órgano efector son mediadas a través de receptores de tipo alfa. Si los receptores alfa del terminal adrenérgico y la

célula efectora fueran idénticos y si se estipula que para igual ocupación de los receptores, las respuestas son idénticas, se debería requerir la misma concentración de noradrenalina para activar los receptores alfa pre y postsinápticos. Bajo estas condiciones en los tejidos en los cuales las respuestas del órgano efector son mediados a través de receptores alfa, la autoinhibición del transmisor liberado, reduciría la disponibilidad de noradrenalina para generar una respuesta del órgano efector. Esto reduciría la eficiencia de la neurotransmisión.

Una segunda posibilidad es que los receptores alfa pre y postsinápticos no sean idénticos y que la afinidad de la noradrenalina para estos dos receptores difiera.

Esta hipótesis diferencial entre los receptores alfa pre y postsinápticos podría reflejarse en la diferencia de potencia de un antagonista alfa irreversible, para bloquear los receptores presinápticos y postsinápticos. Se investigó esta posibilidad, usando concentraciones bajas de fenoxibenzamina en el bazo perfundido de gato y se comparó la potencia relativa de esta droga para bloquear las respuestas del órgano efector y aumentar la liberación del transmisor por estimulación nerviosa.



IIA - Mecanismo de retroinformación positiva, mediado a través de receptores beta de localización presináptica.

Resultados

1.- Efecto del isoproterenol sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa a baja frecuencia. En el grupo control la declinación en el  $^3\text{H}$ -total liberado como resultado de siete períodos de estimulación nerviosa, a 1 Hz durante 120 segundos, fue pequeña cuando los valores de liberación fraccional obtenidos en cada estimulación ( $S_x$ ) se refirieron a la primera estimulación nerviosa ( $S_1$ ) en cada experimento (Fig 25). Los valores de liberación fraccional de la primera ( $S_1$ ) y última ( $S_7$ ) estimulación nerviosa fueron  $4.79 \pm 1.30 \times 10^{-5}$  (n=3) y  $4.54 \pm 1.48 \times 10^{-5}$  (n=3) respectivamente.

La exposición al agonista de los receptores beta, el isoproterenol, en una concentración que no modifica la captación neuronal de noradrenalina (Adler-Graschinsky y Langer, 1975) aumentó significativamente la liberación de radiactividad inducida por estimulación nerviosa, para las concentraciones 1.4 y 14 nM de la droga (Tabla 11). El aumento en la liberación fraccional de radiactividad, en presencia de distintas concentraciones de isoproterenol, fue concentración dependiente y reversible por lavado (Fig 25).

2.- Efecto del isoproterenol sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa en presencia de propranolol. Cuando a partir del segundo período de estimulación nerviosa, se agregó el bloqueante de los receptores beta, propranolol, 0.1  $\mu\text{M}$ , no se modificó la liberación fraccional de radiactividad con respecto al control sin droga (Comparar Fig 25 y 26).

Sin embargo, el propranolol previno completamente, el aumento, inducido por estimulación nerviosa en presencia de isoproterenol (Fig 26).

El bloqueo por propranolol de los efectos del isoproterenol sobre la radiactividad liberada por estimulación nerviosa, es compatible con el hecho que el au-

Grupo Experimental	Liberación fraccional (a) por shock ( $\times 10^{-5}$ )	Cociente (b) $S_x/S_1$
S <sub>1</sub> - Control	4.83 $\pm$ 0.74	1.00
S <sub>2</sub> - Control	4.72 $\pm$ 0.63	0.99 $\pm$ 0.04
S <sub>3</sub> - ISOP 0.14 nM	5.24 $\pm$ 0.79	1.09 $\pm$ 0.02
S <sub>4</sub> - ISOP 1.4 nM	6.01 $\pm$ 0.97	1.24 $\pm$ 0.01*
S <sub>5</sub> - ISOP 14 nM	7.78 $\pm$ 1.32	1.59 $\pm$ 0.05*
S <sub>6</sub> - Control	4.61 $\pm$ 0.76	0.96 $\pm$ 0.07
S <sub>7</sub> - Control	4.57 $\pm$ 0.70	0.96 $\pm$ 0.08

Tabla 11: Efecto de concentraciones crecientes de isoproterenol sobre el <sup>3</sup>H- total liberado por estimulación nerviosa

a) Liberación fraccional por shock: nCi totales liberados por shock dividido por el total de nCi remanentes en el tejido al comienzo de la estimulación nerviosa. Los nervios fueron estimulados a 1 Hz durante 120 seg (0.1 msec, voltaje supramáximo).

b) Cociente entre los valores de liberación fraccional obtenidos en cada estimulación (S<sub>x</sub>) y el obtenido en la primera estimulación nerviosa (S<sub>1</sub>) dentro del mismo experimento.

ISOP: (-)isoproterenol, la droga se adicionó en la concentración indicada 10 minutos antes de la estimulación nerviosa.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de 4 experimentos.

\* p < 0.001 cuando se compara contra S<sub>2</sub>

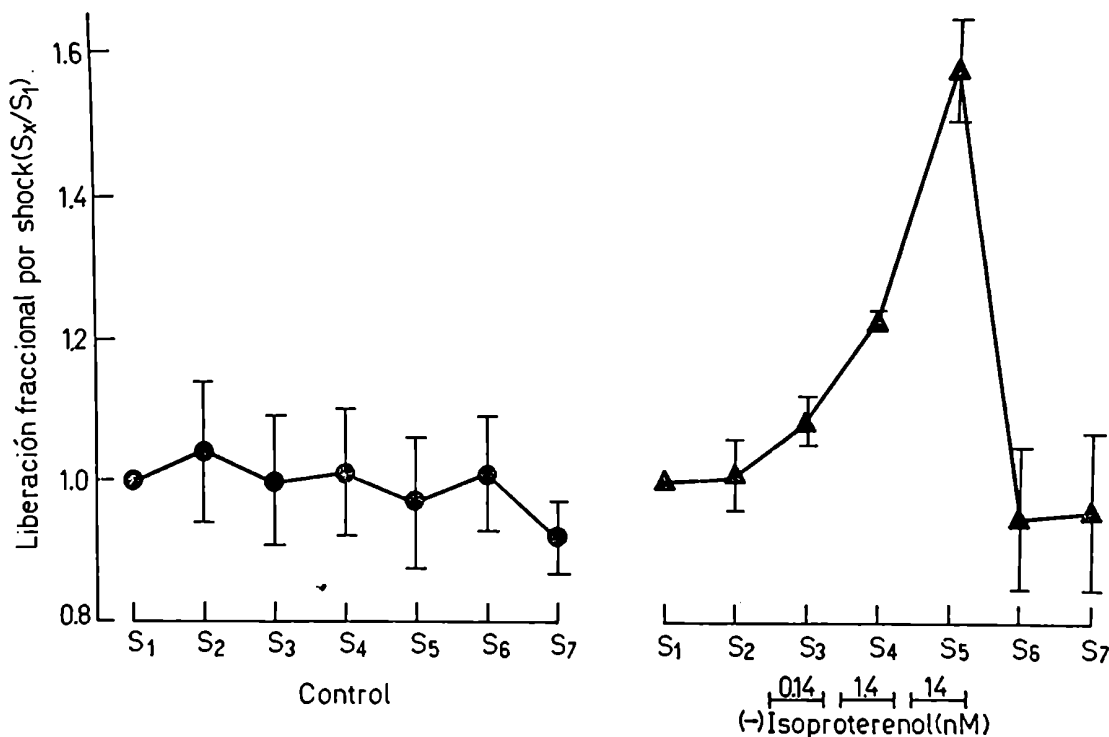


Figura 25: Efecto del isoproterenol sobre el <sup>3</sup>H-total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: representa la liberación fraccional por shock para la radiactividad total liberada en cada período de estimulación nerviosa, expresada como cociente del valor obtenido en cada estimulación (S<sub>x</sub>) con respecto al de la primera estimulación control (S<sub>1</sub>), dentro del mismo experimento.

Los nervios fueron estimulados a 1 Hz durante 120 seg (0.1 msec, voltaje supramáximo).

Abscisa: indica los períodos de estimulación (S<sub>1</sub> - S<sub>7</sub>)

●—● : controles (n=3) S<sub>1</sub> - S<sub>7</sub>

▲—▲ : (-)Isoproterenol (n=3) S<sub>3</sub>: 0.14 nM; S<sub>4</sub>: 1.4 nM; S<sub>5</sub>: 14 nM; S<sub>6</sub> y S<sub>7</sub> después del lavado del isoproterenol. La droga se agregó, a la solución de Krebs, en la concentración correspondiente, 10 minutos antes del comienzo de la estimulación nerviosa.

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

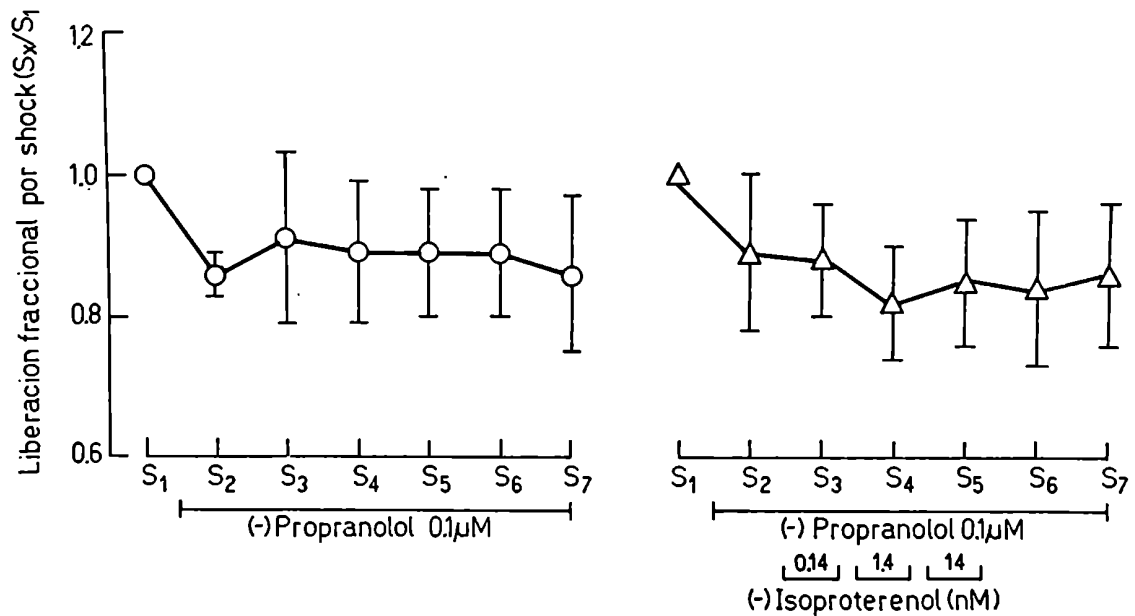


Figura 26: Efecto del isoproterenol sobre el <sup>3</sup>H-total liberado por estimulación nerviosa, en presencia de propranolol.

Ordenada: representa la liberación fraccional por shock para la radiactividad total liberada en cada período de estimulación nerviosa, expresada como cociente del valor obtenido en cada estimulación (Sx) con respecto al de la primera estimulación control (S<sub>1</sub>), dentro del mismo experimento.

Los nervios fueron estimulados a 1 hz durante 120 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

Abscisa: indica los períodos de estimulación (S<sub>1</sub> - S<sub>7</sub>)

○—○: S<sub>1</sub>: control. S<sub>2</sub> a S<sub>7</sub>: (-)propranolol, 0.1 μl. La droga se agregó a la solución de Krebs, 22 minutos antes de la estimulación S<sub>2</sub> y se mantuvo hasta el final del experimento (S<sub>7</sub>) (n=4).

△—△: S<sub>1</sub>: control. S<sub>2</sub> a S<sub>7</sub>: (-)propranolol 0.1 μl. (-)Isoproterenol: S<sub>3</sub>: 0.14 nM; S<sub>4</sub>: 1.4 nM; S<sub>5</sub>: 14 nM. El isoproterenol se adicionó a la solución de Krebs, que contenía propranolol, 10 minutos antes del comienzo de la estimulación nerviosa (n=6).

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

mento en el  $^3\text{H}$ -total observado por exposición al isoproterenol es mediado a través de la activación de receptores adrenérgicos beta.

### Discusión

En el bazo perfundido de gato, la fentolamina (  $3.1 \mu\text{M}$  ) y la fenoxibenzamina (  $29 \text{ nM}$  ) en concentraciones que no inhiben la captación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) de noradrenalina, aumentaron  $8.28 \pm 1.09$  (n=3) veces y  $2.89 \pm 0.74$  (n=4) veces la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa, cuando la frecuencia de estimulación fue 5 Hz. Este efecto se atribuye al bloqueo de los receptores alfa presinápticos, que median el mecanismo de retroinformación negativa, que regula la liberación de noradrenalina (Langer, 1974b).

En nuestras condiciones experimentales se observó un aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa en presencia de isoproterenol, que fue mucho menor que el obtenido con bloqueantes alfa adrenérgicos. Es de interés hacer notar que el aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa en presencia de isoproterenol es un efecto concentración dependiente y reversible luego de lavada la droga. El efecto obtenido con isoproterenol, no es debido al bloqueo de la captación neuronal de noradrenalina, dado que Adler-Graschinsky y Langer (1975) demostraron que la droga, en una concentración  $14 \text{ nM}$  no modifica la captación neuronal de noradrenalina.

El efecto del isoproterenol es independiente del tipo de receptores postsinápticos, responsables de las respuestas del órgano efector, dado que este agente aumentó la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa en aurículas aisladas de cobayo (Langer, Adler-Graschinsky y Enero, 1974; Adler-Graschinsky y Langer, 1975), membrana nictitante aislada de gato (Langer, Adler-Graschinsky y Enero, 1974), espirales de aorta de gato (Celuch y Langer, 1975), espirales de arterias y venas humanas (Stjärne y Brundin, 1975).

El bloqueante de los receptores beta, propranolol (0.1  $\mu$ M), en una concentración que no modifica la captación neuronal del neurotransmisor, ni produce bloqueo neuronal (Adler-Graschinsky y Langer, 1975) no modificó la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato. Un resultado similar fue obtenido, recientemente, por Stjärne y Brundin (1975) en arterias y venas humanas. Sin embargo Adler-Graschinsky y Langer (1975) encontraron que el propranolol (0.1  $\mu$ M) disminuye significativamente la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa, en aurículas aisladas de cobayo. El hecho que el propranolol no disminuya la liberación en nuestras condiciones experimentales podría deberse, a diferencias de sensibilidad al propranolol, entre los tejidos de distintas especies.

Cuando se estudió el efecto del isoproterenol en presencia de propranolol, esta droga, previno completamente el aumento de liberación de radiactividad inducido por estimulación nerviosa que se observó en presencia del agonista beta. Este resultado indicaría que el isoproterenol, aumenta la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa a través de la activación de receptores de tipo beta.

Stjärne y Brundin (1975) encontraron en arterias y venas humanas, que la adrenalina, catecolamina con propiedades agonistas de tipo alfa y beta, en concentraciones bajas aumenta, mientras que en concentraciones altas disminuye la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa.

El aumento en el transmisor liberado, que se observó en presencia de isoproterenol y el bloqueo de estos efectos por propranolol, indican que tales acciones se mediarían a través de receptores beta. Estos resultados son compatibles con la existencia en los terminales nerviosos adrenérgicos del bazo perfundido de gato, de un mecanismo que regularía la liberación del transmisor a través de receptores de localización presináptica, como ya ha sido demostrado en otros órganos (Langer, Adler-Graschinsky y Enero, 1974; Adler-Graschinsky y Langer, 1975; Stjärne y Brundin, 1975). La activación de este mecanismo por agonistas de tipo beta aumentaría la liberación del transmisor por estimulación nerviosa.

Este mecanismo de retroinformación positiva mediado a través de receptores beta de localización presináptica, aparentemente se desencadenaría cuando la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico es baja. En apoyo de esta hipótesis Celuch y Langer (1975) encontraron que el aumento obtenido con isoproterenol, en espirales de aorta de gato, era más pronunciado cuando menor la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada.

Recientemente, Dahlöf, Ablad, Borg, Ek y Waldek (1975) utilizando distintos bloqueantes de receptores beta, demostraron que los receptores presinápticos cuya activación aumenta la liberación del transmisor por estimulación nerviosa, serían principalmente de tipo  $\beta_1$ .

Muchos de los efectos inducidos por estimulación de receptores beta están asociados con la activación de la adenil ciclase y el consiguiente aumento en los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMP cíclico). Es de interés destacar que Wooten, Thoa, Kopin y Axelrod (1973) encontraron que el dibutiril AMP cíclico y la teofilina aumentan la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa en el conducto deferente del cobayo. En adición los agentes que inhiben la fosfodiesterasa aumentan la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa en las aurículas aisladas de cobayo y en la membrana nictitante de gato (Adler-Graschinsky y Langer, 1974; Enero y Langer, 1974). En la aorta de gato, tejido en el cual el isoproterenol produce un marcado incremento en el transmisor liberado, la exposición al dibutiril AMP cíclico causa un aumento significativo en el transmisor liberado por estimulación nerviosa (Celuch y Langer, 1975). En el bazo perfundido de gato, el monobutiril AMP cíclico, los análogos de nucleótidos cíclicos y los inhibidores de fosfodiesterasa aumentan la liberación de noradrenalina y dopamina beta hidroxilasa, por estimulación nerviosa (Cubeddu, Barnes y Weiner, 1974, 1975). En consecuencia, la facilitación de la neurotransmisión adrenérgica observada con los inhibidores de la fosfodiesterasa y los nucleótidos cíclicos indicaría que el AMP cíclico estaría involucrado en el mecanismo de retroinformación positiva mediado por la activación de los receptores beta presinápticos. En apoyo de esta hipótesis, en el bazo perfundido de gato, en condiciones en que se aumenta la concentración

neuronal de AMP cíclico, por inhibición de la fosfodiesterasa con papaverina, el isoproterenol produce un aumento en la radiactividad liberada por estimulación nerviosa que es mayor que el obtenido en condiciones controles, es decir sin inhibición de fosfodiesterasa (Langer y Dubocovich, observaciones no publicadas). En adición, el propranolol (0.1  $\mu$ M) antagoniza el incremento de liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa, que se observa en presencia de papaverina. Esto indicaría que el aumento en los niveles neuronales de AMP cíclico estaría mediado a través de la activación de receptores beta presinápticos.

En apoyo de nuestros hallazgos en los terminales nerviosos adrenérgicos, Serck-Hanssen (1974) postuló que en la médula adrenal hay un sistema beta adrenérgico, confinado en los gránulos de almacenamiento de adrenalina, por el cual aumentaría la liberación de catecolaminas, efecto que aparentemente estaría mediado por un aumento en la concentración celular de AMP cíclico.

Estas evidencias serían compatibles, con la existencia de un mecanismo de retroinformación positivo, que regularía la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa, a través de la activación de receptores beta de localización presináptica, efecto que sería mediado por incrementos en los niveles de AMP cíclico en el terminal nervioso adrenérgico.



IIB - Mecanismo de retroinformación negativa mediado a través de receptores alfa de localización presináptica. Influencia de la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada.

Resultados

1.- Inhibición por noradrenalina exógena del transmisor liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias. Para estudiar la inhibición de la liberación, por noradrenalina exógena, los experimentos fueron realizados en presencia de cocaína (29  $\mu\text{M}$ ) con el objeto de prevenir la recaptación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) de la noradrenalina adicionada y el aumento en la liberación espontánea de radiactividad que podría resultar del desplazamiento por la noradrenalina exógena de la noradrenalina tritiada retenida en los nervios adrenérgicos.

La inhibición de la captación neuronal con cocaína (29  $\mu\text{M}$ ) no modificó significativamente la liberación fraccional por shock, para las frecuencias 1, 2, 5 y 30 Hz (Tabla 12), siendo en todos los casos 300 el número de pulsos aplicados.

La noradrenalina exógena (0.18  $\mu\text{M}$ ), en presencia de cocaína, redujo significativamente la liberación fraccional de radiactividad cuando los nervios fueron estimulados a 1 ó 2 Hz, sin embargo no se encontraron diferencias con respecto de los controles para frecuencias mayores (Tabla 12). En la Figura 26 se muestran los cocientes obtenidos entre la segunda y la primera estimulación nerviosa, para distintas frecuencias, en controles (Fig. 27A) y cuando antes de la segunda estimulación se agregó noradrenalina exógena (Fig. 27B). El neurotransmisor exógeno redujo significativamente los cocientes obtenidos para las frecuencias bajas de estimulación nerviosa (1 y 2 Hz) y no los modificó a altas frecuencias (Fig. 27, Tabla 12).

2.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre la liberación del neurotransmisor inducido por estimulación nerviosa. En condiciones controles, cuando se mantuvo

el número de shocks aplicados (300) constante, la liberación fraccional por shock, fue significativamente mayor a 30 Hz, cuando se la comparó con 5 Hz, o frecuencias menores (Tablas 3 y 13). Sin embargo en presencia de fenoxibenzamina (2.9  $\mu\text{M}$ ) los valores de liberación fraccional obtenidos fueron  $55.89 \pm 6.75 \times 10^{-5}$  (n=4) y  $45.50 \pm 5.88 \times 10^{-5}$  (n=4) para las frecuencias de 5 y 30 Hz, respectivamente (Tabla 13).

Los valores de liberación fraccional obtenidos en dos estimulaciones sucesivas, realizadas en condiciones controles, a 5 ó 30 Hz, no difirieron significativamente (Fig 28A, Tabla 13). Cuando antes de la segunda estimulación se adicionó fenoxibenzamina (2.9  $\mu\text{M}$ ) aumentó  $6.53 \pm 0.96$  veces la liberación inducida por estimulación nerviosa a 5 Hz, y solo  $2.42 \pm 0.26$  veces a 30 Hz (Fig 28B). Para ambas frecuencias, los aumentos observados difirieron significativamente de los valores controles.

3.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en presencia de 0.26 mM de calcio. El aumento en la liberación de  $^3\text{H}$ -total inducida por estimulación nerviosa, en presencia de fenoxibenzamina (Tablas 3 y 13, Fig 28), así como la disminución en presencia de noradrenalina exógena (Tabla 12 y Fig 27) fue menos pronunciada cuando se emplearon frecuencias altas de estimulación nerviosa. La efectividad disminuida de la fenoxibenzamina para aumentar la liberación del transmisor por estimulación nerviosa a frecuencias altas fue observada en el bazo perfundido de gato por otros autores (Brown y Gillespie, 1957; Kirpekar y Cervoni, 1963; Haefely, Hurlimann y Thoenen, 1965). En condiciones controles, la liberación fraccional a 30 Hz, es significativamente mayor que a 5 Hz (Tabla 13), por lo tanto, la efectividad disminuida de la fenoxibenzamina a frecuencias altas podría estar relacionada con los valores altos de liberación obtenidos en los controles. Cubeddu y Weiner (1975a) sugirieron que durante la estimulación nerviosa a altas frecuencias entraría mayor cantidad de calcio al terminal nervioso. Esto nos llevó a pensar que la inefectividad de la fenoxibenzamina para aumentar la liberación a frecuencias altas

podría estar relacionada con la concentración de calcio. Por lo tanto realizamos experimentos donde se redujo la concentración de calcio en el medio de perfusión a la décima parte de la normal.

En los controles, realizados con la concentración de calcio 0.26 mM, se redujo la liberación fraccional de radiactividad para las dos frecuencias utilizadas, con respecto a las obtenidas con la concentración 2.6 mM de calcio (Comparar Tablas 13 y 14). No obstante, para la concentración 0.26 mM de calcio, la liberación fraccional por shock fue significativamente mayor a 30 Hz cuando se la comparó con 5 Hz (Tabla 14).

Cuando se aplicaron dos períodos de estimulación nerviosa consecutivos, a 5 ó 30 Hz en el grupo control no se encontraron diferencias significativas entre los valores de liberación fraccional obtenidos durante el primero y segundo período de estimulación (Tabla 14, Fig. 29A). Cuando antes de la segunda estimulación se agregó fenoxibenzamina (2.9  $\mu$ M) aumentó significativamente la liberación de radiactividad inducida por estimulación nerviosa para las dos frecuencias de estimulación utilizadas, 5 y 30 Hz (Tabla 14, Fig. 29B). No obstante el incremento fue mayor para la frecuencia más baja (Fig. 29B).

Cuando la concentración externa de calcio se redujo a 0.26 mM, el aumento en la liberación del transmisor obtenido en presencia de fenoxibenzamina, cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz fue significativamente mayor que el obtenido en presencia de 2.6 mM de calcio en el medio de perfusión (Fig. 30).

4.- Inhibición por noradrenalina exógena del  $^3$ H-total liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en presencia de 0.26 mM de calcio. Dado que la falta de inhibición, por noradrenalina exógena del  $^3$ H-total liberado por estimulación nerviosa a altas frecuencias, podría deberse a una mayor entrada de calcio, al terminal nervioso cuando se aumenta la frecuencia, se repitieron los experimentos en presencia de calcio, 0.26 mM y de cocaína 29  $\mu$ M.

Grupo Experimental	n	Liberación fraccional por shock (x 10 <sup>-5</sup> ) (a)		Cociente S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>	
			S <sub>2</sub>		
1 Hz	Control	3	8.26 ± 3.78	8.34 ± 3.31	1.11 ± 0.13
	NA 0.18 μM	5	6.64 ± 0.85	1.92 ± 0.26 α	0.32 ± 0.07*
2 Hz	Control	3	10.22 ± 5.51	10.61 ± 6.21	1.01 ± 0.08
	NA 0.18 μM	5	8.97 ± 0.94	5.63 ± 0.62 α	0.64 ± 0.06*
5 Hz	Control	5	8.64 ± 2.53	7.07 ± 2.43	0.84 ± 0.12
	NA 0.18 μM	4	14.14 ± 1.29	14.51 ± 1.37	1.03 ± 0.03
30 Hz	Control	5	11.55 ± 3.24	12.74 ± 3.50	1.12 ± 0.06
	NA 0.18 μM	4	14.94 ± 4.01	13.19 ± 3.28	0.91 ± 0.08

Tabla 12: Inhibición por noradrenalina exógena del <sup>3</sup>Il-total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato (Calcio 2.6 mM).

a) Liberación fraccional por shock: nCi totales liberados por shock dividido por el total de nCi remanentes en el tejido al comienzo de la estimulación nerviosa. Un total de 300 shocks, se aplicaron en cada período de estimulación nerviosa, para cada frecuencia.

NA: noradrenalina, se agregó 10 min antes de S<sub>2</sub>.

Los experimentos se realizaron en presencia de cocaína, 29 μM.

La concentración de calcio en el medio de perfusión fue 2.6 mM.

Se muestran valores medios ± el error standard de la media.

n: número de experimentos.

α: p < 0.025 cuando se compara contra S<sub>1</sub> en el mismo grupo.

\*: p < 0.005 cuando se compara contra el cociente del grupo control.

Grupo Experimental	n	Liberación fraccional por shock ( $\times 10^{-5}$ ) (a)					
		5 Hz			30 Hz		
		$S_1$	$S_2$	$\frac{S_2}{S_1}$ (b)	$S_1$	$S_2$	$\frac{S_2}{S_1}$ (b)
Controles	4	10.80 $\pm$ 2.86	8.68 $\pm$ 2.26	0.83 $\pm$ 0.05	18.00 $\pm$ 4.51	17.79 $\pm$ 4.39	1.01 $\pm$ 0.17
FBA 2.9 $\mu$ M	4	8.80 $\pm$ 1.14	55.8 $\alpha$ $\pm$ 6.75	6.53* $\pm$ 0.96	19.64 $\pm$ 3.39	45.50 $\alpha$ $\pm$ 5.88	2.42* $\pm$ 0.26

Tabla 13: Efecto de la fenoxibenzamina sobre el  $^3$ H-total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato (Calcio: 2.6 mM)

a) Liberación fraccional por shock: nCi totales liberados por shock dividido por el total de nCi remanentes en el tejido al comienzo de la estimulación nerviosa. Un total de 300 shocks se aplicaron en cada período de estimulación nerviosa, para cada frecuencia.

b) Cociente  $\frac{S_2}{S_1}$ ; obtenido entre la liberación fraccional en  $S_2$  sobre la liberación fraccional en  $S_1$ .

FBA: fenoxibenzamina, se agregó 22 min antes de  $S_2$ .

La concentración de calcio en el medio de perfusión fue 2.6 mM

Se muestran valores medios  $\pm$  el error standard de la media.

n: número de experimentos.

$\alpha$ :  $p < 0.01$   $\beta$ :  $p < 0.001$  cuando se compara contra  $S_1$  en el mismo grupo.

\*:  $p < 0.005$  cuando se compara contra el cociente del grupo control.

Grupo Experimental	n	Liberación fraccional por shock ( $\times 10^{-5}$ ) (a)					
		5 Hz			30 Hz		
		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	Cociente S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	Cociente S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>
Controles	3	2.20 ± 0.16	2.61 ± 0.33	1.18 ± 0.07	13.13 ± 2.94	12.55 ± 2.52	0.96 ± 0.06
FBA 2.9 $\mu$ M	6	1.82 ± 0.39	9.34 <sup>α</sup> ± 1.56	5.39* ± 0.43	8.36 ± 1.51	30.53 <sup>α</sup> ± 4.70	3.79* ± 0.37

Tabla 14. Efecto de la fenoxibenzamina sobre el <sup>3</sup>H-total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato (Calcio: 0.26 mM).

a) Liberación fraccional por shock : nCi totales liberados por shock dividido por el total de nCi remanentes en el tejido al comienzo de la estimulación nerviosa.

Un total de 300 shocks, se aplicaron en cada período de estimulación nerviosa, para cada frecuencia.

FBA: fenoxibenzamina, se agregó 22 min antes de S<sub>2</sub>.

La concentración de calcio en el medio de perfusión fue 0.26 mM.

Se muestran valores medios ± el error standard de la media.

n: número de experimentos.

α p < 0.005 cuando se compara contra S<sub>1</sub> en el mismo grupo.

\* p < 0.005 cuando se compara contra el cociente del grupo control.

Grupo Experimental	n	Liberación fraccional por shock (x10 <sup>-5</sup> ) (a)		Cociente S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>
		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	
Control	3	1.77 ± 0.47	1.64 ± 0.46	0.91 ± 0.03
5 Hz NA 0.18 uM	4	4.14 ± 1.22	0.49 ± 0.14 <sup>α</sup>	0.16 ± 0.07 <sup>*</sup>
Control	3	4.66 ± 1.73	4.23 ± 1.25	0.95 ± 0.08
30 Hz NA 0.18 uM	4	5.26 ± 0.99	1.81 ± 0.25 <sup>α</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>*</sup>

Tabla 15: Inhibición por noradrenalina exógena del <sup>3</sup>H-total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato (Calcio 0.26 mM).

a) Liberación fraccional por shock: nCi totales liberados por shock dividido por el total de nCi remanentes en el tejido al comienzo de la estimulación nerviosa. Un total de 300 shocks, se aplicaron en cada período de estimulación nerviosa, para cada frecuencia.

NA: noradrenalina, se agregó 10 min antes de S<sub>2</sub>.

Los experimentos se realizaron en presencia de cocaína, 29 uM.

La concentración de calcio en el medio de perfusión fue 0.26 mM.

Se muestran valores medios ± el error standard de la media.

n: número de experimentos.

α: p < 0.025 cuando se compara contra S<sub>1</sub> en el mismo grupo.

\*: p < 0.001 cuando se compara contra el cociente en el grupo control.

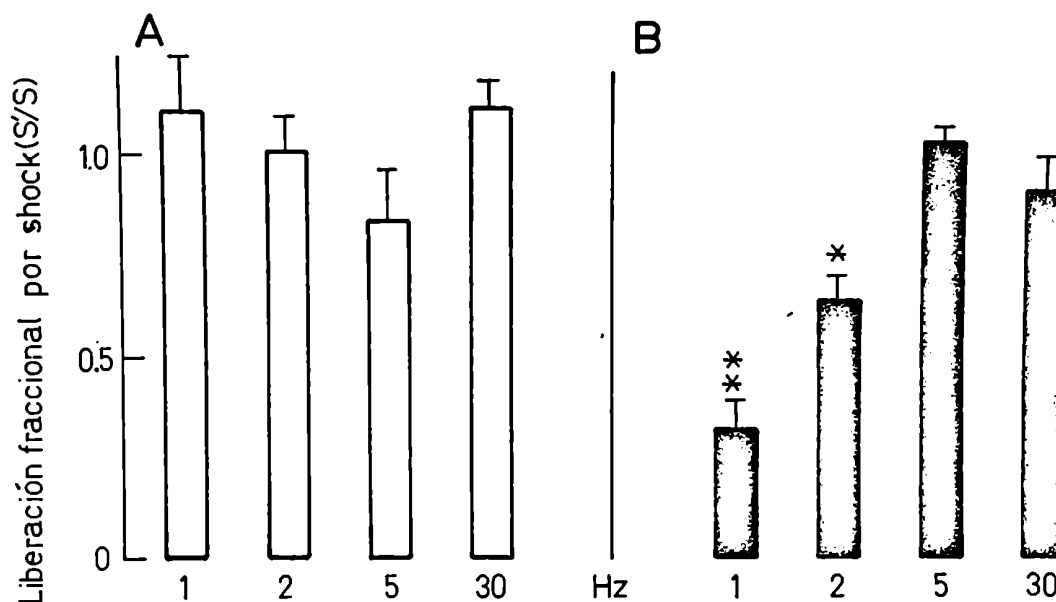




Figura 27: Inhibición por noradrenalina exógena del  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa, a distintas frecuencias en el bazo de gato. (Calcio 2.6 mM)

Ordenada: representa el cociente entre la liberación fraccional obtenida en el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

A:  : controles; B:  : Noradrenalina, (0.18  $\mu\text{M}$ ), la droga se agregó 10 minutos antes de la segunda estimulación (S').

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media de por lo menos 3 experimentos.

\*p < 0.01      \*\*p < 0.001 cuando se compara con el grupo control.



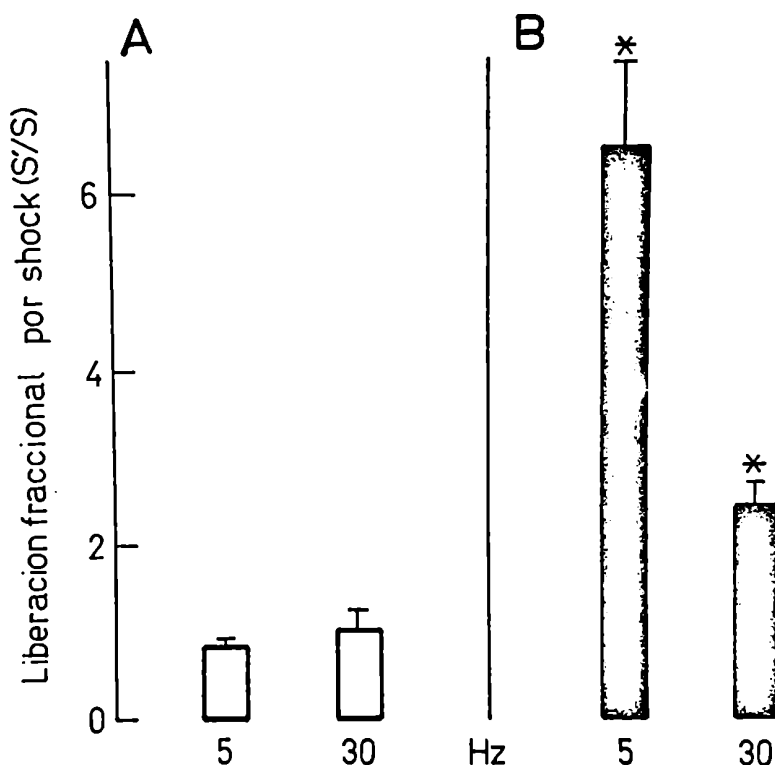




Figura 28: Efecto de la fenoxibenzamina sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato. (Calcio 2.6 mM).

Ordenada: representa el cociente entre la liberación fraccional obtenida en el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Se aplicó un total de 300 estímulos por período de estimulación.

A:  : controles (n=4)

B:  : fenoxibenzamina (2.9  $\mu\text{M}$ ), la droga se agregó 22 min antes de la segunda estimulación (S') (n=4)

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

\*  $p < 0.005$  cuando se compara con el grupo control.

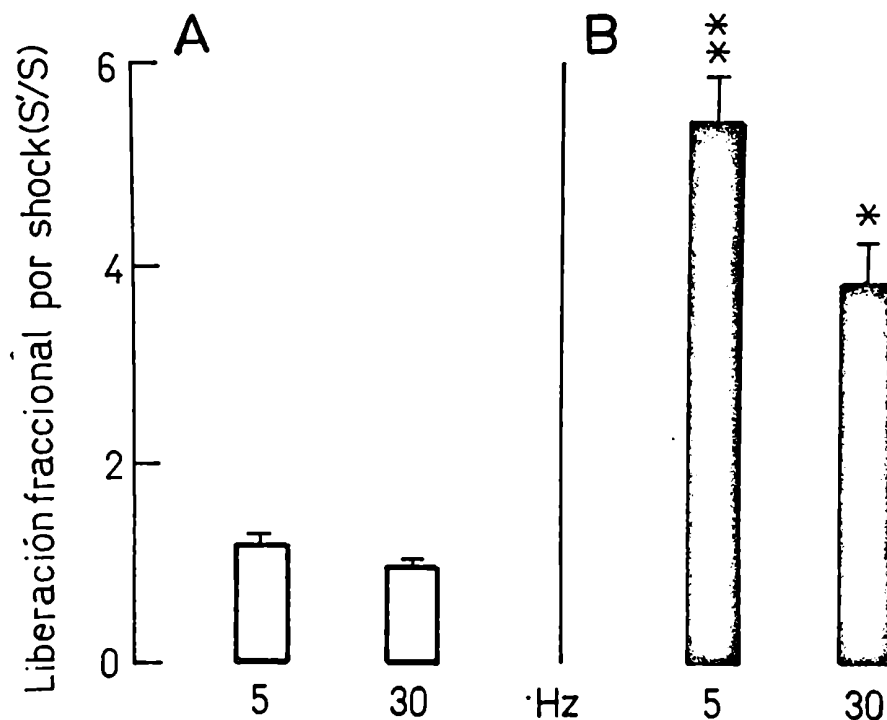


Figura 29: Efecto de la fenoxibenzamina sobre el  $^3\text{H}$ -total liberado en el bazo perfundido de gato. (Calcio 0.26 mM)

Ordenada: representa el cociente entre la liberación fraccional obtenida en el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Se aplicó un total de 300 estímulos por período de estimulación.

A:  controles (n=3)

B:  fenoxibenzamina (2.9  $\mu\text{M}$ ), la droga se agregó 22 min antes de la segunda estimulación (S') (n=6)

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

\*  $p < 0.005$     \*\*  $p < 0.001$  cuando se compara con el grupo control.

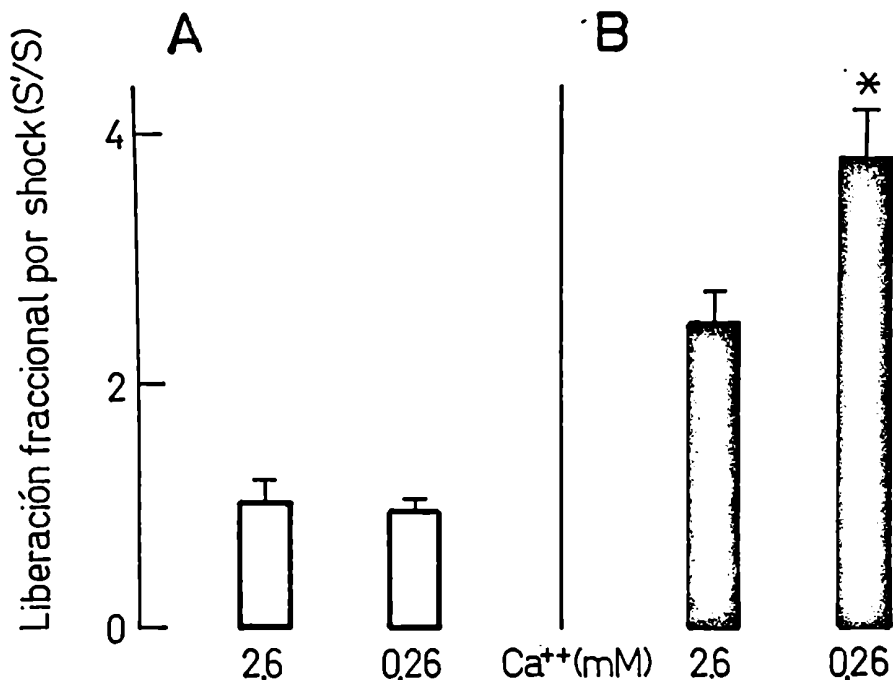




Figura 30 : Efecto de la fenoxibenzamina sobre el <sup>3</sup>H-total liberado por estimulación nerviosa a 30 Hz, en presencia de distintas concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

Ordenada: representa el cociente entre la liberación fraccional obtenida en el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Se aplicó un total de 300 estímulos por período de estimulación.

A:  : controles (Ca<sup>++</sup>, 2.6 mM, n=4; Ca<sup>++</sup> 0.26 mM, n=3).

B:  : fenoxibenzamina (2.9 μg), la droga se agregó 22 minutos antes de la segunda estimulación (S') (Ca<sup>++</sup>, 2.6 mM, n=4; Ca<sup>++</sup>, 0.26 mM, n=6).

Ca<sup>++</sup>: calcio n: número de experimentos por grupo.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.05 cuando se compara con el cociente obtenido con calcio 2.6 mM.

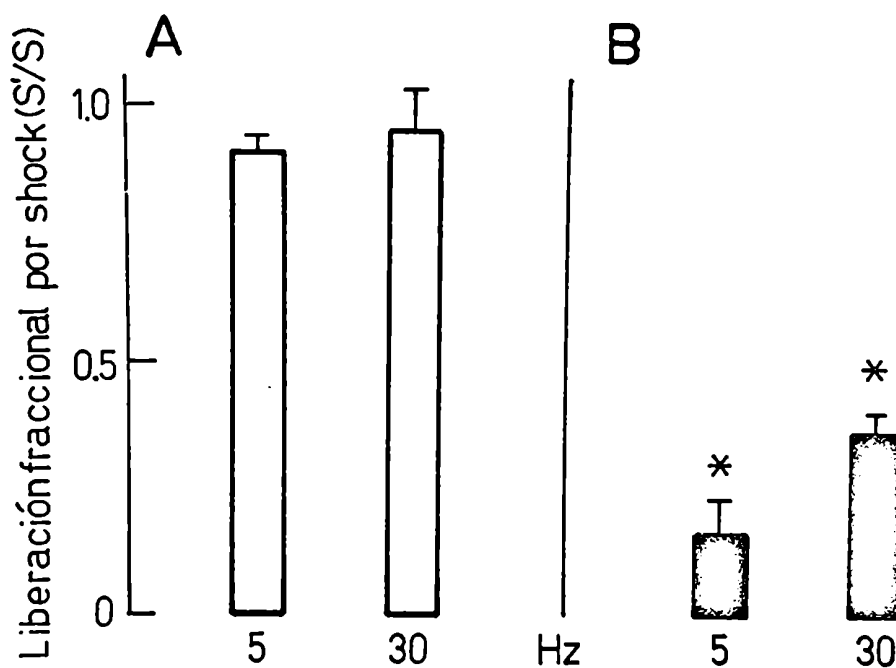


Figura 31: Inhibición por noradrenalina exógena del  $^3\text{H}$ -total liberado en el bazo perfundido de gato. (Calcio 0.26 mM).

Ordenada: representa el cociente entre la liberación fraccional obtenida en el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Se aplicó un total de 300 estímulos por período de estimulación.

A: : controles 2.9  $\mu\text{M}$  (n=3).

B: : noradrenalina, (0.18  $\mu\text{M}$ ), la droga se agregó 10 min antes de la segunda estimulación (S') (n=4).

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

\*p < 0.001 cuando se compara con el grupo control.

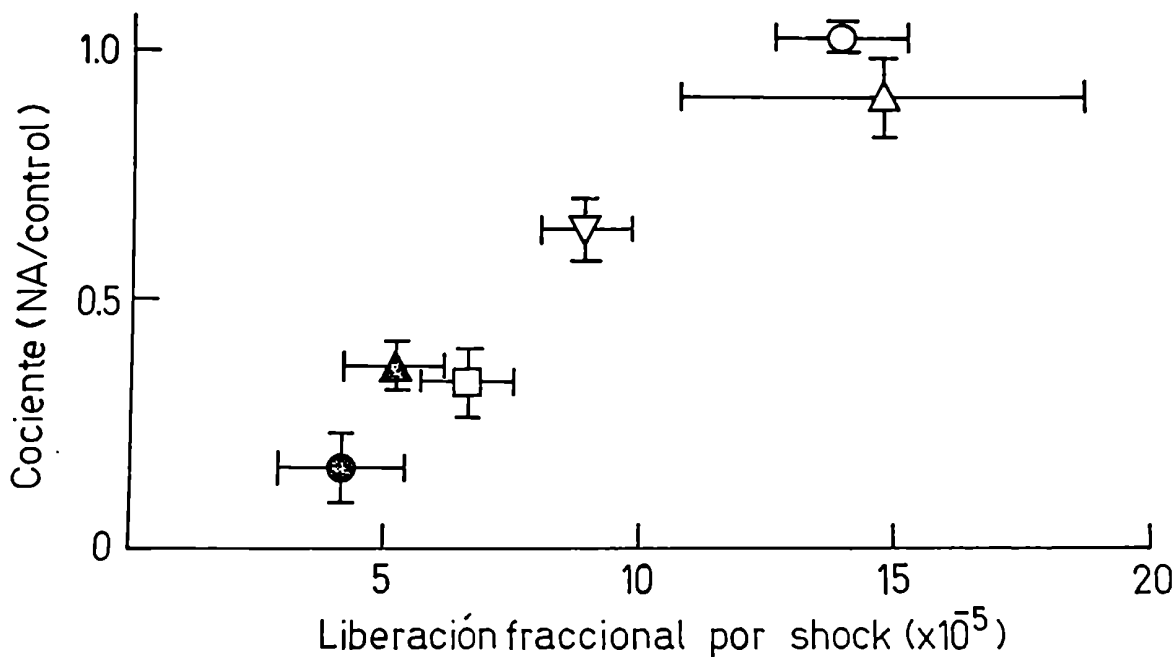


Figura 32: Correlación entre la inhibición de la liberación por noradrenalina exógena, y la liberación fraccional de la primera estimulación nerviosa, para distintas frecuencias.

Ordenada: representa el cociente entre la liberación fraccional obtenida en el segundo período de estimulación ( $S_2$ ) y el control correspondiente ( $S_1$ ) para cada frecuencia de estimulación.

Se aplicó un total de 300 estímulos por período de estimulación. Los experimentos se realizaron en presencia de cocaína, 2.9  $\mu$ M. NA: noradrenalina (0.18  $\mu$ M).

La noradrenalina fue agregada 10 min antes de la segunda estimulación  $S_2$ .

Calcio 2.6 mM:  $\square$  1 Hz (n=3);  $\nabla$  2 Hz (n=5);  $\circ$  5 Hz (n=4);  $\triangle$  30 Hz (n=4)

Calcio 0.26 mM:  $\bullet$  5 Hz (n=4);  $\blacktriangle$  30 Hz (n=4)

n: número de experimentos por grupo. Se muestran valores medios  $\pm$  el error standard de la media.

Como ha sido observado, para la concentración 2.6 mM de calcio, en los controles realizados en presencia de cocaína (Tabla 12), cuando se redujo la concentración de calcio a la décima parte, la liberación fraccional no se modificó en función de la frecuencia (Tabla 15). En estas condiciones tampoco difirieron los valores de liberación fraccional obtenidos, en dos estimuciones sucesivas realizadas a la misma frecuencia (Tabla 15, Fig. 31A). Cuando antes de la segunda estimulación, se agregó noradrenalina exógena (0.18 uM), se redujo significativamente la liberación fraccional por shock a 5 y a 30 Hz, en valores absolutos (Tabla 15) o en cocientes (Fig. 31B) de dos estimuciones sucesivas.

En la Figura 32 se muestra una correlación entre la inhibición inducida por estimulación nerviosa a distintas frecuencias y la liberación de radiactividad en la primera estimulación control. Cuando la liberación fraccional por shock en la primera estimulación es alta, (por ej., cuando se estimula a 5 ó 30 Hz) la noradrenalina exógena no inhibe la liberación. Si se reduce la liberación por shock, ya sea disminuyendo la frecuencia de estimulación o reduciendo la concentración de calcio a 0.26 mM, la noradrenalina exógena inhibe significativamente la liberación inducida por estimulación nerviosa (Fig. 32).

### Discusión

En nuestras condiciones experimentales los bloqueantes alfa adrenérgicos fentolamina y fenoxibenzamina, aumentaron significativamente la liberación del neurotransmisor inducida por estimulación nerviosa, tanto en concentraciones que inhiben la captación neuronal y extraneuronal de noradrenalina, como en las que no inhiben.

Brown y Gillespie (1957) concluyeron que el aumento de liberación por estimulación nerviosa que se observaba en presencia de fenoxibenzamina se debía al bloqueo de los receptores alfa postsinápticos, mientras que Thoenen, Hurlimann y Haefely (1965) atribuyeron este efecto a la inhibición de la captación neuronal que produce

la droga. Posteriormente, la inhibición de la captación extraneuronal por fenoxibenzamina fue postulado como otro factor que contribuiría al aumento en la liberación del transmisor por estimulación nerviosa (Langer, 1970; Langer y Vogt, 1971). Sin embargo cuando se realizó un análisis cuantitativo de la cantidad total de radiactividad liberada en presencia de fenoxibenzamina o fentolamina se concluyó que en adición a la inhibición de los sitios de pérdida, estas drogas producían un aumento real de la liberación inducida por estimulación nerviosa (Langer, 1970; Langer, Enero, Stefano y Rothlin, 1970; Farnebo y Hamberger, 1971; Starke, Montel y Schümann, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972; Farah y Langer, 1974; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a)

Otra evidencia que apoya la hipótesis que los bloqueantes alfa producen un aumento real en la liberación del transmisor por estimulación nerviosa fue obtenida por: De Potter, Chubb, Put y De Schaepdryver (1971); Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner (1974), Cubeddu y Weiner (1975a). Estos autores observaron un aumento en la cantidad de dopamina beta hidroxilasa liberada cuando los nervios simpáticos del bazo de gato eran estimulados en presencia de bloqueantes alfa adrenérgicos.

La estimulación de los receptores alfa presinápticos, con el propio neurotransmisor, redujo significativamente la liberación de noradrenalina, por estimulación nerviosa (Fig. 27, Tabla 12), cuando la frecuencia de estimulación aplicada fue 1 Hz ó 2 Hz. Una reducción similar en la neurotransmisión adrenérgica durante la estimulación nerviosa en presencia de agonistas de tipo alfa fue obtenida en tejidos de distintas especies (Farnebo y Hamberger, 1971; Langer, Enero, Adler-Graschinsky y Stefano, 1972; Starke, 1972b; Kirpekar, Furchgott, Wakade y Prat, 1973; Langer, 1973; Starke, Montel, Gayk y Merker, 1974).

Los resultados obtenidos con agonistas y bloqueantes de tipo alfa son compatibles con la existencia de un mecanismo de retroinformación negativa, que regularía la liberación del transmisor por estimulación nerviosa, a través de receptores alfa de localización presináptica (Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Farnebo y Hamberger, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972a;

Mc Culloch, Rand y Story, 1972; Enero y Langer, 1973; Rand, Story, Allen, Glover y Mc Culloch, 1973; Langer, 1973, 1974b). De acuerdo con esta hipótesis la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, cuando alcanza un nivel de concentración en la vecindad del terminal nervioso adrenérgico, activaría los receptores presinápticos alfa, lo que llevaría a la inhibición del transmisor liberado.

El mecanismo de retroinformación negativa que regula la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa se esperaría que opere más eficientemente cuando la concentración de noradrenalina liberada al espacio sináptico se encuentra sobre un determinado nivel de concentración. En apoyo de esta hipótesis Enero y Langer (1973) encontraron en la membrana nictitante de gato, cuyos depósitos endógenos de noradrenalina habían sido depletados, que la efectividad de la fenoxibenzamina para aumentar la liberación de <sup>3</sup>H-noradrenalina por estimulación nerviosa estaba muy reducida. En adición, en el bazo perfundido de gato, el pretratamiento, con reserpina o alfa metil para-tirosina lleva a la depleción de los depósitos endógenos de noradrenalina, pero no modifica los niveles de dopamina beta hidroxilasa. En estas condiciones no aumentó la dopamina beta hidroxilasa, cuando la estimulación nerviosa se llevó a cabo en presencia de fenoxibenzamina (Cubeddu y Weiner, 1975a). Estos resultados, indicarían que cuando la concentración de noradrenalina liberada al espacio sináptico está por debajo de cierto nivel, no se desencadenaría el mecanismo de retroinformación negativa que regula la liberación de noradrenalina.

La efectividad de la captación neuronal de noradrenalina en reducir la concentración del transmisor en la vecindad de la membrana del terminal adrenérgico, parece modular el mecanismo de retroinformación negativa, reduciendo la cantidad de transmisor liberado por estimulación nerviosa disponible para la activación de los receptores presinápticos alfa (Langer, 1974b). De acuerdo con esta hipótesis cuando la captación neuronal está inhibida por cocaína, una fracción mayor de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa estaría disponible para la activación de los receptores alfa presinápticos. Recientemente, Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner (1974) encontraron en el bazo perfundido de gato, que en presencia de cocaína en un rango de concentraciones de 0.3 a 30  $\mu$ M, no aumentaba la liberación total de radiactividad inducida por estimulación nerviosa. No obstante, en presencia de 3 y 30  $\mu$ M



de cocaína había una reducción dosis dependiente en la cantidad de dopamina beta hidroxilasa liberada por estimulación nerviosa. Estos resultados, apoyan la hipótesis que postula que la inhibición de la captación neuronal por cocaína da lugar a una disminución en la cantidad de transmisor liberado, porque aumenta la autoinhibición por las altas concentraciones de transmisor en la vecindad del terminal adrenérgico (Langer y Enero, 1974).

En nuestras condiciones experimentales, la fenoxibenzamina, en concentraciones que fueron de 29 nM a 29 uM, aumentó la liberación de tritio total o de noradrenalina endógena inducida por estimulación nerviosa. Es de destacar que tanto la fenoxibenzamina como la fentolamina (3.1 uM) fueron más efectivas para aumentar la liberación por estimulación nerviosa cuando se emplearon frecuencias de estimulación de 5 Hz o menores. La efectividad disminuida de los bloqueantes alfa para aumentar la liberación del neurotransmisor, a 30 Hz, ha sido observada en el bazo perfundido de gato por otros autores (Brown y Gillespie, 1957; Brown, Davies y Ferry, 1961; Kirpekar y Cervoni, 1963; Gillespie y Kirpekar, 1966). En adición, en la membrana nictitante de gato, la fentolamina, no aumentó la liberación cuando los nervios fueron estimulados a 25 Hz (Langer, 1970).

La mayor efectividad de la fenoxibenzamina para aumentar la liberación del transmisor a frecuencias bajas de estimulación había sido atribuida a la disminución de la importancia de los mecanismos de inactivación (Brown y Gillespie, 1957) o de la recaptación neuronal del transmisor, cuando se aumentaba la frecuencia de estimulación (Brown, Davies y Ferry, 1961; Kirpekar y Cervoni, 1963; Haefely, Hurlimann y Thoenen, 1965; Gillespie y Kirpekar, 1966).

No obstante, nosotros observamos un aumento selectivo en el transmisor liberado a bajas frecuencias de estimulación con una concentración de fenoxibenzamina (29 nM) que no inhibe la captación neuronal de noradrenalina y con una concentración que inhibe la captación neuronal sólo en un 20%. En adición, la cocaína, en una concentración que inhibe efectivamente la captación neuronal de noradrenalina, no modificó la liberación fraccional por shock con respecto a los controles, a ninguna de las frecuencias de estimulación nerviosa aplicadas (Tabla 3).

Cuando se utilizó fenoxibenzamina (2.9  $\mu\text{M}$ ) el valor de liberación fraccional por shock (Tabla 13) obtenido a 5 Hz. fue mayor que a 30 Hz. Estos resultados indicarían que la efectividad reducida del bloqueante de los receptores alfa para aumentar la liberación del transmisor a 30 Hz no puede ser atribuida al hecho, que a altas frecuencias se alcancen valores máximos de liberación por shock, como inicialmente fue sugerido por Brown y Gillespie (1957).

Por otra parte, cuando los nervios del bazo perfundido de gato, fueron estimulados a 5 ó 30 Hz la noradrenalina exógena (0.18  $\mu\text{M}$ ) fue inefectiva para reducir la liberación del neurotransmisor (Tabla 12). Es de interés que la clonidina, un agonista de los receptores alfa, es más efectiva para reducir las respuestas a la estimulación nerviosa a bajas frecuencias (Armstrong y Boura, 1973). En la arteria pulmonar de conejo, la clonidina inhibe más la liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa a 2 Hz que a frecuencias mayores (8 Hz) (Starke, Montel, Cayk y Merker, 1974).

El hecho que los agonistas y los bloqueantes alfa sean menos efectivos para disminuir y aumentar la liberación respectivamente cuando se utilizan frecuencias altas de estimulación nerviosa, indicaría que el mecanismo regulatorio alfa mediado a través de receptores alfa presinápticos, no jugaría un papel importante en la regulación del transmisor liberado por estimulación nerviosa, en esas condiciones.

Dado que en condiciones controles, la liberación fraccional por shock es significativamente mayor a 30 Hz, cuando se la compara con frecuencias menores (Tablas 3 y 13) se podría suponer que en estas condiciones la activación de los receptores alfa presinápticos es máxima. Sin embargo el bloqueo del mecanismo regulatorio alfa, por fenoxibenzamina, produjo un aumento menor de la liberación inducida por estimulación nerviosa a 30 Hz, que a frecuencias menores. Este hecho indica que deben haber otros factores involucrados en la regulación de la liberación del transmisor a frecuencias altas.

Una alternativa podría estar relacionada con una mayor entrada de calcio al terminal adrenérgico, durante la despolarización a altas frecuencias de estimulación nerviosa, como fue sugerido por Cubeddu y Weiner (1975a). Para investigar esta posibilidad realizamos experimentos donde utilizamos concentraciones menores de calcio en el medio de perfusión.

Cuando se redujo la concentración de calcio, a 0.26 mM, la liberación fraccional por shock, en presencia de cocaína fue menor que en los controles realizados con calcio 2.6 mM. En estas condiciones la noradrenalina exógena redujo significativamente la liberación de radiactividad a 5 y 30 Hz. Sin embargo, la inhibición fue más marcada cuando los nervios fueron estimulados a 5 Hz.

En condiciones en que está inhibida la recaptación neuronal con cocaína aumenta la concentración de noradrenalina en el espacio sináptico disponible para la activación de los receptores alfa presinápticos y por lo tanto aumenta la autoinhibición del transmisor liberado (Langer, 1974b; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Langer y Enero, 1974).

Los valores absolutos de liberación fraccional por shock, de los experimentos controles realizados en presencia de cocaína (29  $\mu$ M) y calcio 2.6 mM no difirieron significativamente para las frecuencias de 1, 2, 5 y 30 Hz (Tabla 12). Esto indicaría que la activación de los receptores presinápticos por la noradrenalina endógena es similar a todas las frecuencias en estas condiciones. Sin embargo, la noradrenalina endógena no inhibió la liberación cuando los nervios fueron estimulados a 5 ó 30 Hz. La diferencia, puede estar relacionada con la duración de la estimulación nerviosa. Si bien el número de pulsos aplicados a cada frecuencia fue 300, la duración de la estimulación fue de 300 y 150 segundos para 1 y 2 Hz respectivamente. Para las frecuencias mayores, la misma cantidad de neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa estuvo en contacto con los receptores presinápticos durante un tiempo menor (60 y 10 segundos para 5 y 30 Hz respectivamente), por lo tanto la autoinhibición sería mayor y la noradrenalina exógena no contribuiría para aumentar la activación de los receptores presinápticos.

La fenoxibenzamina aumentó significativamente la liberación de radiactividad a 5 Hz en condiciones de calcio normal, lo que indicaría que la ineffectividad de la noradrenalina para disminuir la liberación a esa frecuencia se debería a la activación previa de los receptores presinápticos por la noradrenalina endógena acumulada en la vecindad del terminal adrenérgico. Sin embargo, cuando los nervios se estimulan a 30 Hz en condiciones de calcio normal, la falta de inhibición de la liberación por noradrenalina exógena no se debería sólo a la activación previa de los receptores presinápticos, dado que la fenoxibenzamina aumentó menos la liberación a esa frecuencia que a 5 Hz. El hecho que la noradrenalina exógena, no disminuya la liberación inducida por estimulación nerviosa a 30 Hz podría deberse a una suma de factores: activación previa de los receptores presinápticos y mayor entrada de calcio al terminal cuando los nervios se estimulan a frecuencias altas.

Cuando se redujo la concentración de calcio a 0.26 mM la fenoxibenzamina aumentó significativamente la liberación de radiactividad por shock a 5 y 30 Hz, siendo en este caso mayor el aumento para la frecuencia baja de estimulación. Si se comparan los aumentos producidos por la fenoxibenzamina cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz para ambas concentraciones de calcio, el aumento fue significativamente mayor cuando se utilizó la concentración de calcio 0.26 mM en el medio de perfusión.

La mayor efectividad de la fenoxibenzamina para incrementar y de la noradrenalina para reducir la liberación del transmisor a altas frecuencias de estimulación nerviosa cuando se reduce la concentración externa de calcio, indicaría una aparente recuperación del mecanismo regulatorio alfa en estas condiciones experimentales.

La liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa es un proceso calcio dependiente (Hukovič y Muscholl, 1965; Kirpekar y Misu, 1967). En adición, Stjarne (1973f) concluyó que el mecanismo regulatorio alfa presináptico actuaría disminuyendo la disponibilidad de calcio necesario para promover la liberación de noradrenalina.

Por lo tanto nuestros resultados serían compatibles con la hipótesis que postula que el mecanismo de retroinformación negativa que regula la liberación de noradrenalina, inhibe la liberación del transmisor reduciendo la disponibilidad de iones calcio necesarios para el acople eléctrico secretorio. Por lo tanto, bajo condiciones en las cuales se aumenta la disponibilidad de calcio para el proceso de liberación (por ej.: estimulación a altas frecuencias), la inhibición de la neurotransmisión mediada por la estimulación de los receptores alfa presinápticos es inefectiva.

Sin embargo, una segunda alternativa que podría explicar la efectividad disminuida del mecanismo regulatorio alfa, cuando se aplican frecuencias altas de estimulación nerviosa, involucra la posibilidad que las concentraciones altas de neurotransmisor en el espacio sináptico desensibilice los receptores alfa presinápticos. Si es así en condiciones experimentales donde se aumenta la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico por estimulación a frecuencias altas o por inhibición de la captación neuronal, se reducirá la efectividad del mecanismo alfa presináptico para regular la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa.

IIC - Diferencia en la potencia bloqueante de la fenoxibenzamina sobre los receptores alfa adrenérgicos pre y postsinápticos.

Resultados

1.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre las respuestas a la noradrenalina exógena. Las curvas de dosis-respuesta a la noradrenalina fueron determinadas por medición de los cambios en la presión de perfusión. En la Fig. 33 se observa que la fenoxibenzamina provoca un corrimiento hacia la derecha, concentración dependiente y una disminución del máximo de la curva de dosis-respuesta a la noradrenalina exógena.

En presencia de  $8.8 \times 10^{-10}$  de fenoxibenzamina no se encontró una disminución significativa de las respuestas a la noradrenalina exógena mientras que con la concentración  $2.9 \times 10^{-9}$ M se observó corrimiento hacia la derecha y depresión del máximo (Fig. 33).

El grado de bloqueo de los receptores alfa fue completo en presencia de  $2.9 \times 10^{-8}$ M de fenoxibenzamina y un incremento de 10 veces en la concentración de la droga no incrementó el bloqueo de las respuestas a la noradrenalina exógena (Fig. 33).

2.- Efecto de bajas concentraciones de fenoxibenzamina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Las concentraciones de fenoxibenzamina empleadas en este grupo de experimentos ( $8.8 \times 10^{-10}$ M y  $2.9 \times 10^{-9}$ M) no inhiben la captación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974), ni extraneuronal (Gillespie, Hamilton y Hosie, 1970) de noradrenalina en el bazo perfundido de gato.

En el grupo control, donde se aplicaron dos períodos de estimulación consecutivos a 5 Hz y a 30 Hz, no se encontraron diferencias significativas en los valores obtenidos ni para las respuestas ni para la noradrenalina liberada por

estimulación nerviosa entre el primero y segundo período de estimulación dentro de la misma preparación (Fig. 34). En presencia de  $8.8 \times 10^{-10} \text{M}$  ó  $2.9 \times 10^{-9} \text{M}$  de fenoxibenzamina se obtuvo una reducción significativa en las respuestas a la estimulación nerviosa a 5 Hz que fue concentración dependiente. No obstante, en estos grupos no hubo un incremento significativo en la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa (Fig. 34). Cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz, se observó una disociación similar entre el bloqueo de respuestas y la ausencia de incremento en la noradrenalina liberada (Fig. 34).

Estos experimentos muestran claramente que con concentraciones bajas de fenoxibenzamina, se obtiene una disociación entre el bloqueo de las respuestas del órgano efector y el aumento en la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa.

El análisis de los experimentos individuales muestran que para las frecuencias de estimulación 5 y 30 Hz no hubo aumento en el transmisor liberado aún cuando las respuestas a la estimulación nerviosa en presencia del bloqueante de los receptores alfa se redujeron a un tercio de la del control correspondiente (Fig. 35). Para ambas frecuencias de estimulación se encontró que cuando las respuestas a la estimulación nerviosa se reducen a menos del 25%, aumenta la noradrenalina liberada (Fig. 35). Los valores absolutos para las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa se muestran en la Tabla 16. Si se comparan los datos de diferentes experimentos se encuentra mucha variación, por lo tanto, se emplearon los cocientes de valores entre el segundo período de estimulación con respecto del primero a la misma frecuencia y dentro de la misma preparación, en lugar de los valores absolutos.

3.- Efecto de la fenoxibenzamina ( $2.9 \times 10^{-8} \text{M}$  y  $2.9 \times 10^{-7} \text{M}$ ) sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Dada la disociación encontrada entre el bloqueo de respuestas a la estimulación nerviosa y la ausencia de aumento en el transmisor liberado en presencia de bajas concentraciones de fenoxibenzamina fue de interés demostrar que concentraciones mayores de fenoxibenzamina aumentan la liberación del transmisor para las dos frecuencias de estimulación.

Grupo Experimental	n	Respuestas mm Hg (a)		Liberación de NA por estímulo nervioso ng NA (b)	
		5 Hz	30 Hz	5 Hz	30 Hz
Controles	27	75.9 ± 8.2	97.0 ± 7.6	48.3 ± 6.0	160.6 ± 19.5
FBA 8.8 x 10 <sup>-10</sup> M	5	45.4 ± 16.3	55.0 ± 16.0*	31.5 ± 4.0	121.1 ± 23.9
FBA 2.9 x 10 <sup>-9</sup> M	8	31.7 ± 9.4**	32.6 ± 8.0***	49.3 ± 8.5	182.5 ± 32.6
FBA 2.9 x 10 <sup>-8</sup> M	4	8.5 ± 4.5***	16.5 ± 4.2***	129.7 ± 40.5***	273.2 ± 67.4
FBA 2.9 x 10 <sup>-7</sup> M	5	4.4 ± 2.5****	10.6 ± 3.5****	274.6 ± 87.7****	306.9 ± 136.8*

Tabla 16: Efectos de la fenoxibenzamina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

a) Incremento en la presión de perfusión inducido por estimulación nerviosa, expresado en mm de Hg.

b) Noradrenalina total liberada por estimulación nerviosa. Un total de 300 estímulos fueron aplicados a cada frecuencia de estimulación.

FBA: fenoxibenzamina

n: número de experimentos por grupo.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.05    \*\*p < 0.01

\*\*\*p < 0.005

\*\*\*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.



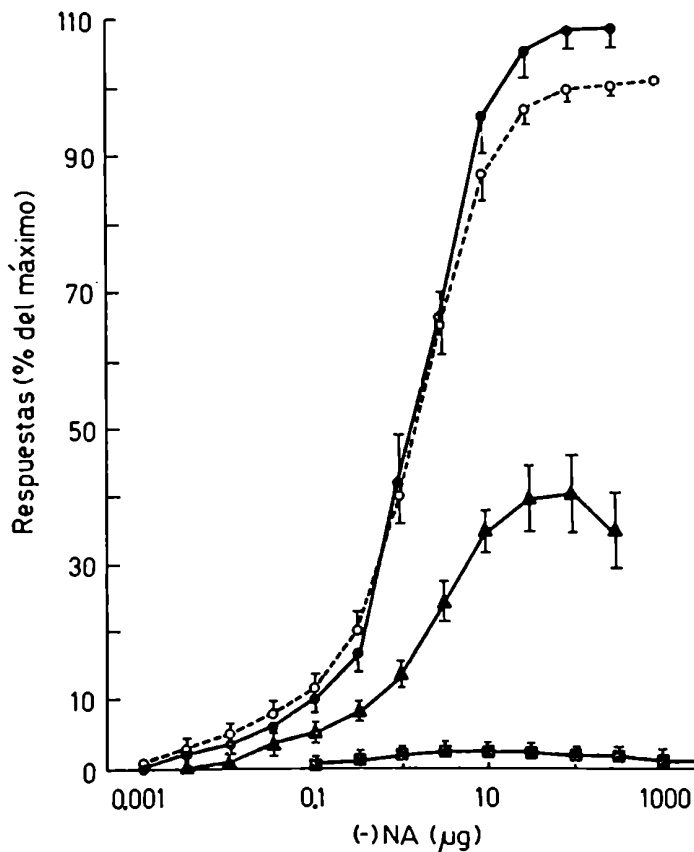


Figura 33: Efectos de la fenoxibenzamina sobre la curva de dosis respuesta a la noradrenalina en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: Incremento en presión de perfusión expresada como porcentaje del máximo obtenido en ausencia de la droga.

Abscisa: dosis de (-) noradrenalina, expresada en µg.

○—○ : controles (n=26); ●—● : FBA  $8.8 \times 10^{-10}$  M (n=4);  
 ▲—▲ : FBA  $2.9 \times 10^{-9}$  M (n=4); □—□ : FBA  $2.9 \times 10^{-8}$  M (n=3);  
 ▼—▼ : FBA  $2.9 \times 10^{-7}$  M (n=4).

FBA: fenoxibenzamina

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

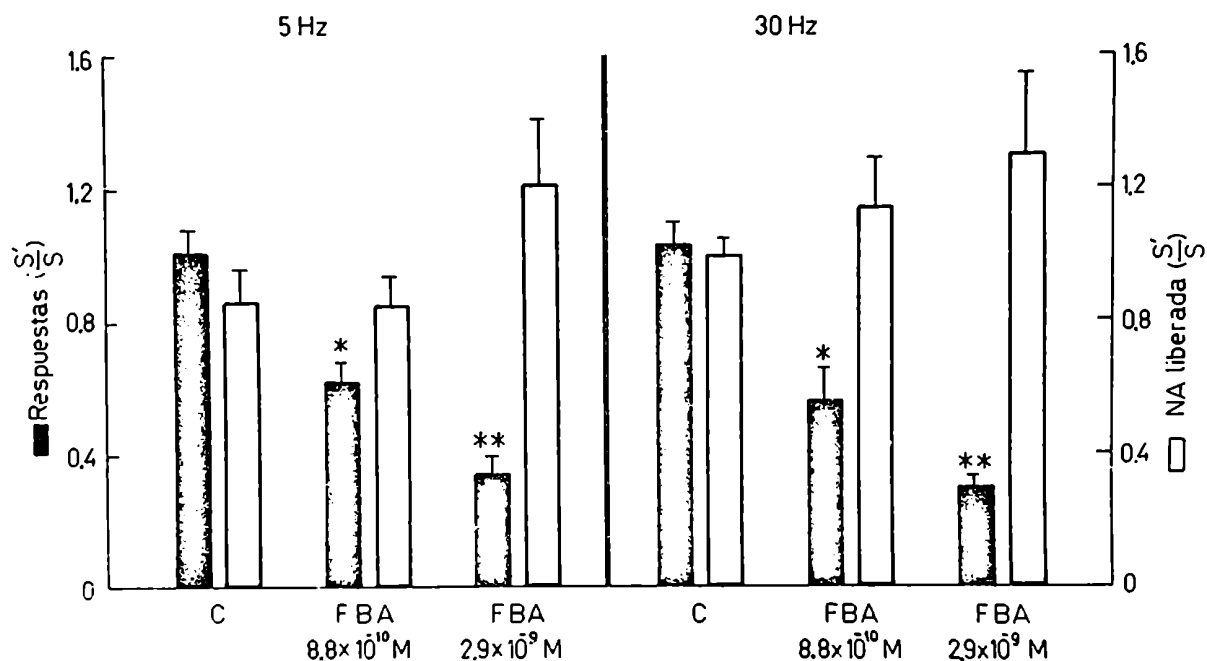




Figura 34: Efectos de bajas concentraciones de fenoxibenzamina (FBA) sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido.

Ordenada izquierda:  cociente de respuestas (incremento en la presión de perfusión en mm de Hg) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Ordenada derecha:  cociente del transmisor liberado (ng de NA) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos (0.1 msec., voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 segundos (0.1 msec., voltaje supramáximo).

C: control (n=5); FBA:  $8.8 \times 10^{-10}$  M (n=5); FBA  $2.9 \times 10^{-9}$  M (n=8)

NA: noradrenalina; FBA: fenoxibenzamina.

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

\*p < 0.005; \*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

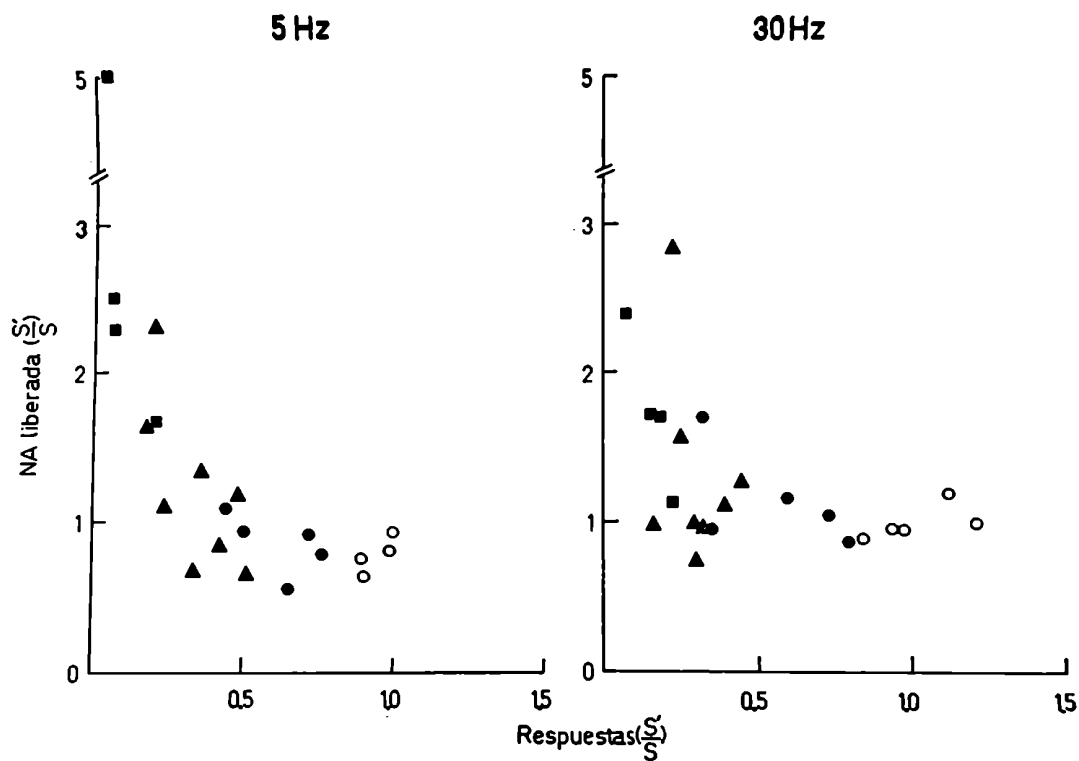


Figura 35: Relación entre el grado de bloqueo de las respuestas a la estimulación nerviosa y el incremento del transmisor liberado en presencia de fenoxibenzamina.

Ordenada: cociente del transmisor liberado (ng de NA) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S), obtenido en la misma preparación.

Abscisa: cociente de respuestas (incremento en presión de perfusión en mm de Hg), entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S), obtenido en la misma preparación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos (0.1 msec., voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 segundos (0.1 msec, voltaje supramáximo).

○ Controles; ● FBA  $8.8 \times 10^{-10} M$ ; ▲ FBA  $2.9 \times 10^{-9} M$ ;  
 ■ FBA  $2.9 \times 10^{-8} M$

NA: noradrenalina; FBA: fenoxibenzamina

Se muestran todos los valores individuales obtenidos.

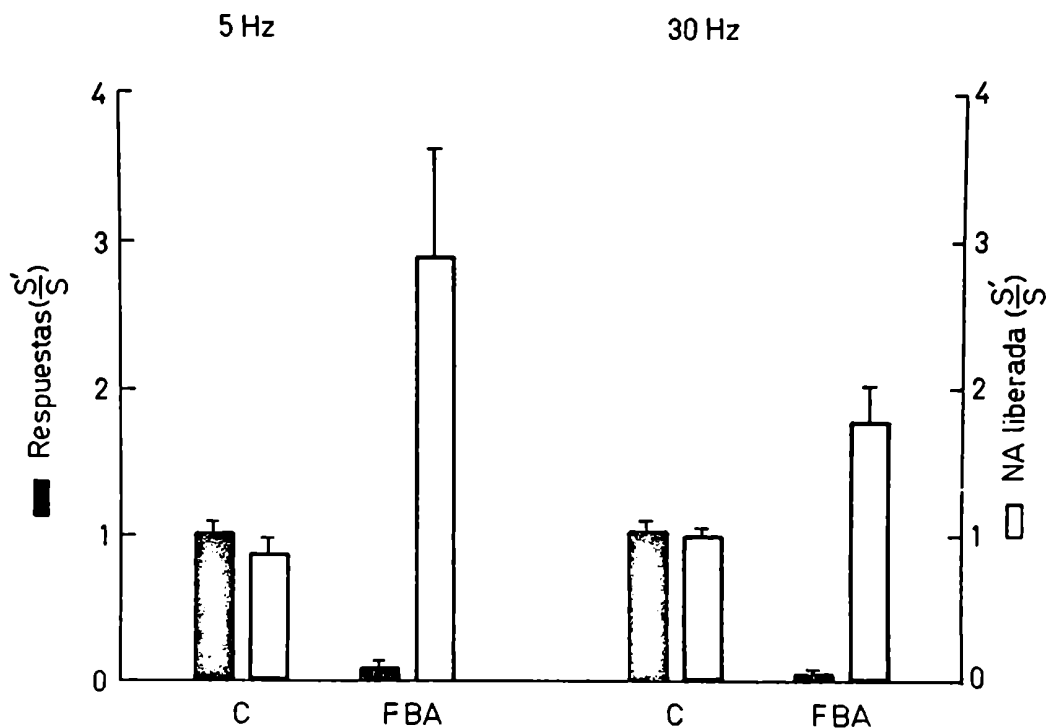




Figura 36: Efectos de fenoxibenzamina (FBA) sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido.

Ordenada izquierda:  cociente de respuestas (incremento en presión de perfusión en mm de Hg) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Ordenada derecha:  cociente del transmisor liberado (ng de noradrenalina) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 segundos (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

C: control (n=5); FBA:  $2.9 \times 10^{-8}$  M (n=4)

NA: noradrenalina; FBA: fenoxibenzamina

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

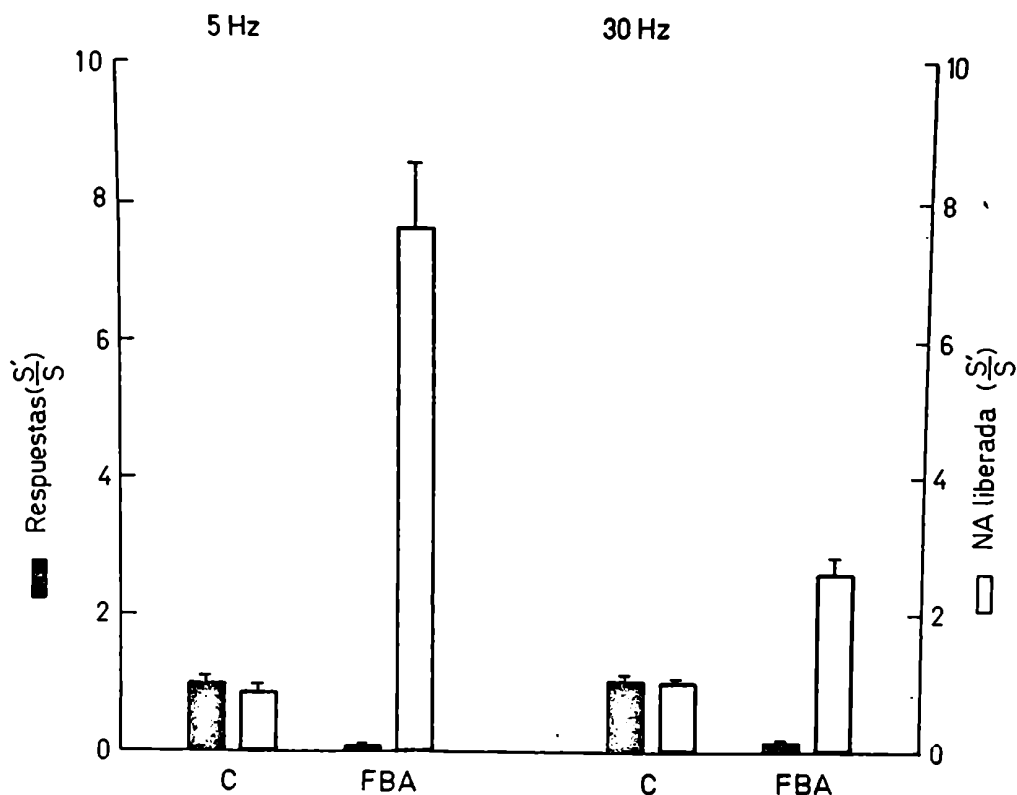




Figura 37: Efectos de la fenoxibenzamina (FBA) sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido.

Ordenada izquierda:  cociente de respuestas (incremento en presión de perfusión en mm de Hg) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Ordenada derecha:  cociente del transmisor liberado (ng de noradrenalina) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 segundos (0.1 msec, voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 segundos (0.1 msec, voltaje supramáximo).

C: control (n=5); FBA:  $2.9 \times 10^{-7} M$  (n=5).

NA: noradrenalina; FBA: fenoxibenzamina.

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

En presencia de  $2.9 \times 10^{-8}$  M de fenoxibenzamina, la captación neuronal de noradrenalina en el bazo perfundido no está inhibida (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974). En la Figura 33, se observa que  $2.9 \times 10^{-8}$  M de fenoxibenzamina, bloquea completamente las respuestas a la noradrenalina exógena en el bazo perfundido de gato.

En la Figura 36 y Tabla 16 se observa que en presencia de  $2.9 \times 10^{-8}$  M de fenoxibenzamina las respuestas a la estimulación nerviosa a 5 Hz ó 30 Hz se redujeron considerablemente. En estos experimentos hubo un aumento significativo del transmisor liberado por estimulación nerviosa para las dos frecuencias utilizadas. La noradrenalina liberada por estimulación nerviosa fue significativamente mayor a 5 Hz, no obstante la reducción en las respuestas fue similar cuando se compararon las dos frecuencias de estimulación (Fig 36).

La concentración mayor de fenoxibenzamina empleada en estos experimentos ( $2.9 \times 10^{-7}$  M) inhibe la captación neuronal de noradrenalina en un 20% aproximadamente en el bazo perfundido (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974). Con esta concentración de fenoxibenzamina (Fig 37) las respuestas a la estimulación nerviosa fueron prácticamente anuladas. El transmisor liberado por estimulación nerviosa para la frecuencia de 5 Hz, en presencia de  $2.9 \times 10^{-7}$  M de la droga, aumentó 7 veces, mientras que el incremento a 30 Hz fue de 2.5 veces (Fig 37).

Los valores absolutos para las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa obtenidos en presencia de  $2.9 \times 10^{-8}$  M y  $2.9 \times 10^{-7}$  M de fenoxibenzamina se muestran en la Tabla 16.

### Discusión

La mayor parte de los estudios de los efectos de los agentes bloqueantes de los receptores alfa sobre la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa han sido llevados a cabo en presencia de concentraciones altas de fenoxibenzamina o fentolamina (Thoenen, Hürlimann y Haefely, 1963, 1964a,b; Haefely, Hürlimann y Thoenen, 1965; Boullin, Costa y Brodie, 1966, 1967; Langer, 1970; Langer y Vogt, 1971; Bennett, 1973). Estas concentraciones de fenoxibenzamina son por

lo menos diez veces mayores que las concentraciones requeridas para bloquear completamente las respuestas del órgano efector a la estimulación nerviosa o a la noradrenalina exógena. Bajo estas condiciones experimentales es difícil asignar el aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa, al bloqueo de los receptores alfa, dado que esta droga además inhibe la captación neuronal (Cubeddu, Langer y Weiner, 1974) y extraneuronal de noradrenalina (Gillespie, Hamilton y Hosie, 1970).

En este estudio nosotros empleamos concentraciones bajas de fenoxibenzamina y comparamos en cada experimento el grado de bloqueo de los receptores alfa con los cambios en el transmisor liberado inducido por estimulación nerviosa. Dado que las concentraciones de bloqueantes alfa utilizadas no inhiben la captación neuronal, ni extraneuronal de noradrenalina, la comparación del grado de bloqueo de los receptores alfa con los cambios en el transmisor liberado, no fue afectada por estos dos efectos adicionales de la fenoxibenzamina.

Los resultados obtenidos con las concentraciones 0.88 y 2.9  $\mu$ M de fenoxibenzamina indicarían que esta droga es más potente para bloquear los receptores alfa postsinápticos que median las respuestas vasculares del bazo de gato a la noradrenalina exógena o a la endógena, que para bloquear los receptores alfa presinápticos que regularían la liberación del transmisor inducido por estimulación nerviosa. Una disociación similar ha sido observada por otros autores en experimentos en los cuales, en condiciones en que los receptores alfa postsinápticos estaban parcial o totalmente bloqueados por fenoxibenzamina, no se observaba aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa (Thoenen, Hürlimann y Haefely, 1964a,b; Zimmerman, Chia, Liao y Gisslen, 1971; Håggendal, Johansson, Jonason y Ljung, 1972).

Recientemente, Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner (1974), encontraron en el bazo perfundido de gato una diferencia similar en la potencia de la fenoxibanzamina para bloquear los receptores alfa pre y postsinápticos, en experimentos en los cuales se midió la liberación de dopamina beta hidroxilasa y noradrenalina.

Varios autores han sugerido que el aumento en el transmisor liberado observado en presencia de bloqueantes alfa se debe a la disminución de las respuestas del órgano efector (Brown y Gillespie, 1957; Boullin, Costa y Brodie, 1967; Farnebo y Malmfors, 1971). En nuestras condiciones experimentales las concentraciones de fe-

noxibenzamina que reducen significativamente las respuestas del órgano efector a la estimulación nerviosa no aumentan la liberación de noradrenalina. Estos resultados no apoyarían la hipótesis que postula un mecanismo transináptico que regularía la liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa.

Dado que la concentración de fenoxibenzamina requerida para bloquear los receptores alfa presinápticos que regulan la liberación del transmisor fue 30 veces mayor que la requerida para bloquear las respuestas del órgano efector es posible que los receptores alfa pre y postsinápticos no sean idénticos. Si esto es así, la afinidad de estos dos tipos de receptores por el agente bloqueante alfa fenoxibenzamina y por el agonista, noradrenalina, debe ser diferente.

Una segunda hipótesis que podría explicar la diferencia en la efectividad de la fenoxibenzamina para bloquear los receptores adrenérgicos pre y postsinápticos podría deberse a la presencia de una mayor cantidad de receptores alfa presinápticos en la célula nerviosa, con respecto a la cantidad de receptores del órgano efector. Esta diferencia podría resultar de una mayor población de receptores de reserva en las terminaciones nerviosas adrenérgicas, que explicaría la necesidad de usar concentraciones mayores de fenoxibenzamina para bloquear los receptores alfa presinápticos (Waud, 1968; Langer y Trendelenburg, 1968).

En la célula con mayor concentración de receptores, la sensibilidad al agonista noradrenalina debería ser mayor cuando se compara, con una célula con menor concentración de receptores (Waud, 1968; Langer y Trendelenburg, 1968). Cuando se examinó las potencias relativas de la noradrenalina sobre los receptores alfa pre y postsinápticos en presencia de cocaína ( $2.9 \times 10^{-5}M$ ), se encontró que la noradrenalina exógena fue más potente para inhibir la liberación de  $^3H$ -noradrenalina por estimulación nerviosa que para activar los receptores alfa postsinápticos (Langer, 1973). Sin embargo recientemente en estudios realizados con agonistas alfa, se encontró que bajas concentraciones de clonidina y oximetazolina activan selectivamente los receptores presinápticos, mientras que concentraciones bajas de fenilefrina y metoxamina activan selectivamente los receptores postsinápticos (Starke, 1972a;



Starke, Montel, Gayk y Mecker, 1974; Starke, Endo y Tauke, 1975). En adición, recientemente, Starke, Borowski y Endo (1975) encontraron que el bloqueante alfa yohimbina, es más potente para bloquear los receptores presinápticos, en la arteria pulmonar de conejo. Estos resultados apoyarían la hipótesis que sugiere que los receptores pre y postsinápticos son diferentes, pues su comportamiento es distinto frente a agonistas y bloqueantes y no serían compatibles con la existencia de una mayor cantidad de receptores de reserva en el terminal nervioso.

En la membrana nictitante aislada de gato la exposición a distintas concentraciones de fenoxibenzamina dio como resultado una buena correlación entre el bloqueo de los receptores alfa postsinápticos y la magnitud del aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa (Enero, Langer, Rothlin y Stefano, 1972). Estos resultados indicarían que podría haber diferencias de tejidos y especies respecto de la afinidad de los receptores alfa presinápticos por los agonistas, así como también por los antagonistas. Compatible con esto, es el hecho que mientras la dopamina inhibe la liberación del transmisor por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato y en la membrana nictitante (Langer, 1973; Enero y Langer, 1975), no la reduce en las aurículas aisladas o en el conducto deferente aislado de cobayo (Mc Culloch, Rand y Story, 1973).

De nuestros resultados podemos concluir que la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa regula su propia liberación a través de un mecanismo de retroinformación negativa por el cual inhibiría su propia liberación activando receptores presinápticos de tipo alfa. La diferencia de 30 veces en la potencia bloqueante de la fenoxibenzamina sobre los receptores alfa pre y postsinápticos apoya la hipótesis que postula que estos dos receptores de naturaleza alfa adrenérgica no son idénticos.

## CAPITULO III

EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUDIDO DE GATO.-

RESULTADOS

DISCUSION

III - EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

Resultados

- IIIA - 1.- Efecto de cambios en la concentración externa de calcio sobre las respuestas y sobre la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.
- 2.- Efecto de la prostaglandina  $E_2$  sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.
- 3.- Efecto de la indometacina sobre la liberación de prostaglandinas inducida por estimulación nerviosa o por noradrenalina exógena en el bazo perfundido de gato.
- 4.- Efecto de la indometacina sobre las respuestas y sobre la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.
- 5.- Efecto de diferentes concentraciones de indometacina sobre las respuestas,  $^3H$ -total y noradrenalina endógena liberada por estimulación nerviosa.
- 6.- Cambios en la liberación del transmisor inducido por bloqueo de los receptores alfa presinápticos o por inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Discusión

III. EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

INTRODUCCION

Las prostaglandinas de la serie E inhiben la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa en órganos de diferentes especies (Hedqvist, 1970a, 1973, 1974; Wennmalm, 1971; Stjärne, 1972, 1973a, b, c, d, e). En algunos de estos tejidos se ha encontrado que las prostaglandinas de la serie E, se liberan durante los períodos de estimulación nerviosa adrenérgica (Davies, Horton y Withrington, 1968; Gilmore, Vane y Wyllie, 1968; Hedqvist, Stjärne y Wennmalm, 1971; Samuelson y Wennmalm, 1971; Chanh, Junstad y Wennmalm, 1972; Ferreira, Moncada y Vane, 1973; Junstad y Wennmalm, 1973a). Estos resultados llevaron a postular la hipótesis que durante la estimulación nerviosa las prostaglandinas liberadas del órgano efector (Gilmore, Vane y Wyllie, 1968; Junstad y Wennmalm, 1973b) o de los terminales nerviosos adrenérgicos (Stjärne, 1972, 1973b) podrían inhibir la liberación de noradrenalina. De acuerdo con esta hipótesis las prostaglandinas podrían mediar un mecanismo endógeno de retroinformación inhibitorio que regularía la liberación de noradrenalina (Hedqvist, 1970a, b, 1973, 1974; Hedqvist, Stjärne y Wennmalm, 1970, 1971; Samuelson y Wennmalm, 1971; Wennmalm, 1971; Chanh, Junstad y Wennmalm, 1972; Stjärne, 1972, 1973a, b, c; Junstad y Wennmalm, 1973a).

Si existe un mecanismo endógeno de retroinformación negativo mediado por prostaglandinas, debería aumentar la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa cuando la síntesis de prostaglandinas se inhibe por drogas. No obstante, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por drogas da lugar a pequeños aumentos (Fredholm y Hedqvist, 1973; Starke y Montel, 1973; Stjärne, 1973a,b,c) o no se obtienen aumentos (Hoszowska y Panczenko, 1974) en la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa.

En publicaciones recientes, se sugirió que las prostaglandinas reducirían la

disponibilidad del calcio necesario para la liberación del transmisor por estimulación nerviosa, lo que aumentaría el efecto inhibitorio de las prostaglandinas sobre la neurotransmisión (Stjärne, 1973d,e; Hedqvist, 1973). En consecuencia, en este trabajo, estudiamos en el bazo perfundido de gato, los efectos sobre la neurotransmisión adrenérgica de la prostaglandina  $E_2$  y de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por indometacina en presencia de diferentes concentraciones de calcio. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando dos frecuencias de estimulación nerviosa, 5 y 30 Hz.

IIIA 1.- Efecto de cambios en la concentración externa de calcio sobre las respuestas y sobre la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Como se muestra en la figura 38A, la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa, fue dependiente de la concentración de calcio presente en el medio de perfusión cuando se empleó una frecuencia baja de estimulación, 5 Hz. Cuando la estimulación nerviosa se llevó a cabo a 30 Hz, no se observó una disminución significativa en el transmisor liberado cuando se redujo la concentración de calcio. En contraste con estos resultados las respuestas vasculares a la estimulación nerviosa disminuyeron significativamente cuando se redujo la concentración externa de calcio (Fig 38B). La disminución marcada de las respuestas vasculares no puede ser atribuida enteramente a diferencias en la cantidad de transmisor liberado (Fig 38A) y podría estar relacionada con una disminución de la sensibilidad del órgano efector a la noradrenalina cuando se utilizan concentraciones bajas de calcio. Como se muestra en la Figura 39, cuando la concentración de calcio en el medio de perfusión se redujo de 2.6 a 0.26 mM, hubo un corrimiento paralelo hacia la derecha de la curva de dosis respuesta a la (-) noradrenalina.

2.- Efecto de la prostaglandina E<sub>2</sub> sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

En los controles, donde se aplicaron dos períodos de estimulación nerviosa consecutivos, a 5 ó 30 Hz, no se encontraron diferencias significativas ni en la cantidad de noradrenalina liberada (Fig 40) ni en las respuestas (Fig 41), cuando se compararon los valores obtenidos durante el primer y segundo período de estimulación nerviosa dentro del mismo experimento.

La exposición a la prostaglandina E<sub>2</sub> (0.28 uM) redujo significativamente la cantidad de transmisor liberado por estimulación nerviosa a 5 Hz para las tres concentraciones de calcio empleadas (Fig 40). No obstante esta concentración de prostaglandina E<sub>2</sub> no redujo la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz, en presencia de 2.6 ó 0.65

mM de calcio. Para la concentración de calcio menor, 0.26 mM, hubo una reducción pequeña, pero estadísticamente significativa en la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 30 Hz, durante la exposición a 0.28  $\mu$ M de prostaglandina  $E_2$  (Fig 40).

La reducción en las respuestas vasculares a la estimulación nerviosa obtenidas en presencia de prostaglandina  $E_2$  fueron más pronunciadas a medida que se disminuía la concentración de calcio en el medio de perfusión (Fig 41). Se observó reducción de las respuestas vasculares para las dos frecuencias de estimulación nerviosa utilizadas; no obstante el efecto inhibitorio de la prostaglandina  $E_2$  fue más pronunciado a 5 que a 30 Hz (Fig 41).

Los valores absolutos para las respuestas vasculares y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, para las tres concentraciones de calcio estudiadas, en controles y en presencia de prostaglandina  $E_2$ , se muestran en la Tabla 17.

Debe destacarse que la reducción en las respuestas vasculares a la estimulación nerviosa en presencia de 0.28  $\mu$ M de prostaglandina  $E_2$ , no puede ser atribuido enteramente a la disminución en la cantidad de transmisor liberado, porque como se muestra en la Figura 42A, se observó un corrimiento hacia la derecha de la curva de dosis respuesta a la noradrenalina exógena durante la exposición a esa concentración de prostaglandina  $E_2$ .

Para la menor concentración de calcio empleada, 0.26 mM, la prostaglandina  $E_2$  no redujo las respuestas vasculares a la noradrenalina exógena (Fig 42B) cuando se las comparó con el control correspondiente.

Estos resultados demuestran que la disminución de las respuestas a la estimulación nerviosa durante la exposición a la prostaglandina  $E_2$  puede deberse no sólo a la reducción de la cantidad de transmisor liberado, sino también a cambios en la sensibilidad del órgano efector al neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa.

3.- Efecto de la indometacina sobre la liberación de prostaglandinas inducida por estimulación nerviosa o por noradrenalina exógena en el bazo perfundido de gato.

La inhibición de la síntesis de prostaglandinas por indometacina ha sido extensivamente empleada, para la demostración de la importancia fisiológica, que tendría la formación de prostaglandinas endógenas. Tales experimentos son válidos si se demuestra que la concentración de indometacina empleada previene efectivamente la liberación de prostaglandinas en las condiciones experimentales bajo las cuales se ha realizado el estudio. Por lo tanto, se determinó la liberación de prostaglandinas del bazo perfundido de gato, inducida por estimulación nerviosa o después de la administración de noradrenalina exógena. Estos experimentos se realizaron antes y después del agregado de indometacina al medio de perfusión.

Los resultados obtenidos, en un experimento típico, se muestran en la Figura 43. La liberación de prostaglandinas inducida por noradrenalina exógena o por estimulación nerviosa aumentó como una función del tiempo durante todo el experimento (Fig 43). Usualmente, por nuestro procedimiento de bioensayo no se detectaba liberación de prostaglandinas en el efluente venoso ni por estimulación nerviosa, ni por noradrenalina exógena durante las primeras horas de perfusión del bazo. Los resultados negativos obtenidos al comienzo del experimento, podrían deberse al hecho que la cantidad de prostaglandinas liberadas están por debajo del límite de sensibilidad de nuestro método de bioensayo o bien que haya un retraso genuino en la liberación de prostaglandinas en estas condiciones.

En la mayor parte de los experimentos las prostaglandinas liberadas fueron detectadas sólo después de 3 horas de perfusión del bazo. No obstante, se observó un aumento progresivo en función del tiempo en la cantidad de prostaglandinas liberadas por estimulación nerviosa, o por noradrenalina exógena.

La perfusión del bazo con  $14 \mu\text{M}$  de indometacina previno enteramente la liberación de prostaglandinas inducida por noradrenalina exógena o por estimulación nerviosa (Fig 43).



4.- Efecto de la indometacina sobre las respuestas y sobre la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

Con el objeto de investigar la posibilidad que durante la estimulación nerviosa, las prostaglandinas endógenas liberadas inhiban la liberación del transmisor adrenérgico, se realizaron experimentos antes y después de la exposición a 14  $\mu\text{M}$  de indometacina. Esta concentración de la droga previno completamente la liberación de prostaglandinas durante la estimulación nerviosa en nuestras condiciones experimentales (Fig 43).

Como se muestra en la Figura 44, la exposición a 14  $\mu\text{M}$  de indometacina no afectó significativamente la liberación de noradrenalina en respuesta a la estimulación nerviosa, a 5 ó 30 Hz, cuando la concentración de calcio en el medio de perfusión fue 2.6 mM. Para las concentraciones externas menores de calcio (0.65 ó 0.26 mM) la indometacina redujo significativamente la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 5 Hz (Fig 44). No hubo cambios en la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa a 30 Hz, durante la perfusión con indometacina para las concentraciones externas de calcio 0.65 ó 0.26 mM.

Como se muestra en la Figura 45, las respuestas vasculares a la estimulación nerviosa a 5 ó 30 Hz no fueron afectadas por la presencia de indometacina, para ninguna de las tres concentraciones de calcio empleadas.

Los valores absolutos para la noradrenalina liberada y para las respuestas vasculares a la estimulación nerviosa obtenidas durante la exposición a 14  $\mu\text{M}$  de indometacina se muestran en la Tabla 17.

El hecho que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas con indometacina, (Fig 44) no aumente la liberación de noradrenalina inducida por estimulación podría deberse a que las prostaglandinas liberadas por estimulación nerviosa sólo alcanzan niveles de significancia después que el bazo ha sido perfundido durante 3 horas aproximadamente (Fig 43). Con el objeto de investigar esta posibilidad

se llevaron a cabo experimentos en los cuales el bazo se perfundi6 durante 4 horas antes de comenzar con los per6odos de estimulaci6n nerviosa. En estos experimentos se estudiaron los efectos de la indometacina sobre la neurotransmisi6n. Como se muestra en la Figura 46 A,B, la exposici6n a 14 uM de indometacina no aument6 ni la liberaci6n de noradrenalina, ni las respuestas vasculares a la estimulaci6n nerviosa a6n cuando el bazo hab6a sido perfundido durante 4 horas antes de comenzar con los per6odos de estimulaci6n nerviosa. Por el contrario, la liberaci6n de noradrenalina inducida por estimulaci6n nerviosa, a 5 Hz en presencia de indometacina, se redujo significativamente cuando se la compar6 con el control correspondiente (Fig 46 A).

En la Tabla 18, se muestran los valores absolutos para la noradrenalina liberada y las respuestas a la estimulaci6n nerviosa obtenidos en el grupo en el cual se estudiaron los efectos de la indometacina despu6s que el bazo hab6a sido perfundido durante 4 horas.

5.- Efecto de diferentes concentraciones de indometacina sobre las respuestas, <sup>3</sup>H-total y noradrenalina end6gena liberada por estimulaci6n nerviosa.

La ineffectividad de la indometacina para aumentar la liberaci6n de noradrenalina inducida por estimulaci6n nerviosa, podr6a deberse a un efecto directo de la droga. Si esto fuera as6, se obtendr6a una reducci6n en el transmisor liberado independientemente de la habilidad de la indometacina para inhibir la s6ntesis de prostaglandinas. Con el objeto de explorar esta posibilidad, se estudiaron varias concentraciones de indometacina para determinar si la droga inhibe la liberaci6n del transmisor.

En estos experimentos los bazos fueron marcados con <sup>3</sup>H-noradrenalina y se midi6 la noradrenalina end6gena y el <sup>3</sup>H-total liberado por estimulaci6n nerviosa. En el grupo control la declinaci6n en el <sup>3</sup>H-total y la <sup>3</sup>H-noradrenalina end6gena liberada, como resultado de siete per6odos consecutivos de estimulaci6n fue peque6a, cuando los valores se expresaron como porcentaje del segundo per6odo de estimulaci6n nerviosa dentro del mismo experimento (Fig 47 A,B).

La perfusión con indometacina, en un rango de concentraciones que fue desde 2.8 a 84  $\mu\text{M}$  no afectó significativamente la liberación ni del  $^3\text{H}$ -total, (Fig 47A) ni de la noradrenalina endógena (Fig 47B). Durante la exposición a 84  $\mu\text{M}$  de indometacina hubo un pequeño aumento en el transmisor liberado que fue reversible por lavado de la droga (Fig 47 A y B). Este aumento en el transmisor liberado por estimulación nerviosa no fue estadísticamente significativo cuando se lo comparó con el control  $S_6$  y además, fue obtenido con una concentración de indometacina seis veces mayor que la requerida para inhibir la liberación de prostaglandinas del bazo perfundido de gato durante la estimulación nerviosa.

Los valores absolutos para la liberación de  $^3\text{H}$ -total, noradrenalina exógena y respuestas vasculares a la estimulación nerviosa obtenidos en controles se muestran en la Tabla 19 y para el grupo expuesto a las diferentes concentraciones de indometacina en la Tabla 20. En presencia de indometacina las respuestas a la estimulación nerviosa no difirieron significativamente de los valores controles.

6.- Cambios en la liberación del transmisor inducido por bloqueo de los receptores alfa presinápticos o por inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Con el objeto de comparar la efectividad de los receptores presinápticos y de las prostaglandinas endógenas en la regulación de la noradrenalina liberada durante la estimulación nerviosa, se llevaron a cabo experimentos en presencia de fentolamina o fenoxibenzamina para bloquear los receptores alfa presinápticos y durante la exposición a la indometacina para inhibir la síntesis de prostaglandinas.

Como se muestra en la Tabla 21, hubo un aumento pronunciado en el  $^3\text{H}$ -total liberado en presencia de fentolamina o fenoxibenzamina. En contraste con estos resultados, durante la exposición a la indometacina (28  $\mu\text{M}$ ), no hubo cambios significativos en el transmisor liberado por estimulación nerviosa.

Concentración de Calcio (a)	Grupo Experimental	n	Respuestas mm de Hg (b)		Liberación de NA (ng) (c)
			5 Hz	30 Hz	
2.6 mM	Controles	35	83.1 ± 7.4	101.4 ± 6.6	53.2 ± 5.5
	IND. 14 μM	4	84.3 ± 27.9	102.3 ± 31.1	45.4 ± 18.9
	PGE <sub>2</sub> 0.28 μM	4	83.5 ± 13.9	103.5 ± 4.7	26.5 ± 5.6
0.65 mM	Controles	14	33.8 ± 5.4	66.5 ± 7.1	25.5 ± 3.3
	IND. 14 μM	5	23.4 ± 3.5	57.0 ± 7.8	17.1 ± 5.2
	PGE <sub>2</sub> 0.28 μM	4	19.0 ± 6.8	52.0 ± 15.5	14.2 ± 5.6
0.26 mM	Controles	15	8.1 ± 1.4	34.3 ± 4.2	18.8 ± 1.4
	IND. 14 μM	4	8.3 ± 2.8	40.0 ± 6.1	9.1 ± 1.5**
	PGE <sub>2</sub> 0.28 μM	6	2.0 ± 0.5*	15.7 ± 1.3*	5.1 ± 0.7***

Tabla 17 : Efectos de las prostaglandinas E<sub>2</sub> e indometacina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato, en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

- a) Concentración de calcio en el medio de perfusión. Los bazos se perfundieron durante 1 hora con la concentración de calcio indicada, antes de comenzar con los períodos de estimulación.
- b) Incremento en presión de perfusión inducido por estimulación nerviosa, expresado en mm de Hg.
- c) Noradrenalina total liberada por estimulación nerviosa. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

IND: indometacina; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>; NA: noradrenalina.

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.  
 \*p < 0.05    \*\*p < 0.01    \*\*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

Grupo Experimental	Respuestas en (b) mm de Hg	Liberación de NA (c) (ng)	
		5 Hz	30 Hz
Controles	61.6 ± 17.8	77.9 ± 17.3	251.4 ± 45.1
IND 14 μM	67.0 ± 22.0	66.0 ± 19.9	231.6 ± 36.9

Tabla 18: Efecto de la indometacina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa después de cuatro horas de perfusión del bazo.

- a) Los bazos se perfundieron durante 4 horas con solución de Krebs (concentración de Calcio: 2.6 mM) antes de comenzar con los períodos de estimulación nerviosa.
- b) Incremento en presión de perfusión inducido por estimulación nerviosa, expresado en mm de Hg.
- c) Noradrenalina total liberada por estimulación nerviosa. Un total de 300 estímulos fueron aplicados para cada frecuencia de estimulación.

IND: indometacina; NA: noradrenalina

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

	n	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>
(a) <sup>3</sup> H-total L.F. x 10 <sup>-5</sup>	4	8.06 ± 2.11	7.27 ± 1.97	6.40 ± 1.64	5.76 ± 1.54	5.92 ± 1.44	5.37 ± 1.32	5.82 ± 1.33
(b) Noradrenalina (n <sub>2</sub> )	3	89.6 ± 7.5	82.1 ± 6.0	70.8 ± 7.6	65.1 ± 10.4	61.0 ± 6.9	61.2 ± 7.2	62.6 ± 6.2
(c) Respuestas (mm de Hg)	4	59.8 ± 19.6	60.5 ± 19.9	57.5 ± 19.5	56.5 ± 18.5	56.5 ± 15.4	54.8 ± 15.1	53.8 ± 13.9

Tabla 19. Efecto de repetidos períodos de estimulación nerviosa sobre las respuestas y la liberación de noradrenalina y <sup>3</sup>H-total en el bazo perfundido de gato.

a) Radiactividad total liberada por estimulación nerviosa, expresada como la fracción de radiactividad tisular liberada por shock (x 10<sup>-5</sup>). Para detalles, ver Métodos.

b) Noradrenalina total liberada por período de estimulación nerviosa, expresado en nanogramos.

c) Incremento en presión de perfusión inducido por estimulación nerviosa, expresado en mm de Hg.

Los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg (0.1 msec, voltaje supramáximo) cada 28 minutos (S<sub>1</sub> a S<sub>7</sub>).

Todos los períodos de estimulación se realizaron sin agregado de drogas. L.F.: liberación fraccional por shock.

n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

	n	S <sub>1</sub> CONTROL	S <sub>2</sub> CONTROL	S <sub>3</sub> IND: 2.8 µM	S <sub>4</sub> IND: 8.4 µM	S <sub>5</sub> IND: 28 µM	S <sub>6</sub> IND: 84 µM	S <sub>7</sub> CONTROL
<sup>3</sup> H-total L.F. x 10 <sup>-5</sup>	4	7.13 ± 1.29	6:18 ± 1.28	4.82 ± 1.03	4.99 ± 1.23	5.90 ± 1.49	7.52 ± 2.09	4.29 ± 0.87
Noradrenalina (ng)	4	62.2 ± 10.0	53.6 ± 9.6	38.3 ± 3.9	32.3 ± 3.7	49.4 ± 6.3	62.1 ± 10.5	40.5 ± 5.5
Respuestas (mm de lig)	4	96.7 ± 21.2	105.0 ± 24.5	101.5 ± 28.1	99.5 ± 28.2	83.3 ± 22.9	53.3 ± 14.5	94.0 ± 33.0

Tabla 20. Efecto de diferentes concentraciones de indometacina sobre las respuestas y la liberación de noradrenalina y de <sup>3</sup>H-total inducido por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

- a) Radiactividad total liberada por estimulación nerviosa expresada como la fracción de radiactividad tisular liberada por shock. Para detalles ver Métodos.
- b) Noradrenalina total liberada por período de estimulación, expresada en nanogramos.
- c) Incremento en presión de perfusión inducido por estimulación nerviosa, expresado en mm de Hg.
- Los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg. (0.1 mseg. voltaje supramáximo) cada 28 minutos (S<sub>1</sub> a S<sub>7</sub>).  
IND: indometacina; L.F.: liberación fraccional por shock.
- n: número de experimentos por grupo. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

Grupo Experimental	n	Liberación fraccional por shock		
		$S_1$ ( $\times 10^{-5}$ ) (a)	$S_2$ ( $\times 10^{-5}$ ) (b)	$S_2/S_1$ (c)
Controles	4	$7.27 \pm 1.97$	$5.92 \pm 1.44$	$0.86 \pm 0.07$
IND 28.0 $\mu$ M	5	$6.71 \pm 1.12$	$6.05 \pm 1.17$	$0.90 \pm 0.07$
FENT 3.1 $\mu$ M	3	$9.03 \pm 0.65$	$73.67 \pm 7.31^{**}$	$8.28 \pm 1.09^{**}$
FBA 2.9 $\mu$ M	4	$8.80 \pm 1.14$	$55.89 \pm 6.75^{**}$	$6.53 \pm 0.96^*$

Tabla 21: Efecto de la indometacina, fentolamina y fenoxibenzamina sobre el  $^3$ H-total liberado por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

(a) Radiactividad total liberada en la primera estimulación nerviosa control ( $S_1$ ) a 5 Hz durante 60 seg (0.1 msec, voltaje supramáximo) expresada como la fracción tisular liberada por shock.

(b) Radiactividad total liberada en la segunda estimulación nerviosa ( $S_2$ ) obtenida en presencia de la droga, expresada como la fracción tisular liberada por shock.

(c) Cociente de la liberación fraccional por shock obtenida entre el segundo período de estimulación ( $S_2$ ) y el control correspondiente ( $S_1$ )

IND: indometacina; FENT: fentolamina; FBA: fenoxibenzamina

Las drogas IND, FENT o FBA fueron agregadas 21 minutos antes de  $S_2$ . Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

n: número de experimentos por grupo

\* $p < 0.005$  \*\* $p < 0.001$  cuando se compara con el control correspondiente



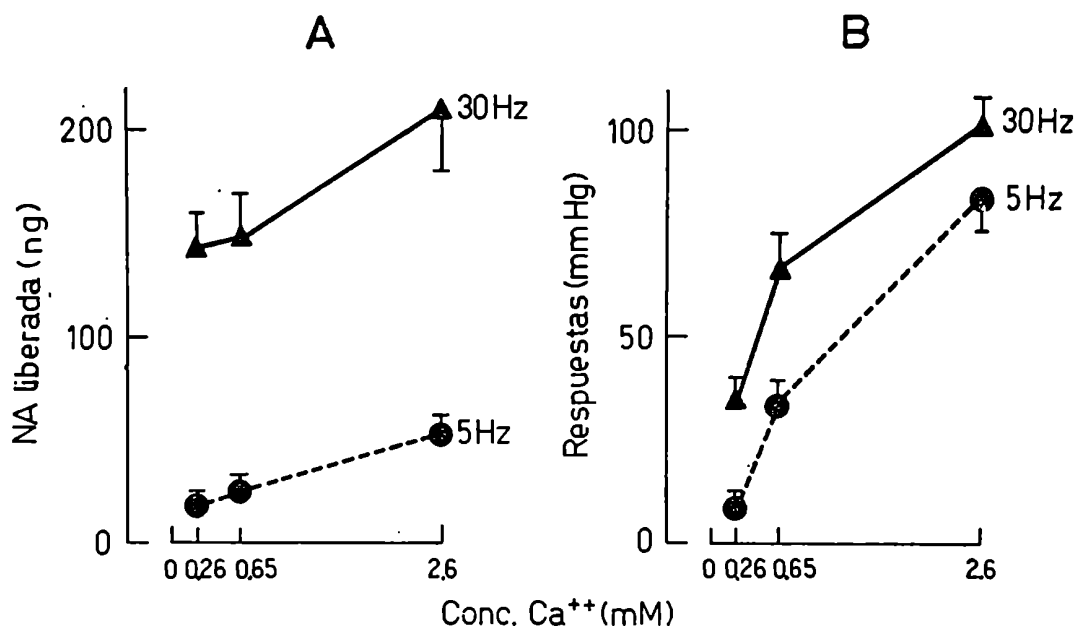


Figura 38: Influencia de la concentración de calcio sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

Abscisa: representa la concentración milimolar (mM) de calcio (Ca) en el medio de perfusión. Ca: 0.26 mM, n=15; Ca: 0.65 mM, n=14; Ca: 2.6 mM, n=35.

A: la ordenada representa los ng de noradrenalina (NA) liberados en las primeras estimulaciones controles.

B: la ordenada representa el incremento en presión de perfusión expresada en mm de Hg, de las primeras estimulaciones controles.

▲ — ▲ 5 Hz durante 60 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo)

● - - ● 30 Hz durante 10 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo)

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

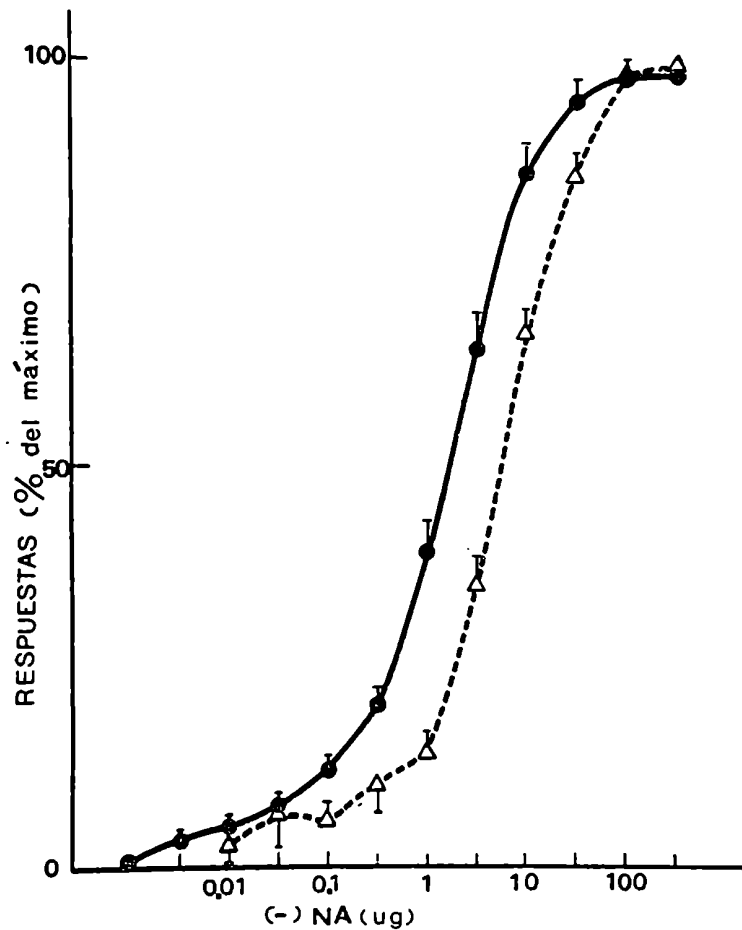


Figura 39: Efecto de la concentración de calcio (Ca) externa sobre la curva de dosis respuesta a la noradrenalina (NA) en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: aumentos en la presión de perfusión expresados como porcentaje de la respuesta máxima.

Abscisa: dosis de (-) noradrenalina, expresada en ug.

● — ● Ca 2.6 mM (n=26)

△ - - △ Ca 0.26 mM (n=4)

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

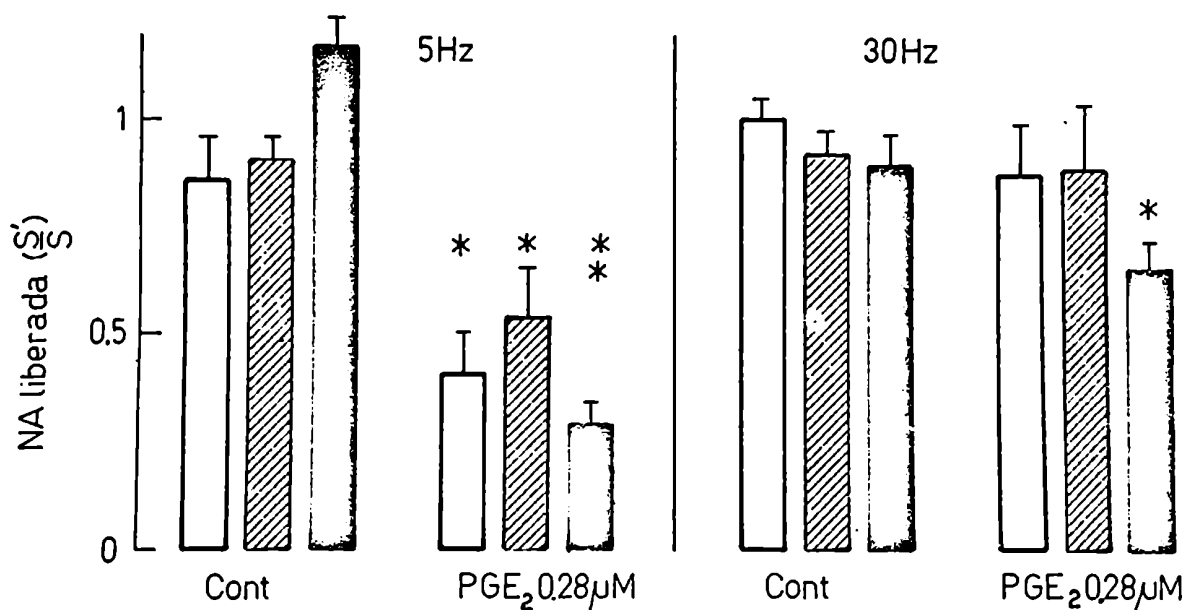


Figura 40 : Efecto de las prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sobre la liberación de noradrenalina (NA) inducida por estimulación nerviosa, en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

Ordenada: cociente del transmisor liberado (ng de NA) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg (0.1 msec; voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 seg (0.1 msec; voltaje supramáximo).

NA: noradrenalina; PGE<sub>2</sub>: prostaglandinas E<sub>2</sub> (0.28 μM); CONT: controles; Ca: calcio.

□ Ca, 2.6 mM (CONT: n=5; PGE<sub>2</sub>: n=4)

▨ Ca, 0.65 mM (CONT: n=4; PGE<sub>2</sub>: n=4)

■ Ca, 0.26 mM (CONT: n=5; PGE<sub>2</sub>: n=6)

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.05      \*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

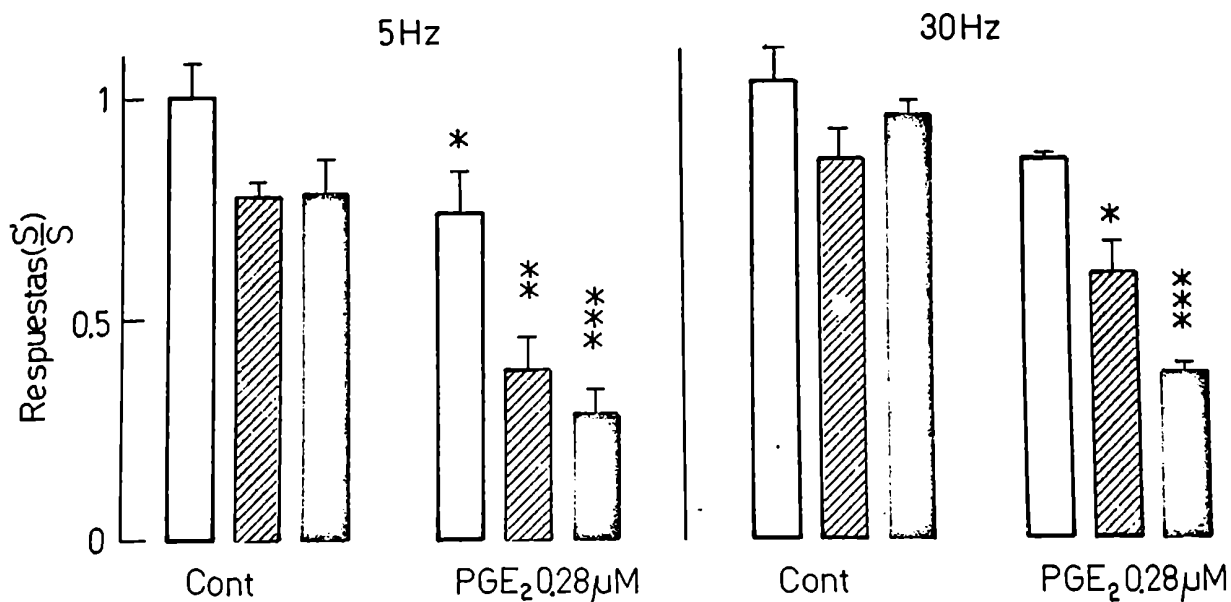


Figura 41: Efecto de las prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sobre las respuestas inducidas por estimulación nerviosa en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

Ordenada: cociente de respuestas (incremento en la presión de perfusión en mm de Hg) entre el segundo período de estimulación (S') y los controles correspondientes (S) para cada frecuencia de estimulación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg. (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 seg. (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

PGE<sub>2</sub>: prostaglandinas E<sub>2</sub> (0.28 μM); CONT: controles; Ca: calcio.

- Ca, 2.6 mM (CONT: n=5; PGE<sub>2</sub>: n=4)
- ▨ Ca, 0.65 mM (CONT: n=4; PGE<sub>2</sub>: n=4)
- ▩ Ca, 0.26 mM (CONT: n=5; PGE<sub>2</sub>: n=6)

n: número de experimentos, Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

\*p < 0.05    \*\*p < 0.01    \*\*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente

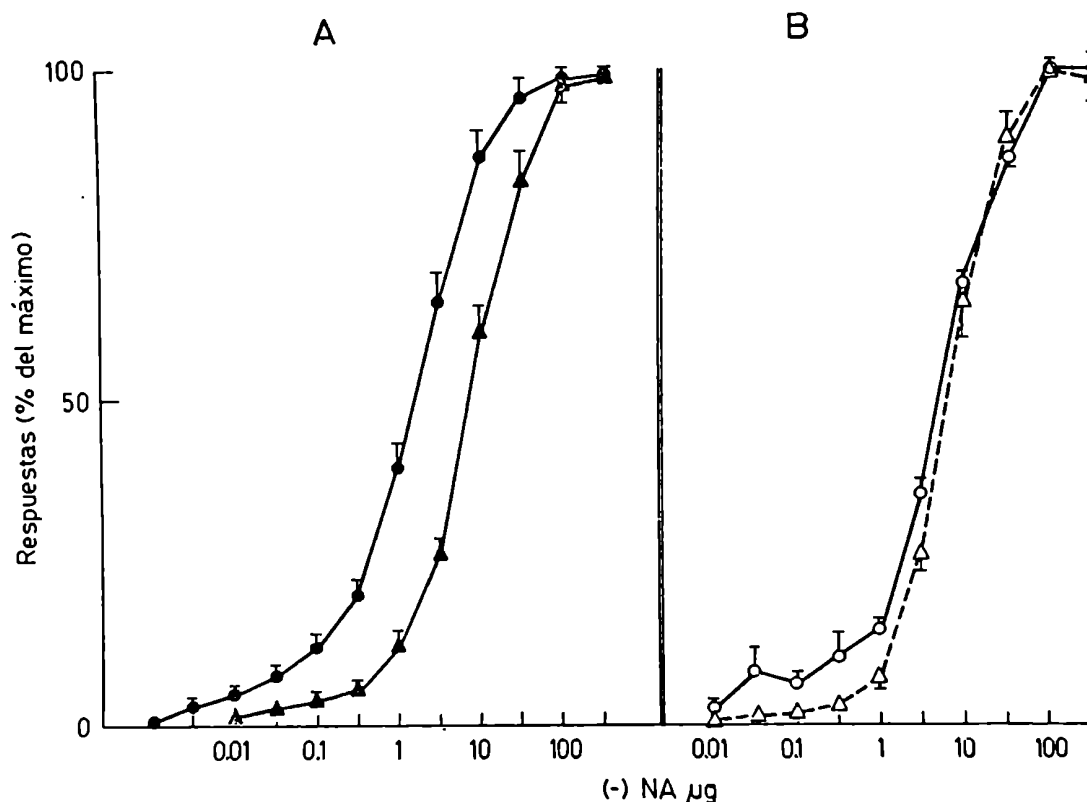


Figura 42: Efecto de las prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sobre la curva de dosis respuesta a la noradrenalina (NA) en presencia de diferentes concentraciones de calcio (Ca) en el medio de perfusión.

Ordenada: aumentos en la presión de perfusión expresados como porcentaje de la respuesta máxima.

Abscisa: dosis de (-) noradrenalina, expresada en ug.

A: concentración de calcio utilizada en el medio de perfusión: 2.6 mM.

●—● Control (n=27)

△—△ Prostaglandinas E<sub>2</sub>: 0.28 uM (n=4)

B: concentración de calcio utilizada en el medio de perfusión: 0.26 mM.

○—○ Control (n=4)

△---△ Prostaglandinas E<sub>2</sub>: 0.28 uM (n=4)

n: número de experimentos.

Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

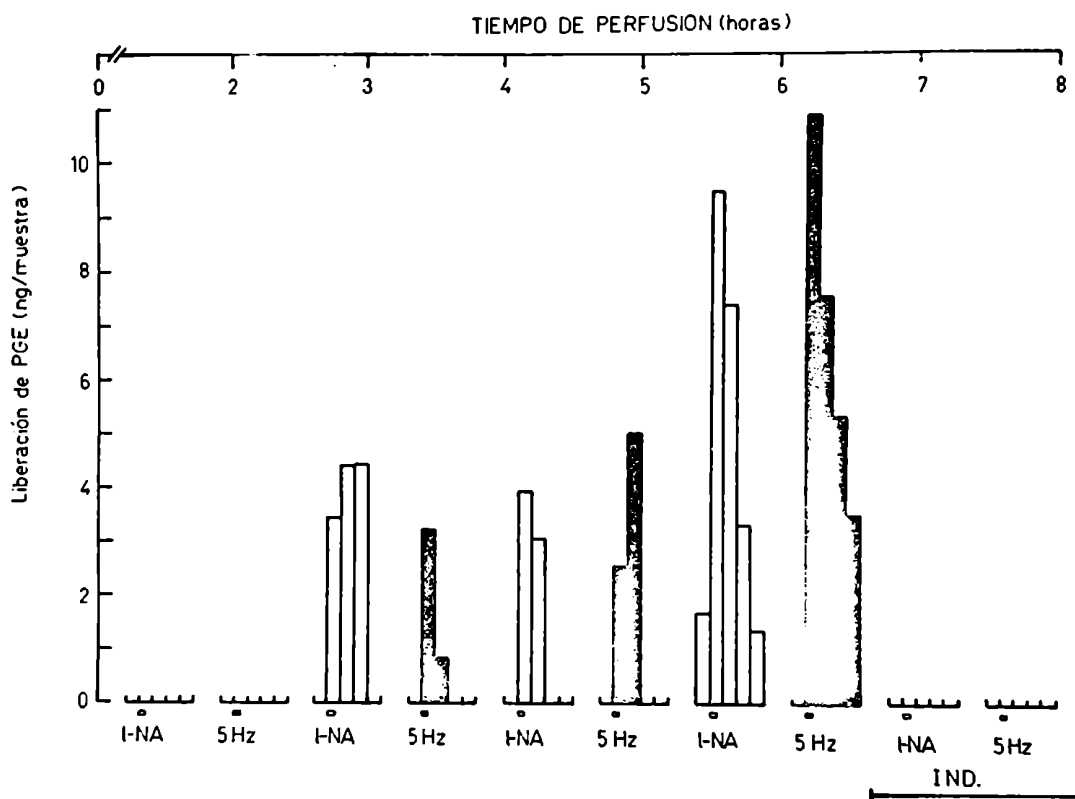


Figura 43 : Efecto de la indometacina (IND) sobre las prostaglandinas (PGE) liberadas por estimulación nerviosa o por noadrenalina (NA) exógena en el bazo perfundido de gato.

Ordenada: representa la liberación de prostaglandinas: se expresa en nanogramos por muestra de dos minutos, del efluente venoso.

Las barras blancas representan aumentos en la liberación de prostaglandinas inducidos por noradrenalina exógena. El rectángulo blanco debajo de la abscisa indica el momento de la inyección de noradrenalina: 3 ug.

Las barras negras representan la liberación de prostaglandinas inducida por estimulación nerviosa. El rectángulo negro debajo de la abscisa indica el momento de la estimulación nerviosa a 5 Hz durante 60 seg.

La línea horizontal superior indica el tiempo de perfusión del bazo que se expresa en horas. Los dos últimos períodos de estimulación se realizaron en presencia de indometacina (IND) 14 uM, lo que se indica por la línea horizontal debajo de la abscisa.

El gráfico corresponde a un experimento tipo.

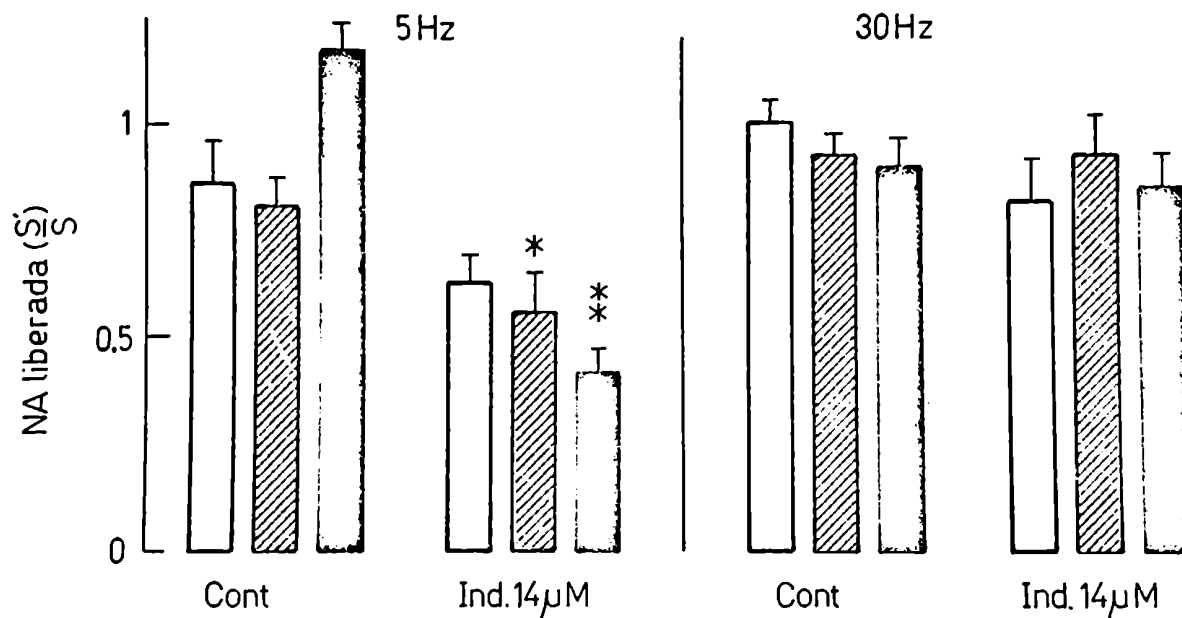


Figura 44: Efecto de la Indometacina (IND) sobre la liberación de noradrenalina (NA) inducida por estimulación nerviosa en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

Ordenada: cociente del transmisor liberado (ng de NA) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación. Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

NA: noradrenalina; IND: Indometacina (14 µM); CONT: controles; Ca: calcio.

- Ca, 2.6 mM (CONT: n=5; IND: n=4)
- Ca, 0.65 mM (CONT: n=4; IND: n=5)
- Ca, 0.26 mM (CONT: n=5; IND: n=4)

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

\*p < 0.05    \*\*p < 0.001 cuando se compara con el control correspondiente.

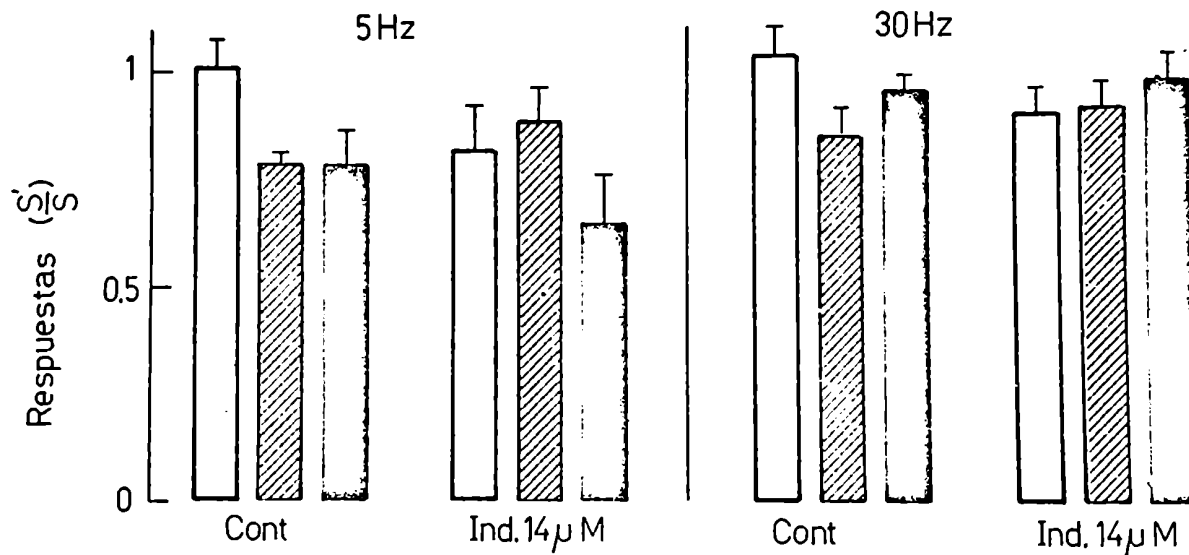


Figura 45 : Efecto de la Indometacina (IND) sobre las respuestas inducidas por estimulación nerviosa en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión.

Ordenada: cociente de respuestas (incremento en la presión de perfusión en mm de Hg) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Izquierda: los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg (0.1 mseg, voltaje su pramáximo).

Derecha: los nervios fueron estimulados a 30 Hz durante 10 seg (0.1 mseg, voltaje su pramáximo).

CONT: controles; IND: Indometacina (14 uM); Ca: calcio.

- Ca, 2.6 mM (CONT: n=5; IND: n=4)
- Ca, 0.65 mM (CONT: n=4; IND: n=5)
- Ca, 0.26 mM (CONT: n=5; IND: n=4)

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.



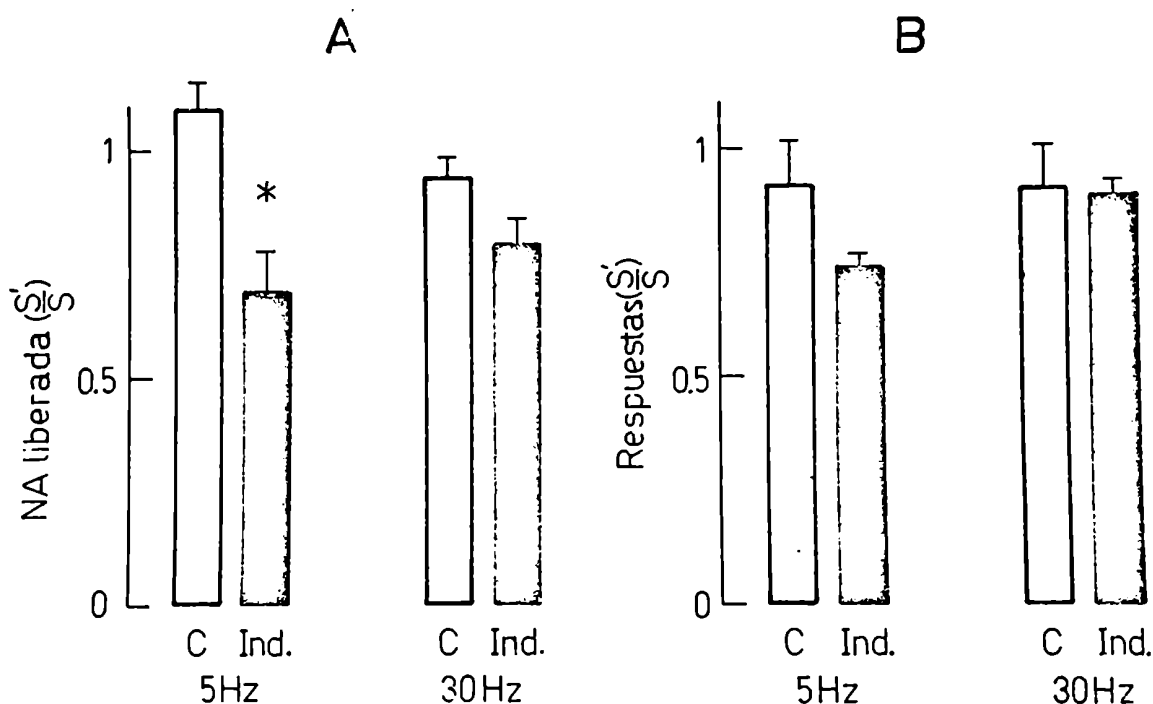




Figura 46: Efecto de la indometacina (IND) sobre las respuestas y la liberación de noradrenalina (NA) inducida por estimulación nerviosa después de 4 horas de perfusión del bazo.

A: Ordenada: cociente del transmisor liberado (ng de NA) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

B: Ordenada: cociente de respuestas (incremento en presión de perfusión en mm de Hg) entre el segundo período de estimulación (S') y el control correspondiente (S) para cada frecuencia de estimulación.

Un total de 300 estímulos se aplicaron para cada frecuencia de estimulación. Concentración de calcio: 2.6 mM.

NA: noradrenalina;  C: controles (n=4);  IND: Indometacina (14  $\mu$ M) (n=5). n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  el error standard de la media.

\*p < 0.01 cuando se compara con el control correspondiente.

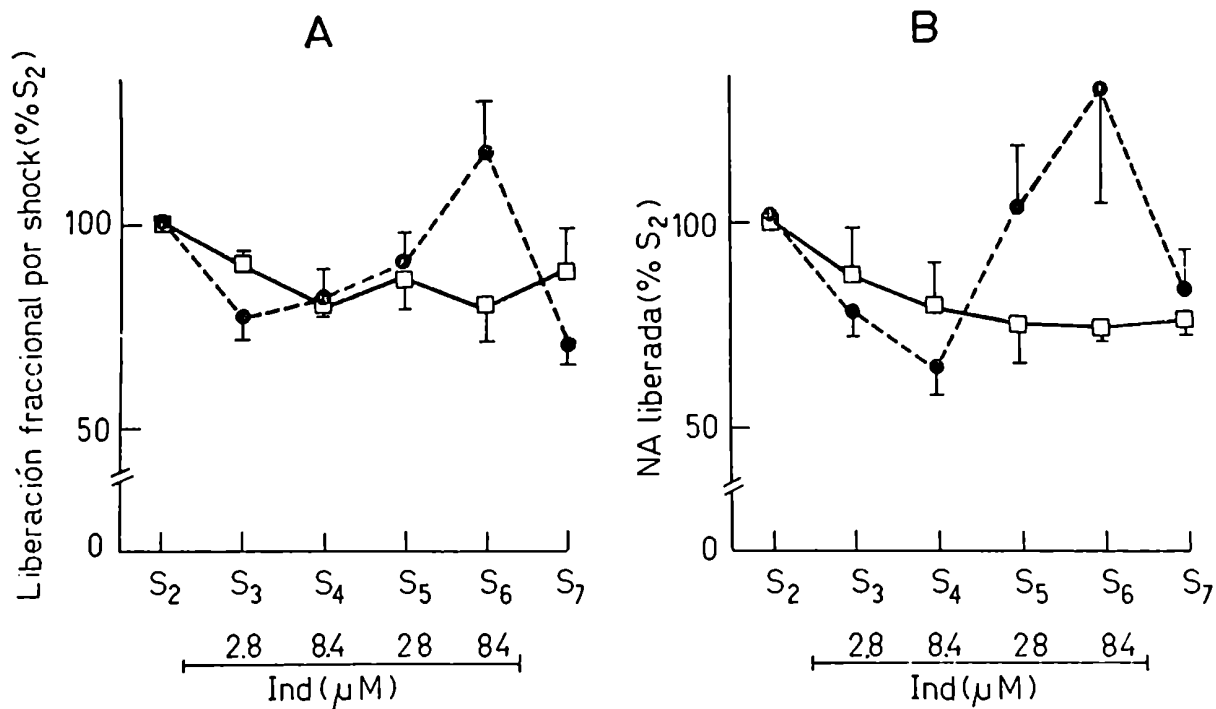


Figura 47 : Efecto de diferentes concentraciones de Indometacina (IND) sobre la liberación de noradrenalina (NA) y <sup>3</sup>H-total inducida por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

A: La ordenada representa la liberación fraccional por shock para la radiactividad total liberada en cada período de estimulación. Se expresa como porcentaje de la segunda estimulación (S<sub>2</sub>) dentro del mismo experimento.

B: La ordenada representa la liberación de noradrenalina (ng de NA) en cada período de estimulación. Se expresa como porcentaje de la segunda estimulación (S<sub>2</sub>) dentro del mismo experimento.

Abscisa: indica los períodos de estimulación (S<sub>2</sub> a S<sub>7</sub>). Los nervios fueron estimulados a 5 Hz durante 60 seg (0.1 mseg, voltaje supramáximo).

□ — □ Controles (n=4) S<sub>2</sub> - S<sub>7</sub>

● - - - ● IND: Indometacina (n=4) S<sub>3</sub>: 2.8 μM; S<sub>4</sub>: 8.4 μM; S<sub>5</sub>: 28 μM; S<sub>6</sub>: 84 μM; S<sub>7</sub>: después del lavado de la IND.

n: número de experimentos. Cada valor corresponde a la media ± el error standard de la media.

### Discusión

Las prostaglandinas exógenas de la serie  $E_2$  redujeron la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa, sólo cuando se aplicaron frecuencias bajas de estimulación (5 Hz). Este efecto inhibitorio no se observó cuando se empleó una frecuencia alta de estimulación nerviosa (30 Hz). La mayor efectividad de las prostaglandinas  $E_2$  exógenas, para inhibir la liberación del transmisor a bajas frecuencias de estimulación nerviosa, fue también observada por otros autores (Hedqvist, Stjärne y Wennmalm, 1970; Hedqvist, 1973).

Además del fenómeno de frecuencia dependencia sobre la liberación del transmisor por prostaglandina  $E_2$  exógena, varios autores sugirieron que la reducción en la noradrenalina liberada durante la exposición a la prostaglandina  $E_2$  es más pronunciada cuando la concentración de calcio en el medio se reduce (Hedqvist, 1970c, 1973; Stjärne, 1973d,e). No obstante en nuestros experimentos, donde los nervios fueron estimulados a 5 Hz, la liberación de noradrenalina en presencia de prostaglandina  $E_2$  no fue modificada por disminución de la concentración de calcio en el medio de perfusión. En contraste con estos resultados, la reducción en las respuestas a la estimulación nerviosa durante la exposición a la prostaglandina  $E_2$  fue más pronunciada para las concentraciones menores de calcio. Estos resultados fueron observados a 5 y 30 Hz.

Esta aparente disociación entre la cantidad de transmisor liberado y las respuestas a la estimulación nerviosa puede ser explicada por los cambios de sensibilidad de la célula efectora a la noradrenalina. En nuestras condiciones experimentales, la perfusión con prostaglandina  $E_2$  disminuyó las respuestas a la noradrenalina exógena. Una disminución similar en las respuestas fue observada cuando la concentración de calcio en el medio de perfusión se redujo de 2.6 a 0.26 mM. En consecuencia, la reducción en las respuestas a la estimulación nerviosa como resultado de los efectos de la prostaglandina  $E_2$  exógena y la disminución en la concentración externa de calcio representa una mezcla de efectos presinápticos (por ej.: disminución en la cantidad de transmisor liberado) y efectos postsinápticos (por ej.: reducción en la sensibilidad del órgano efector al neurotransmisor). De

esto surge, que una reducción en las respuestas a la estimulación nerviosa, no implica una disminución en el transmisor liberado. Cuando los estudios de los efectos de las prostaglandinas sobre la neurotransmisión se basan en las respuestas a la estimulación nerviosa, la contribución de los cambios postsinápticos de sensibilidad al neurotransmisor deben ser tenidos en cuenta (von Euler y Hedqvist, 1969; Hedqvist, 1972; Taylor y Einhorn, 1972; Illés, Hadhazy, Torma, Vizi y Knoll, 1973).

La ausencia de una relación entre la concentración externa de calcio y el efecto inhibitorio de las prostaglandinas sobre la neurotransmisión adrenérgica, en nuestras condiciones experimentales, no refleja necesariamente un conflicto de evidencias con otros autores y puede ser debido a diferencias de órganos y especies.

La mayor efectividad de la prostaglandina de la serie  $E_2$  para reducir la liberación del transmisor a 5 Hz cuando se compara con 30 Hz, es similar a los resultados obtenidos en los controles con concentraciones bajas de calcio. En estas condiciones experimentales la reducción en la cantidad de transmisor liberado fue más pronunciada para las frecuencias bajas de estimulación nerviosa. Es de interés hacer notar que el bloqueo de los receptores presinápticos alfa por fenoxibenzamina o por fentolamina aumentó menos la liberación del transmisor por estimulación nerviosa (Capítulo I), cuando se aplicó una frecuencia alta (30 Hz). De esto surge que la frecuencia de estimulación que se utiliza para estudiar los mecanismos regulatorios del transmisor liberado es un parámetro muy importante, que debe ser tenido en cuenta.

La asociación entre la inhibición de la liberación del transmisor por estimulación nerviosa en presencia de prostaglandinas y el posible papel de estas sustancias en un mecanismo endógeno de retroinformación negativo, se basa en el hecho que estas sustancias se liberan al efluente venoso del bazo perfundido durante los períodos de estimulación nerviosa (Davies, Horton y Withrington, 1968; Gilmore, Vane y Wyllie, 1968; Ferreira, Moncada y Vane, 1973; Hoszowska y Panczenko, 1974). En nuestras condiciones experimentales, se liberaron prostaglandinas del bazo perfun-

dido de gato, por estimulación nerviosa y por noradrenalina exógena. No obstante hay ciertas características en este fenómeno que nosotros consideramos de cierto interés: a) no se detectó liberación de prostaglandinas, ni por estimulación nerviosa, ni por noradrenalina exógena al comienzo del experimento (por ej.: durante las dos primeras horas de perfusión del bazo) y b) cuando ambos tratamientos promovían la liberación de prostaglandinas (por ej.: después de 3 horas de perfusión) había un aumento progresivo en la cantidad de prostaglandinas liberadas en función del tiempo. Esto nos llevó a preguntarnos cuando las prostaglandinas liberadas por estimulación nerviosa o por noradrenalina exógena representan un fenómeno de relevancia fisiológica. El aumento en la liberación de prostaglandinas como una función del tiempo de perfusión fue observada también en el bazo perfundido de gato por Ferreira, Moncada y Vane (1973). El retraso observado, en la aparición de prostaglandinas podría involucrar, un fenómeno adicional tiempo-dependiente. Ferreira, Moncada y Vane (1973) sugirieron que el bazo perfundido podría sufrir un deterioro gradual, como consecuencia del edema. Se sabe que el daño tisular puede dar lugar a la formación de prostaglandinas (Piper y Vane, 1971). Si esto fuera así, la importancia fisiológica de las prostaglandinas liberadas por estimulación nerviosa o por noradrenalina exógena requeriría una revisión.

La concentración de indometacina empleada en nuestros experimentos previene efectivamente la liberación de prostaglandinas inducida por estimulación nerviosa o por noradrenalina exógena, después de por los menos 2 horas de comenzada la perfusión del bazo. En consecuencia, se debe establecer cuando esta concentración de indometacina aumenta la liberación del transmisor inducido por estimulación nerviosa. La ineffectividad de la indometacina para aumentar la liberación del transmisor por estimulación nerviosa, a las tres concentraciones de calcio utilizadas, está en contra de la hipótesis que sugiere que las prostaglandinas liberadas por estimulación nerviosa estarían involucradas en un mecanismo de retroinformación negativo que regularía la liberación del transmisor. Es de

interés recalcar que la indometacina tampoco aumentó la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa, cuando los experimentos se realizaron luego de perfundir el bazo durante 4 horas (es decir, cuando se detectaba liberación de prostaglandinas como resultado de la estimulación nerviosa, en nuestras condiciones experimentales).

En presencia de concentraciones bajas de calcio en el medio de perfusión, la exposición a la indometacina dio lugar a una reducción significativa en la liberación del transmisor por estimulación nerviosa. Este efecto de la indometacina podría estar relacionado a una acción inhibitoria directa de la droga sobre el transmisor liberado, que sería independiente de la habilidad de la indometacina para inhibir la síntesis de prostaglandinas. No obstante, cuando se estudió el efecto de diferentes concentraciones de indometacina sobre el transmisor liberado por estimulación nerviosa, se encontró que esta droga no redujo la liberación del transmisor en un amplio rango de concentraciones, cuando la concentración de calcio en el medio de perfusión era 2.6 mM.

Podría argumentarse que la inefectividad de la indometacina para aumentar la liberación del transmisor en nuestras condiciones experimentales, podría deberse al hecho que en nuestros experimentos nosotros medimos noradrenalina endógena. Los pequeños aumentos observados en la liberación del transmisor, en presencia de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, fueron determinados generalmente utilizando el transmisor tritiado (Stjärne, 1972, 1973, a, b, d; Fredholm y Hedqvist, 1973). En nuestras condiciones experimentales cuando se determinó la liberación del transmisor tritiado por estimulación nerviosa, en presencia de indometacina, los resultados fueron idénticos a los obtenidos con noradrenalina endógena.

Cuando fueron utilizados otros inhibidores de síntesis de prostaglandinas en el bazo perfundido de gato (ETA: 5,7,11,14-ácido eicosatetranoico, 30  $\mu$ M) se obtuvieron esencialmente los mismos resultados: no aumentó la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa (Dubocovich y Langer, observaciones no publicadas). En adición, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por meclofenamato en el bazo perfundido de gato no aumentó la liberación del transmisor durante la estimulación nerviosa (Hoszowska y Panczenko, 1974).

En el riñón perfundido de conejo, la indometacina previno la liberación de prostaglandinas inducida por estimulación de las fibras nerviosas renales. Además, en presencia de indometacina la liberación de catecolaminas y la constricción de la arteria renal no fueron afectadas en respuesta a la estimulación nerviosa (Needleman, Douglas, Jakschik, Stoecklein y Johnson, 1974).

Si bien, el bloqueo de la síntesis de prostaglandinas, no aumenta la liberación durante la estimulación nerviosa, el bloqueo de los receptores alfa presinápticos por fentolamina o fenoxibenzamina da lugar a un incremento marcado en el transmisor liberado (Tabla 21). Estos resultados, apoyan la hipótesis que postula que la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, regularía su propia liberación, por un mecanismo de retroinformación negativo, a través de receptores alfa de localización presináptica que jugarían un rol fisiológico dentro de la neurotransmisión adrenérgica (Langer, Adler, Enero y Stefano, 1971; Farnebo y Hamberger, 1971; Kirpekar y Puig, 1971; Enero y Langer, 1973; Langer, 1973, 1974b; Rand, Story, Allen; Glover y Mc Culloch, 1973; Cubeddu, Barnes, Langer y Weiner, 1974; Farah y Langer, 1974; Cubeddu y Weiner, 1975a). De acuerdo con esta hipótesis, el neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa inhibiría su propia liberación a través de la activación de receptores alfa de localización presináptica desencadenando un mecanismo de retroinformación negativa el cual llevaría a una disminución en la liberación del transmisor.

Es de interés recalcar, que tanto la estimulación, como el bloqueo de los receptores presinápticos alfa por drogas, da lugar a los efectos esperados sobre el transmisor liberado por estimulación nerviosa, en todos los tejidos que se han estudiado. Sin embargo, esta generalización no puede ser aplicada para todos los tejidos, cuando se estudia la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en presencia de prostaglandinas exógenas dado que en la membrana nictitante de gato, ni la prostaglandina de la serie  $E_1$ , ni la de la serie  $E_2$  reducen la liberación del transmisor tritiado durante la estimulación nerviosa (Enero y Langer, observaciones no publicadas). En adición en el bazo perfundido de gato, se observó una reducción en el transmisor liberado en presencia de prostaglandina

$E_1$  sólo en 4 de un total de 10 experimentos (Hedqvist y Brundin, 1969).

El posible eslabón entre las prostaglandinas de la serie E y el mecanismo de retroinformación negativo, mediado por receptores alfa presinápticos, ha sido descartado por experimentos en los cuales la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por indometacina u otras drogas no afectó ni el aumento en la liberación de noradrenalina inducida por el bloqueo de receptores alfa, ni la inhibición del transmisor liberado en presencia de agonistas de receptores alfa (Starke y Montel, 1973; Stjärne, 1973a,c).

Estos resultados apoyan la hipótesis que postula que las prostaglandinas de la serie E estarían involucradas en un mecanismo endógeno que regularía la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa. Aún en los tejidos donde las prostaglandinas de la serie  $E_1$  ó  $E_2$  reducen la liberación de noradrenalina durante la estimulación nerviosa, estos efectos podrían ser de una naturaleza farmacológica en lugar de reflejar la presencia de un mecanismo endógeno que regularía la liberación del transmisor.



# RESUMEN

I.- METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

Se estudió el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada espontáneamente y por estimulación nerviosa a distintas frecuencias, luego de marcar los depósitos endógenos del bazo de gato con  $(-)^3\text{H}$ -noradrenalina.

En el bazo perfundido de gato el 95% del eflujo espontáneo de radiactividad le corresponde a los  $^3\text{H}$ -metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina. El  $^3\text{H}$ -DOPEG ( $^3\text{H}$ -3,4-dihidroxifenilglicol) contribuyó con el 60% de la radiactividad liberada en condiciones de reposo nervioso, siguiéndole en importancia los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados y la  $^3\text{H}$ -normetanefrina. El  $^3\text{H}$ -ácido 3-4-dihidroxi-mandélico (DOMA) representó sólo el 2 % de la radiactividad del eflujo espontáneo.

La inhibición de la captación neuronal de noradrenalina, con cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) o de la captación neuronal y extraneuronal, con fenoxibenzamina (29  $\mu\text{M}$ ), no modificó el eflujo espontáneo de los  $^3\text{H}$ -metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina.

De estos resultados se concluye que los metabolitos liberados en condiciones de reposo nervioso se formarían a partir de la noradrenalina que se pierde de los gránulos de almacenamiento hacia el citoplasma del terminal nervioso por la acción combinada de la monoamino oxidasa, aldehído reductasa y catecol O-metil transferasa (Fig 21A). Al espacio sináptico llegaría una pequeña fracción de noradrenalina y el resto lo formarían sus metabolitos: DOPEG, metabolitos O-metilados deaminados y normetanefrina (Fig 21A).

La proporción de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, que se recogió sin metabolizar representó entre un 50 y un 60% del aumento total en radiactividad, para todo el rango de frecuencias estudiadas (0.5 Hz a 30 Hz). El glicol deaminado  $^3\text{H}$ -DOPEG fue el principal metabolito de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. La inhibición de la captación neuronal de noradrenalina con cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) o fenoxibenzamina (29  $\mu\text{M}$ ) previno completamente la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Estos resultados nos permiten concluir que el  $^3\text{H}$ -DOPEG se forma a nivel presináptico por la actividad de la monoamino oxidasa y aldehído reductasa, a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es recaptada

por el terminal adrenérgico (Fig 21B).

Del incremento total de radiactividad inducido por estimulación nerviosa, un 8% le correspondió a los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados. Cuando se inhibió la captación neuronal de noradrenalina con cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) se redujo la cantidad de metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados liberados por estimulación nerviosa. Estos metabolitos se formarían en su mayor parte a nivel presináptico por la actividad de las enzimas neuronales: monoamino oxidasa, aldehído reductasa y catecol O-metil transferasa a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, que ha sido recaptada por el terminal adrenérgico (Fig 21B). Estos resultados no excluyen la posibilidad, que los metabolitos  $^3\text{H}$ -O-metilados deaminados se formen por O-metilación a nivel postsináptico, de los  $^3\text{H}$ -metabolitos deaminados de origen neuronal.

La inhibición de la captación neuronal con cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) aumentó la cantidad de  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Este efecto es probablemente debido a un aumento de la cantidad de  $^3\text{H}$ -noradrenalina disponible para ser metabolizada a nivel postsináptico. La fenoxibenzamina (29  $\mu\text{M}$ ) que inhibe la captación neuronal y extraneuronal de noradrenalina redujo completamente la cantidad de  $^3\text{H}$ -normetanefrina formada a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Estos resultados nos permiten concluir que la  $^3\text{H}$ -normetanefrina se forma por la acción de la catecol O-metil transferasa extraneuronal, a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es captada por el órgano efector (Fig 21B).

Cuando se aumentó el tiempo de contacto entre el transmisor liberado por estimulación nerviosa y el tejido por interrupción de la perfusión, disminuyó la cantidad total de  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberado por estimulación nerviosa, pero aumentó significativamente el metabolismo vía el glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG. La cocaína (2.9  $\mu\text{M}$ ) previno totalmente la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG. La disminución en la cantidad de  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en condiciones de interrupción de la perfusión, se debe parcialmente a un aumento del metabolismo.

En la Figura 21B se muestra en forma esquemática la sinápsis neuroefectora y se indica el origen de los metabolitos formados a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato. Cuando se estimulan los nervios adrenérgicos, se libera noradrenalina al espacio sináptico por el proceso de exocitosis. El neurotransmisor activa los receptores del órgano efector y una fracción se metaboliza por acción de la catecol O-metil transferasa extraneuronal que se recoge como normetanefrina. Una fracción importante de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa es recaptada por el terminal nervioso y predominantemente deaminada a DOPEG por la monoamino oxidasa y aldehído reductasa presináptica. Los metabolitos O-metilados deaminados se formarían principalmente a nivel presináptico a partir de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es recaptada por los terminales nerviosos (Fig 21B).

El metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina total liberada por estimulación nerviosa no se modificó para las distintas frecuencias utilizadas. Sin embargo, cuando se analizó el aumento en radiactividad en las muestras recogidas durante la estimulación nerviosa se encontró una disminución progresiva en la fracción de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina que fue recogida como  $^3\text{H}$ -metabolitos a medida que la frecuencia de estimulación se incrementó de 0.5 Hz a 5 Hz.

En las muestras recogidas después de la estimulación nerviosa no se encontró una relación entre la frecuencia de estimulación aplicada y el metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. Aproximadamente el 80% del aumento total en radiactividad le correspondió a los metabolitos de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina, particularmente al glicol deaminado,  $^3\text{H}$ -DOPEG. La secuencia temporal del metabolismo de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa reveló que la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG fue pequeña durante la estimulación nerviosa y que aumentó rápidamente después de la estimulación. El aumento selectivo en la formación del  $^3\text{H}$ -DOPEG después de la estimulación nerviosa es compatible con un incremento de la recaptación neuronal del transmisor liberado inmediatamente después de finalizada la estimulación nerviosa.

La inhibición de la captación neuronal por cocaína o fenoxibenzamina previno la formación de  $^3\text{H}$ -DOPEG a partir de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. En presencia de cocaína, la liberación fraccional por shock de la radiactividad total no aumentó para ninguna de las frecuencias utilizadas: 1, 5 ó 30 Hz. Estos resultados indicarían que una fracción de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa sería recaptada por el terminal nervioso y metabolizada a  $^3\text{H}$ -DOPEG antes que ser almacenada para su posterior reuso.

La conversión a  $^3\text{H}$ -DOPEG de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina liberada por estimulación nerviosa que es recaptada por el terminal nervioso adrenérgico, sugiere que deben existir diferencias en el proceso de captación neuronal bajo condiciones de reposo y aquel que opera durante y después de la estimulación nerviosa. En condiciones de reposo la captación neuronal en el bazo perfundido de gato está acoplada con el almacenamiento vesicular. Por otra parte durante y después de la estimulación nerviosa, la captación neuronal de noradrenalina estaría acoplada al metabolismo pre-sináptico a través de la monoamino oxidasa y aldehído reductasa.

II.- MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

En el bazo perfundido de gato, el agonista de los receptores beta, el isoproterenol (0.14 a 14 nM), aumentó la liberación fraccional de radiactividad por shock inducida por estimulación a 1 Hz. Este efecto es concentración dependiente y reversible por lavado de la droga. La exposición, al bloqueante de los receptores beta, propranolol (0.1  $\mu$ M), no modificó la liberación fraccional de radiactividad por shock, pero previno el aumento inducido por isoproterenol.

El bloqueo por propranolol de los efectos del isoproterenol sobre la radiactividad liberada por estimulación nerviosa, indicaría que el aumento inducido por exposición al isoproterenol, es mediado a través de la activación de receptores beta adrenérgicos de localización presináptica. Estos receptores mediarían un mecanismo de retroinformación positiva que regularía la liberación de noradrenalina (Fig 49).

La inhibición de la fosfodiesterasa con papaverina (27  $\mu$ M) aumentó la liberación fraccional de radiactividad por shock y en estas condiciones el isoproterenol produjo un aumento mayor que en condiciones controles. Por otra parte, el bloqueo de los receptores beta, con propranolol (0.1  $\mu$ M), antagonizó el aumento de radiactividad inducido por estimulación nerviosa en presencia de papaverina. La potenciación del efecto del isoproterenol sobre la liberación de radiactividad inducida por estimulación nerviosa cuando se aumentan los niveles neuronales de AMP cíclico por inhibición de la fosfodiesterasa, indicaría que el mecanismo de retroinformación positiva mediado a través de receptores beta presinápticos estaría encadenado con la activación de la adenil ciclasa.

Los bloqueantes de receptores alfa: fentolamina (3.1  $\mu$ M) y fenoxibenzamina (29 nM a 29  $\mu$ M) aumentaron significativamente la liberación fraccional de radiactividad por shock y del neurotransmisor endógeno por estimulación nerviosa adrenérgica en el bazo perfundido de gato. Los aumentos observados en presencia de bloqueantes alfa, representan incrementos reales en la cantidad de neurotransmisor liberado por estímulo nervioso y no se deberían a bloqueo de sitios de pérdida, dado que estos efectos se obtuvieron aún con concentraciones de las drogas que no

inhiben la captación neuronal ni extraneuronal de noradrenalina (Fig 48).

La activación de los receptores alfa presinápticos, por noradrenalina exógena (0.18  $\mu$ M), en presencia de cocaína, inhibió la liberación fraccional de radiactividad por shock inducida por estimulación nerviosa (Fig 48).

El hecho que el bloqueo y la activación de los receptores alfa aumente y disminuya respectivamente la liberación de radiactividad inducida por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato, es compatible con la hipótesis que postula que la noradrenalina regula su propia liberación a través de un mecanismo de retroinformación negativa mediado por receptores alfa de localización presináptica (Fig 48).

En el bazo perfundido de gato, órgano con receptores postsinápticos de tipo alfa, la liberación de noradrenalina se regularía por dos mecanismos de retroinformación: uno que actuaría aumentando la liberación de noradrenalina por estímulo nervioso a través de la activación de receptores beta presinápticos y el otro que actuaría disminuyendo la liberación de noradrenalina por estímulo nervioso a través de la activación de receptores alfa presinápticos (Fig 48).

En la Figura 49, se representa en forma esquemática la participación de los mecanismos de retroinformación, en la regulación de la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso. El mecanismo de retroinformación positivo se desencadenaría cuando la concentración de noradrenalina en el espacio sináptico es baja, la cual activaría los receptores beta presinápticos aumentando la cantidad de neurotransmisor liberado por estímulo nervioso (Fig 49). Este fenómeno ocurriría cuando la cantidad de noradrenalina liberada por estímulo es pequeña (por ej.: cuando se estimula a frecuencias bajas). Cuando la cantidad de noradrenalina en el espacio sináptico alcanza una concentración mayor, la activación de los receptores alfa presinápticos desencadenaría el mecanismo de retroinformación negativa, dando lugar a una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado (Fig 49).

Los bloqueantes de receptores adrenérgicos alfa, fentolamina (3.1  $\mu\text{M}$ ) y fenoxibenzamina (2.9  $\mu\text{M}$ ), fueron menos efectivos para aumentar la liberación fraccional de radiactividad inducida por estimulación nerviosa a 30 Hz, que a frecuencias menores, cuando la concentración de calcio en el medio de perfusión era 2.6 mM.

La noradrenalina exógena (0.18  $\mu\text{M}$ ), en presencia de cocaína, no redujo la liberación fraccional de radiactividad por shock cuando los nervios fueron estimulados a 5 ó 30 Hz. No obstante, cuando se disminuyó la frecuencia de estimulación nerviosa a 1 ó 2 Hz el agonista alfa, noradrenalina, inhibió significativamente la liberación fraccional por shock.

Cuando se redujo la concentración de calcio en el medio de perfusión a 0.26 mM, la liberación fraccional de radiactividad inducida por estimulación nerviosa a 30 Hz en presencia de fenoxibenzamina fue significativamente mayor que la obtenida con la concentración de calcio 2.6 mM.

La estimulación de los receptores alfa, con noradrenalina exógena, en presencia de una concentración reducida de calcio (0.26 mM) en el medio de perfusión inhibió significativamente la liberación fraccional de radiactividad inducida por estímulo nervioso a 5 y 30 Hz.

En consecuencia nuestros resultados indicarían que la efectividad disminuida del mecanismo de retroinformación negativo mediado a través de receptores presinápticos alfa, que se observó cuando los nervios fueron estimulados a 30 Hz podría estar relacionada con una mayor entrada de iones calcio al terminal nervioso cuando se estimula a frecuencias altas.

Mientras que el mecanismo de retroinformación positiva, mediado a través de receptores beta presinápticos, estaría encadenado a la activación neuronal de la adenilciclase, el mecanismo de retroinformación negativa mediado a través de receptores alfa presinápticos inhibiría la liberación del transmisor por estímulo nervioso, disminuyendo la disponibilidad de los iones calcio necesarios para el acople eléctrico secretorio. Por lo tanto bajo condiciones en las que se aumenta la disponibilidad de calcio para el proceso de liberación (por ej.: estimulando a frecuencias altas) la inhibición de la liberación mediada por estimulación de los receptores alfa presinápticos es inefectiva.



Cuando se estudió la potencia de la fenoxibenzamina para bloquear los receptores pre y postsinápticos en el bazo perfundido de gato, se encontró una reducción significativa en las respuestas a la estimulación nerviosa en presencia de concentraciones bajas de fenoxibenzamina (0.88 y 2.9 nM), pero no aumentó la cantidad de transmisor liberado por estímulo nervioso en estas condiciones. La diferencia entre la concentración de fenoxibenzamina requerida para bloquear los receptores postsinápticos alfa y aquella necesaria para aumentar la liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa fue de 30 veces. Estos resultados son compatibles con el hecho que los receptores alfa pre y postsinápticos no son idénticos. Los receptores alfa postsinápticos que median las respuestas del órgano efector podrían denominarse  $\alpha_1$  mientras que los receptores presinápticos que regulan la liberación del neurotransmisor serían  $\alpha_2$ .

III.- EVIDENCIAS EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA LIBERACION DE NORADRENALINA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.

Se estudió el efecto de la prostaglandina  $E_2$  y de un inhibidor de síntesis de prostaglandinas, la indometacina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato, utilizando diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión: 0.26, 0.65 y 2.6 mM.

En presencia de 0.28  $\mu\text{M}$  de prostaglandina  $E_2$  se redujeron significativamente las respuestas y la cantidad de transmisor liberado por estimulación nerviosa. La prostaglandina  $E_2$  fue más efectiva para reducir la liberación del transmisor por estímulo nervioso a 5 Hz que a 30 Hz.

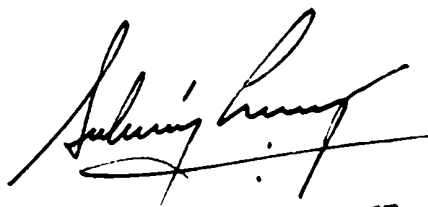
En contraste con el marcado incremento obtenido cuando el mecanismo de retroinformación negativa mediado a través de receptores presinápticos alfa se bloquea por fentolamina o fenoxibenzamina, cuando se inhibió la síntesis de prostaglandinas con indometacina (14  $\mu\text{M}$ ), en el bazo perfundido de gato no aumentó la cantidad de noradrenalina liberada por estimulación nerviosa. La concentración de indometacina empleada en estos experimentos previno completamente la liberación de prostaglandinas inducidas por estimulación nerviosa o noradrenalina exógena.

Luego de perfundir el bazo de gato durante 4 horas, es decir en condiciones en que la liberación de prostaglandinas es mayor, la indometacina (14  $\mu\text{M}$ ) tampoco aumentó la liberación de noradrenalina inducida por estimulación nerviosa.

Resultados similares a los obtenidos con la prostaglandina  $E_2$  exógena y con indometacina en presencia de 2.6 mM de calcio en el medio de perfusión, fueron obtenidos en presencia de 0.65 y 0.26 mM de calcio. En nuestras condiciones experimentales no se observó un aumento de la potencia inhibitoria de la prostaglandina  $E_2$ , sobre la liberación del neurotransmisor inducido por estimulación nerviosa, cuando se redujo la concentración de calcio en el medio de perfusión.

Dado que la inhibición de síntesis de prostaglandinas no aumentó la cantidad de transmisor liberado por estimulación nerviosa, nuestros resultados no apoyan la hipótesis que postula que las prostaglandinas de la serie E estarían involucradas

en un mecanismo regulatorio endógeno que modularía la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa. La reducción en la cantidad de noradrenalina liberada por estímulo nervioso durante la exposición a la prostaglandina  $E_2$  sería de una naturaleza farmacológica. En contraste con este sitio de acción farmacológica existen sobre el terminal nervioso adrenérgico receptores de tipo alfa, inhibitorios y de tipo beta, excitatorios que participan en mecanismos que regulan la liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa, que tienen relevancia fisiológica dentro del sistema nervioso adrenérgico.



DR. SALOMÓN Z. LANGER  
DIRECTOR



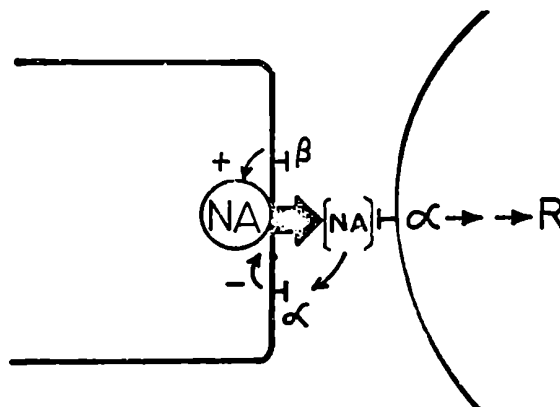


Figura 48: Mecanismos de retroinformación que regulan la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato.

El mecanismo de retroinformación positivo, es mediado a través de la activación de receptores beta presinápticos, lo que induce un aumento en el neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa.

El mecanismo de retroinformación negativo, es mediado a través de la activación de receptores alfa presinápticos, lo que induce una disminución en el neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa.

La respuesta (R) del órgano efector es mediada a través de receptores alfa, en el bazo perfundido de gato.

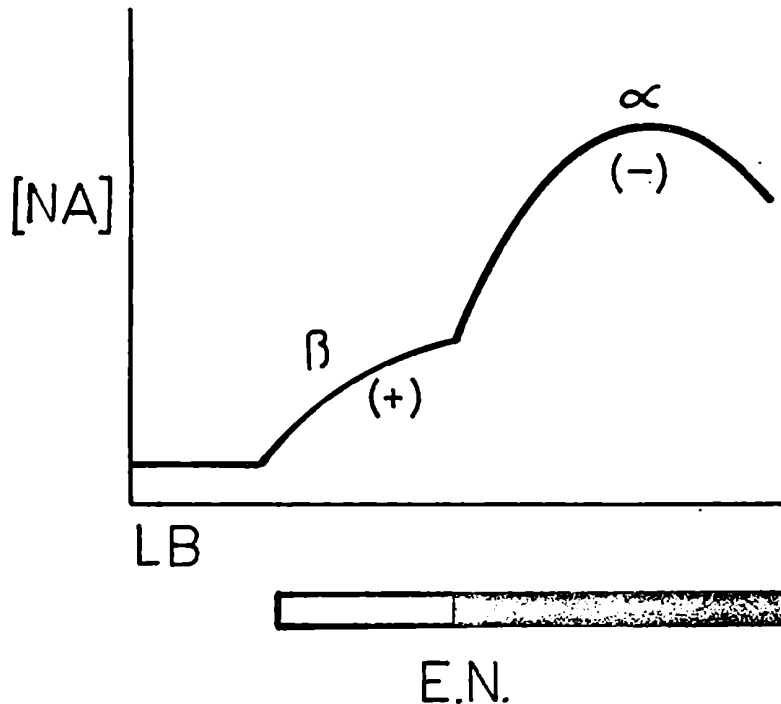


Figura 49: Representación esquemática que involucra la participación de los receptores presinápticos alfa y beta en la regulación de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa.

Ordenada: Concentración hipotética de la noradrenalina (NA) liberada por estimulación nerviosa que está presente en el espacio sináptico. LB: liberación basal en condiciones de reposo. EN: estimulación nerviosa, a muy baja frecuencia  y a frecuencias intermedias

El mecanismo de retroinformación positivo es activado por concentraciones bajas de noradrenalina dando lugar a un aumento en el transmisor liberado. Cuando se alcanzan concentraciones altas de neurotransmisor en el espacio sináptico se desencadenaría el mecanismo de retroinformación negativa mediado por receptores alfa presinápticos dando lugar a la inhibición del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa.

# BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ADLER-GRASCHINSKY E. , LANGER S.Z.

Acciones del dibutiril AMP cíclico y de los inhibidores de la fosfodiesterasa sobre la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa. Medicina 33: 600-601, 1973

ADLER-GRASCHINSKY E., 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

ADLER-GRASCHINSKY E., LANGER S.Z., RUBIO M.C.

Metabolism of norepinephrine released by phenoxybenzamine in isolated guinea-pig atria. J. Pharmacol. exp. Ther. 180: 286-301, 1972

AHLQUIST R.P.

A study of adrenotropic receptors. Am. J. Physiol. 153: 586-600, 1948

ANTON A.H., SAYRE D.F.

A study of the factor affecting the aluminium oxide trihydroxyindole procedures for the analysis of catecholamines. J. Pharmacol. exp. Ther. 138: 360-375, 1962

ARMSTRONG J.M., BOURA A.L.A.

Effects of clonidine and guanetidine on peripheral sympathetic nerve function in the pithed rat. Br. J. Pharmacol. 47: 850-852, 1973

AXELROD J.

Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase.  
J. biol. Chem. 237: 1557-1660, 1962

AXELROD J.

Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines  
and other biogenic amines.  
(Second International Catecholamine Symposium, Milan) Pharmac. Rev.  
18: 95-113, 1966

AXELROD J.

Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines  
and other biogenic amines.  
Pharmacol. Rev. 18: 95-113, 1966

BACQ Z.M.

La pharmacologie du système nerveux autonome, et particulièrement du  
sympathique, d'après la théorie neurohumorale.  
Ann. Physiol. 10: 467-528, 1934

BACQ Z.M.

La transmission chimique des influx dans le système nerveux autonome  
Ergebn. Physiol. 37: 82-185, 1935

BACQ Z.M., FISCHER P.

Nature de la substance sympathicomimétique extraite des nerfs ou des  
tissus des mammifères.  
Archs. int. Physiol. 55: 73-91, 1947

BARGER G., DALE H.H.

Chemical structure and sympathomimetic action of amines.  
J. Physiol. (Lond). 41: 19-59, 1910



An electrophysiological analysis of the uptake of noradrenaline at sympathetic nerve terminals.

J. Physiol. (Lond) 229: 533-546, 1973

BHAGAT B., ZEIDMAN H.

Increased retention of norepinephrine- $H^3$  in vas deferens during nerve stimulation.

Am. J. Physiol. 219: 691-696, 1970

BIBERFELD J.

Pharmakologische Eigenschaften eines synthetisch dargestellten Suprarenins und einiger seiner Derivate.

Medsche. Klin. 1177-1179, 1906

BLAKELEY A.G.H., BROWN G.L., FERRY C.B.

Pharmacological experiments on the release of the sympathetic transmitter.

J. Physiol. (Lond) 167: 505-514, 1963

BLASCHKO H.

The specific action of L-dopa decarboxylase

J. Physiol. (Lond) 96: 50-51P, 1939

BOGDANSKI D.F., BRODIE B.B.

The effects of inorganic ions on the storage and uptake of  $^3H$ -norepinephrine by rat heart slices.

J.Pharmacol.exp. Ther. 165: 181-189, 1969

BOGDANSKI D.F., TISSARI A., BRODIE B.B.

Role of sodium, potassium, ouabain and reserpine in uptake storage and metabolism of biogenic amines in synaptosomes.

Life Sci. 7: 419-428, 1968

BOULLIN D.J., COSTA E., BRODIE B.B.

Apparent depletion of NE stores after repetitive stimulation of cat colon in presence of phenoxybenzamine.

Int. J. Neuropharmacol. 5: 293-298, 1966

BOULLIN D.J., COSTA E., BRODIE B.B.

Evidence that blockade of adrenergic receptors causes overflow of norepinephrine in cat's colon after nerve stimulation.

J. Pharmacol. exp. Ther. 157: 125-134, 1967

BROWN G.L., DAVIES B.M., FERRY C.B.

The effect of neuronal rest on the output of sympathetic transmitter from the spleen.

J. Physiol. (Lond) 159: 365-380, 1961

BROWN G.L., GILLESPIE J.S..

The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat

J. Physiol. (Lond) 138: 81-102, 1957

BROWN G.L.

Release of sympathetic transmitter by nerve stimulation.

In Adrenergic Mechanisms pp. 116-124, 1960. CIBA, London: Churchill

BURN J.H.

Practical Pharmacology.

Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1952

CANNON W.B.

The argument for chemical mediation of nerve impulses.

Science 90: 521-527, 1939

CANNON W.B., ROSENBLUETH A.

Sympathin-E and Sympathin I.

Am. J. Physiol. 104: 557-574, 1933

CANNON W.B., URIDIL J.E.

Studies on the conditions of activity in endocrine glands. VIII.

Some effects on the denervated heart of stimulating the nerves of the liver.

Am. J. Physiol. 58: 353-354, 1921

CELUCH S.M., LANGER S.Z.

Relationship between the frequency of nerve stimulation and the effects of isoprenaline in the release of <sup>3</sup>H-noradrenaline from the cat thoracic aorta.

Acta Physiol. Latinoam. 1975 (en prensa).

CHANG C.C., CHIUEH C.C.

Modulation of noradrenaline incorporation by nerve activities in the rat submaxillary gland.

J. Physiol. (Lond) 203: 145-157, 1969

CHANH P.M., JUNSTAD M, WENNMALM A.

Augmented noradrenaline release following nerve stimulation after inhibition of prostaglandin synthesis with indomethacin.

Acta physiol. scand. 86: 563-567, 1972

CHIDSEY C.A., KAISER G.A., BRAUNWALD E.

Biosynthesis of norepinephrine in isolated canine heart.

Science, N.Y. 139: 828-829, 1963

COLBURN R.W., GOODWIN F.K., MURPHY D.L., BUNNEY W.E., Jr., DAVIS J.M.  
Quantitative studies of norepinephrine uptake by synaptosomes.  
Biochem. Pharmacol. 17: 957-964, 1968

CRAWFORD T.B.

Derivatives of adrenaline and noradrenaline in an extract of an  
adrenal medullary tumor.  
Biochem. J. 48: 203-208, 1951

CROUT J.R.

Standard Methods of Clinical Chemistry.  
Ed: Selizson D., Chap. 3 pp. 62-80, 1961. New York Academic Press.

CUBEDDU L.X., BARNES E.N., LANGER S.Z., WEINER N.

Release of norepinephrine and dopamine-beta-hydroxylase by nerve  
stimulation. I. Role of neuronal and extraneuronal uptake and of  
alpha-presynaptic receptors.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 190: 431-450, 1974

CUBEDDU L.X., BARNES E.N., WEINER N.

Release of norepinephrine and dopamine hydroxylase by nerve stimulation.  
II. Effects of papaverine.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 191: 444-457, 1974.

CUBEDDU L.X., BARNES E.N., WEINER N.

Release of norepinephrine and dopamine hydroxylase by nerve stimulation.  
IV. An evaluation of a role for cyclic adenosine monophosphate.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 193: 105-127, 1975.

CUBEDDU L.X., LANGER S.Z., WEINER N.

Relationship between alpha-receptor block, inhibition of neuronal uptake and release and metabolism of  $^3\text{H}$ -norepinephrine in the cat spleen.

J. Pharmacol. exp. Ther. 188: 368-385, 1974

CUBEDDU L.X., WEINER N.

Nerve stimulation mediated overflow of norepinephrine and dopamine  $\beta$ -hydroxylase. III. Effects of norepinephrine depletion on the alpha presynaptic regulation of release.

J. Pharmacol. exp. Ther. 192: 1-14, 1975a

CUBEDDU L.X., WEINER N.

Release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase by nerve stimulation. V. The effect of a benzoquinolizine derivative with reserpine-like properties.

J. Pharmacol. exp. Ther. 193: 757-774, 1975b

"  
DAHLOF C., ABLAD B., BORG K.O., EK L., WALDECK B.

Prejunctional inhibition of adrenergic nervous vasomotor control due to beta receptor blockade

Proceedings of the Symposium on "Chemical tools in catecholamine research" Gothenburg, 1975 (en prensa).

DALE H.H.

The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine.

J. Pharmacol. exp. Ther. 6: 147-190, 1914

DAVIES B.N., GAMBLE J., WITHRINGTON P.G.

Frequency dependent differences in the responses of the capsular and vascular smooth muscle of the spleen of the dog to sympathetic nerve stimulation.

J. Physiol. (Lond) 228: 13-25, 1973

DAVIES B.N., HORTON E.W., WITHRINGTON P.G.

The occurrence of prostaglandin  $E_2$  in splenic venous blood of the dog following splenic nerve stimulation.

Br. J. Pharmacol. 32: 127-135, 1968

DEMIS D.J., BLASCHKO H., WELCH A.D.

The conversion of dihydroxyphenylalanine-2- $C^{14}$  (DOPA) to norepinephrine by bovine adrenal medullary homogenates.

J. Pharmacol. exp. Ther. 113: 14-15, 1955

DENGLER H.J., MICHAELSON I.A., SPIEGEL H.E., TITUS E.O.

The uptake of labelled norepinephrine in isolated brain and other tissues of the cat.

Int. J. Neuropharmacol. 1: 23-38, 1962.

DE POTTER W.P., CHUBB I.W., DE SCHIAEPDRYVER A.F.

Pharmacological aspects of peripheral noradrenergic transmission.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 196: 258-287, 1972.

DE POTTER W.P., CHUBB I.W., PUT A., DE SCHIAEPDRYVER A.F.

Facilitation of the release of noradrenaline and dopamine- $\beta$ -hydroxylase at low stimulation frequencies by  $\alpha$ -blocking agents.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 193: 191-197, 1971.

DINER O.

L'expulsion des granules de la médullo-surrénale chez le hamster.

C. Sea. Acad. Sci. Paris Série D 265: 616-619, 1967.

DIXON W.E.

On the mode of action of drugs.

Med. Mag. London., 16: 454-457, 1907.

DIXON W.E., HAMILL P.

The mode of action of specific substances with special reference to secretin.

J. Physiol. (Lond). 38: 314-336, 1909.

DOUGLAS W.W.

Stimulus-secretion coupling. The concept and clues from chromaffin and other cells.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 34: 451-474, 1968

DOUGLAS W.W., RUBIN R.P.

The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling.

J. Physiol. (Lond) 167: 288-310, 1963

DRASKOCZY P.R., TRENDELENBURG Ü.

Intraneuronal and extraneuronal accumulation of sympathomimetic amines in the isolated nictitating membrane of the cat.

J. Pharmacol. exp. Ther. 174: 290-306, 1970

DUBOIS-REYMOND E.

Untersuchungen über thierische elektricität  
p. 368, 1860. G. Reimer, Berlin

ECCLES J.C.

The physiology of sinapses  
Springer-Verlag, Berlin, 1964

EISENFELD A.J., AXELROD J., KRAKOFF L.

Inhibition of the extraneuronal accumulation and metabolism of norepinephrine by adrenergic blocking agents.

J. Pharmacol. exp. Ther. 156: 107-113, 1967

ELIASSON R., EULER U.S. von., STJÄRNE L.

Studies on the release of the adrenergic neurotransmitter from the perfused ox spleen.

Acta physiol. scand. 33: Sup. 118: 63-69, 1955

ELLIOT T.R.

The action of adrenaline

J. Physiol. (Lond). 32: 401-467, 1905

ENERO M.A., LANGER S.Z.

Influence of reserpine-induced depletion of noradrenaline on the negative feed-back mechanism for transmitter release during nerve stimulation.

Br. J. Pharmacol. 49: 214-225, 1973

ENERO M.A., LANGER S.Z.

Relación entre el efecto granular de drogas y la facilitación de la liberación del neurotransmisor adrenérgico por estimulación nerviosa en la membrana nictitante de gato.

Medicina 34: 617-618, 1974

ENERO M.A., LANGER S.Z.

Inhibition by dopamine of <sup>3</sup>H-noradrenaline release elicited by nerve stimulation in the isolated cat's nictitating membrane.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 289: 179-203, 1975

ENERO M.A., LANGER S.Z., ROTHLIN R.P., STEFANO F.J.E.

Role of the alpha-adrenoceptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation.

Br. J. Pharmacol. 44: 672-688, 1972

EULER U.S. von.

The presence of a substance with sympathin-E properties in spleen extracts.

Acta physiol. scand. 11: 168-186, 1946 a



EULER U.S. von.

The presence of a sympathomimetic substance in extracts of mammalian heart.

J. Physiol. (Lond) 105: 38-44, 1946 b

EULER U.S. von.

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 U.S. von.

Identification of the sympathomimetic ergone in adrenergic nerves of cattle (sympathin-N) with laevo-noradrenaline.

Acta physiol. scand. 16: 63-74, 1948

EULER U.S. von.

Noradrenaline (arterenol), adrenal medullary hormone and chemical transmitter of adrenergic nerves.

Ergebn. Physiol. 46: 261-307, 1950

EULER U.S. von.

The nature of adrenergic nerve mediators.

Pharmac. Rev. 3: 247-277, 1951

EULER U.S. von.

Noradrenaline.

Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1956

EULER U.S. von.

Autonomic neuroeffector transmission.

In Handbook of Physiology, vol. 1, Section 1, Neurophysiology p.215, 1959. Washington, D.C.: American Physiology Society.

EULER U.S. von., LISHAJKO F.

Dopamine in mammalian lung and spleen.

Acta physiol. pharmac. nēerl. 6: 295-303, 1957

FALCK B.

Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method.

Acta physiol. scand. Sup. 56: 197, 1962

FARAH M.B., LANGER S.Z.

Protection by phentolamine against the effects of phenoxybenzamine on transmitter release elicited by nerve stimulation in the perfused cat heart.

Br. J. Pharmacol. 52: 549-557, 1974

FARNEBO L.-O., HAMBERGER B.

Drug induced changes in the release of <sup>3</sup>H-noradrenaline from field stimulated rat iris.

Br. J. Pharmacol. 43: 97-106, 1971

FARNEBO L.-O., MALMFORS T.

<sup>3</sup>H-noradrenaline release and mechanical response in the field stimulated mouse vas deferens.

Acta physiol. scand. 371: 1-18, 1971

FELDERG W., KRAYER O.

Das Auftreten eines Azetylcholinartigen Stoffes in Herzuenenblut von Warmblütern bei Beizung der Nervi vagi

Ach. exp. Path. Pharmak. 172: 170-193, 1933

FERREIRA S.H., MONCADA S., VANE J.R.

Some effects of inhibition endogenous prostaglandin formation on the responses of the cat spleen.

Br. J. Pharmacol. 47: 48-58, 1973

FINKLEMAN B.

On the nature of inhibition in the intestine.  
J. Physiol. (Lond) 70: 145-157, 1930

FREDHOLM B., HEDQVIST P.

Increased release of noradrenaline from stimulated guinea pig vas deferens after indomethacin treatment.  
Acta physiol. scand. 87: 570-572, 1973

GADDUM J.H., KWIATKOWSKI H.

Properties of the substance liberated by adrenergic nerves in the rabbit ear.  
J. Physiol. (Lond). 96: 385-391, 1939.

GASKELL W.H.

The involuntary nervous system: Londres, 1916.

GEFFEN L.B.

The effect of desmethylimipramine upon the overflow of sympathetic transmitter from the cat's spleen.  
J. Physiol. (Lond) 181: 69-70, 1965

GEFFEN L.B., LIVETT B.G., RUSH R.A.

Immunochemical localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons, and their release by nerve impulses.  
J. Physiol. (Lond) 204: 58-59, 1969

GEWIRTZ G.P., KOPIN I.J.

Release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase with norepinephrine during cat splenic nerve stimulation.  
Nature (Lond) 227: 406-407, 1970

GILMORE N., VANE J.R., WYLLIE J.H.

Prostaglandin release by the spleen.  
Nature 218: 1135-1140, 1968

GILLESPIE J.S., HAMILTON D.N.H., HOSIE R.J.A.

The extraneuronal uptake and localization of noradrenaline in the cat spleen and the effects on this of some drugs, of cold and of denervation.

J. Physiol. (Lond) 206: 563-590, 1970

GILLESPIE J.S., KIRPEKAR S.M.

Uptake and release of H<sup>3</sup>-noradrenaline by the splenic nerves.

J. Physiol. (Lond) 178: 44-45P., 1965

GILLESPIE J.S., KIRPEKAR S.M.

The uptake and release of radioactive noradrenaline by the splenic nerves of cats.

J. Physiol. (Lond) 187: 51-58, 1966

GILLIS C.N.

Increased retention of exogenous norepinephrine by cat atria after electrical stimulation of the cardioaccelerator nerves.

Biochem. Pharmacol. 12: 593-595, 1963

GILLIS C.N., PATON D.M.

Cation dependence of sympathetic transmitter retention by slices of rat ventricles.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 29: 309-318, 1967

GOLDSTEIN M., FRIEDHOFF A.J., SIMMONS C.

A method for the separation and estimation of catechol amines in urine.

Experientia 15: 80-81, 1959

GOODALL Mc C., KIRSHNER N.

Biosynthesis of epinephrine and norepinephrine by sympathetic nerves and ganglia.

Circulation 17: 366-371, 1958

GRAEFE K.H., STEFANO F.J.E., LANGER S.Z.

Preferential metabolism of (-)-<sup>3</sup>H-norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens.

Biochem. Pharmacol. 22: 1147-1160, 1973

GRAEFE K.H., TRENDELENBURG U.

The effect of hydrocortisone on the sensitivity of the isolated nictitating membrane to catecholamines: relationship to extraneuronal uptake and metabolism

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286: 1-48, 1974

GREER C.M., PINKSTON J.O., BAXTER J.H., BRANNON E.S.

Norepinephrine ( $\beta$ -(3,4-dihydroxyphenyl)- $\beta$ -hydroxyethylamine) as a possible mediator in the sympathetic division in the autonomic nervous system.

J. Pharmacol. exp. Ther. 62: 189-227, 1938

GRANATA A.R., STEFANO F.J.E., LANGER S.Z.

Slopes of dose-response curves to norepinephrine in isolated strips of the cat's spleen.

Eur. J. Pharmacol. 29: 328-338, 1974

HAEFELY W., HURLIMANN A., THOENEN H.

Relation between the rate of stimulation and the quantity of noradrenaline liberated from sympathetic nerve endings in the isolated perfused spleen of the cat.

J. Physiol. (Lond). 181: 48-58, 1965

HAGEN P.

Biosynthesis of norepinephrine from 3,4-dihydroxyphenylethylamine. (dopamine).

J. Pharmacol. exp. Ther. 116: 26-27, 1956

"  
HÄGGENDAL J., JOHANSSON B., JONASON J., LJUNG B.

Effects of phenoxybenzamine on transmitter release and effector response in the isolated portal vein.

J. Pharmac. Pharmac . 24: 161-164, 1972

"  
HÄGGENDAL J., MALMFORS T.

The effect of nerve stimulation on the uptake of noradrenaline into the adrenergic nerve terminals.

Acta physiol. scand. 75: 28-32, 1969

HEDQVIST P.

Studies on the effect of prostaglandins  $E_1$  and  $E_2$  on the sympathetic neuromuscular transmission in some animal tissues.

Acta physiol. scand. Sup. 345: 1-40, 1970 a

HEDQVIST P.

Control by prostaglandin  $E_2$  of sympathetic neurotransmission in the spleen.

Life Sci. 9: 269-278, 1970 b

HEDQVIST P.

Antagonism by calcium of the inhibitory action of prostaglandin  $E_2$  on sympathetic neurotransmission in the cat spleen.

Acta physiol. scand 80: 269-275, 1970 c

HEDQVIST P.

Prostaglandin-induced inhibition of vascular tone and reactivity in the cat's hindleg in vivo.

Eur. J.Pharmacol. 17: 157-162, 1972

HEDQVIST P.

Aspects on prostaglandin and  $\alpha$ -receptor mediated control of transmitter release from adrenergic nerves.

Frontiers in Catecholamine Research. Usdin E & Snyder S., eds. pp. 583-587, 1973 Pergamon Press.

HEDQVIST P.

Restriction of transmitter release from adrenergic nerves mediated by prostaglandins and  $\alpha$ -adrenoceptors.

Pol. J. Pharmacol. Pharm. 26: 119-125, 1974

HEDQVIST P., BRUNDIN J.

Inhibition by prostaglandin  $E_1$  of noradrenaline release and of effector response to nerve stimulation in the cat spleen.

Life Sci. 8: 389-395, 1969

HEDQVIST P., STJARNE L.

The relative role of recapture and of "de novo" synthesis for the maintenance of neurotransmitter homeostasis in noradrenergic nerves.

Acta physiol. scand. 76: 270-283, 1969

HEDQVIST P., STJARNE L., WENNMALM A.

Inhibition by prostaglandin  $E_2$  of sympathetic neurotransmission in the rabbit heart.

Acta physiol. scand. 79: 139-141, 1970

HEDQVIST P., STJARNE L., WENNMALM A.

Facilitation of sympathetic neurotransmission in the cat spleen after inhibition of prostaglandin synthesis.

Acta physiol. scand. 83: 430-432, 1971

HERTTING G.

Effects of drugs and sympathetic denervation on noradrenaline uptake and binding in animal tissues. Pharmacol. of Cholinergic and Adrenergic Transmission.

Proc. Soc. Intern. Pharmacol. Meeting, 1963. Pergamon Press 3: 277-289, 1965

HERTTING G., AXELROD J.

Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve endings.  
Nature, Lond. 192: 172-173, 1961

HOLTZ P., CREDNER K., KRONEBERG G.

Über das sympathicomimetische pressorische Prinzip des Harns  
("Urosympathin").  
Arch. exp. Path. Pharmak. 204: 228-243, 1947

HOLTZ P., HEISE R., LUDTKE K.

Quantitativer Abbau von L-dioxyphenylalanin (Dopa) durch Niere.  
Archs. exp. Path. Pharmak. 191: 87-118, 1938

HOLZ R.W., COYLE J.T.

The effects of various salts, temperature and the alkaloids veratri-  
dine and batrachotoxin on the uptake of (<sup>3</sup>H) dopamine into synap-  
tosomes from rat striatum.  
Mol. Pharmacol. 10: 746-758, 1974

HOSZOWSKA A., PANCZENKO B.

Effects of inhibition of prostaglandin biosynthesis on noradrenaline  
release from isolated perfused spleen of the cat.  
Pol. J. Pharmacol. Pharm. 26: 137-147, 1974

HUKOVIĆ S., MUSCHOLL E.

Die Noradrenaline-abgabe aus dem isolierten Kaninchenherzen bei sympa-  
thischer nervereizung und ihre pharmakologische Beeinflussung  
Naunyn-Schmidebergs Arch. exp. path. Pharmak. 244: 81-96, 1962

HUGHES J.

Evaluation of mechanisms controlling the release and inactivation of  
the adrenergic transmitter in the rabbit portal vein and vas deferens  
Br. J. Pharmacol. 44: 472-491, 1972



ILLÉS P., HADHÁZY P., TORMA Z., VIZI E.S., KNOLL J.

The effect of number of stimuli and rate of stimulation on the inhibition by PGE<sub>1</sub> of adrenergic transmission  
Eur. J. Pharmacol. 24: 29-36, 1973

IVERSEN L.L.

The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart.  
Br. J. Pharmacol. Chemother. 21: 523-537, 1963

IVERSEN L.L.

The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: A novel catecholamine uptake process.  
Br. J. Pharmacol. Chemother. 25: 18-33, 1965

IVERSEN L.L.

The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves.  
Cambridge University Press (London and Cambridge), 1967.

IVERSEN L.L., KRAVITZ E.A.

Sodium dependence of transmitter uptake at adrenergic nerve terminals.  
Mol Pharmacol. 2: 360-362, 1966

IVERSEN L.L., LANGER S.Z.

Effects of phenoxybenzamine on the uptake and metabolism of noradrenaline in the rat heart and vas deferens.  
Br. J. Pharmacol. 37: 627-637, 1969

JARROTT B.

Occurrence and properties of monoamine oxidase in adrenergic neurons.  
J. Neurochem. 18: 7-16, 1971 a

JARROTT B.

Occurrence and properties of catechol-O-methyl transferase in adrenergic neurons.

J. Neurochem. 18: 17-27, 1971 b

JARROTT B., LANGER S.Z.

Changes in monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activities after denervation of the nictitating membrane of the cat.

J. Physiol. (Lond) 212: 549-559, 1971

JUNSTAD M., WENNMALM A.

Prostaglandin mediated inhibition of noradrenaline release at different nerve impulse frequencies.

Acta physiol. scand. 89: 544-549, 1973 a

JUNSTAD M., WENNMALM A.

On the release of prostaglandin E<sub>2</sub> from the rabbit heart following infusion of noradrenaline.

Acta physiol. scand. 87: 573-574, 1973 b

KATZ B.

The transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action.

Proc. R. Soc. B 155: 455-477, 1962

KIRPEKAR S.M., CERVONI P.

Effect of cocaine, phenoxybenzamine and phentolamine on the catecholamine output from spleen and adrenal medulla.

J. Pharmacol. exp. Ther. 142: 59-70, 1963

KIRPEKAR J.M., FURCHGOTT R.F., WAKADE A.R., PRAT J.C.

Inhibition by sympathomimetic amines of the release of norepinephrine evoked by nerve stimulation in the cat spleen.

J. Pharmacol. exp. Ther. 187: 529-538, 1973

KIRPEKAR S.M., MISU Y.

Release of noradrenaline by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium.

J. Physiol. (Lond). 188: 219-234, 1967

KIRPEKAR J.M., PUIG M.

Effect of flow stop on noradrenaline 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 noradrenaline uptake by the perfused spleen of the cat.

J. Physiol. (Lond). 194: 609-626, 1968

KIRSHNER N.

Biosynthesis of adrenaline and noradrenaline.

Pharmac. Rev. 11: 350-360, 1959

KIRSHNER N., GOODALL McC.

Biosynthesis of adrenaline and noradrenaline by adrenal slices.

Fed. Proc. 15: 110-111, 1956

KIRSHNER N., SAGE H.J., SMITH W.J.

Mechanism of secretion from the adrenal medulla. II. Release of catecholamines and storage vesicle protein in response to chemical stimulation.

Mol. Pharmacol. 3: 254-265, 1967

KIRSHNER N., SAGE H.J., SMITH W.J., KIRSHNER A.G.

Release of catecholamines and specific protein from adrenal gland.

Science (Washington) 154: 529-531, 1966

KOPIN I.J.

Storage and metabolism of catecholamines: the role of monoamine oxidase.

Pharmacol. Rev. 16: 179-191, 1964

LANGER S.Z.

The metabolism of <sup>3</sup>H-noradrenaline released by electrical stimulation from the isolated nictitating membrane of the cat and from the vas deferens of the rat.

J. Physiol. (Lond) 208: 515-546, 1970

LANGER S.Z

The regulation of transmitter release elicited by nerve stimulation through a presynaptic feed-back mechanism.

Frontiers in Catecholamine Research. E. Usdin & S. Snyder eds. Pergamon Press, pp. 543-549, 1973

LANGER S.Z.

Selective metabolic pathways for noradrenaline in the peripheral and in the central nervous system.

Med. Biol. 52: 372-383, 1974 a

LANGER S.Z.

Presynaptic regulation of norepinephrine release elicited by nerve stimulation.

Biochem. Pharmac. 23: 1793-1800, 1974 b

LANGER S.Z., ADLER-GRASCHINSKY E., ALMEIDA A.P., DINIZ C.R.

Prejunctional effects of a purified toxin from the scorpion Tityus serrulatus. Release of <sup>3</sup>H-norepinephrine and enhancement of transmitter overflow elicited by nerve stimulation.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287: 243-259, 1975

LANGER S.Z., ADLER-GRASCHINSKY E., ENERO M.A.

Positive feed-back mechanism for the regulation of noradrenaline released by nerve stimulation.

Abstract to Jerusalem Satellite Symposia. XXVI International Congress of Physiological Sciences, p. 31, 1974

LANGER S.Z., ADLER E., ENERO M.A., STEFANO F.J.E.

The role of the alpha receptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation.

XXVth. Int. Congr. Physiol. Sciences. p. 335, 1971, Munich.

LANGER S.Z., ENERO M.A.

The potentiation of responses to adrenergic nerve stimulation in the presence of cocaine: its relationship to the metabolic fate of released norepinephrine.

J. Pharmacol. exp. Ther. 191: 431-443, 1974

LANGER S.Z., ENERO M.A., ADLER-GRASCHINSKY E., STEFANO F.J.E.

The role of the alpha receptor in the regulation of transmitter overflow elicited by nerve stimulation.

Vth. Int. Congr. Pharmacology. p. 134, 1972, San Francisco U.S.A.

LANGER S.Z., ENERO M.A., STEFANO F.J.E., ROTHLIN R.P.

Acciones de la fenoxibenzamina sobre la liberación de noradrenalina por estimulación nerviosa en la membrana nictitante aislada de gato. Medicina 30: 557-558, 1970

LANGER S.Z., STEFANO F.J.E., ENERO M.A.

Pre- and postsynaptic origin of the norepinephrine metabolites formed during transmitter release elicited by nerve stimulation.

J. Pharmacol. exp. Ther. 183: 90-102, 1972

LANGER S.Z., TRENDELENBURG U.

Decrease in effectiveness of phenoxybenzamine after chronic denervation and chronic decentralization of the nictitating membrane of the pithed cat.

J. Pharmacol. exp. Ther. 163: 290-299, 1968

LANGER S.Z., VOGT M.

Noradrenaline release from isolated muscles of the nictitating membrane of the cat.

J. Physiol. (Lond) 214: 159-171, 1971

LANGLEY J.N.

The autonomic nervous system.

Heffer. Cambridge, England, 1921

LANGLEY J.N.

Observations on the physiological action of extracts of the suprarenal bodies.

J. Physiol. (Lond) 27: 237-256, 1901

LANGLEY J.N., DICKSON W.L.

On the local paralysis of peripheral ganglia and on the connection of different classes of nerve fibers with them.

Proc. Roy. Soc. (London) 46: 423-431, 1889

LAVERTY R., TAYLOR K.M.

The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: Improvement and extensions to the hydroxyindole technique.

Analyt. Biochem. 22: 269-279, 1968

LEVIN J.A.

Metabolism of  $^3\text{H}$ -norepinephrine by the adventitia and media of rabbit aorta.

In Abstracts of the Fifth International Congress on Pharmacology. San Francisco, Calif. p. 139, 1972

LIGHTMAN S.L., IVERSEN L.L.

The role of uptake<sub>2</sub> in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart.

Br. J. Pharmacol. 37: 638-649, 1969

LOEWI O.

Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 189: 239-242, 1921

LOEWI O.

Quantitative und qualitative Untersuchungen über den Sympathicustoff.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 237: 504-514, 1936

LOEWI O., NAVRATIL E.

Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mitteilung über das Schicksal des Vagusstoffs.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 214: 678-688, 1926

LOFFELHOLZ K., MUSCHOLL E.

A muscarinic inhibition of the noradrenaline release evoked by postganglionic sympathetic nerve stimulation.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 265: 1-15, 1969

LONG J.P., HEINTZ S., CANNON J.G., KIM J.

Inhibition of the sympathetic nervous system by 5-,6-dihydroxy-2-dimethylamino tetralin (M-7), apomorphine and dopamine.

J. Pharmacol. exp. Ther. 192: 336-342, 1975

LORENZ R.R., VANHOUTTE P.M.

Inhibition of adrenergic neurotransmission in isolated veins of the dog by potassium ions.

J. Physiol. (Lond). 246: 479-509, 1975

LUCHELLI-FORTIS M.A., LANGER S.Z.

Reserpine-induced depletion of the norepinephrine stores: is it a reliable criterion for the classification of the mechanism of action of sympathomimetic amines?

J. Pharmacol. exp. Ther. 188: 640-653, 1974

LUCHELLI-FORTIS M.A., LANGER S.Z.

Selective inhibition by hydrocortisone of <sup>3</sup>H-normetanephrine formation during <sup>3</sup>H-transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287: 261-275, 1975

MC CULLOCH M.W., RAND M.J., STORY D.F.

Evidence for a dopaminergic mechanism for modulation of adrenergic transmission in the rabbit ear artery.

Br. J. Pharmacol. 49: 141-142P., 1973

MALAMED S., POISNER A.M., TRIFARO J.M., DOUGLAS W.W.

The fate of the chromaffin granule during catecholamine release from the adrenal medulla. III. Recovery of a purified fraction of electron-translucent structures.

Biochem. Pharmacol. 17: 241-246, 1968

MALMFORS T.

Studies on adrenergic nerves. The use of rat and mouse iris for direct observations on their physiology and pharmacology at cellular and subcellular levels.

Acta physiol. scand. 248: 1-93, 1965



MANN M., WEST G.B.

The nature of hepatic and splenic 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

MASUOKA D.T., CLARK W.G., SCHOTT H.F.

Biosynthesis of catecholamines by rat brain tissue in vitro  
Rev. Canad. Biol. 20: 1-6, 1961

MASUOKA D.T., SCHOTT H.F., AKAWIE R.I., CLARK W.G.

Conversion of C<sup>14</sup>-arterenol to epinephrine in vivo.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 93: 5-7, 1956

MASUOKA D.T., SCHOTT H.F., PETRIELLO L.

Formation of catecholamines by various areas of cat brain.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 139: 73-76, 1963

MUSACCHIO J.M., GOLDSTEIN M.

Biosynthesis of norepinephrine and norepinephrine in the perfused  
rabbit heart.  
Biochem. Pharmacol. 12: 1061-1063, 1963

NEEDLEMAN P., DOUGLAS J.R. Jr., JAKSCHIK B., STOECKLEIN P.B., JOHNSON E.M. Jr.

Release of renal prostaglandin by catecholamines: relationship to  
renal endocrine function.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 188: 453-460, 1974

OUTSCHOORN A.S.

The hormones of the adrenal medulla and their release.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 7: 605-615, 1952

OUTSCHOORN A.S., VOGT M.

The nature of cardiac sympathin in the dog.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 7: 319-324, 1952

PALAIC D., PANISSET J.C.

Inhibition of the noradrenaline uptake in guinea-pig vas deferens  
by continuous nerve stimulation.

J. Pharm. Pharmac. 21: 328-329, 1969

PATON D.M., GILLIS G.N.

Effect of altered perfusion rates on the retention of noradrenaline  
by the spleen.

Nature 208: 391-392, 1965

PEART W.S.

The nature of splenic sympathin

J. Physiol. (Lond). 108: 491-501, 1949

PELLERIN J., D'IRIO A.

Metabolism of DL-3,4-dihydroxyphenylalanine- $\alpha$ -C<sup>14</sup> in bovine adrenal  
homogenate.

Canad. J. Biochem. Physiol. 35: 151-156, 1957

PIPER P.J., VANE J.R.

The release of prostaglandin from lung and other tissues.

Ann. New York Acad. Sci., 180: 363-385, 1971

POISNER A.M., TRIFARO J.M., DOUGLAS W.W.

The fate of the chromaffin granule during catecholamine release from the adrenal medulla. II. Loss of protein and retention of lipid in subcellular fractions.

Biochem. Pharmacol. 16: 2101-2108, 1967

POTTER L.T., AXELROD J.

Properties of norepinephrine storage particles of the rat heart.

J. Pharmacol. exp. Ther. 142: 299-305, 1963

POWELL C.E., SLATER I.H.

Blocking and inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analogue of isoproterenol.

J. Pharmacol. exp. Ther. 122: 480-488, 1958

RAND M.J., STORY D.F., ALLEN G.S., GLOVER A.B., MC CULLOCH, M.B.

Pulse-to-pulse modulation of noradrenaline release through a prejunctional  $\alpha$ -receptor auto-inhibitory mechanism.

Frontiers in Catecholamine Research. Usdin F. & Snyder S. eds., pp. 579-581, 1973 Pergamon Press.

ROFFLER-TARLOV S., LANGER S.Z.

The fate of  $^3\text{H}$ -norepinephrine released from isolated atria and vas deferens: effect of field stimulation.

J. Pharmacol. exp. Ther. 179: 186-197, 1971

ROSELL S., KOPIN I.J., AXELROD J.

Fate of  $\text{H}^3$ -norepinephrine in skeletal muscle before and following sympathetic stimulation.

Am. J. Physiol. 205: 317-321, 1963

RUTLEDGE C.O., JONASON J.

Metabolic pathways of dopamine and norepinephrine in rabbit brain  
in vitro.

J. Pharmacol. exp. Ther. 157: 493-502, 1967

RUTLEDGE C.O., WEINER N.

The effect of reserpine upon the synthesis of norepinephrine in  
the isolated rabbit heart.

J. Pharmacol. exp. Ther. 157: 290-302, 1967

RYLAN T P.

La "Transmisión humoral de l'action des nerfs cardiaques"  
de Loewi chez la mammifère

C.R. Séanc. Soc. Biol. 96: 204-205, 1927

SALT P.J.

Inhibition of noradrenaline uptake<sub>2</sub> in the isolated rat heart by  
steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines.

Eur. J. Pharmacol. 20: 329-340, 1972

SALT P.J., IVERSEN L.L.

Inhibition of the extraneuronal uptake of catecholamine in the  
isolated rat heart by cholesterol.

Nature New Biology 238: 91, 1972

SAMUELSON B., WENNMALM A.

Increased nerve stimulation induced release of noradrenaline from  
rabbit heart after inhibition of prostaglandin synthesis.

Acta physiol. scand. 83: 163-168, 1971

"  
SCHMITERLOW C.G.

The nature and occurrence of pressor and depressor substances in  
extracts from blood vessels.

Acta physiol. scand. 16. Suppl. 56, 1948

SCHNEIDER F.H., SMITH A.D., WINKLER H.

Secretion from the adrenal medulla: Biochemical evidence for exocytosis.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 31: 94-104, 1967

SERCK-HANSEN G.

Effects of theophylline and propranolol on acetylcholine-induced release of adrenal medullary catecholamines.

Biochem. Pharmacol. 23: 2225-2234, 1974

SMITH A.D., DE POTTER W.P., MOERMAN E.J., DE SCHAEFDRIYVER A.F.

Release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase and chromogranin A upon stimulation of the splenic nerve.

Tissue Cell 2: 547-568, 1970

SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G.

Statistical Methods.

6th. Edn. Ames, Iowa: The Iowa State University Press, 1967

SNYDER S., FISCHER J., AXELROD J.

Evidence for the presence of monoamine oxidase in sympathetic nerve endings.

Biochem. Pharmacol. 14: 363-365, 1965

SPECTOR S., SJOERDSMA A., ZALTMAN-NIRENBERG P., LEVITT M., UDENFRIEND S.

Norepinephrine synthesis from tyrosine-C<sup>14</sup> in isolated perfused guinea pig hearts.

Science 139: 1299-1301, 1963

STEHLE R.L., ELLSWORTH H.C.

Dihydroxyphenylethanolamine (arterenol) as a possible sympathetic hormone.

J. Pharmacol. exp. Ther. 59: 114-121, 1937

STARKE K.

Influence of  $\alpha$ -receptor stimulants on noradrenaline release.  
Naturwissenschaften 58: 420, 1971

STARKE K.

Alpha sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274: 18-45, 1972a

STARKE K.

Influence of extracellular noradrenaline on the stimulation evoked secretion of noradrenaline from sympathetic nerves: Evidence for an  $\alpha$ -receptor-mediated feed-back inhibition of noradrenaline release.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275: 11-23, 1972 b

STARKE K., BOROWSKI E., ENDO T.

Preferential blockade of presynaptic  $\alpha$ -adrenoceptors by yohimbine.  
Eur. J. Pharmacol. (en prensa).

STARKE K., ENDO T., TAUBE H.D.

Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with  $\alpha$ -adrenoceptor affinity.  
Nature (Lond) 254: 440, 1975

STARKE K., MONTEL H.

Sympathomimetic inhibition of noradrenaline release mediated by prostaglandins?  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278: 111-116, 1973

STARKE K., MONTEL H., GAYK W., MERKER R.

Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery.  $\alpha$ -sympathomimetic inhibition of neurogenic vasoconstriction.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285: 133-150, 1974.

STARKE K., MONTEL H., SCHUMANN H.J.

Influence of cocaine and phenoxybenzamine on noradrenaline uptake and release

Naunyn-Schmiedebergs Arch. int. Pharmak. 270: 210-214, 1971

STARKE K., MONTEL H., WAGNER J.

Effect of phentolamine on noradrenaline uptake and release.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. int. Path. Pharmak. 271: 181-192, 1971

STEFANO F.J.E., PEREC C.J., TUMILASCI O.R.

Changes in neuronal uptake and metabolism of, and sensitivity to, norepinephrine during the degeneration secretion in the rat submaxillary gland.

J. Pharmacol. exp. Ther. 191: 403-417, 1974

"  
STJÄRNE L.

Prostaglandin E restricting noradrenaline secretion neural origin?

Acta physiol. scand. 86: 574-576, 1972

"  
STJÄRNE L.

Prostaglandin-versus  $\alpha$ -adrenoceptor mediated control of sympathetic neurotransmitter secretion in guinea pig isolated vas deferens.

Eur. J. Pharmacol. 22: 233-238, 1973 a

"  
STJÄRNE L.

Dual alpha-adrenoceptor mediated control of secretion of sympathetic neurotransmitter: one mechanism dependent and one independent of prostaglandin E.

Prostaglandins 3, 111-116, 1973b.

"  
STJÄRNE L.

Alpha-adrenoceptor mediated feed-back control of sympathetic neurotransmitter secretion in guinea-pig vas deferens.

Nature New Biol. 241: 190-191, 1973c.

"  
STJÄRNE L.

Kinetics of secretion of sympathetic neurotransmitter as a function of external calcium. Mechanism of inhibitory effect of prostaglandin E.

Acta physiol. scand. 87: 428-430, 1973 d

"  
STJÄRNE L.

Inhibitory effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on noradrenaline secretion from sympathetic nerves as a function of external calcium.

Prostaglandins 3: 105-109, 1973 e

"  
STJÄRNE L.

Michaelis-Menten kinetics of secretion of sympathetic neurotransmitter as a function of external calcium: effect of graded alpha-adrenoceptor blockade.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278: 323-327, 1973 f

"  
STJÄRNE L., BRUNDIN J.

Dual adrenoceptor-mediated control of noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves: Facilitation by  $\beta$ -receptors and inhibition by  $\alpha$ -receptors.

Acta physiol. scand. 94: 139-141, 1975

STOLZ F.

Über Adrenalin und Alkylaminoacetobrenzcatechin.

Ber. disch. chem Ges. 37: 4149-4154, 1904

SU C., BEVAN S.A.

Blockade of the nicotine-induced norepinephrine release by cocaine, phenoxybenzamine and desipramine.

J. Pharmacol. exp. Ther. 175: 533-540, 1970



TABAKOFF B., ANDERSON R., SPYRIDON G.A.A.

Enzymatic reduction of "biogenic" aldehydes in brain.

Mol. Pharmacol. 9: 428-437, 1973

TABAKOFF B., ERWIN V.G.

Purification and characterization of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reduction from brain.

J. Biol. Chem. 245: 3263-3268, 1970

TAYLOR G.S., EINHORN U.F.

The effect of prostaglandins on junction potentials in the mouse vas deferens.

Eur. J. Pharmacol. 20:40-45, 1972

THOENEN H., HURLIMANN A., HAEFELY W.

The effect of postganglionic sympathetic stimulation on the isolated, perfused spleen of the cat. Simultaneous determination of norepinephrine output and changes in volume and vascular resistance.

Helv. physiol. pharmac. Acta 21: 17-26, 1963

THOENEN H., HURLIMANN A., HAEFELY W.

The effect of sympathetic nerve stimulation on volume, vascular resistance and norepinephrine output in the isolated perfused spleen of the cat.

J. Pharmacol. exp. Ther. 143: 57-63, 1964a

THOENEN H., HURLIMANN A., HAEFELY W.

Wirkungen von Phenoxybenzamin, Phentolamin und Azapetin auf adrenergische Synapsen der Katzenmilz.

Helv. physiol. pharmac. Acta 22 : 148-161, 1964 b

TULLAR B.F.

The resolution of dl-arterenol.

J. Am. chem. Soc. 70: 2067-2068, 1948

UDENFRIEND S., WYNGAARDEN J.B.

Precursors of adrenal epinephrine and norepinephrine in vivo

Biochem. Biophys. Acta. 20: 48-52, 1956

VANE J.R.

A sensitive method for assay of 5-hydroxytryptamine.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 12: 344-349, 1957,

VIVEROS O.H., ARQUEROS L., KIRSHNER N.

Release of catecholamines and dopamine- $\beta$ -oxidase from the adrenal medulla.

Life Sci. 7: 609-618, 1968

VIVEROS O.H., ARQUEROS L., KIRSHNER N.

Mechanism of secretion from the adrenal medulla. Retention of storage vesicle membranes following release of adrenaline.

Mol. Pharmacol. 5: 342-349, 1969

VON EULER, U.S., HEDQVIST P.

Inhibitory action of prostaglandins  $E_1$  and  $E_2$  on the neuromuscular transmission in the guinea pig vas deferens.

Acta physiol. scand. 77: 510-512, 1969

WALTMAN S., SEARS M.

Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase activity in the ocular tissue of albino rats.

Invest. Ophthalmol. 3: 601-605, 1964

WAUD D.R.

On the estimation of receptor occlusion by irreversible competitive pharmacological antagonists.

Biochem. Pharmacol. 17: 649-653, 1968

WEINSHILBOUM R.M., THOA N.B., JOHNSON D.G., KOPIN I.J., AXELROD J.

Proportional release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase from sympathetic nerves.

Science (Washington) 174: 1349-1351, 1971

WENNMALM A.

Studies on mechanisms controlling the secretion of neurotransmitters in the rabbit heart.

Acta physiol. scand. Sup. 365: 1-36, 1971

WEST G.B.

Further studies on sympathin.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 5: 165-172, 1950

WHITBY L.G., AXELROD J., WEIL-MALHERBE H.

The fate of H<sup>3</sup>-norepinephrine in animals.

J. Pharmacol. exp. Ther. 132: 193-201, 1961

WOOTEN G.F., THOA N.B., KOPIN I.J., AXELROD J.

Enhanced release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase and norepinephrine from sympathetic nerves by dibutyryl Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and theophylline.

Mol. Pharmacol. 9: 178-183, 1973

YAMAMOTO H., KIRPEKAR S.M.

Effects of nerve stimulation on the uptake of norepinephrine by the perfused spleen of the cat.

Eur. J. Pharmacol. 17: 25-33, 1972

ZIMMERMAN B.G., JI CHIAO LIAO, GISSLEN J.

Effect of phenoxybenzamine and combined administration of iproniazid and tropolone on catecholamine release elicited by renal sympathetic nerve stimulation.

J. Pharmacol. exp. Ther. 176: 603-610, 1971

A: adrenalina  
ADH: aldehido dehidrogenasa  
AMP: adenosin monofosfato  
AR: aldehido reductasa  
Ci: curie  
COMT: catecol O-metil transferasa  
DBH: dopamina beta hidroxilasa  
DOMA: ácido 3,4 dihidroximandélico  
DOPA: 3,4 dihidroxifenilalanina  
DOPAL: aldehido 3,4 dihidroxifenilglicólico  
DOPEG: 3,4 dihidroxifenilglicol  
MAO: monoamino oxidasa  
MOPEG: 3-metoxi 4-hidroxifenilglicol  
NA: noradrenalina  
NAD: nicotinamina adenina dinucleótido  
NADP: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato  
OMDA: metabolitos O-metilados deaminados  
PGE: prostaglandinas de la serie E  
VMA: ácido 3 metoxi, 4 hidroximandélico

INDICE

	Página
OBJETIVOS .....	1
INTRODUCCION	
A - SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO .....	5
B - SINTESIS, ALMACENAMIENTO, LIBERACION POR ESTIMULACION NERVIOSA Y CAPTACION DE LA NORADRENALINA .....	11
C - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA .....	15
D - REGULACION DE LA LIBERACION DE NORADRENALINA POR ESTIMU- LACION NERVIOSA .....	18
E - INHIBICION DE LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN PRESENCIA DE DIFERENTES COMPUESTOS .....	23
METODOS	
A - DISECCION Y PERFUSION DEL BAZO DE GATO .....	25
B - PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y EL TEJIDO .....	26
C - SEPARACION POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LA NORADRENA- LINA Y SUS METABOLITOS .....	28
D - DETERMINACION FLUOROMETRICA DE LA NORADRENALINA .....	30
E - CURVAS DE DOSIS RESPUESTA A LA (-)-NORADRENALINA .....	31
1.- Controles .....	32
2.- En presencia de distintas concentraciones de fenoxi- benzamína .....	32

3.- En presencia de prostaglandinas de la serie E <sub>2</sub> .....	32
F - CURVAS DE FRECUENCIA RESPUESTA .....	33
G - DETECCION DE PROSTAGLANDINAS EN EL EFLUENTE VENOSO DEL BAZO PERFUNDIDO DE GATO .....	33
H - DISEÑOS EXPERIMENTALES, correspondientes a los capítulos:	
I - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEA- MENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUN- DIDO DE GATO .....	34
IA - Metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada es- pontáneamente y retenida en el tejido .....	34
IB - Metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en el bazo perfundido de gato.....	35
IC - Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada por es- timulación nerviosa .....	35
II - MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUN- DIDO DE GATO .....	36
IIA - Mecanismo de retroinformación positiva mediado a través de receptores beta de localización presináp- tica .....	36

IIB - Mecanismos de retroinformación negativa mediado a través de receptores alfa de localización presináptica. Influencia de la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada .....	37
IIC - Diferencia en la potencia bloqueante de la fenoxibenzamina sobre los receptores alfa adrenérgicos pre y postsinápticos .....	38
III - EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA .....	39
I - CALCULOS	
a) Determinación fluorométrica de noradrenalina .....	41
b) Cálculo de la radiactividad presente en cada muestra .....	41
c) Liberación fraccional por shock .....	42
d) Definición de términos usados en el texto .....	43

## CAPITULO I

I - METABOLISMO DE LA NORADRENALINA LIBERADA ESPONTANEAMENTE Y POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO.	
---	--



	Página
INTRODUCCION .....	45
IA - Metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada espontáneamente y retenida en el tejido	
Resultados .....	47
Discusión .....	50
IB - Metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en el bazo perfundido de gato	
Resultados	
1 - Respuestas vasculares y liberación fraccional por shock como una función de la frecuencia de estimulación .....	53
2 - Metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada del bazo perfundido de gato a diferentes frecuencias de estimulación nerviosa .....	54
3 - Secuencia temporal del metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada a diferentes frecuencias de estimulación nerviosa .....	55
4 - Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa .....	58
5 - Efecto de la fentolamina y fenoxibenzamina sobre el metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa .....	59
Discusión .....	87

IC - Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la <sup>3</sup>H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa

Resultados

1 - Efecto de la interrupción de la perfusión sobre el metabolismo de la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa a 5 y 10 Hz en condiciones controles .....	102
2 - Efecto de la cocaína sobre el metabolismo de la <sup>3</sup> H-noradrenalina liberada por estimulación nerviosa durante la interrupción de la perfusión .....	104
Discusión .....	110

CAPITULO II

II - MECANISMOS QUE REGULAN LA LIBERACION DE NORADRENALINA INDUCIDA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO

INTRODUCCION	113
--------------	-----

IIA - Mecanismo de retroinformación positiva mediado a través de receptores beta de localización presináptica

Resultados

1.- Efecto del isoproterenol sobre el <sup>3</sup> H-total liberado por estimulación nerviosa a baja frecuencia .....	116
2.- Efecto del isoproterenol sobre el <sup>3</sup> H-total liberado por estimulación nerviosa en presencia de propranolol .....	116
Discusión .....	120

IIB - Mecanismo de retroinformación negativa mediado a través de receptores alfa de localización presináptica. Influencia de la frecuencia de estimulación nerviosa aplicada.

Resultados

1.- Inhibición por noradrenalina exógena del neurotransmisor liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias .....	124
2.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre la liberación del neurotransmisor inducida por estimulación nerviosa.....	124
3.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre el <sup>3</sup> H-total liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en presencia de 0.26 mM de calcio .....	125
4.- Inhibición por noradrenalina exógena del <sup>3</sup> H-total liberado por estimulación nerviosa a distintas frecuencias en presencia de 0.26 mM de calcio .....	126
Discusión .....	137

IIC - Diferencia en la potencia bloqueante de la fenoxibenzamina sobre los receptores alfa adrenérgicos pre y postsinápticos.

Resultados

	Página
1.- Efecto de la fenoxibenzamina sobre las respuestas a la noradrenalina exógena .....	145
2.- Efecto de bajas concentraciones de fenoxibenzamina sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa .....	145
3.- Efecto de la fenoxibenzamina ( $2.9 \times 10^{-8}M$ y $2.9 \times 10^{-7}M$ ) sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa .....	146
Discusión .....	153

### CAPITULO III

III - EVIDENCIA EN CONTRA DE UN PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REGULACION DE LA NORADRENALINA LIBERADA POR ESTIMULACION NERVIOSA EN EL BAZO PERFUNDIDO DE GATO .	
INTRODUCCION .....	157
Resultados	
IIIA - 1.- Efecto de cambios en la concentración externa de calcio sobre las respuestas y sobre la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa .....	159
2.- Efecto de la prostaglandina $E_2$ sobre las respuestas y la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión .....	159

3.- Efecto de la indometacina sobre la liberación de prostaglandinas inducida por estimulación nerviosa o por noradrenalina exógena en el bazo perfundido de gato .....	161
4.- Efecto de la indometacina sobre las respuestas y sobre la noradrenalina liberada por estimulación nerviosa, en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el medio de perfusión .....	162
5.- Efecto de diferentes concentraciones de indometacina sobre las respuestas, <sup>3</sup> H-total y noradrenalina endógena liberada por estimulación nerviosa .....	163
6.- Cambios en la liberación del transmisor inducido por bloqueo de los receptores alfa presinápticos o por inhibición de la síntesis de prostaglandinas .....	164
Discusión .....	180
RESUMEN .....	186
BIBLIOGRAFIA .....	198
ABREVIATURAS .....	236