

## Tesis de Posgrado

# Estudio sobre la participación de la noradrenalina en la regulación de la transmisión ganglionar

Martínez, Alicia Ester

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:**

Martínez, Alicia Ester. (1980). Estudio sobre la participación de la noradrenalina en la regulación de la transmisión ganglionar. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1660\\_Martinez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1660_Martinez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Martínez, Alicia Ester. "Estudio sobre la participación de la noradrenalina en la regulación de la transmisión ganglionar". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1660\\_Martinez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1660_Martinez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO SOBRE LA PARTICIPACION DE LA NORADRENALINA EN LA REGULACION  
DE LA TRANSMISION GANGLIONAR

ALICIA ESTER MARTINEZ

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dra. Edda Adler-Graschinsky

Lugar de Trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLOGICAS, CONICET

1 9 8 0

1660  
Ej: 2

*A mis padres*

*A mis hermanas*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Edda Adler-Graschinsky por haberme permitido formarme a su lado y por su infinita paciencia para conducir mis pasos durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco José Evaristo Stefano por su gran comprensión y por sus acertados consejos.

A la Sta. María Isabel Mercado por su cuidadosa dactilografía.

A la Sta. Delia Marina Galli por su esmero en la realización de los dibujos.

Al Personal del Instituto que de una u otra manera ha colaborado para que este trabajo sea posible.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas que me permitieron llevar a cabo los trabajos de investigación.

I N D I C E

## 1. INTRODUCCION

1.1.	GENERALIDADES sobre el SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO	
1.1.1.	Anatomía funcional . . . . .	1
1.1.2.	Transmisión neurohumoral . . . . .	3
1.2.	ANTECEDENTES HISTORICOS en NEUROTRANSMISION GANGLIONAR .	11

## 2. METODOS

2.1.	TEJIDO	
2.1.1.	Ubicación anatómica. . . . .	20
2.1.2.	Extracción y disección	21
2.2.	CAPTACION de <sup>3</sup> H-NORADRENALINA	
2.2.1.	Curva control . . . . .	22
2.2.2.	Protocolo experimental . . . . .	22
2.2.3.	Procesamiento del tejido al finalizar el experimento	24
2.2.4.	Expresión de los resultados . . . . .	24
2.3.	LIBERACION de NEUROTRANSMISORES	
2.3.1.	Montaje del tejido en el baño de órgano aislado . . . . .	25
2.3.2.	Marcación de los depósitos endógenos de noradrenalina y de acetilcolina . . . . .	26
2.3.3.	Liberación de <sup>3</sup> H-noradrenalina y/o de <sup>3</sup> H-acetilcolina por estimulación eléctrica preganglionar . . . . .	27
2.3.4.	Liberación de <sup>3</sup> H-noradrenalina por acetilcolina exógena	28
2.3.5.	Procesamiento del tejido al finalizar el experimento	29
2.3.6.	Determinación de la radiactividad de las muestras	29
2.3.7.	Cálculo y expresión de los resultados	
	a) Radiactividad de las muestras y del tejido . . . . .	29
	b) Liberación fraccional por estímulo eléctrico del nervio preganglionar . . . . .	30
	c) Liberación de <sup>3</sup> H-noradrenalina por acetilcolina exógena	31

2.4.	DETERMINACION del CONTENIDO TISULAR de NORADRENALINA	
2.4.1.	Separación cromatográfica de la noradrenalina por adsorción en columnas de alúmina . . . . .	31
2.4.2.	Determinación de la noradrenalina por el método del trihidroxiindol . . . . .	32
2.4.3.	Cálculo y expresión de los resultados .	33
2.5.	DETERMINACION de los <sup>3</sup> H-METABOLITOS de la <sup>3</sup> H-NORADRENALINA	
2.5.1.	Procesamiento de las muestras para la cromatografía	35
2.5.2.	Separación cromatográfica de la <sup>3</sup> H-noradrenalina y de sus <sup>3</sup> H-metabolitos . . . . .	36
2.5.3.	Determinación de la radiactividad de las muestras .	37
2.5.4.	Cálculo y expresión de los resultados .	37
2.6.	CURVA de CONCENTRACION-RESPUESTA a la METOXAMINA	38
2.7.	METODO ESTADISTICO	39
2.8.	DROGAS y SOLUCIONES UTILIZADAS	
2.8.1.	Drogas . .	39
2.8.2.	Solución de Krebs	40
2.8.3.	Solución de tejido . . . . .	40
2.8.4.	Soluciones utilizadas para el método del trihidroxiindol .	40
2.8.5.	Líquido centellador para muestras radiactivas	41
2.8.6.	Otros reactivos	41

### 3. RESULTADOS

3.1.	CAPTACION de <sup>3</sup> H-NORADRENALINA	
3.1.1.	Captación de <sup>3</sup> H-noradrenalina por el ganglio cervical superior aislado del gato: Control y efecto de drogas inhibitoras	43
3.2.	LIBERACION de NEUROTRANSMISORES	
3.2.1.	Liberación de <sup>3</sup> H-noradrenalina por estímulo eléctrico del nervio preganglionar	
	a) Control	45

b)	En ausencia de $\text{Ca}^{++}$ extracelular . . . . .	46
c)	En presencia de agonistas y de antagonistas $\alpha$ -adrenérgicos . . . . .	49
d)	En presencia de inhibidores de la captación de noradrenalina . . . . .	51
e)	En presencia de antagonistas colinérgicos . . . . .	57
3.2.2.	Liberación de $^3\text{H}$ -noradrenalina por acetilcolina exógena .	57
3.2.3.	Liberación de $^3\text{H}$ -acetilcolina por estímulo eléctrico del nervio preganglionar	
a)	Control . . . . .	61
b)	En presencia de noradrenalina exógena .	61
c)	En presencia de antagonistas colinérgicos . . .	64
3.2.4.	Efecto de drogas sobre la liberación espontánea de $^3\text{H}$ -noradrenalina y de $^3\text{H}$ -acetilcolina	
a)	Liberación espontánea de $^3\text{H}$ -noradrenalina .	68
b)	Liberación espontánea de $^3\text{H}$ -acetilcolina	68
3.3	CONTENIDO TISULAR ENDOGENO de NORADRENALINA	
	Control y efecto de drogas . . . . .	68
3.4.	DISTRIBUCION METABOLICA de la $^3\text{H}$ -NORADRENALINA .	74

#### 4. DISCUSION y CONCLUSIONES

4.1.	DISCUSION	
4.1.1.	Captación de noradrenalina tritiada . . . . .	76
4.1.2.	Estructuras ganglionares involucradas en los fenómenos de captación y de liberación de noradrenalina .	76
4.1.3.	Características de la liberación de noradrenalina .	79
4.1.4.	Acción de la acetilcolina sobre la liberación de noradrenalina . . . . .	82
4.1.5.	Papel fisiológico de la noradrenalina	84

**4.1.6. Diferencias entre especies**

**4.2. CONCLUSIONES**

**5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. Generalidades sobre el sistema nervioso autónomo

### 1.1.1. Anatomía funcional

Tal como fuera propuesto por Claude Bernard (1878) y más tarde por Cannon (1929), la constancia del medio interno de un organismo es controlada principalmente por el sistema nervioso vegetativo. Dicho sistema, también llamado autónomo o involuntario, inerva el corazón, las glándulas y el músculo liso de todos los órganos. De esta manera participa en la regulación de la temperatura corporal, la circulación sanguínea, el metabolismo basal, la secreción glandular, la reproducción y coordina además todos estos procesos vitales.

El sistema nervioso autónomo consta de dos partes funcionalmente distintas y generalmente antagónicas: los sistemas simpático y parasimpático. En ambos casos las neuronas terminales se localizan fuera del sistema nervioso central (SNC). La agregación de los cuerpos celulares de estas neuronas constituye los ganglios autónomos. Las neuronas preganglionares tienen sus cuerpos celulares en el SNC y sus axones llegan hasta los ganglios. Las neuronas postganglionares tienen sus cuerpos celulares en los ganglios y sus axones llegan hasta los órganos efectores.

Los dos sistemas autónomos se diferencian entre sí por las tres características siguientes:

- a) El origen de la neurona preganglionar en el SNC.
- b) La ubicación topográfica de los ganglios.
- c) El transmisor químico que actúa sobre los efectores.

En el sistema nervioso simpático los cuerpos celulares de la neuronas preganglionares se encuentran en las regiones torácica y lumbar superior de la médula espinal. Los axones de estas neuronas salen de la médula por las raíces ventrales y llegan hasta los ganglios simpáticos localizados a ambos lados de la médula espinal, en las regiones torácica, lumbar y sacra. Dichos ganglios están relacionados por troncos nerviosos y constituyen las cadenas ganglionares derecha e izquierda. Las neuronas postganglionares envían sus axones desde los ganglios hacia la cabeza, tórax, abdomen y extremidades. Los ganglios del sistema simpático se encuentran relativamente lejos de los órganos que inervan; por lo tanto, los axones simpáticos postganglionares son generalmente muy largos.

En el sistema nervioso parasimpático, los cuerpos de las neuronas preganglionares se encuentran en el tallo cerebral y en la médula sacra. Los axones que parten del tallo cerebral corren por el nervio vago hacia los órganos del tórax y del abdomen y por los nervios craneales hacia la cabeza . Los axones que parten de la médula sacra corren por el nervio pélvico hacia los órganos de la pelvis. Los ganglios parasimpáticos se encuentran, por lo tanto, muy cerca de los órganos que inervan; en consecuencia, los axones de las neuronas postganglionares son muy cortos.

En ambos sistemas, simpático y parasimpático, el neurotransmisor de los axones preganglionares es la acetilcolina (ACh). Sin embargo, se diferencian en el transmisor postganglionar, que es la ACh para el parasimpático y la noradrenalina (NA) para el simpático.

### 1.1.2. Transmisión neurohumoral

En el proceso de transmisión neurohumoral se pueden diferenciar las dos etapas siguientes:

- a) **Conducción:** Pasaje de un impulso a lo largo de un axón o de una fibra muscular.
- b) **Transmisión:** Pasaje de un impulso a través de una sinapsis neuro-neuronal o de una sinapsis neuro-muscular.

La conducción axonal se fundamenta en las propiedades eléctricas de la membrana. En estado de reposo, la célula nerviosa posee un potencial eléctrico que está determinado por una distribución diferencial de cargas a ambos lados de la membrana. El lado interno, donde predomina el ión  $K^+$  en equilibrio con cargas negativas fijas, es negativo con respecto al externo, donde predominan el ión  $Na^+$  y el ión  $Cl^-$ . Esta diferencia de potencial es mantenida por un proceso activo a través de la acción de una ATPasa  $Na^+-K^+$  dependiente.

Cuando se produce un estímulo por encima del nivel umbral, se inicia un potencial de acción que se caracteriza por un cambio rápido del potencial de reposo desde un valor negativo hasta un valor positivo. Esta inversión del potencial de membrana, o despolarización, se debe a un aumento en la permeabilidad de la membrana para el ión  $Na^+$ , que fluye hacia el interior en favor de su gradiente de concentración. Luego se produce la repolarización, como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de la membrana para el ión  $K^+$  que fluye hacia el exterior favorecido por su gradiente de concentración. Finalmente, por acción de una ATPasa  $Na^+-K^+$  dependiente,

se moviliza el ión  $\text{Na}^+$  hacia el exterior y el ión  $\text{K}^+$  hacia el interior del terminal nervioso y se restablecen las condiciones que determinan el potencial de reposo.

Estas corrientes iónicas que se producen en zonas localizadas de la membrana activan zonas adyacentes; en consecuencia, el potencial de acción se propaga hacia el terminal axonal. La despolarización del terminal nervioso provoca la liberación del neurotransmisor. En este momento se inicia la etapa de transmisión nerviosa que incluye los fenómenos siguientes:

- \* La liberación del transmisor.
- \* La combinación del transmisor con el receptor postsináptico.
- \* La inactivación del transmisor.

Uno de los pasos involucrados en la liberación del transmisor es la movilización del ión  $\text{Ca}^{++}$  hacia el interior del terminal nervioso, donde se ha postulado que promueve la fusión de las vesículas sinápticas que almacenan el neurotransmisor con la membrana celular. El contenido vesicular se descarga hacia el espacio sináptico por el proceso llamado exocitosis (Douglas y Rubin, 1961, 1963).

Como resultado de la interacción del neurotransmisor con el receptor postsináptico se genera un potencial postsináptico. Este será excitatorio o inhibitorio según se produzca, respectivamente, despolarización o hiperpolarización de la membrana postsináptica. Consecuentemente con el potencial postsináptico se desarrolla una respuesta postsináptica. De acuerdo con la naturaleza de la estructura postsináptica, dicha respuesta se traduce por una contracción o por una relajación muscular, o en otros casos, por una modificación en la secreción de una glándula o en la liberación de un neurotransmisor.

Las respuestas postsinápticas son mediadas por la activación de receptores específicos para los distintos neurotransmisores. En el sistema nervioso autónomo se han descrito dos tipos de receptores para la acetilcolina: los nicotínicos y los muscarínicos. Este concepto surgió de las observaciones experimentales de Dale (1914) quién refirió que la acetilcolina exógena provoca dos efectos distintos. Por un lado reproduce las respuestas que se obtienen por estimulación de los nervios parasimpáticos y por otro lado es capaz de estimular las células de los ganglios simpáticos. El primer efecto se debe a su acción sobre receptores muscarínicos que es bloqueada por atropina y el segundo se debe a su acción sobre receptores nicotínicos, que es antagonizada por bloqueantes ganglionares tales como el hexametonio. En cambio las acciones de la acetilcolina sobre el receptor nicotínico del músculo estriado son bloqueadas por antagonistas colinérgicos del tipo curare.

Por otra parte, se han descrito dos tipos de receptores para la noradrenalina:  $\alpha$ -adrenérgicos y  $\beta$ -adrenérgicos (Ahlquist, 1948). En general, la activación de los sitios receptores  $\alpha$  provoca la contracción del músculo liso, mientras que la activación de los receptores  $\beta$ , provoca su relajación. La clasificación propuesta por Ahlquist (1948) fue corroborada por el hecho que ciertas drogas, como la fenoxibenzamina, bloquean selectivamente los efectos que se obtienen por activación de los sitios receptores  $\alpha$ ; mientras que otras, como el propranolol, bloquean selectivamente los sitios receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

Los neurotransmisores terminan su acción biológica por diversos mecanismos. La acetilcolina sufre principalmente la acción de la acetilcolinesterasa, que la desdobra rápidamente en colina y acetato (Nachmansohn y

Wilson, 1951 ). La colina es captada en forma activa por el terminal colinérgico y reutilizada para la síntesis de ACh. Sin embargo, la colina circulante es la fuente principal para dicha síntesis, en la que interviene la acetil-coenzima A, de origen mitocondrial, como dadora del grupo acetilo. La acetilcolintransferasa citoplasmática transfiere dicho acetilo a la colina. Después de sintetizada, la acetilcolina es almacenada en las vesículas sinápticas ( MacIntosh, 1963; Hebb, 1972; Wilson y cols., 1973), (Fig. 1).

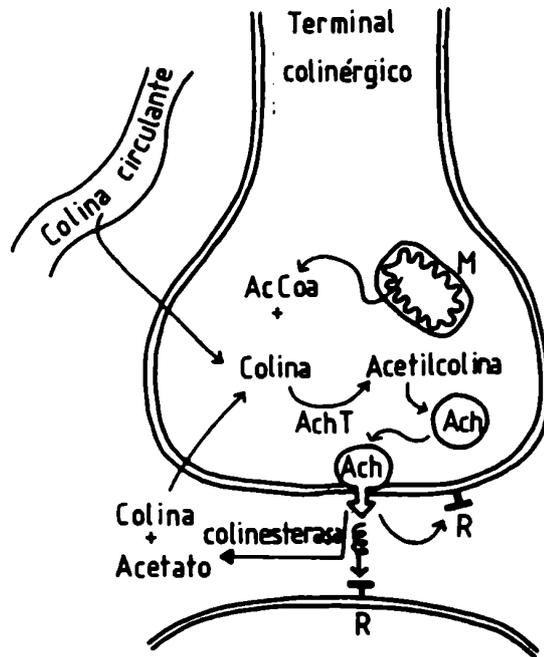
A diferencia de lo que ocurre con la ACh, la NA termina su acción biológica principalmente por acción de mecanismos de captación: el neuronal o presináptico y el extraneuronal o postsináptico, (Koelle, 1959; Iversen y cols., 1966; Tarlov y Langer, 1971). Parte de la NA recaptada por el terminal nervioso adrenérgico es almacenada en vesículas sinápticas (Hedqvist y Stjärne, 1969) y parte es metabolizada principalmente por acción de la monoaminoxidasa (Fig. 2). A nivel del terminal, el principal producto deaminado de la NA es el 3,4-dihidroxifenilglicol (DOPEG), (Adler-Graschinsky y cols., 1972; Graefe y cols., 1973).

La NA recaptada extraneuronalmante también puede ser metabolizada por la monoaminoxidasa, pero conduce principalmente al metabolito ácido deaminado (DOMA). La catecol-O-metil transferasa es, generalmente, la vía metabólica preponderante a nivel extraneuronal (Langer, 1974; Figs. 2 y 3).

Otra diferencia con respecto a la acetilcolina, es que los productos metabólicos de la NA no son utilizados para la síntesis del neurotransmisor. La NA es sintetizada a partir de la fenilalanina (Blaschko, 1939; Gurin y Delluva, 1947) precursor que es transformado en tirosina. Esta última es captada de la circulación sanguínea por las neuronas adrenérgicas, en las que se realiza la síntesis de NA. La primera etapa biosintética ocurre en el

**FIGURA 1**

**Síntesis e inactivación de la acetilcolina**



**Ac-CoA: acetil-coenzima A**

**ACh: acetilcolina**

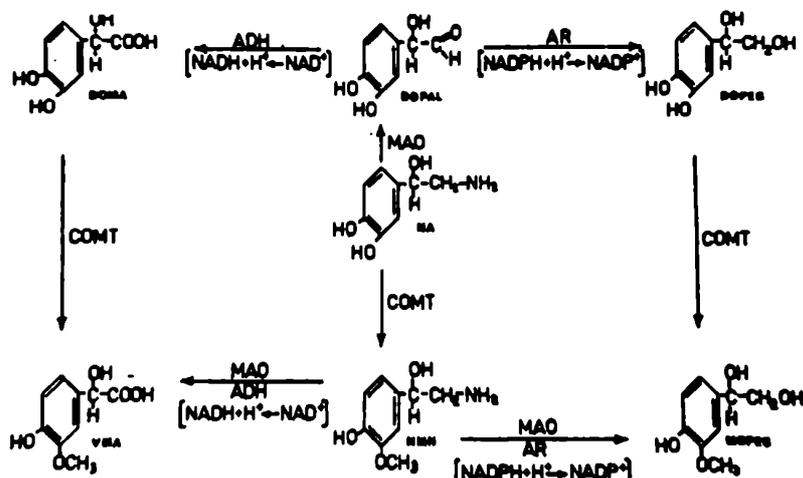
**AChT: acetilcolintransferasa**

**M: mitocondria**

**R: receptor colinérgico**

**FIGURA 2**

**Caminos metabólicos de la noradrenalina**

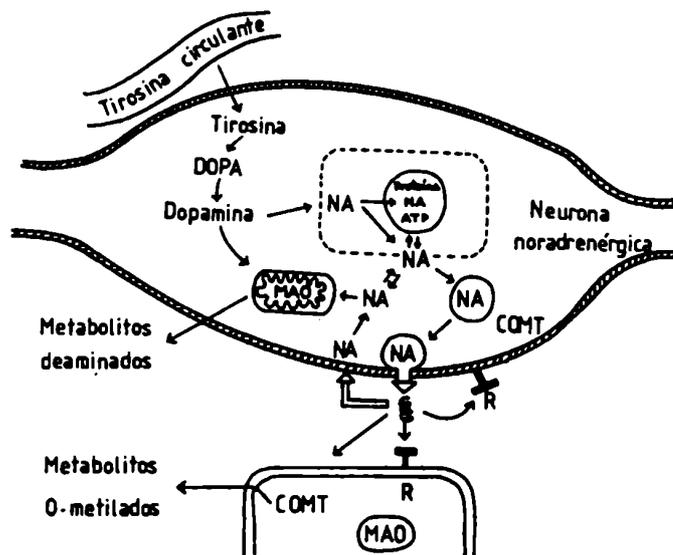


- MAO: monoaminoxidasa  
 COMT: catecol-O-metil transferasa  
 AR: aldehído reductasa  
 ADH: aldehído deshidrogenasa  
 NAD: nicotinamida adenina dinucleótido  
 NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
 NA: noradrenalina  
 DOPEG: 3,4-dihidroxifenilglicol  
 DOMA: ácido 3,4-dihidroximandélico  
 DOPAL: aldehído 3,4-dihidroxifenilglicol  
 NMN: normetanefrina  
 MOPEG: 3-metoxi, 4-hidroxifenilglicol  
 VMA: ácido 3-metoxi, 4-hidroximandélico

MOPEG + VMA = O-metilados desaminados  
 DOPEG y DOMA = metabolitos desaminados  
 NMN = metabolito O-metilado

citoplasma por medio de los siguientes pasos enzimáticos: por acción de la tirosina hidroxilasa es convertida en dihidroxifenilalanina, que luego se transforma en dopamina por acción de una decarboxilasa. La dopamina es captada por el gránulo donde se lleva a cabo la segunda etapa de la síntesis que consiste en la transformación de la dopamina en NA por acción de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa. La NA es finalmente almacenada en los gránulos o vesículas sinápticas (Potter y Axelrod, 1962, 1963; Potter, 1966 ; Iversen, 1967; Fig. 3).

FIGURA 3

Síntesis e inactivación de la noradrenalina

NA: noradrenalina

MAO: monoaminoxidasa

COMT: catecol-O-metil transferasa

R: receptor noradrenérgico

## 1.2. Antecedentes históricos en neurotransmisión ganglionar

Los primeros estudios realizados sobre el sistema nervioso autónomo y en particular sobre los ganglios simpáticos, fueron esencialmente anatómicos y trataron de determinar las distintas vías seguidas por las fibras nerviosas y cuales órganos o tejidos eran inervados por ellas.

Langley (1892, 1895) observó que las fibras preganglionares provenientes de neuronas ubicadas en la región cervical inferior y torácica superior de la médula espinal inervan células nerviosas del ganglio cervical superior en los mamíferos. De acuerdo con Langley cada fibra preganglionar contacta con un grupo determinado de neuronas dentro del ganglio. Estas observaciones fueron verificadas por Nja y Purves (1977) quienes comprobaron que la estimulación *in vivo* de cada raíz ventral que suple al ganglio provoca un patrón distinto de respuestas en los órganos terminales efectores. Por ejemplo: la estimulación de la raíz ventral torácica superior, excita la musculatura de la pupila y del párpado, pero tiene relativamente poco efecto sobre las arterias de la oreja, mientras que la estimulación de las raíces torácicas inferiores casi no tiene efecto sobre el ojo pero causa vasoconstricción en la oreja y piloerección en cara y cuello.

Los experimentos anatómicos fueron sucedidos por experimentos fisiológicos. Querido (1924, 1925) y Brown (1934), midieron respuestas de la membrana nictitante provocadas por la estimulación de los nervios pre y postganglionares. El objetivo de los experimentos de Brown era determinar si las respuestas musculares podían ser utilizadas como una medida de la actividad nerviosa. En particular, sus observaciones sobre la duración muy cor

ta del período refractario del ganglio y sobre la rapidez con que el impulso nervioso pasaba a través del ganglio, le sugirieron la participación de un mediador químico en dicho proceso. Ya en esa época existían evidencias que la acetilcolina estaría involucrada en el pasaje del impulso nervioso a través del ganglio (Feldberg y Gaddum, 1933) y un grupo de investigadores estaba dedicado al estudio de este aspecto de la transmisión ganglionar. Kibjakow (1933) perfundía, con solución de Locke oxigenada, el ganglio cervical superior del gato anestesiado y registraba las contracciones de la membrana nictitante provocadas por estimulación del nervio cervical simpático. Este autor recogía la solución de Locke que fluía del ganglio perfundido y la reinyectaba por la arteria del mismo o de otro ganglio. De esta manera encontró que la reinyección del líquido venoso recolectado durante la estimulación del nervio cervical superior, provocaba una contracción de la membrana nictitante comparable con la obtenida directamente por estímulo del nervio preganglionar. Además, el efluente venoso recolectado de un ganglio no estimulado no causaba dicha acción. Kibjakow consideró a este fenómeno como una evidencia de transmisión química en el ganglio. En relación con esto Chang y Gaddum (1933) sugirieron que la sustancia implicada en dicha transmisión química podría ser la acetilcolina.

La primera evidencia directa sobre la función colinérgica de las fibras simpáticas preganglionares fue obtenida por Feldberg y cols. (1933) en experimentos realizados en médula suprarrenal estimulada a través del nervio esplácnico. Posteriormente Feldberg y Gaddum (1934) encontraron evidencias que les indicaban que las fibras preganglionares que hacen sinapsis en el ganglio simpático eran también colinérgicas.

En un trabajo posterior Feldberg y Vartiainen (1935) presentaron evidencias conclusivas que apoyaban la teoría que el mecanismo por el cual un impulso nervioso pasa a través de una sinapsis involucra la liberación de una pequeña cantidad de acetilcolina.

Los estudios neuroanatómicos clásicos demostraron la presencia de neuronas postganglionares cuyos cuerpos se encontraban en el ganglio cervical superior y la organización del ganglio reconocida clásicamente establecía que las fibras preganglionares colinérgicas formaban sinapsis excitatorias sobre las neuronas postganglionares. El ganglio era considerado una estructura simple en la cual las sinapsis eran puentes entre el sistema nervioso central y los órganos controlados por el sistema nervioso simpático periférico (Da Castro, 1965; Greengard y Kebabian, 1974).

Sin embargo, evidencias posteriores permitieron comprobar que el ganglio era una estructura más compleja. Ya desde fines del siglo pasado se había observado la existencia de tejido cromafínico que formaba parte de la estructura ganglionar de los mamíferos. Kohn (1898) encontró tejido cromafínico en ganglios simpáticos de gatos. Smirnow (1890) ya había observado este tipo de tejido en ganglios simpáticos de anfibios. Posteriormente Ivanov (1932) publicó un trabajo de revisión en el cual hacía mención a sistemas de "células cromafines" presentes en los ganglios simpáticos humanos y se refirió a la posibilidad de una "secreción local de alguna sustancia que podría actuar en las sinapsis simpáticas como su propio tónico o estimulante".

Luego surgieron evidencias experimentales que sugerían que las catecolaminas juegan un papel inhibitorio en los ganglios simpáticos. Las primeras observaciones realizadas por Marrazzi (1939a) y Bülbbring (1944)

indicaban que la adrenalina exógena aplicada en el ganglio cervical superior provocaba depresión de las descargas del nervio carotídeo del ganglio cervical superior.

El advenimiento de las técnicas histológicas de fluorescencia (Falck y cols., 1962) permitió estudiar las distintas estructuras catecolaminérgicas presentes en los ganglios simpáticos. Eränkö y Härkönen (1963), utilizando las técnicas de inducción de fluorescencia de las catecolaminas con formaldehído, demostraron la existencia de catecolaminas en el ganglio cervical superior de la rata. Estos autores describieron dos compartimientos de catecolaminas, uno difuso y otro granular. Además de las células nerviosas, se observaron en el ganglio células más pequeñas que exhibían una fluorescencia extremadamente brillante. Estas células presentaban una reacción cromafínica negativa pero por microscopía electrónica se vio que contenían pequeños gránulos osmiofílicos a semejanza de las células cromafines de la médula adrenal. Se sugirió que representaban un nuevo tipo de células que almacenan catecolaminas y que posiblemente tendrían una función endocrina, (Eränkö y Härkönen, 1965). Fueron llamadas células SIF (small, intensely fluorescent), o células cromafines por su semejanza estructural con las células cromafines de la médula adrenal.

Las células SIF fueron demostradas en distintos ganglios simpáticos de varias especies utilizando las técnicas microscópicas de fluorescencia (Härkönen, 1964; Norberg y Hamberger, 1964; Falck y cols., 1965; Norberg y Sjoqvist, 1966; Csillik y cols., 1967; Jacobowitz, 1967; Hamberger y Norberg, 1963; Hamberger y cols., 1963; Williams y cols., 1975; Chiba y Williams, 1975; Chiba, 1977).

La naturaleza química de la amina que se encuentra en las células SIF fue estudiada extensivamente. Norberg y cols. (1966) analizaron, mediante estudios de fluorescencia histoquímica, las características de los fluoróforos que se detectan en las células SIF de ganglios de rata. Ellos concluyeron que el fluoróforo derivaba de la noradrenalina (NA) o de la dopamina (DA), pero no pudieron distinguir entre ambas alternativas. Subsecuentemente, Björklund y cols. (1970), utilizando una técnica histoquímica que distingue entre los fluoróforos derivados de la NA y de la DA, demostraron la presencia de DA en las células SIF de muchos mamíferos. Concluyeron que las células SIF contienen DA y que la mayor parte de la DA contenida en ganglios simpáticos parece encontrarse en las células SIF. Por el contrario, las neuronas postganglionares contienen principalmente NA (Greengard y Keibian, 1974).

Por estudios realizados recientemente utilizando técnicas de histofluorescencia se sabe que hay dos tipos de células SIF en los ganglios simpáticos. Según la clasificación que hicieron Chiba y Williams (1975), el tipo I corresponde a células solitarias con procesos largos que hacen sinapsis con la neurona postganglionar y el tipo II identifica a las células SIF que se encuentran en racimos en relación con los microvasos sanguíneos que irrigan el ganglio.

Otros autores observaron que las células SIF poseen características ultraestructurales que sugieren que pueden comportarse como interneuronas. Por un lado, son inervadas por fibras preganglionares colinérgicas y por otro lado pueden integrar sinapsis eferentes en las cuales las células SIF serían el elemento presináptico (Matthews, 1971; Matthews y Nash, 1970;

Matthews y Raisman, 1969; Siegrist y cols., 1968; Van Orden III y cols., 1970; Williams y Palay, 1969; Williams, 1967). Estas evidencias sugieren que las células de tipo I, según la clasificación de Chiba y Williams, son las que se comportarían como interneuronas. De acuerdo con la especie considerada existen distintas proporciones de estos dos tipos de células cromafines en el ganglio cervical superior (G.C.S.). Por ejemplo: en el G.C.S. de bovino existen alrededor de 7000 células SIF, de las cuales el 25 % son de tipo I, mientras que en el G.C.S. del gato hay sólo 100 células SIF, de las cuales a lo sumo una es del tipo I. Por el contrario el G.C.S. del conejo también tiene alrededor de 100 células SIF, pero el 80 % son de tipo I (Williams y cols., 1975; Chiba y Williams, 1975). Estos datos sugieren la posibilidad que la interneurona juegue un papel fisiológico en la transmisión ganglionar en el bovino y en el conejo mas que en el gato.

A pesar que en las secciones histológicas del tejido ganglionar es prácticamente imposible diferenciar entre axones y dendritas (Elfvin, 1963), estudios histoquímicos recientes han revelado la presencia de un extenso e intrincado sistema de terminales adrenérgicos que se encuentran próximos a los cuerpos celulares de las neuronas postganglionares y dentro de los fascículos nerviosos (Jacobowitz, 1970). Esta organización estructural tan compleja fue estudiada tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica.

Sobre la base de las evidencias fisiológicas, farmacológicas y anatómicas entonces disponibles, Eccles y Libet (1961) presentaron un esquema hipotético que describía la mediación sináptica de los distintos potenciales determinados en el ganglio. Este esquema fue ligeramente modificado por Libet (1970) y luego por Greengard y Keibian (1974) quienes

incluyeron a la interneurona en una vía inhibitoria, (Fig. 4). De acuerdo con estas evidencias la organización sináptica del ganglio cervical superior sería la siguiente: las fibras preganglionares colinérgicas hacen sinapsis con dos tipos de células dentro del ganglio: la neurona postganglionar noradrenérgica y la interneurona catecolaminérgica. La acetilcolina (ACh) liberada por las fibras preganglionares provocaría: a) la excitación de la neurona postganglionar a través de receptores nicotínicos y muscarínicos, generando respectivamente potenciales excitatorios postsinápticos rápidos (f-EPSP) y lentos (s-EPSP); b) la excitación de la interneurona a través de receptores muscarínicos, causando la liberación de una catecolamina, probablemente dopamina (Libet y Tosaka, 1970; Keabian y cols., 1975), que generaría un potencial inhibitorio postsináptico lento (s-IPSP) por su acción sobre la neurona postganglionar (Greengard y Keabian, 1974).

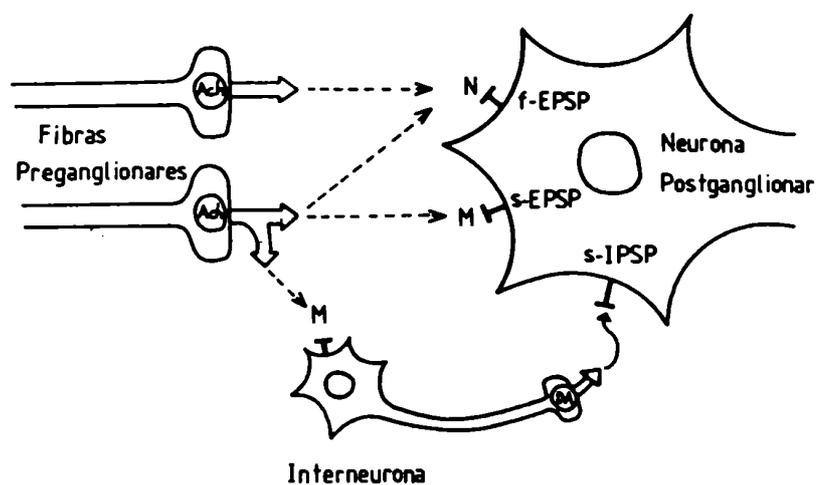
Sin embargo otros resultados experimentales indican que el esquema de Greengard y Keabian (1974) tendría validez para el conejo (Libet y Owan, 1974) mientras que en el cobayo no se pudo detectar dicho potencial inhibitorio (Dun y Karczmar, 1977).

Existen evidencias que la estimulación de los troncos nerviosos preganglionares provoca la liberación de catecolaminas en el efluente del ganglio (Lissak, 1939; Büllbring, 1944; Reinert, 1963). Además las catecolaminas exógenas pueden afectar la transmisión ganglionar (Marrazzi, 1939 b; Trendelenburg, 1961; Volle, 1966; Volle, 1969).

En particular, se ha postulado que el potencial inhibitorio podría ser mediado a través de una acción inhibitoria de las catecolaminas sobre

FIGURA 4Mediación sináptica de los potenciales ganglionares

(Según Libet, 1970; Greengard y Keibian, 1974)



ACh: acetilcolina

DA: dopamina

N: receptor nicotínico

M: receptor muscarínico

f-EPSP: potencial postsináptico excitatorio rápido

s-EPSP: potencial postsináptico excitatorio lento

s-IPSP: potencial postsináptico inhibitorio lento

la liberación de ACh (Christ y Nishi, 1971; Dun y Nishi, 1974). Aunque la participación de las catecolaminas en la transmisión ganglionar en mamíferos es un hecho reconocido, aún no se ha podido determinar cuál es su función en la fisiología del ganglio. Recientemente, Noon y cols., (1975) refirieron que la estimulación preganglionar del ganglio cervical superior de conejo provocaba la liberación de NA y postularon que dicha NA provendría de terminales adrenérgicos. De acuerdo con Noon y cols., dichos terminales estarían situados dentro del ganglio, pero pertenecerían a neuronas adrenérgicas cuyos cuerpos celulares se encontrarían fuera del G.C.S., posiblemente en un lugar anterior al ganglio en la cadena nerviosa simpática.

Dado que se han referido marcadas diferencias entre especies para distintos aspectos de la neurotransmisión ganglionar (Chiba y Williams, 1975) el objetivo de este trabajo de tesis ha sido estudiar, mediante el empleo de drogas cuya acción farmacológica es conocida en otros tejidos, si en el ganglio cervical superior del gato sometido a estimulación preganglionar se verifica el proceso de liberación de catecolaminas descrito por Noon y cols. (1975) para el ganglio cervical superior del conejo.

Los experimentos fueron realizados *in vitro*, en ganglios marcados con noradrenalina tritiada o con colina tritiada de acuerdo con el ensayo a realizar. Se estimuló eléctricamente el nervio preganglionar en condiciones control y en presencia de distintas drogas. Los resultados fueron utilizados para analizar la posible interrelación entre las acciones de acetilcolina y de noradrenalina en la regulación de la transmisión ganglionar.

## 2. METODOS

## 2.1. TEJIDO

Se utilizó como modelo experimental el ganglio cervical superior del gato. Todos los ensayos fueron realizados *in vitro*.

### 2.1.1. Ubicación anatómica

El sistema nervioso simpático, en la región del cuello, comprende los ganglios siguientes: el cervical superior, el cervical medio y el cervical inferior. El ganglio cervical inferior se encuentra fusionado con los tres ganglios torácicos para formar el ganglio estrellado. Los ganglios cervicales se encuentran relacionados por la porción cervical del tronco simpático.

En la región del cuello el nervio vago y el tronco simpático (nervio cervical superior) se encuentran muy juntos, envueltos por una vaina de tejido conectivo. A su vez estos nervios se encuentran unidos a la arteria carótida común por otra vaina de tejido conectivo (Field y Taylor, 1950).

En el gato, el ganglio cervical superior (simpático) se encuentra en estrecha relación con el ganglio nodoso (parasimpático). Ambos reciben la corriente sanguínea a través de una o dos pequeñas ramas de la arteria occipital, que usualmente llegan a la mitad craneal del conjunto. La mitad caudal es suplida por pequeños colaterales de la bifurcación carotídea. Además, una rama de la arteria tiroidea corre a lo largo del tronco vago-simpático y su división ascendente llega hasta la mitad caudal de ambos ganglios. La sangre venosa del conjunto es drenada por la vena yugular interna, o por la yugular externa, cuando la interna está ausente (Chungcharoen y cols., 1952).

De lo anterior se deduce que es imposible separar el ganglio cervical

superior del ganglio nodoso sin dañar la irrigación sanguínea de ambos.

### 2.1.2. Extracción y disección

Se emplearon indistintamente gatos machos o hembras de 1,8 a 3,5 kg de peso.

Los gatos fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico de 35 mg/kg, administrada por vía intraperitoneal. Inmediatamente se procedió a extirpar los ganglios cervicales superiores derecho e izquierdo. Ambos ganglios cervicales se extrajeron junto con el ganglio nodoso adyacente y además junto con una porción del tronco vagosimpático (preganglionar) de 5 cm de longitud aproximadamente. El tronco nervioso postganglionar se seccionó a ras del hueso craneano.

La disección del conjunto simpático-parasimpático se realizó *in vitro*, con el tejido sumergido en una placa de Petri con solución de Krebs a temperatura ambiente y burbujeada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>).

Para separar el ganglio cervical superior del ganglio nodoso se abrió la vaina de tejido conectivo que envuelve a ambos ganglios y a los respectivos nervios. Después se extrajo la vaina de tejido conectivo que envuelve al ganglio cervical superior y a los nervios cervical superior (preganglionar) y carotídeo (postganglionar). De esta manera se logró que el tejido nervioso se encuentre en íntimo contacto con el medio de incubación.

### 2.2. CAPTACION de <sup>3</sup>H-NORADRENALINA

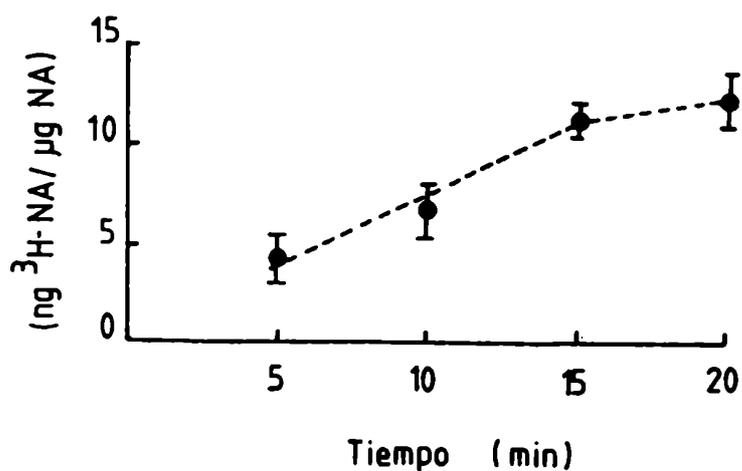
Con el objeto de estudiar la captación de la noradrenalina tritiada ( $^3\text{H-NA}$ ) y su retención por el tejido, los ganglios fueron extraídos y disecados como se describió más arriba (2.1.2.). Luego fueron colocados en vasos de precipitado individuales que contenían 5 ml de solución de Krebs. A su vez, los vasos se introdujeron en un baño termostático del tipo Dubnoff, con agitación moderada. La temperatura se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  y se burbujeó con gas carbónico durante todo el ensayo.

### 2.2.1. Curva control

Los ganglios se incubaron durante intervalos de tiempo crecientes (5, 10, 15 y 20 min) en 5 ml de solución de Krebs que contenía  $^3\text{H-NA}$   $0,1\ \mu\text{M}$ . Luego se determinó la captación de  $^3\text{H-NA}$  para cada grupo y se observó que el proceso de captación llegaba al equilibrio en un período de 15 minutos (figura 5). Por lo tanto, en todos los experimentos realizados para estudiar la captación de noradrenalina, los ganglios fueron incubados con la  $^3\text{H-NA}$  por un lapso de 15 minutos.

### 2.2.2. Protocolo experimental

Se realizó una preincubación, durante 15 minutos, en solución de Krebs libre de droga. Luego los ganglios fueron incubados durante 30 minutos en 5 ml de solución de Krebs que contenía droga en la concentración correspondiente. Los controles se incubaron en Krebs libre de droga, también durante 30 minutos.

FIGURA 5Curva control de captación de  $^3\text{H-NA}$ 

Ordenada : Captación de noradrenalina tritiada expresada como nanogramos de  $^3\text{H-NA}$  captados por microgramo de NA endógena.

Abcisa : Intervalos (minutos) durante los cuales los ganglios fueron incubados con  $^3\text{H-NA}$  0,1  $\mu\text{M}$ .

A continuación tanto los ganglios tratados con droga como los controles fueron incubados durante 15 minutos en 5 ml de solución de Krebs que contenía  $^3\text{H-NA}$  en concentración 0,1  $\mu\text{M}$ . Por último, se efectuó un lavado de 5 minutos con medio de incubación libre de droga.

### 2.2.3. Procesamiento del tejido al finalizar el experimento.

Terminado el experimento, el ganglio se secó inmediatamente sobre papel de filtro, se pesó y se colocó en 5 ml de ácido perclórico 0,4 N que contenía 1 % de EDTA al 10 % y 1 % de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  al 12,5 %. El tejido fue homogeneizado en este medio para extraer y preservar la noradrenalina. Luego de permanecer una hora a 4°C, el homogenato se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y el homogenato se guardó congelado para determinar el contenido tisular de noradrenalina.

### 2.2.4. Expresión de los resultados

Se midió la radiactividad de las siguientes muestras:

- B: Baño de incubación que contiene la  $^3\text{H-NA}$ .
- T: Sobrenadante del homogenato del tejido.
- E: Eluato de la columna de alúmina empleado para determinar el contenido endógeno de noradrenalina del tejido ( ver 2.4.1.).

Se agregó una alícuota de 0,5 ml de cada una de estas muestras sobre 5 ml de solución centelladora contenida en viales. La radiactividad se midió en un contador de centelleo Packard modelo 3320 y la eficiencia de las lecturas

se evaluó por agregado de 25  $\mu$ l de agua tritiada de actividad específica conocida.

Las cuentas por minuto (c.p.m.) leídas en el contador de centelleo líquido fueron multiplicadas por un factor de conversión, que se calculó teniendo en cuenta los datos siguientes: la eficiencia de la lectura, calculada sobre la base de las desintegraciones por minuto (d.p.m.) del agua tritiada, la actividad específica de la noradrenalina tritiada, la alícuota de muestra utilizada y el peso del tejido (ver 2.3.7.). En consecuencia, los resultados quedaron expresados como sigue:

B: nanogramos de  $^3\text{H}$ -NA por ml de baño de incubación (ng/ml).

T y E: nanogramos de  $^3\text{H}$ -NA por gramo de tejido (ng/g); T representa el tritio total en el tejido y E, el tritio correspondiente a la noradrenalina separada por cromatografía en alúmina.

La relación T/B indica la capacidad de concentración de tritio por el tejido. La relación E/NA endógena (ng/ $\mu$ g) indica la cantidad de noradrenalina captada con respecto a la noradrenalina tisular. Teniendo en cuenta estas relaciones se compararon los resultados obtenidos en condiciones control con los obtenidos en presencia de drogas.

### 2.3. LIBERACION de NEUROTRANSMISORES

#### 2.3.1. Montaje del tejido en el baño de órgano aislado.

Se utilizó una cámara de acrílico de 3 ml de capacidad, con orificios para la entrada y para la salida de la solución de Krebs y para el burbujeo

con gas carbógeno. En su interior se colocaron dos electrodos circulares de platino.

El tejido previamente disecado (ver 2.1.2.) se dispuso en la cámara de tal manera que el nervio cervical superior quedó enhebrado en los dos electrodos y el cuerpo ganglionar quedó suspendido en el medio de incubación. La cámara con el tejido se colocó en un baño de órgano aislado termostatzado para mantener la temperatura a 37°C durante el experimento. En estas condiciones, el ganglio se preincubó durante 15 minutos en solución de Krebs burbujeada con gas carbógeno.

### 2.3.2. Marcación de los depósitos endógenos de noradrenalina y de acetilcolina

Tanto la  $^3\text{H}$ -NA (Langer y Vogt, 1971) como la  $^3\text{H}$ -ACh (Adler-Graschinsky y cols., 1980) pueden comportarse como trazadores radiactivos de los neurotransmisores respectivos.

Por lo tanto, los depósitos endógenos de noradrenalina se marcaron incubando el ganglio durante 30 minutos con noradrenalina tritiada ( (+) -7- [ $^3\text{H}$ ]-N-NA, actividad específica 10,3 Ci/mmol) en concentración 5  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,5  $\mu\text{M}$ ). De acuerdo con Friesen y cols. (1965), cuando fue necesario marcar los depósitos endógenos de acetilcolina, el tejido fue incubado durante 30 minutos con colina tritiada (metil- [ $^3\text{H}$ ]-colina, actividad específica 4,2 Ci/mmol) en concentración 10  $\mu\text{Ci/ml}$  (2,38  $\mu\text{M}$ ).

Los dos trazadores radiactivos fueron diluídos en 3 ml de solución de Krebs en el momento de ser utilizados para la marcación. En el caso de la  $^3\text{H}$ -NA, el pH de la solución radiactiva fue ajustado a 7,4 con cantidad sufi-

ciente de HONa 0,1 N, antes de ponerla en contacto con el tejido.

2.3.3. Liberación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina y/o de  $^3\text{H}$ -acetilcolina por estimulación eléctrica del nervio preganglionar.

Después de incubar el ganglio con el material radiactivo, se renovó la solución de Krebs cada 5 minutos durante 80 minutos. Al finalizar este período de lavados se aplicó el primer estímulo eléctrico a través del nervio preganglionar. En cada experimento se hicieron tres estímulos sucesivos con intervalos de 45 minutos entre ellos. Luego del último estímulo se realizó otro período de lavados de 20 minutos. Durante todo el experimento se renovó el medio de incubación cada 5 minutos. Estos lavados constituyeron las muestras donde se midió la radiactividad liberada.

El estímulo eléctrico se realizó por medio de un estimulador Grass, modelo S44, que produce trenes de onda cuadrada cuya frecuencia, voltaje y duración son graduables. Para estudiar la liberación de noradrenalina por estímulo eléctrico del nervio preganglionar se aplicaron pulsos de 2 mseg de duración y de 80 voltios, con una frecuencia de 10 pulsos por segundo, durante 5 minutos. Para los ensayos de liberación de acetilcolina los parámetros de estimulación fueron: 5 pulsos por segundo, 40 voltios, 2 mseg de duración, durante 5 minutos. De acuerdo con Collier (1969) las frecuencias de estimulación utilizadas se encuentran dentro del rango fisiológico para el ganglio autónomo.

Cuando se estimuló en presencia de drogas se siguió el mismo esquema experimental que el utilizado para los controles. La droga fue agregada al medio de incubación 25 minutos antes de realizar el segundo y/o el tercer

estímulo y fue mantenida durante la estimulación.

Todas las drogas ensayadas, excepto la fenoxibenzamina, fueron disueltas en agua destilada. La concentración de droga requerida en cada caso se obtuvo por agregado de 0,1 ml de la dilución correspondiente de la droga a los 3 ml de solución de Krebs del baño de órgano aislado. De esta manera no hubo variaciones en el pH y las variaciones en el volumen fueron menores del 5%.

La fenoxibenzamina (FBA) se diluyó en la forma siguiente:

Dilución I (50 mg/ml): FBA. ClH: 25 mg; etanol 96%: 0,4 ml; ClH 0,1 N: 0,1 ml.

Dilución II (1 mg/ml): Dilución I: 0,1 ml; ClH 0,1 N: 0,2 ml; H<sub>2</sub>O destilada: 4,7 ml.

Las diluciones posteriores se hicieron con agua destilada y se adicionaron al medio de incubación en igual forma que las de las otras drogas.

#### 2.3.4. Liberación de <sup>3</sup>H-noradrenalina por acetilcolina exógena.

Para realizar este grupo experimental se procedió igual que para los grupos de estimulación preganglionar con respecto a la marcación de los depósitos endógenos de NA (2.3.2.) y a la estabilización de la liberación espontánea de radiactividad (2.3.3.), pero en lugar del estímulo eléctrico se aplicaron dos pulsos de acetilcolina (ACh) exógena (100 µM). Los pulsos fueron de 1 min de duración y con un intervalo de 50 minutos entre ellos.

Se tomaron 5 muestras anteriores al pulso de ACh, cada una de 1 minuto de duración, para obtener la liberación basal de tritio.

La degradación de la ACh por la colinesterasa se previno agregando eserina al medio de incubación (Koelle y Gilman, 1949; Birks y Mac Intosh, 1961), en concentración 3,08 µM, 10 minutos antes y durante la aplicación de cada pulso de acetilcolina.

El primer pulso de ACh se realizó en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, que fue retirado del medio de incubación 45 minutos antes. El segundo pulso de ACh se realizó 45 minutos después de restaurar el  $\text{Ca}^{++}$  al medio de incubación.

#### 2.3.5. Procesamiento del tejido al finalizar el experimento.

Una vez finalizados los ensayos de liberación el tejido fue procesado como se indicó anteriormente (ver 2.2.3.).

#### 2.3.6. Determinación de la radiactividad de las muestras.

Tanto la radiactividad presente en las muestras del baño de órgano aislado como la contenida en el sobrenadante del tejido se determinó por agregado de una alícuota de 0,5 ml de las muestras a 5 ml de líquido centellador contenido en viales. La radiactividad fue leída utilizando un contador de centelleo líquido. Se hicieron patrones apropiados con 25  $\mu\text{l}$  de agua tritiada como se indicó anteriormente (ver 2.2.4.).

#### 2.3.7. Cálculo y expresión de los resultados

a) Radiactividad de las muestras y del tejido: se expresó como nanocuries por 100 mg de tejido (nCi/100 mg).

La radiactividad en c.p.m. de las muestras y del tejido fue convertido a nCi/100 mg multiplicándola por un factor cuyo cálculo tiene en cuenta la

eficiencia de la lectura (calculada por medio de los patrones de agua tritiada), la alícuota de muestra utilizada y el peso del tejido. Por lo tanto:

$$n\text{Ci}/100 \text{ mg} = \frac{L \text{ (c.p.m.)}}{E \times 2.200} \times 100 \times \frac{100}{P_t} \times \frac{V \text{ (ml)}}{0,5 \text{ (ml)}}$$

donde:

L: Lectura correspondiente a la muestra y/o al tejido.

E: Eficiencia (cpm/dpm x 100).

P<sub>t</sub>: Peso del tejido en mg.

V: Volumen total de la muestra de baño de órgano aislado o del homogenato del tejido.

b) Liberación fraccional por estímulo eléctrico del nervio preganglionar.

Expresa el aumento en la liberación de radiactividad por encima del nivel basal espontáneo al aplicar el estímulo eléctrico.

Se calculó de la manera siguiente: a la radiactividad remanente en el tejido al final del experimento, se le sumó la radiactividad liberada al baño de órgano aislado desde la última muestra hasta la obtenida durante la estimulación. De esta forma se obtuvo la radiactividad contenida en el tejido en el momento de estimular (A), expresada en nCi/100 mg de tejido.

La liberación de tritio por sobre el nivel basal (B), se calculó restando de la radiactividad liberada por el estímulo, la radiactividad liberada en forma espontánea, ambas expresadas en nCi/100 mg.

La liberación de tritio por pulso (C) se obtuvo dividiendo (B) por la cantidad de pulsos aplicados durante la estimulación.

Finalmente, dividiendo (C) por (A) se obtuvo la liberación fraccional (de  $^3\text{H-NA}$  y/o de  $^3\text{H-ACh}$ ) por estímulo, que se expresó como :  $\text{LF} \times 10^{-5}$ .

Con el objeto de analizar el efecto de cada droga ensayada sobre la liberación de radiactividad provocada por estímulo eléctrico, se efectuaron los cocientes  $E_2/E_1$  y  $E_3/E_1$  que resultan de dividir las ( $\text{LF} \times 10^{-5}$ ) obtenidas en el segundo y el tercer estímulo por la obtenida en el primer estímulo. Luego se compararon los cocientes de los experimentos control con los correspondientes obtenidos en los experimentos realizados con drogas.

#### c) Liberación de $^3\text{H-noradrenalina}$ por acetilcolina exógena.

La liberación de tritio por sobre el nivel basal se calculó restando de la radiactividad liberada por la Ach, la radiactividad liberada en forma espontánea. Los resultados fueron expresados como nanocuries liberados por 100 mg de tejido y por minuto (nCi/100 mg/min).

### 2.4. DETERMINACION del CONTENIDO TISULAR de NORADRENALINA

#### 2.4.1. Separación cromatográfica de la noradrenalina por adsorción en columnas de alúmina.

La noradrenalina fue extraída de las muestras del tejido utilizando la modificación del método de Anton y Sayre (1962) descripta por Neff y Costa (1966).

Este método se fundamenta en la capacidad que tiene la alúmina para adsorber estructuras catecólicas en medio alcalino.

La alúmina ( $Al_2O_3$ ) fue preparada de acuerdo con el método de Crout (1961), con las modificaciones descritas por Graefe y cols. (1973).

Se emplearon columnas cromatográficas de 0,5 cm de diámetro y se colocó en su interior 200 mg de  $Al_2O_3$  activada que quedó sostenida con lana de vidrio. Antes de usarlas, las columnas de alúmina fueron lavadas con agua destilada y luego con 0,1 ml de EDTA al 10% para prevenir la oxidación de la noradrenalina.

Para separar la NA se utilizó una alícuota de 1,5 ml del homogenato del tejido que fue llevada a un pH aproximado de 8,0 - 8,2 con 3 ml de solución amortiguadora tris-ClH 0,5 M, pH 9,0. Esta mezcla fue pasada por columna y se descartó el efluente. Luego se lavó la columna sucesivamente con 1 ml y con 2 ml de agua destilada, que también se descartaron. Finalmente se eluyó la noradrenalina adsorbida en la columna con 3 veces 1 ml de ácido acético 0,2 N, para luego determinar su concentración por un método fluorimétrico.

Simultáneamente se prepararon patrones internos y externos con cantidades conocidas de noradrenalina. Los primeros fueron pasados por columna en iguales condiciones que el tejido, los segundos fueron preparados igual que el eluido, es decir, en 3 ml de ácido acético 0,2 N.

#### 2.4.2. Determinación de la noradrenalina por el método del trihidroxiindol

Para estas determinaciones se siguió el método del trihidroxiindol descrito por Laverty y Taylor (1968). Este método se basa en la propiedad que

tienen los compuestos catecólicos de emitir fluorescencia en medio alcalino, si previamente fueron oxidados.

Se procedió de la siguiente manera:

\* A cada muestra de 1 ml de ácido acético 0,2 N eluído de la columna (2.4.1.) se le agregó 0,2 ml de buffer fosfato 0,5 M con el objeto de llevarla a pH 6,5, que es el pH óptimo para la oxidación de la noradrenalina.

\* A tiempo cero se agregó 50  $\mu$ l de solución de yodo-yodurado, el agente oxidante.

\* Luego de 3 minutos se agregó 0,5 ml de sulfito alcalino.

\* Luego de 8 minutos se agregó 0,2 ml de ácido acético glacial.

Después de cada adición la muestra fue agitada vigorosamente. (Para todas las soluciones utilizadas ver 2.8.4.).

\* Luego de 30 minutos se leyó la muestra en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman, en las siguientes longitudes de onda: Excitación: 380 m $\mu$ ; Emisión: 480 m $\mu$ .

Los patrones internos y externos preparados en 2.4.1. fueron tratados en igual forma que las muestras de tejido.

Los blancos se realizaron invirtiendo el orden de agregado de los reactivos, es decir, la solución de yodo-yodurado se agregó después del ácido acético glacial.

#### 2.4.3. Cálculo y expresión de los resultados.

Luego de restar los blancos correspondientes, las lecturas de fluorescencia de la noradrenalina del tejido (F) fueron multiplicadas por un factor (f)

cuyo cálculo considera la alícuota de muestra y la relación (r) entre unidades fluorimétricas y nanogramos de noradrenalina determinada por medio de los patrones. Finalmente se dividió por el peso del tejido. Por lo tanto el contenido tisular del neurotransmisor quedó expresado en microgramos de noradrenalina por gramo de tejido.

$$NA (\mu\text{g/g}) = \frac{F \times f}{P_t}$$

$$\text{donde : } f = r (\text{ng}) \frac{5 (\text{ml})}{1,5 (\text{ml})}$$

$P_t$  = peso del tejido (mg)

## 2.5. DETERMINACION de los $^3\text{H}$ -METABOLITOS de la $^3\text{H}$ -NORADRENALINA

La noradrenalina (NA) liberada, ya sea espontáneamente o como consecuencia de un potencial de acción puede seguir dos caminos metabólicos: uno de ellos relacionado con la actividad de la monoaminoxidasa (MAO) y el otro con la actividad de la catecol-O-metil transferasa (COMT). La actividad de estas dos enzimas conduce a la formación de cinco metabolitos de la noradrenalina: el ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA), el 3,4-dihidroxi fenilglicol (DOPEG), el ácido vainillin mandélico (VMA), el 3-metoxi, 4-hidroxi fenilglicol (MOPEG) y la normetanefrina (NMN).

La noradrenalina tritiada y sus metabolitos radiactivos fueron separados mediante la combinación de cromatografía de adsorción en alúmina y

cromatografía de intercambio iónico en resina Dowex 50 Wx4. Se procedió de acuerdo con el método descrito por Graefe y cols. (1973) que se fundamenta en las siguientes propiedades de los metabolitos: por cromatografía en alúmina se adsorben selectivamente los derivados catecólicos, es decir, la NA, el DOMA y el DOPEG, mientras que los productos O-metilados NMN, VMA, y MOPEG no son retenidos. A su vez, la Dowex 50 W x 4, resina intercambiadora catiónica fuertemente ácida, empleada en su forma hidrogenada, retiene a la NA y a la NMN, que poseen un grupo amino sin sustituir y por lo tanto permite separar a la NMN de los O-metilados deaminados (MOPEG y VMA) y a la NA del DOPEG.

Las columnas de alúmina fueron preparadas como ya se describió (2.4.1.). Las columnas de Dowex fueron llenadas hasta una altura de 1,5 cm con la resina a pH 2,0 y fueron lavadas con 2 ml de agua destilada antes de usarlas.

Para estas determinaciones se utilizaron las muestras recogidas inmediatamente antes del estímulo o muestra de liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -NA y la obtenida durante el estímulo eléctrico preganglionar, ambas en condiciones control. Los ganglios empleados en estos experimentos también fueron analizados para determinar la distribución metabólica de la noradrenalina en el tejido.

#### 2.5.1. Procesamiento de las muestras para la cromatografía.

##### I) Luego de terminado el experimento:

Las muestras se llevaron a pH ácido para prevenir la oxidación de la noradrenalina.

A) Tejido: Se homogeneizó en 5 ml de una solución de ácido perclórico 0,4 N adicionado con 1 % de EDTA al 10 % y 1 % de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  al 12,5%. Se centrifugó. Se extrajo una alícuota de 0,5 ml para la lectura de radiactividad. Se guardó el sobrenadante

congelado (ver 2.2.3.).

B) Muestras del medio de incubación: Después de extraer una alícuota de 0,5 ml para leer la radiactividad, se mezclaron las muestras equivalentes provenientes de dos ganglios, con el objeto de tener suficiente material para las determinaciones. De esta mezcla, se extrajo una nueva alícuota de 0,5 ml para la lectura de la radiactividad. Luego se acondicionaron las muestras de la siguiente manera: a los 4,5 ml de la mezcla se agregaron 0,3 ml de HCl 1 N y 0,2 ml de una mezcla a/a de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  12,5 % y EDTA 10 %.

II) Para pasar por columna:

Las muestras fueron llevadas a pH 8,0 - 8,2.

A) Tejido: A una alícuota de 1,5 ml de sobrenadante se agregaron 3,0 ml de solución amortiguadora tris-ClH 0,5 M, pH 9,0.

B) Muestras: A las muestras I<sub>B</sub>) se les agregó 1,7 ml de solución amortiguadora tris ClH 0,5 M, pH 8,4.

#### 2.5.2. Separación cromatográfica de la $^3\text{H}$ -noradrenalina y de sus $^3\text{H}$ -metabolitos

a) Se colocó la columna de alúmina sobre la de Dowex y se pasó la muestra. En la columna de alúmina se retienen la NA, el DOMA y el DOPEG. Los O-metilados (NMN, VMA y MOPEG) pasan por la columna de Dowex. Se lavó sucesivamente con 1 ml y luego con 2 ml de agua destilada. Se retiró la columna de alúmina y se reservó. Luego se lavó la columna de Dowex con 2 ml de agua destilada. Todo el efluente de esta columna corresponde a la fracción I: MOPEG + VMA = O-metilados deaminados.

- b) La NMN quedó retenida en la resina Dowex y se eluyó lavando 2 veces con 1 ml de una mezcla a:a de etanol: ClH 6N. De esta forma se obtiene la fracción II: NMN. (Se descartó la columna de Dowex).
- c) La columna de alúmina reservada en el punto a) se colocó sobre una nueva columna de Dowex y se eluyó 2 veces con 1 ml de ácido acético 0,2 N. De esta forma se arrastran la NA y el DOPEG mientras que el DOMA queda retenido en la alúmina. Nuevamente se reservó la columna de alúmina. La columna de Dowex se lavó con 2 ml de agua destilada, que sumados a los 2 ml de ácido acético 0.2 N constituyen la fracción III: DOPEG. La NA queda retenida en la columna de Dowex.
- d) La columna de Dowex se lavó con 2 ml de agua destilada, que se descartaron. Luego se eluyó con 2 veces 1 ml de HCl 2 N, arrastrando de esta forma la fracción IV: NA.
- e) La columna de alúmina reservada en el punto c) se lavó con 4 ml de ácido acético 0,5 N. Con este lavado, que se descartó, se eluyó la cantidad remanente de NA y DOPEG que representa aproximadamente un 5% del total (dato que se tuvo en cuenta al realizar los cálculos). Finalmente se eluyó con 2 veces 1 ml de HCl 0,2 N arrastrando de esta manera la fracción V: DOMA.

### 2.5.3. Determinación de la radiactividad de las muestras.

Se leyó la radiactividad de 2 ml de cada fracción agregando 14 ml de solución centelladora de tritón. Se hicieron patrones para cada fracción metabólica, utilizando 25 µl de agua tritiada como se describió en 2.2.3.

### 2.5.4. Cálculo y expresión de los resultados

Las c.p.m. obtenidas al leer la radiactividad de cada fracción metabólica en el contador de centelleo líquido, fueron convertidas a nanocuries por 100 mg de tejido (nCi/100 mg) multiplicándolas por un factor, que se calculó considerando la eficiencia de la lectura, la alícuota de muestra utilizada y el peso del tejido, tal como se indicó en 2.3.7. Cada fracción metabólica fue luego expresada como porcentaje del contenido total del tritio.

## 2.6. CURVA de CONCENTRACION-RESPUESTA a la METOXAMINA

Se emplearon indistintamente gatos machos o hembras de 1.8 a 3.6 kg de peso. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Inmediatamente se extirpó el globo ocular y se extrajo la membrana nictitante junto con todo el tejido circundante. El tejido se colocó en una caja de Petri con solución de Krebs a temperatura ambiente, previamente equilibrada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>). Luego, se procedió a disecar el músculo medial bajo lupa.

A continuación, el cartílago sobre el que se inserta el músculo medial se sujetó a la parte inferior de un baño de órgano aislado de 10 ml de capacidad. La porción terminal superior del músculo se conectó a un transductor de fuerza-desplazamiento y éste a su vez a un polígrafo Grass modelo 7 B, para registrar la tensión desarrollada por el músculo.

El baño del órgano aislado, con el tejido suspendido en solución de Krebs gaseada con carbógeno, se colocó en un baño termostatzado para mantener la temperatura a 37° C durante el experimento. Luego se efectuaron lavados periódicos durante 60 minutos y durante este lapso se ajustó repetidamente la tensión

del músculo a 2.5 g. A continuación se efectuaron las curvas de concentración-respuesta a la metoxamina en forma acumulativa, esto es, aumentando la concentración de la droga por un factor de 3 inmediatamente después de obtener el máximo de respuesta a la concentración previa. Los intervalos entre cada administración de metoxamina oscilaron entre 2 y 5 minutos.

En cada ensayo se realizaron dos curvas de concentración-respuesta con un intervalo de 90 minutos entre ellas. Durante este lapso se renovó periódicamente la solución de Krebs del baño de incubación.

Los resultados se calcularon de la manera siguiente: las respuestas contráctiles (en gramos) obtenidas para cada concentración de metoxamina se expresaron como porcentaje de la máxima tensión desarrollada en la primera curva.

## 2.7. METODO ESTADISTICO

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

## 2.8. DROGAS y SOLUCIONES UTILIZADAS

### 2.8.1. Drogas

- \* Acetilcolina, clorhidrato (Sigma Chemicals, U.S.A.)
- \* Atropina, sulfato (Sigma Chemicals, U.S.A.)
- \* Clonidina, clorhidrato (C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim-Am Rhein-Germany)
- \* Cocaína, clorhidrato (Verardo y Cía, Bs. As.)
- \* Desmetilimipramina, clorhidrato (Geigy, Bs. As.)

- \* Eserina, sulfato (Calbiochem, U.S.A.)
- \* Fenoxibenzamina, clorhidrato (Smith Kline and French Labs., U.S.A.)
- \* Hexametonio, bromuro (Sigma Chemicals, U.S.A.)
- \* dl-Metoxamina, clorhidrato (Burroughs Wellcome Co. Research Triangle Park, W.C.)
- \* l-Noradrenalina, bitartrato monohidrato (Sterling-Research Institute N.Y.-U.S.A.)
- \* dl-Noradrenalina, l-bitartrato ( $7\text{-}^3\text{H}$  (N) ) (Actividad específica: 10.3 Ci/mM; New England Nuclear U.S.A.)
- \*  $^3\text{H}$ -metil-Colina, clorhidrato (Actividad específica: 4.16 Ci/mM; New England Nuclear U.S.A.)

#### 2.8.2. Solución de Krebs

Se utilizó solución de Krebs modificada, con la siguiente composición mi limolar: ClNa: 118,0; ClK: 4,7;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ : 1,2;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ : 1,0;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ : 2,6  $\text{CO}_3\text{HNa}$ : 25,0; glucosa: 11,1; ácido ascórbico: 0,11; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): 0,004. Estos dos últimos fueron adicionados para prevenir la oxidación de la noradrenalina. Con burbujeo de gas carbónico (95%  $\text{O}_2$ : 5%  $\text{CO}_2$ ) el pH final del medio de incubación fue 7,4 a 37° C.

#### 2.8.3. Solución de tejido

Acido perclórico ( $\text{ClO}_4\text{H}$ ) 0,4 N: 24,5 ml; EDTA al 10%: 0,25 ml; sulfito de sodio ( $\text{SO}_3\text{Na}_2$ ) al 12,5 %: 0,25 ml.

#### 2.8.4. Soluciones utilizadas para el método del trihidroxiindol

- \* Buffer fostato: fosfato trisódico ( $\text{PO}_4\text{Na}_3$ ) 0,5 M.

- \* Yodo-Yodurado: Yoduro de sodio (INa): 5,5 g; Yodo ( $I_2$ ): 0,5g; agua: 100ml.
- \* Sulfito alcalino: HONa 3 N: 48 ml;  $SO_3Na_2$  12,5%: 6 ml; EDTA 10%: 6 ml.

#### 2.8.5. Líquido centellador para muestras radiactivas.

Se utilizó un medio con la siguiente composición: tolueno: 600 ml; tritón-X-100: 300 ml; etanol absoluto: 100 ml; ClH 1 N: 200 ml; 1,4-bis (2-(5 feniloxazolil))- benceno (POPOP): 0,1 g; 2,5-difeniloxazol (PPO): 5 g.

#### 2.8.6. Otros reactivos

- \* Oxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ) estandarizado para cromatografía de adsorción según Broockman (Merck).
- \* Dowex 50 W x 4; forma hidrogenada (Sigma Chemicals Co., U.S.A.).

### 3. RESULTADOS

### 3.1. CAPTACION de $^3\text{H}$ -NORADRENALINA

Raab y Humphreys (1947) y Raab y Gigg (1955), fueron los primeros autores que observaron que luego de administrar *in vivo* dosis grandes de adrenalina o de noradrenalina se producía un aumento del contenido de catecolaminas en el corazón del gato y en el del perro.

Cuando se dispuso de catecolaminas marcadas radiactivamente, se pudieron realizar estudios similares inyectando dosis de adrenalina o de noradrenalina lo suficientemente pequeñas como para ser comparables con las encontradas en condiciones fisiológicas.

Los resultados obtenidos por Axelrod y cols. (1959) cuando utilizaron trazadores radiactivos mostraron que luego de la administración intravenosa de adrenalina marcada, una proporción importante de la dosis inyectada era inactivada por medio de una transferencia rápida desde la circulación hacia los tejidos periféricos. De esta manera, estos autores fueron los primeros en demostrar la importancia del proceso de captación de las catecolaminas circulantes para terminar su acción biológica. Evidencias posteriores confirmaron la habilidad de varios tejidos periféricos para acumular catecolaminas exógenas (Muscholl, 1961; Harvey y Pennefather, 1962; Trendelenburg y Crout, 1964; Gillespie y Kirpekar, 1966).

Por otra parte, se observó que existe una correlación aproximada entre la densidad de inervación simpática y la concentración de noradrenalina en el tejido, evidencia que indicaría que la mayor proporción de captación ocurre en los terminales nerviosos (Whitby y cols., 1961), aunque en ciertas condiciones la captación extraneuronal puede ser también importante (Andén y cols., 1963).

De acuerdo con resultados obtenidos en el ganglio cervical superior de la rata, mediante el empleo de la técnica de fluorescencia histoquímica descrita por Falck y cols. (1962), Hamberger y cols. (1964) sugirieron que la captación de noradrenalina podría ocurrir no sólo en los terminales nerviosos, sino también en otros sitios de la superficie de la neurona simpática postganglionar, tales como los axones preterminalés y los cuerpos celulares.

3.1.1. Captación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina por el ganglio cervical superior aislado del gato: Control y efecto de drogas inhibitoras

Con el objeto de analizar si en el ganglio cervical superior aislado del gato se verifica el proceso de captación del neurotransmisor adrenérgico, se realizaron ensayos (ver 2.2.1.) en los cuales se incubó el ganglio con cantidades trazadoras de noradrenalina tritiada ( $^3\text{H}$ -NA) y se midió la cantidad de tritio acumulado en el tejido.

En la tabla I se resumen los resultados obtenidos. Cuando se trabajó en condiciones control, la concentración de tritio en el tejido resultó tres veces mayor que la determinada en el baño de incubación. Estos datos sugieren que el tejido ganglionar posee estructuras con capacidad para captar y para concentrar noradrenalina.

También se incluyen en la tabla I los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de varias drogas conocidas como inhibitoras de la captación de noradrenalina. La cocaína, clásico inhibidor de este proceso (Muscholl, 1961), fue ensayada en la concentración 8,8  $\mu\text{M}$  y disminuyó en un 50 % los valores controles.

TABLA I

Captación de  $^3\text{H-NA}$  por el ganglio y su modificación por drogas.

Los ganglios se incubaron durante 30 min, a  $37^\circ\text{C}$ , en solución de Krebs que contenía droga en las concentraciones indicadas y/o en solución de Krebs libre de drogas. Luego, tanto los ganglios tratados con droga como los controles, se incubaron durante 15 min en solución de Krebs que contenía  $^3\text{H-NA}$   $0,1 \mu\text{M}$ . Finalmente se realizó un lavado de 5 min.

Experimento	n	Concentración de droga ( $\mu\text{M}$ )	(a) NA endógena ( $\mu\text{g NA/g tej}$ )	(b) Relación (T/B)	(c) Captación ( $\text{ng } ^3\text{H-NA}/\mu\text{g NA}$ )
Control	14	- -	$4,46 \pm 0,41$	$3,3 \pm 0,2$	$11,99 \pm 0,69$
Fentolamina	3	3,1	$5,82 \pm 0,81$	$3,5 \pm 0,5$	$9,63 \pm 0,21$
Fenoxibenzamina	5	0,29	$3,67 \pm 0,37$	$2,7 \pm 0,4$	$10,67 \pm 1,79$
Fenoxibenzamina	6	2,9	$5,11 \pm 0,64$	$2,0 \pm 0,2$	$5,74 \pm 1,01$ (d)
Cocaína	4	8,8	$5,19 \pm 0,76$	$1,9 \pm 0,2$	$5,82 \pm 0,97$ (d)
Desmetilimipramina	5	0,33	$3,81 \pm 0,48$	$1,2 \pm 0,1$	$3,97 \pm 0,71$ (d)
Desmetilimipramina	6	3,3	$4,02 \pm 0,47$	$0,8 \pm 0,02$	$2,33 \pm 0,22$ (d)

(a) Noradrenalina tisular.

(b) Cociente entre la cantidad de tritio retenida por el tejido (T) y la cantidad de tritio presente en el baño de incubación (B).

(c) Captación de noradrenalina: nanogramos de  $^3\text{H-NA}$  captados por microgramo de NA tisular.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de n experimentos.

(d)  $p < 0,001$  respecto del control

Por otra parte se estudió el comportamiento de los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos fentolamina y fenoxibenzamina, dado que estas drogas pueden afectar, eventualmente, el mecanismo de recaptación neuronal (Euler y Lishajko, 1968). La fentolamina (3,1  $\mu$ M) no afectó la captación de tritio por el ganglio. La fenoxibenzamina en la concentración 0,29  $\mu$ M tampoco produjo modificaciones, mientras que una concentración 10 veces mayor (2,9  $\mu$ M) tuvo un efecto inhibitor similar al de la concentración de cocaína empleada.

Dado que en el ganglio cervical superior existen tanto estructuras noradrenérgicas como dopaminérgicas (ver Introducción) y que la cocaína es capaz de inhibir el mecanismo de captación en ambas estructuras, se ensayó la acción de la desmetilimipramina, droga que se caracteriza por inhibir selectivamente la captación de noradrenalina en estructuras noradrenérgicas (Horn y cols., 1971).

La desmetilimipramina fue ensayada en las concentraciones 0,33 y 3,3  $\mu$ M y en ambas disminuyó la captación de  $^3\text{H}$ -NA en un 70 % y un 80 % de los valores controles, respectivamente.

### 3.2. LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES

#### 3.2.1. Liberación de $^3\text{H}$ -noradrenalina por estímulo eléctrico del nervio preganglionar.

##### a) Control

Con el objeto de investigar si las estructuras que captaban noradrenalina en el ganglio cervical superior del gato tenían también capacidad para

liberarla por acción de un estímulo nervioso, como fuera descrito por Noon y cols. (1975) para el ganglio cervical superior del conejo, se realizaron ensayos en los cuales el tejido se marcó con noradrenalina tritiada ( $^3\text{H-NA}$ ) y se sometió a la estimulación eléctrica preganglionar (ver 2.3.2.y 2.3.3.).

En la figura 6 se representa la liberación espontánea de radiactividad obtenida en muestras sucesivas recogidas cada 5 minutos y el aumento en la liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocado por tres períodos consecutivos de estimulación eléctrica del nervio preganglionar. Puede observarse que el eflujo de tritio presentó una caída inicial rápida seguida de una caída más lenta que se mantuvo hasta el final del experimento. Este hecho sugiere que luego de los 60 minutos de lavados el eflujo de radiactividad provendría en forma predominante de un único compartimiento, tal como fuera sugerido por Paton (1973) para la aorta de la rata y por lo tanto puede considerarse como una medida de la liberación espontánea de  $^3\text{H-noradrenalina}$ .

Aunque la liberación espontánea decayó, el tejido conservó su capacidad de respuesta al estímulo durante todo el ensayo (fig. 6). A este respecto, en la figura 7 A puede verse que los valores de liberación fraccional de  $^3\text{H-NA}$  fueron prácticamente similares para los tres períodos de estimulación aplicados. Luego, los cocientes efectuados entre las liberaciones fraccionales obtenidas en estímulos sucesivos realizados en condiciones control (fig. 7 B), no difirieron significativamente de la unidad.

b) En ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular.

De acuerdo con los resultados descriptos más arriba, el ganglio cervical superior del gato fue capaz de liberar noradrenalina cuando se estimuló eléctricamente el nervio preganglionar. Dado que se acepta que la liberación del

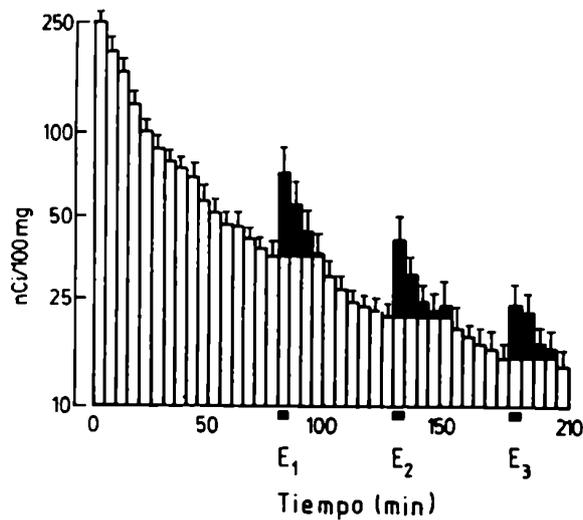
FIGURA 6

Aumento en la liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -NA provocado por la estimulación eléctrica preganglionar.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

Marcación:  $^3\text{H}$ -NA 5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Estimulación: 10 pulsos por seg, 80 V, 2 mseg, durante 5 min.



Ordenada (Esc. log.): Nanocuries por 100 miligramos de tejido.

Barras abiertas: liberación basal.

Barras cerradas: aumento sobre los valores basales provocado por el estímulo.

Abscisa : Tiempo en minutos después de la marcación con  $^3\text{H}$ -NA.

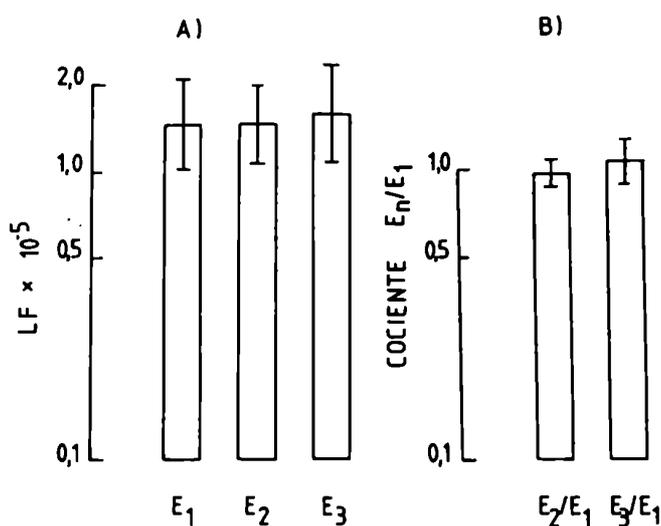
Los rectángulos inferiores señalan los períodos de estimulación.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 6 experimentos.

FIGURA 7

Liberación fraccional de  $^3\text{H-NA}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar.

El protocolo experimental fue similar al descrito para la figura 6.



Ordenadas (Esc. log.): A) Liberación de  $^3\text{H-NA}$  expresada como fracción del contenido tisular ( $\text{LF} \times 10^{-5}$ ) en el momento de efectuar la estimulación.

B) Cocientes entre las  $\text{LF} \times 10^{-5}$  obtenidas en el segundo ( $E_2$ ) y en el tercer ( $E_3$ ) estímulo y la obtenida en el primer ( $E_1$ ) estímulo.

Se muestran las medias geométricas  $\pm$  ES de 7 experimentos.

neurotransmisor adrenérgico como consecuencia de un estímulo nervioso se produce por un mecanismo dependiente del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular (Douglas, 1968), se analizó la  $\text{Ca}^{++}$ -dependencia de la liberación de NA que ocurre en el ganglio simpático del gato. Para ello se realizó un grupo de experimentos en los cuales se omitió el  $\text{Ca}^{++}$  de la solución de Krebs durante la estimulación eléctrica (ver 2.3.3.).

Como se muestra en la figura 8, no se observó liberación de  $^3\text{H}$ -NA cuando la estimulación preganglionar se efectuó en un medio libre de  $\text{Ca}^{++}$  ( $E_1$ ). Cuando se restauró el  $\text{Ca}^{++}$  en la solución de Krebs, el estímulo preganglionar provocó un aumento en la liberación de noradrenalina tritiada ( $E_2$ ).

Los resultados indican, por lo tanto, que la liberación de noradrenalina por estimulación eléctrica del nervio cervical superior es dependiente del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular.

#### c) En presencia de agonistas y de antagonistas $\alpha$ -adrenérgicos

De acuerdo con distintas evidencias farmacológicas, en la sinapsis noradrenérgicas periféricas existen receptores  $\alpha$ -presinápticos que median una regulación de la liberación de noradrenalina de los terminales nerviosos a través de un mecanismo de retroinformación negativa (Stjärne, 1973; Langer, 1973; Starke, 1973; Kirpekar y cols., 1973). Las evidencias mencionadas son las siguientes: los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos disminuyen la liberación de NA por estímulo eléctrico, mientras que los antagonistas  $\alpha$ , la aumentan.

Con el objeto de investigar si en el ganglio del gato se verifica este mecanismo regulatorio, se estudió el efecto de agonistas y de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por estímulo eléctrico del nervio preganglionar (ver 2.3.3.).

FIGURA 8

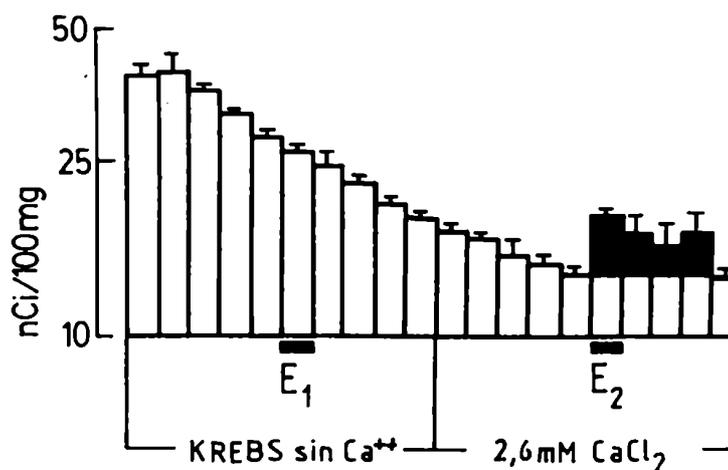
Liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por la estimulación eléctrica preganglionar:  
Dependencia del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular.

Incubación: Solución de Krebs,  $37^\circ\text{C}$ .

Marcación:  $^3\text{H}$ -NA 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , 30 min.

Estimulación: 10 pulsos por seg, 80 V, 2 mseg, durante 5 min.

$\text{Ca}^{++}$ : Se omitió del medio de incubación 25 min antes de la primera estimulación y se restauró 25 min antes de la segunda.



Ordenada (Esc. log.): Nanocuries por 100 miligramos de tejido presentes en muestras recogidas 55 min después de la marcación.

Barras abiertas: liberación basal.

Barras cerradas: aumento sobre los valores basales provocado por el estímulo.

Abscisa : Tiempo en minutos.  $\text{H}$  5 min.

Los restángulos inferiores señalan los períodos de estimulación.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 3 experimentos.

Los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos empleados fueron la clonidina y la metoxamina. En la figura 9 se representan los resultados obtenidos. Puede observarse que, tanto las dos concentraciones más elevadas de metoxamina como la concentración más baja de clonidina, causaron una disminución significativa en la liberación de tritio provocada por el estímulo nervioso.

Los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos ensayados fueron la fenoxibenzamina y la fentolamina. En la figura 10 puede observarse que tanto el antagonista no competitivo fenoxibenzamina (2,9  $\mu\text{M}$ ) como el bloqueante competitivo fentolamina (3,1  $\mu\text{M}$ ) causaron un aumento significativo en la liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por el estímulo eléctrico preganglionar. Concentraciones diez veces menores de ambos antagonistas no modificaron la liberación de tritio por estímulo.

Los resultados obtenidos con los agonistas y con los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos sugieren, por lo tanto, que se verificaría el mecanismo regulatorio de retroinformación negativa para la liberación de noradrenalina provocada por estímulo eléctrico del nervio cervical superior.

d) En presencia de inhibidores de la captación de noradrenalina.

Dado que se ha descrito que los bloqueantes  $\alpha$ -adrenérgicos pueden actuar en algunos casos inhibiendo la captación de noradrenalina (Euler y Lishajko, 1968), se investigó si el aumento causado por estas drogas en la liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por estímulo preganglionar (ver 2.3.3.) no podía deberse a su efecto inhibitor de la captación.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11. Puede observarse que ni la cocaína, en las concentraciones 0,88 y 8,8  $\mu\text{M}$ , ni la desmetilamipramina, en la concentración 0,33  $\mu\text{M}$ , modificaron en forma significativa la

FIGURA 9

Liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar:

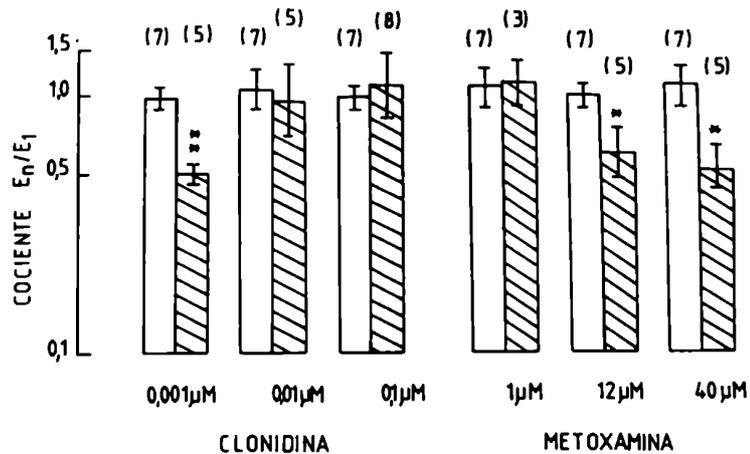
Efecto de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

Marcación:  $^3\text{H-NA}$  5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Estimulación: 10 pulsos por seg, 80 V, 2 mseg, durante 5 min.

Drogas: Se agregaron al medio de incubación 25 min antes y durante la segunda ( $E_2$ ) y/o la tercera ( $E_3$ ) estimulación.



Ordenada (Esc. log.): Los cocientes  $E_n/E_1$  obtenidos en presencia de los agonistas (barras rayadas) se comparan con sus equivalentes obtenidos en condiciones control (barras abiertas).

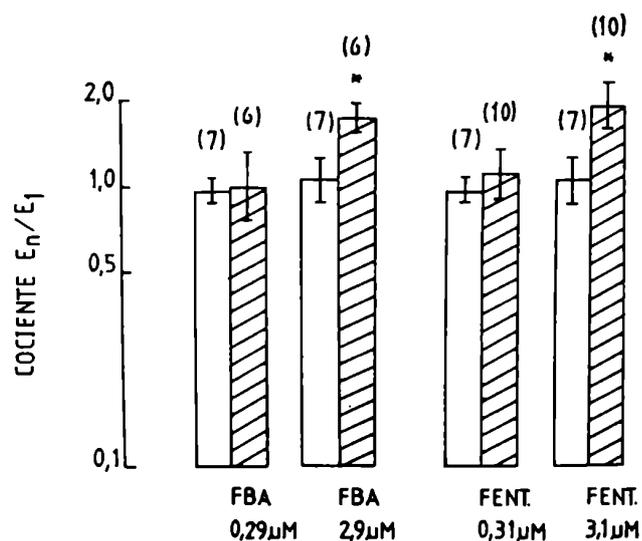
Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

\*  $p < 0,025$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; respecto de los controles.

Liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar:

Efecto de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos.

El protocolo experimental fue similar al descrito para la figura 9. En este caso las drogas empleadas fueron la fenoxibenzamina (FBA) y la fentolamina (FENT.)



Ordenada (Esc. log.): Los cocientes  $E_n/E_1$  obtenidos en presencia de los antagonistas (barras rayadas) se comparan con sus equivalentes obtenidos en condiciones control (barras abiertas).

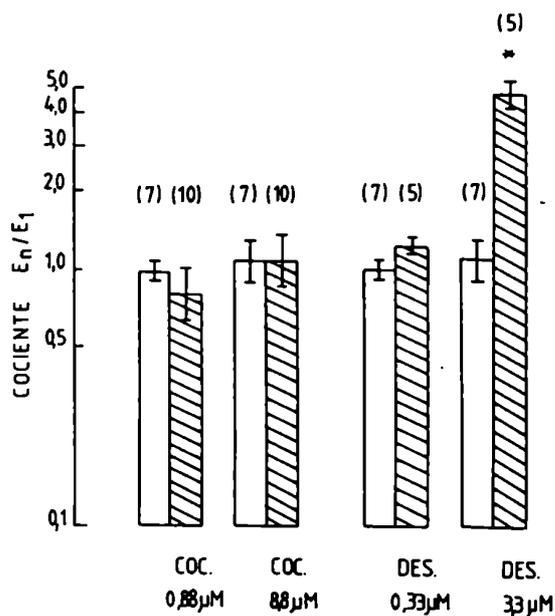
Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

\*  $p < 0,025$  respecto del control.

FIGURA 11

Liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar;  
Efecto de inhibidores de la captación de noradrenalina.

El protocolo experimental fue similar al descrito para la figura 9. En este caso las drogas empleadas fueron la cocaína (COC.) y la desmetilimipramina (DES.)



Ordenada (Esc. log.): Los cocientes  $E_n/E_1$  obtenidos en presencia de los inhibidores (barras rayadas) se comparan con sus equivalentes obtenidos en condiciones control (barras abiertas).

Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

\*  $p < 0,001$  respecto del control.

liberación de tritio provocada por el estímulo eléctrico. Sin embargo, la desmetilimipramina, en la concentración más alta ensayada, causó un aumento significativo en la liberación de noradrenalina tritiada provocada por el estímulo nervioso.

Puesto que la cocaína no modificó la liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por estímulo y dado que se ha descrito que la desmetilimipramina se comporta como antagonista  $\alpha$ -adrenérgico en algunos tejidos periféricos, tales como la arteria de la oreja del conejo (McCulloch y Story, 1972), se consideró de interés ensayar el efecto de la desmetilimipramina sobre las respuestas contráctiles de la membrana nictitante del gato. Este tejido fue seleccionado porque es inervado por fibras noradrenérgicas provenientes del ganglio cervical superior y además porque sus respuestas contráctiles son mediadas por la activación de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

Se determinó la respuesta contráctil de la membrana en función de concentraciones crecientes de metoxamina (ver 2.6.), agonista  $\alpha$ -adrenérgico que se caracteriza por poseer una afinidad muy baja para el mecanismo de captación neuronal (Trendelenburg y cols., 1970). Las curvas de concentración-respuesta a la metoxamina se realizaron en condiciones control (fig. 12 A) y en presencia de desmetilimipramina 0,33 y 3,3  $\mu\text{M}$  (figs. 12B y 12C).

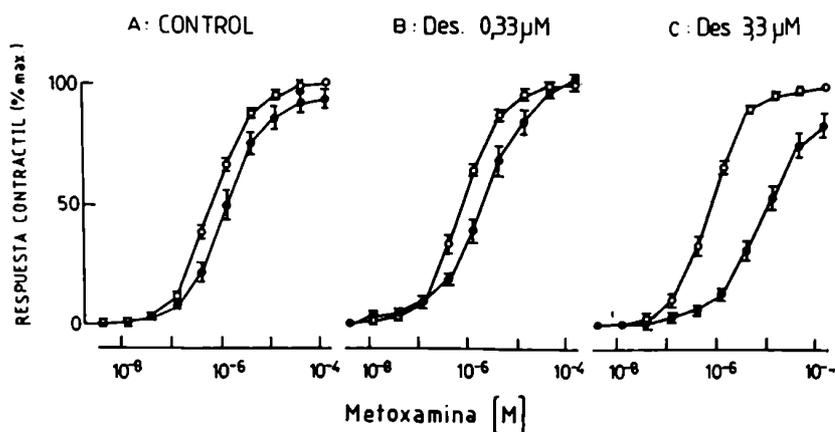
La concentración menor de desmetilimipramina no modificó las respuestas del músculo al agonista  $\alpha$ -adrenérgico (fig. 12 B). Por el contrario, la mayor concentración de desmetilimipramina provocó un corrimiento hacia la derecha en la curva de concentración-respuesta a la metoxamina (fig. 12 C). El  $\text{pD}_2$  (la dosis efectiva 50 % de la metoxamina) fue  $6,19 \pm 0,53$  M para la curva control y  $5,00 \pm 0,11$  M ( $p < 0,001$ ) luego de la exposición a desmetilimipramina 3,3  $\mu\text{M}$ . El valor máximo de contracción obtenido en presencia de

FIGURA 12

Curvas de concentración-respuesta a la metoxamina efectuadas en la membrana nictitante del gato: Acción de la desmetilimipramina.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

- A) Dos curvas realizadas en condiciones control. La segunda curva (●) se efectuó 90 min después de la primera (○), n = 8.
- B) La segunda curva se realizó en presencia de desmetilimipramina 0,33  $\mu$ M, que se agregó al medio de incubación 30 min antes, n = 10.
- C) Igual que en B), pero la desmetilimipramina se empleó en concentración 3,3  $\mu$ M, n = 10.



Ordenadas: Contracción de la membrana nictitante como porcentaje de la máxima respuesta obtenida en la primera curva.

Abcisas: Concentración molar de metoxamina.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES del número de experimentos indicado en A), B) y C).

desmetilimipramina  $3,3 \mu\text{M}$  ( $15,3 \pm 1,4 \text{ g}$ ) no difirió significativamente del máximo obtenido en condiciones control ( $17,3 \pm 1,4 \text{ g}$ ).

De la figura 12 C se desprende, por lo tanto, que la desmetilimipramina, en la concentración más alta ensayada, se comportó como un bloqueante de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

e) En presencia de antagonistas colinérgicos

Noon y cols., (1975) concluyeron que la estimulación preganglionar del ganglio cervical superior del conejo libera noradrenalina de terminales nerviosos y que esa liberación es independiente de las vías colinérgicas que arriban al ganglio porque, en sus condiciones experimentales, no era bloqueada ni con el antagonista nicotínico curare, ni con el antagonista muscarínico atropina.

En la figura 13 puede observarse que en el ganglio cervical superior del gato tanto el bloqueante nicotínico hexametonio como el bloqueante muscarínico atropina disminuyeron en forma significativa la liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por estímulo eléctrico preganglionar y que esta disminución se encuentra en relación directa respecto de la concentración de ambos antagonistas, sobre todo el nicotínico. Los resultados presentados en la figura 13 sugieren, por lo tanto, que en el ganglio cervical superior del gato la liberación de noradrenalina provocada por el estímulo preganglionar está relacionada de alguna manera con vías colinérgicas.

3.2.2. Liberación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina por acetilcolina exógena

Con el objeto de investigar si, en nuestras condiciones experimentales,

FIGURA 13

Liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar:

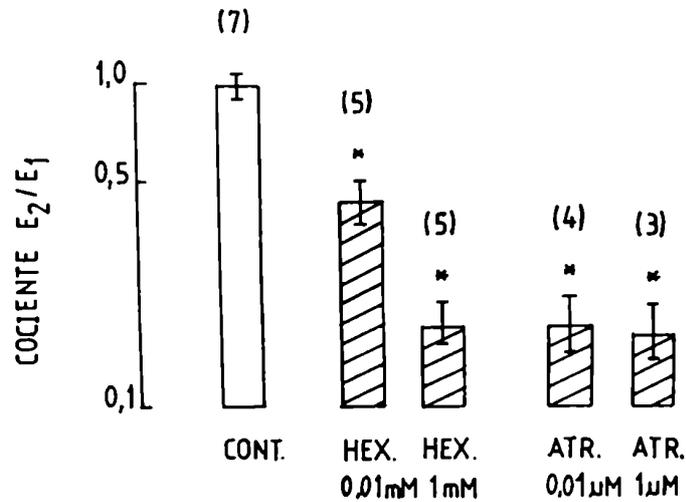
Efecto de antagonistas colinérgicos.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

Marcación:  $^3\text{H-NA}$  5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Estimulación: 10 pulsos por seg, 80 V, 2 mseg, durante 5 min.

Drogas: Se agregaron al medio de incubación 25 min antes y durante la segunda ( $E_2$ ) estimulación ( HEX.: hexametonio; ATR.: atropina).



Ordenada (Esc. log.): Los cocientes  $E_2/E_1$  obtenidos en presencia de los antagonistas (barras rayadas) se comparan con el control respectivo (barra abierta).

Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

\*  $p < 0,001$  respecto del control.

la liberación de noradrenalina provocada por el estímulo nervioso se debía a una acción liberadora de la acetilcolina endógena, en forma semejante a lo descrito para la liberación de catecolaminas en la médula adrenal (Douglas y Rubin, 1961), se estudió el efecto de la acetilcolina exógena sobre el ganglio previamente marcado con noradrenalina tritiada (ver 2.3.4.).

Los resultados obtenidos para este grupo experimental se muestran en la figura 14. En esta figura puede observarse que la acetilcolina exógena, en concentración 100  $\mu$ M, provocó la liberación de  $^3\text{H}$ -NA y que esta acción liberadora de la acetilcolina se asemeja de alguna manera a la del estímulo eléctrico preganglionar, puesto que también fue dependiente del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular.

Estos datos sugieren, por lo tanto, que la liberación de noradrenalina producida en respuesta al estímulo preganglionar, podría ser mediada por acetilcolina proveniente de las fibras preganglionares colinérgicas.

### 3.2.3. Liberación de $^3\text{H}$ -acetilcolina por estímulo eléctrico del nervio preganglionar

La liberación de acetilcolina que se produce en los ganglios simpáticos a partir de terminales colinérgicos (Perry, 1953) y su participación como mediador químico de los impulsos que se transmiten a través de las sinapsis ganglionares, fueron ya mencionados (Introducción) como hechos perfectamente conocidos. Sin embargo, aún no se ha podido dilucidar cómo se relacionan o en qué forma interaccionan la acetilcolina y la noradrenalina a nivel de la transmisión ganglionar. Con el objeto de investigar posibles interacciones entre ambos neurotransmisores en el ganglio simpático del gato, se emplearon trazadores radiactivos para la acetilcolina (ver 2.3.2.) y se estudió su liberación provocada por estimulación eléctrica preganglionar (ver 2.3.3.).

FIGURA 14

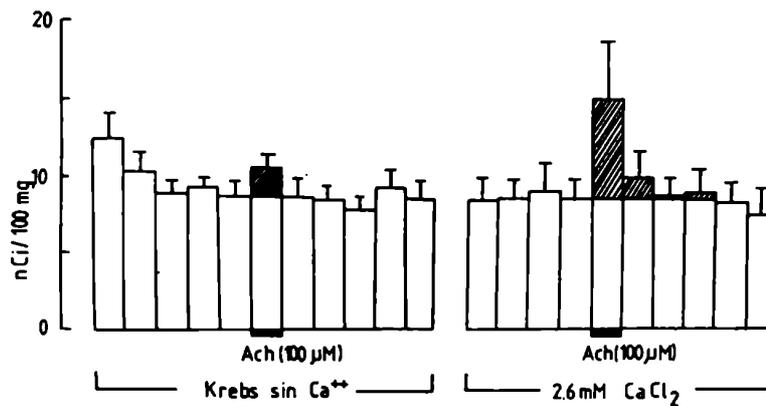
Liberación de  $^3\text{H-NA}$  por acetilcolina exógena y su dependencia del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

Marcación:  $^3\text{H-NA}$  5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Estimulación: ACh 100  $\mu\text{M}$  durante 1 min (Simultáneamente y 10 min antes, se agregó eserina 3,08  $\mu\text{M}$ ).

$\text{Ca}^{++}$ : Se omitió del medio de incubación 45 min antes de efectuar el primer pulso de ACh y se restauró 45 min antes del segundo.



Ordenada: Nanocuries por 100 miligramos de tejido y por minuto, presentes en 5 muestras anteriores y 5 muestras posteriores a cada pulso.

Barras abiertas: liberación basal.

Barras rayadas: aumento sobre los valores basales provocado por la ACh.

Abscisa: Tiempo en minutos.  $\dashv$  1 min.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 5 experimentos.

a) Control

En la figura 15 se representan los valores de liberación espontánea de acetilcolina tritiada ( $^3\text{H-ACh}$ ) y los aumentos de la liberación provocados por tres estimulaciones sucesivas. Puede observarse que la liberación espontánea de tritio disminuyó en forma semejante a lo ya descrito para la liberación espontánea de  $^3\text{H-NA}$  (ver 3.2.1. a). Es decir, después de una caída inicial rápida durante los primeros 60 minutos de lavados, la liberación de radiactividad decae con una pendiente menor que se conserva hasta el final del experimento. Esta última representa la liberación espontánea de  $^3\text{H-acetilcolina}$  (Adler-Graschinsky y cols., 1980).

En la figura 16 A se observa que aunque la respuesta del tejido disminuyó después de la primera estimulación ( $E_1$ ), las respuestas a estimulaciones posteriores ( $E_2$  y  $E_3$ ) tuvieron magnitudes similares. Estos resultados indican, por lo tanto, que la capacidad del tejido para responder a la estimulación eléctrica se mantiene aproximadamente constante a partir de la segunda estimulación. A este respecto puede verse en la figura 15 B que los cocientes entre liberaciones fraccionales de estimulaciones sucesivas tuvieron valores similares.

b) En presencia de noradrenalina exógena.

Es un hecho conocido que las catecolaminas producen potenciales inhibitorios en los ganglios simpáticos. Dun y Nishi (1974) realizaron determinaciones electrofisiológicas en el ganglio cervical superior del conejo y sugirieron que la acción hiperpolarizante de las catecolaminas podría estar mediada a través de una inhibición de la liberación de acetilcolina a partir de los terminales colinérgicos ganglionares. Esta posibilidad se investigó en el ganglio cervical supe-

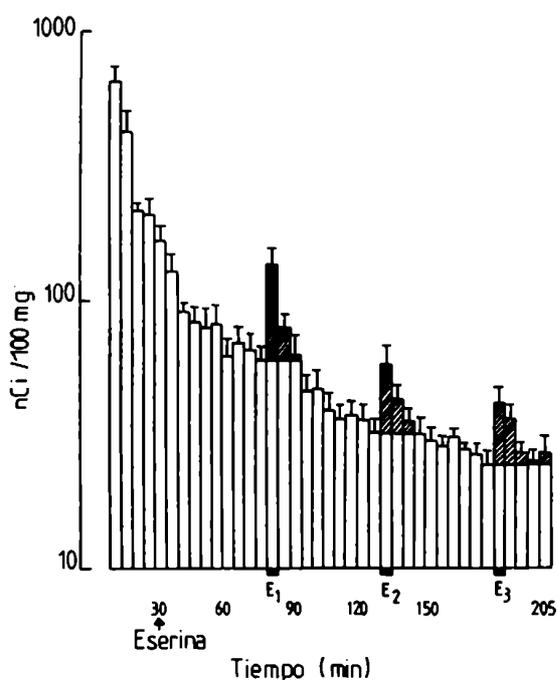
FIGURA 15

Aumento en la liberación basal de  $^3\text{H-ACh}$  provocado por la estimulación eléctrica preganglionar.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.  
( 30 min después de la marcación y hasta el final del experimento se agregó eserina en concentración 3,08  $\mu\text{M}$  ).

Marcación:  $^3\text{H-colina}$  10  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Estimulación: 5 pulsos por seg, 40 V, 2 mseg, durante 5 min.



Ordenada (Esc. log.): Nanocuries por 100 miligramos de tejido.

Barras abiertas: liberación basal.

Barras rayadas: aumento sobre los valores basales provocado por el estímulo.

Abscisa: Tiempo en minutos después de la marcación con  $^3\text{H-colina}$ .

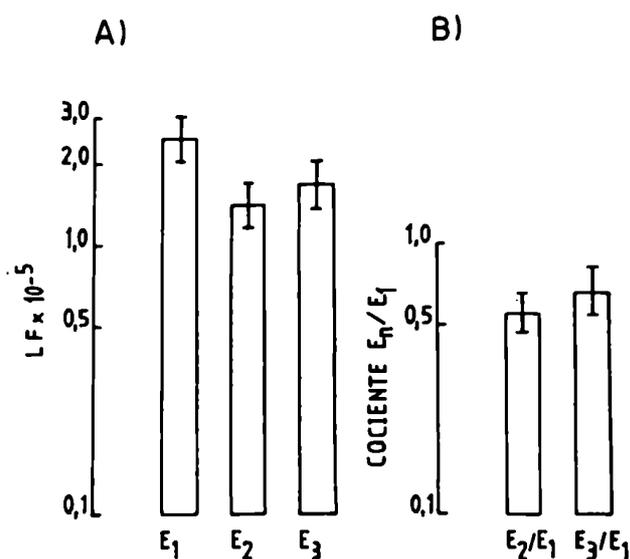
Los rectángulos inferiores señalan los períodos de estimulación.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 6 experimentos.

FIGURA 16

Liberación fraccional de  $^3\text{H-ACh}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar.

El protocolo experimental fue similar al descrito para la figura 15.



Ordenadas (Esc. log.): A) Liberación fraccional de  $^3\text{H-ACh}$  expresada como fracción del contenido tisular (  $\text{LF} \times 10^{-5}$  ) en el momento de efectuar la estimulación.

B) Cocientes entre las  $\text{LF} \times 10^{-5}$  obtenidas en el segundo ( $\text{E}_2$ ) y en el tercer ( $\text{E}_3$ ) estímulo y la obtenida en el primer ( $\text{E}_1$ ) estímulo.

Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES de 6 experimentos.

rior del gato utilizando métodos farmacológicos. A tal efecto, el ganglio se marcó con colina tritiada (ver 2.3.2.) y se estimuló preganglionarmente en presencia de noradrenalina (1-NA) exógena (ver 2.3.3.).

En la figura 17 se representan los resultados obtenidos. Puede verse en esta figura que la 1-noradrenalina exógena, en concentración 3,1  $\mu\text{M}$ , causó una disminución significativa en la liberación de  $^3\text{H}$ -acetilcolina provocada por estímulo eléctrico del nervio preganglionar. La concentración menor de 1-NA (0,31  $\mu\text{M}$ ) disminuyó la liberación de tritio por estímulo nervioso en dos de los seis experimentos realizados; sin embargo, el valor promedio de los cocientes entre liberaciones fraccionales no difirió significativamente del control respectivo.

c) En presencia de antagonistas colinérgicos.

En el ganglio cervical superior del gato, la liberación de noradrenalina provocada por estímulo eléctrico preganglionar mostró estar relacionada con vías colinérgicas de acuerdo con las siguientes evidencias: la acetilcolina exógena fue capaz de liberar  $^3\text{H}$ -NA y además, la liberación de  $^3\text{H}$ -NA causada por estímulo eléctrico disminuyó en presencia de bloqueantes colinérgicos.

En relación con la segunda evidencia se pensó que la menor liberación de  $^3\text{H}$ -NA podía deberse a que los antagonistas colinérgicos actuaran disminuyendo la liberación de acetilcolina desde los terminales colinérgicos. Para investigar esta posibilidad, se ensayó el efecto de bloqueantes colinérgicos sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -ACh provocada por la estimulación de ganglios marcados con colina tritiada (ver 2.3.3.). Los anticolinérgicos ensayados fueron el hexametonio y la atropina y se emplearon en las concentraciones que disminuyeron la liberación de

FIGURA 17

Liberación de  $^3\text{H-ACh}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar:

Efecto de la noradrenalina exógena.

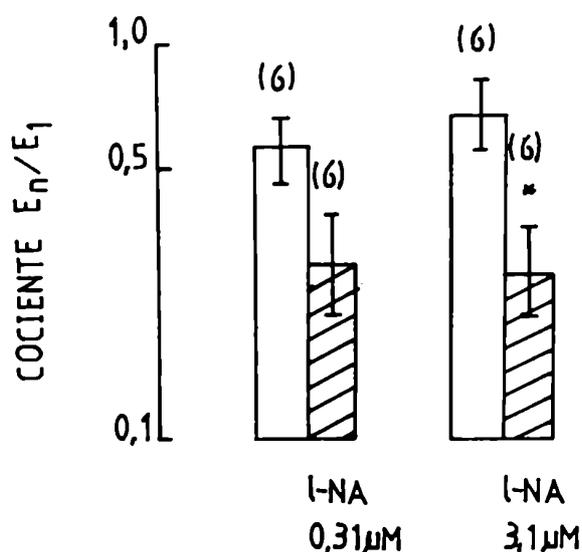
Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

( 30 min después de la marcación y hasta el final del experimento se agregó eserina en concentración 3,08  $\mu\text{M}$  ).

Marcación:  $^3\text{H-colina}$  10  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Estimulación: 5 pulsos por seg, 40 V, 2 mseg, durante 5 min.

l-NA: Se agregó al medio de incubación 25 min antes y durante la segunda ( 0,31  $\mu\text{M}$  ) y/o la tercera ( 3,1  $\mu\text{M}$  ) estimulación.



Ordenada (Esc. log.): Los cocientes  $E_n/E_1$  obtenidos en presencia de l-NA (barras rayadas) se comparan con sus equivalentes obtenidos en condiciones control (barras abiertas).

Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES de 6 experimentos.

\*  $p < 0,025$  respecto del control.

$^3\text{H}$ -NA por estímulo. Los resultados se representan en la figura 18. En ésta puede observarse que el antagonista muscarínico atropina provocó una disminución significativa en la liberación de  $^3\text{H}$ -ACh, mientras que el bloqueante nicotínico hexametonio no la modificó.

Estos resultados sugieren, por lo tanto, que la inhibición causada por el hexametonio sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -NA provocada por estímulo nervioso, se debería a un efecto directo de esta droga anticolinérgica sobre las estructuras que liberan noradrenalina, mientras que la inhibición causada por la atropina se debería a un efecto indirecto, es decir, el bloqueante muscarínico actuaría inhibiendo la liberación de acetilcolina y en consecuencia también disminuiría la liberación de noradrenalina.

#### 3.2.4. Efecto de drogas sobre la liberación espontánea de $^3\text{H}$ -noradrenalina y de $^3\text{H}$ -acetilcolina.

Determinaciones electrofisiológicas realizadas en terminales nerviosos autónomos periféricos, tanto noradrenérgicos (Smith y Winkler, 1972) como colinérgicos (Schmidt, 1978), indican que éstos poseen una actividad basal y como consecuencia de ella liberan los neurotransmisores respectivos en forma espontánea.

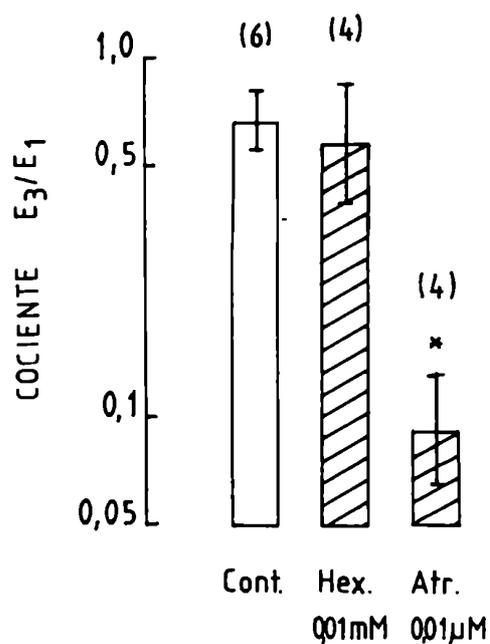
De acuerdo con los resultados mostrados más arriba, el ganglio cervical superior del gato también presentó liberación espontánea tanto de  $^3\text{H}$ -noradrenalina (ver 3.2.1.a) como de  $^3\text{H}$ -acetilcolina (ver 3.2.3.a). En consecuencia, se consideró oportuno analizar si las drogas empleadas en los ensayos sobre liberación de  $^3\text{H}$ -NA y/o de  $^3\text{H}$ -ACh por estímulo preganglionar, presentaban alguna acción sobre la liberación basal de los neurotransmisores mencionados.

FIGURA 18

Liberación de  $^3\text{H-ACh}$  provocada por la estimulación eléctrica preganglionar:

Efecto de antagonistas colinérgicos.

El protocolo experimental fue similar al descripto para la figura 17. Los antagonistas colinérgicos empleados fueron el hexametonio (HEX.) y la atropina (ATR.). Estos se agregaron al medio de incubación 25 min antes y durante la tercera estimulación.



Ordenada (Esc. log.): Los cocientes  $E_3/E_1$  obtenidos en presencia de los bloqueantes colinérgicos (barras rayadas) se comparan con el cociente equivalente del control (barra abierta).

Los datos mostrados representan la media geométrica  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

\*  $p < 0,001$  respecto del control.

a) Liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -noradrenalina

En las figuras 19 A, 19 B y 19 C se muestran los resultados obtenidos con las concentraciones mayores de las distintas drogas ensayadas. Puede verse que la liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -NA no se modificó cuando se agregaron las drogas a la solución de Krebs. Las otras concentraciones ensayadas, no mostradas en la figura 19, tampoco modificaron la liberación basal de noradrenalina tritizada.

b) Liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -acetilcolina

Tal como se muestra en la figura 20, la liberación basal de  $^3\text{H}$ -ACh tampoco fue modificada por las drogas ensayadas.

3.3. CONTENIDO TISULAR ENDOGENO DE NORADRENALINA

Control y efecto de drogas.

El contenido endógeno del neurotransmisor adrenérgico es mantenido dentro de un nivel constante como resultado del equilibrio existente entre las velocidades de síntesis y de degradación o de utilización (Weiner, 1970). Sin embargo, algunas drogas pueden desplazar este equilibrio interfiriendo con los mecanismos mencionados. Por lo tanto, se consideró de interés analizar si las drogas ensayadas produjeron alguna modificación en el contenido tisular de noradrenalina.

En la tabla II se resumen los resultados obtenidos cuando se determinó el contenido de noradrenalina (ver 2.4.) en los ganglios utilizados en los experimentos de liberación de neurotransmisores por estímulo eléctrico. En esta tabla puede apreciarse que, aunque algunas de las drogas mostraron una tendencia a disminuir el contenido tisular de NA, sin embargo, ninguna de ellas lo

FIGURA 19 A

Liberación espontánea de  $^3\text{H-NA}$ : Efecto de agonistas y de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos.

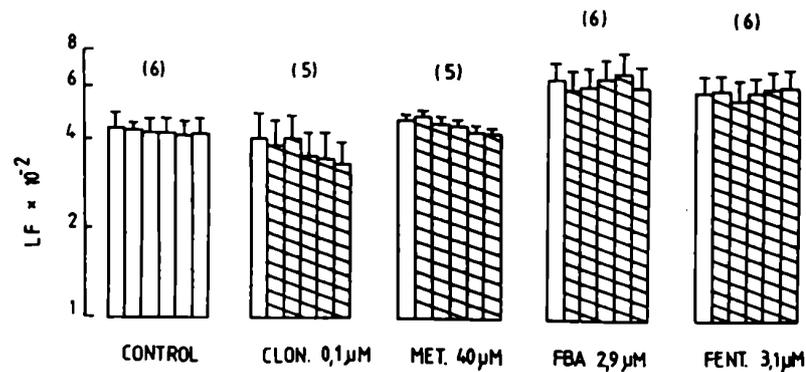
Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

Marcación:  $^3\text{H-NA}$  5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Drogas: Se agregaron el medio de incubación, por un período de 25 min, 105min y/o 155 min luego de la marcación.

CLON.: clonidina; MET.: metoxamina; FBA: fenoxibenzamina;

FENT.: fentolamina.



Ordenada (Esc. log.): Liberación de  $^3\text{H-NA}$  expresada como fracción del contenido tisular (  $\text{LF} \times 10^{-2}$  ) para cada muestra.

Barras abiertas: en ausencia de drogas.

Barras rayadas: en presencia de drogas.

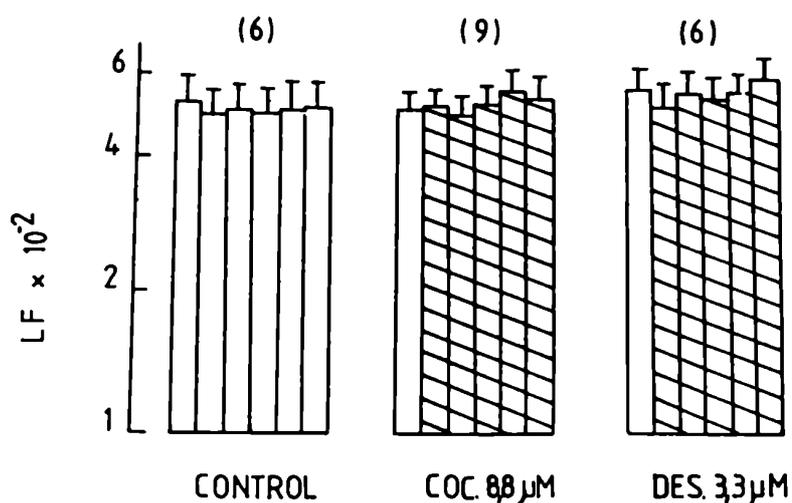
Abscisa: Tiempo en minutos. H 5 min.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

FIGURA 19 B

Liberación espontánea de  $^3\text{H-NA}$ : Efecto de inhibidores de la captación de noradrenalina.

El protocolo experimental fue similar al descrito para la figura 19 A. Las drogas empleadas en este caso fueron la cocaína (COC.) y la desmetilimipramina (DES.).



Ordenada (Esc. log.): Liberación de  $^3\text{H-NA}$  expresada como fracción del contenido tisular ( $\text{LF} \times 10^{-2}$ ) para cada muestra.

Barras abiertas: en ausencia de drogas.

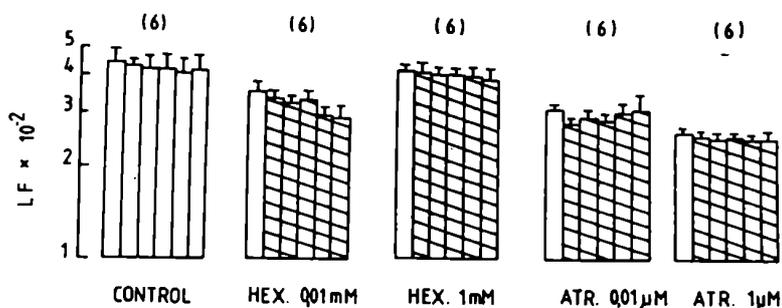
Barras rayadas: en presencia de drogas.

Abscisa: Tiempo en minutos.  $\lrcorner$  5 min.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

**FIGURA 19 C****Liberación espontánea de  $^3\text{H-NA}$ : Efecto de antagonistas colinérgicos.**

El protocolo experimental fue similar al descrito para la figura 19 A. Las drogas empleadas en este caso fueron el hexametonio (HEX.) y la atropina (ATR.).



Ordenada (Esc. log.): Liberación de  $^3\text{H-NA}$  expresada como fracción del contenido tisular (  $\text{LF} \times 10^{-2}$  ) para cada muestra.

Barras abiertas: en ausencia de drogas.

Barras rayadas : en presencia de drogas.

Abscisa : Tiempo en minutos.  $\text{H}$  5 min.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

FIGURA 20

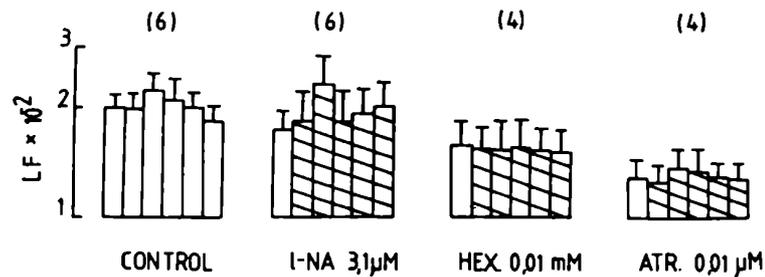
Liberación espontánea de  $^3\text{H-ACh}$ : Efecto de antagonistas colinérgicos y de la noradrenalina exógena.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C, con agregado de eserina en concentración 3,08  $\mu\text{M}$ .

Marcación:  $^3\text{H-colina}$  10  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

Drogas: Se agregaron al medio de incubación, por un período de 25 min, 155 min luego de la marcación.

HEX.: hexametonio; ATR.: atropina; 1-NA: noradrenalina.



Ordenada (Esc. log.): Liberación de  $^3\text{H-ACh}$  expresada como fracción del contenido tisular (  $\text{LF} \times 10^{-2}$  ) para cada muestra.

Barras abiertas: en ausencia de drogas.

Barras rayadas: en presencia de drogas.

Abscisa: Tiempo en minutos.  $\text{—}$  5 min.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES del número de experimentos indicado sobre las barras.

TABLA II

Contenido tisular endógeno de noradrenalina: Efecto de las distintas drogas ensayadas.

Incubación: Solución de Krebs, 37°C.

Marcación:  $^3\text{H-NA}$  5  $\mu\text{Ci/ml}$  ó  $^3\text{H-colina}$  10  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.

NA endógena: Al finalizar los experimentos de liberación de neurotransmisores, los ganglios fueron empleados para determinar el contenido tisular de noradrenalina.

Experimento	n	Concentración de droga ( $\mu\text{M}$ )	NA endógena ( $\mu\text{g NA/g tej}$ )
Control	8	- -	3,92 $\pm$ 0,72
Clonidina	5	0,01	4,62 $\pm$ 0,83
Metoxamina	4	12,0	2,75 $\pm$ 0,71
Fenoxibenzamina	5	2,9	5,58 $\pm$ 1,26
Fentolamina	6	3,1	3,50 $\pm$ 1,09
Cocaína	9	8,8	4,06 $\pm$ 0,90
Desmetilimipramina	6	3,3	4,30 $\pm$ 0,96
Hexametonio	5	1000,0	4,03 $\pm$ 0,29
Atropina	3	1,0	2,83 $\pm$ 0,84
1-Noradrenalina	6	3,1	4,44 $\pm$ 0,69
Eserina	6	3,08	4,07 $\pm$ 0,50

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES del número de experimentos (n).

modificó en forma significativa.

Por otra parte, si se compara la NA endógena determinada en los ganglios que fueron estimulados en condiciones control (tabla II) con la determinada en los ganglios no estimulados ni tratados con drogas (tabla I), puede concluirse que la estimulación eléctrica tampoco modificó el contenido tisular de noradrenalina.

#### 3.4. DISTRIBUCION METABOLICA de la $^3\text{H}$ -NORADRENALINA

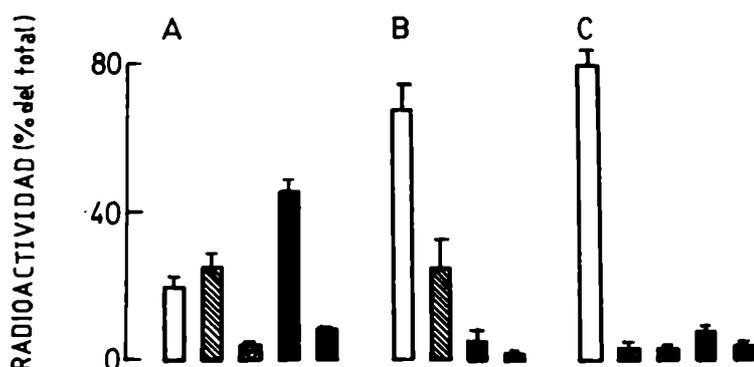
Las enzimas metabolizantes de la noradrenalina producen a partir de ésta cinco metabolitos (ver fig. 2 y 2.5.). En los terminales nerviosos adrenérgicos periféricos la distribución metabólica de la NA presenta, en términos generales, diferencias características si se comparan la producida durante la liberación espontánea con la resultante en la liberación por estímulo (Langer, 1974). Por lo tanto, se consideró de interés analizar la distribución metabólica de la  $^3\text{H}$ -noradrenalina bajo los tres aspectos siguientes: liberación espontánea, liberación por estímulo eléctrico y retención tisular. Los resultados obtenidos al respecto se resumen en la figura 21.

El análisis de la radiactividad liberada espontáneamente (fig. 21 A) dió como resultado un 20% de  $^3\text{H}$ -NA. Los principales metabolitos fueron la fracción de O-metilados deaminados que representó el 50% y el glicol deaminado (DOPEG) que constituyó el 25% de la radiactividad total liberada.

La radiactividad liberada por estímulo eléctrico (fig. 21 B) consistió principalmente de  $^3\text{H}$ -NA sin metabolizar (70%). El glicol deaminado DOPEG representó la principal fracción metabólica del tritio liberado por estímulo.

Finalmente, el tritio remanente en el tejido (fig. 21 C) fue principalmente el correspondiente a la  $^3\text{H}$ -NA sin metabolizar (81%).

FIGURA 21

Distribución metabólica de la noradrenalinaIncubación: Solución de Krebs, 37°C.Marcación:  $^3\text{H-NA}$  5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 30 min.Estimulación: 10 pulsos por seg, 80 V, 2 mseg, durante 5 min.Ordenada: Radiactividad de cada fracción metabólica expresada como porcentaje del total.

- A) Liberación espontánea en las muestras recogidas 80 min después de marcar el tejido.
- B) Aumento de la liberación sobre el nivel basal provocado por el estímulo.
- C) Tritio retenido en el tejido al final del experimento (205 min después de marcar el tejido).

□ :  $^3\text{H-NA}$ ; ▨ :  $^3\text{H-DOPEG}$ ; ▩ :  $^3\text{H-DOMA}$ ; ▮ :  $^3\text{H-OMDA}$  (VMA + MOPEG); ■ :  $^3\text{H-NMN}$ .

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 6 experimentos.

4. D I S C U S I O N

Y

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

#### 4.1. DISCUSION

##### 4.1.1. Captación de noradrenalina tritiada.

Hamberger y cols. (1964) describieron que la neurona adrenérgica, en su totalidad, posee la propiedad de captar y de concentrar noradrenalina y dopamina y sugirieron que el mecanismo de captación y/o de concentración de aminas operaba tanto en los terminales nerviosos como en los axones y dendritas de la neurona postganglionar.

Los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo demuestran que la noradrenalina tritiada es almacenada por el ganglio cervical superior (G.C.S.) aislado del gato y posteriormente liberada espontáneamente por estímulo nervioso preganglionar.

El hecho que la captación de  $^3\text{H}$ -NA fuera inhibida por la cocaína y por la desmetilimipramina sugiere la existencia de una bomba de membrana (Hillarp y Malmfors, 1964) que sería la responsable de la acumulación de noradrenalina en el tejido ganglionar.

##### 4.1.2. Estructuras ganglionares involucradas en los fenómenos de captación y de liberación de noradrenalina tritiada.

De acuerdo con estudios morfológicos realizados por varios autores, en el tejido ganglionar existen tres estructuras que pueden estar involucradas en los fenómenos de captación y de liberación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina:

- a) la interneurona o célula SIF (Libet, 1970)
- b) los terminales nerviosos adrenérgicos descritos por Noon y cols. (1975).
- c) las dendritas de la neurona postganglionar (Jacobowitz, 1970).

En el G.C.S. del gato la interneurona contiene dopamina (Björklund y cols., 1970). Aunque la noradrenalina puede ser captada tanto por estructuras noradrenérgicas como dopaminérgicas, se ha descrito que la desmetilimipramina inhibe selectivamente el proceso de captación de catecolaminas en neuronas noradrenérgicas y que en las concentraciones empleadas en este trabajo no afecta la captación de noradrenalina o de dopamina en estructuras dopaminérgicas (Carlson y cols. 1966; Coyle y Snyder, 1969; Horn y cols, 1971). Por lo tanto, la inhibición de la captación de  $^3\text{H-NA}$  causada por la desmetilimipramina en el ganglio del gato sugiere que este fenómeno ocurre en estructuras noradrenérgicas más que en dopaminérgicas.

Por otra parte, aunque las células SIF fueron descritas para los ganglios simpáticos de todos los mamíferos estudiados (Norberg y Sjöqvist, 1966; Jacobowitz, 1970; Olson, 1967; Hervonen y Kanerva, 1972; Chiba y cols., 1975), la población de células SIF en el ganglio del gato es muy escasa comparada con la de otras especies (Chiba y Williams, 1975).

En consecuencia, los resultados presentados sugieren que los terminales nerviosos adrenérgicos propuestos por Noon y cols. (1975) o las dendritas de la neurona postganglionar serían los posibles sitios donde se verifica la acumulación de  $^3\text{H-NA}$  y su liberación por estímulo eléctrico preganglionar en el ganglio cervical superior del gato.

En varios trabajos se ha descrito la existencia de una intrincada red de fibras adrenérgicas en el ganglio cervical superior (Jacobowitz, 1970; Eränko, 1978). Según la especie analizada existe la posibilidad que algunos terminales de axones postganglionares simpáticos no salgan del ganglio o que salgan y luego emitan colaterales hacia el ganglio. Estas fibras adrenérgicas representan pro-

bables sitios donde se verificaría la liberación de noradrenalina. Sin embargo, la proporción de  $^3\text{H-NA}$  sin metabolizar liberada tanto espontáneamente como por estímulo preganglionar del ganglio del gato fue dos veces mayor que la registrada para los terminales nerviosos postganglionares presentes en la membrana nictitante del gato (Luchelli-Fortis y Langer, 1975), que provienen del ganglio cervical superior.

El análisis del destino metabólico seguido por la noradrenalina en el G.C.S. del gato y en la membrana nictitante del gato indica que las estructuras noradrenérgicas que almacenan y liberan  $^3\text{H-NA}$  en el ganglio no se comportan en igual forma que los terminales nerviosos de las sinapsis neuroefectoras. La proporción de metabolitos deaminados observada en el ganglio resultó menor que la descrita para la membrana (Luchelli-Fortis y Langer, 1975). Aunque esta diferencia sugiere una menor actividad de la monoaminoxidasa en el ganglio, Stefano y Filinger (1978) describieron que la actividad de esta enzima es casi idéntica en ambos tejidos.

Filinger y Rubio (1976) observaron que 40 horas después de administrar 6-OH-dopamina a gatos adultos no se modificó ni el contenido endógeno de NA en el ganglio ni la liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por concentraciones elevadas de  $\text{K}^+$ . La simpatectomía química con 6-OH-dopamina provoca la destrucción selectiva de terminales nerviosos adrenérgicos sin dañar los cuerpos celulares (Tranzer y Thoenen, 1968). Por lo tanto, de acuerdo con las observaciones de Filinger y Rubio, una proporción importante de la NA presente en el G.C.S. del gato estaría localizada en los cuerpos celulares de las neuronas postganglionares y además, la  $^3\text{H-NA}$  liberada por  $\text{K}^+$  provendría de dendritas y no de terminales nerviosos. En las presentes condiciones experimentales la estimulación preganglionar del ganglio cervical superior provocaría un fenómeno semejante. En consecuencia las dendritas de la

neurona postganglionar parecen ser los sitios probables donde se almacena y libera NA en el ganglio cervical superior del gato. En apoyo de esta hipótesis Giacobini y cols. (1970) encontraron, en el ganglio cervical superior del gato, que las catecolaminas se encuentran principalmente en los cuerpos celulares de las neuronas postganglionares.

#### 4.1.3. Características de la liberación de noradrenalina

La liberación de noradrenalina tritiada provocada por el estímulo eléctrico preganglionar del G.C.S. del gato resultó dependiente del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular. Este hecho sugiere la participación de un mecanismo de exocitosis (Boullin, 1967; Douglas, 1968; Rubin, 1970) en la liberación del neurotransmisor adrenérgico.

Además, el análisis de las fracciones metabólicas de la radiactividad liberada por estímulo eléctrico mostró que el tritio liberado correspondió en forma predominante a la  $^3\text{H}$ -NA sin metabolizar, a pesar de la alta proporción de metabolitos observada en el eflujo espontáneo. Este hecho sugiere que la liberación de noradrenalina provocada por el estímulo se produjo a partir de gránulos o vesículas. En relación con esto se ha descrito que la reserpina depleciona el contenido endógeno de NA en el G.C.S. (Trendelenburg, 1961; Fischer y Snyder, 1965; Hamberger y cols., 1964). Cabe mencionar que Geffen y cols. (1976), refirieron que en las dendritas de la sustancia nigra, la despolarización con concentraciones elevadas de  $\text{K}^+$  provoca una liberación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de  $^3\text{H}$ -DA lo que sugiere que la liberación de neurotransmisores por un mecanismo excitótico no estaría restringido a los terminales axonales.

La liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por el estímulo eléctrico preganglionar fue disminuída por los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos clonidina y metoxamina y aumentada por los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos fenoxibenzamina y fentolamina. Estos resultados sugieren que en el G.C.S. del gato opera un mecanismo regulatorio de retroinformación negativa, mediado por receptores  $\alpha$ , semejante al que fuera descrito para los terminales nerviosos de varias preparaciones periféricas (Langer, 1977; Starke, 1977).

Boonyviroj y cols. (1977) observaron que en las células cromafines de la médula adrenal de la rata el agonista  $\alpha$ -adrenérgico fenilefrina disminuye la liberación exocitótica de catecolaminas y de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, lo que sugiere que la inhibición de la liberación de NA a través de la activación de receptores  $\alpha$  no está restringida a terminales nerviosos.

El aumento inducido por la fenoxibenzamina en la liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por el estímulo preganglionar del ganglio cervical superior del gato, representó sólo un 40% del aumento provocado por este bloqueante  $\alpha$  en la liberación de NA a partir de terminales nerviosos de la membrana nictitante del gato. En esta última preparación una concentración similar de fenoxibenzamina aumenta 5 veces la liberación de  $^3\text{H-NA}$  por estímulo nervioso postganglionar a 10 pulsos por segundo (Enero y cols., 1972), lo que indicaría que el mecanismo regulatorio  $\alpha$ -presináptico es más eficiente en los terminales nerviosos que en las dendritas de la neurona postganglionar.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados del presente trabajo, la concentración de clonidina requerida para disminuir la liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por estímulo del nervio cervical superior fue mucho menor que la concentración equiefectiva de metoxamina. A este respecto, distintas evidencias experimen

tales indican que la clonidina es un agonista selectivo para receptores  $\alpha$  del tipo presináptico, mientras que la metoxamina activa preferentemente receptores  $\alpha$  postsinápticos (Starke y cols., 1974. y 1977). Estas observaciones sugieren que los receptores  $\alpha$  adrenérgicos implicados en la liberación de  $^3\text{H-NA}$  a partir de dendritas de la neurona postganglionar en el ganglio cervical superior del gato se comportan farmacológicamente como receptores presinápticos. En apoyo de esta teoría puede mencionarse que recientemente Brown y Caulfield (1979), observaron que los receptores que median la respuesta hiperpolarizante en el ganglio cervical superior de la rata son del tipo  $\alpha_2$  o  $\alpha$  presináptico.

El efecto inhibitorio de la metoxamina sobre la liberación de NA por estímulo mostró tener una relación directa con la concentración de la droga. Por el contrario en el caso de la clonidina las concentraciones más elevadas no modificaron la liberación de  $^3\text{H-NA}$  por estímulo mientras que la menor concentración (0,001  $\mu\text{M}$ ) la disminuyó significativamente. Este hecho puede explicarse considerando que la clonidina se caracteriza por ser un agonista parcial (Goodman y Gilman, 1975; Medgett y cols., 1978; Pelayo y cols., 1980). Es decir, que en las concentraciones más altas empleadas en este trabajo, la clonidina se comportaría como un antagonista  $\alpha$ -adrenérgico y, por lo tanto, tendería a aumentar, mas que a disminuir, la liberación de  $^3\text{H-NA}$  por estimulación nerviosa.

Con respecto al aumento en la liberación de  $^3\text{H-NA}$  por estímulo preganglionar provocado por la desmetilimipramina (3,3  $\mu\text{M}$ ), éste se debería al bloqueo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos mas que a la inhibición de la captación neuronal. Esta conclusión se basa en la observación que ni la cocaína, ni la concentración de desmetilimipramina que no antagonizó las respuestas de la

membrana nictitante a la metoxamina, aumentaron la liberación de tritio provocada por el estímulo del nervio cervical superior.

El efecto bloqueante  $\alpha$  de concentraciones altas de desmetilimipramina también fue observado por McCulloch y Story (1972) en la arteria aislada de la oreja del conejo. Por su parte, U'Prichard y cols. (1978) refirieron que, en el cerebro de rata, los antidepresivos tricíclicos compiten con los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos por el mismo sitio de unión y Svenson y Usdin (1978) sugirieron que la inhibición provocada por los antidepresivos tricíclicos en las neuronas noradrenérgicas del cerebro de rata es mediada a través del bloqueo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos presinápticos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son compatibles con la teoría que la liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por estímulo preganglionar del ganglio cervical superior del gato es regulada a través de un mecanismo de retroinformación negativa mediado por la activación de receptores  $\alpha$  de tipo presináptico. Estas evidencias sugieren, además, que este mecanismo regulatorio para la liberación de NA por estímulo no se restringe a terminales nerviosos sino que también se verifica en las dendritas de la neurona postganglionar adrenérgica.

#### 4.1.4. Acción de la acetilcolina sobre la liberación de noradrenalina.

La liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por el estímulo preganglionar puede ser el resultado de un efecto despolarizante directo sobre las dendritas de la neurona postganglionar, pero puede deberse también a un efecto indirecto mediado por la acetilcolina endógena que se libera como consecuencia de la estimulación del tronco preganglionar. El efecto liberador de la acetilcolina sería semejante al descrito para la liberación de adrenalina en la glándula adrenal del gato

(Douglas y Rubin, 1961).

En nuestras condiciones experimentales la incubación con ACh provocó la liberación de  $^3\text{H-NA}$  en forma  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente. Este hecho sugiere que la ACh endógena promovería la liberación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de NA observada durante la estimulación eléctrica preganglionar, al actuar sobre las dendritas de la neurona postganglionar, probablemente favoreciendo la entrada de calcio (Stallcup, 1979).

Por otra parte, se observó que el bloqueo de los receptores colinérgicos con hexametonio y con atropina redujo la liberación de  $^3\text{H-NA}$  provocada por el estímulo nervioso sin afectar la liberación espontánea de noradrenalina.

Recientemente Greene y Rein (1978) observaron que la estimulación de receptores nicotínicos y muscarínicos en células disociadas de ganglios simpáticos de embrión de pollo provoca la liberación de  $^3\text{H-NA}$  en forma  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente. Además, de acuerdo con resultados obtenidos por Guiorguieff y cols. (1977), el bloqueante muscarínico atropina y al bloqueante nicotínico pempidina antagonizan la liberación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de  $^3\text{H-dopamina}$  provocada por la ACh en la corteza del estriado de la rata. Estos autores concluyeron que existían receptores colinérgicos excitatorios de tipo nicotínico y de tipo muscarínico en los terminales dopaminérgicos del estriado.

De acuerdo con nuestros resultados experimentales, existiría la posibilidad que la ACh endógena active receptores colinérgicos, tanto nicotínicos como muscarínicos, en la neurona postganglionar y de esta manera provoque la liberación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de noradrenalina en el ganglio del gato.

Sin embargo, a pesar que el efecto del hexametonio sobre la liberación de  $^3\text{H-NA}$  parece ser el resultado de su interacción con receptores nicotínicos

localizados en las dendritas postganglionares, la disminución causada por la atropina en la liberación de  $^3\text{H}$ -NA puede ser atribuida a la menor cantidad de ACh endógena que llega a la neurona postganglionar. Estas observaciones sugieren que la activación de receptores nicotínicos por acción de la ACh endógena despolariza las dendritas y que esta despolarización provoca la liberación de noradrenalina. Con respecto a la acción de la atropina sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -ACh a partir de las fibras preganglionares, es necesario realizar más estudios para determinar si es mediada a través de receptores muscarínicos facilitatorios presinápticos o si está involucrado otro mecanismo de acción.

Cabe destacar que, de acuerdo con los estudios realizados en los últimos años, la liberación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de noradrenalina puede ser regulada a través de la activación de distintos receptores. Las evidencias presentadas en este trabajo son compatibles con la hipótesis que además del efecto liberador referido para la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Adler-Graschinsky y Langer, 1975) y propuesto para la angiotensina, la serotonina y la prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  (Westfall, 1977), la activación de receptores colinérgicos nicotínicos también aumenta la liberación  $\text{Ca}^{++}$ -dependiente de NA.

#### 4.1.5. Papel fisiológico de la noradrenalina.

En el ganglio cervical superior del gato marcado *in vitro* con  $^3\text{H}$ -colina, la liberación de radiactividad provocada por el estímulo fue reducida en un 40% con respecto del control por acción de la 1-NA ( $3,1 \mu\text{M}$ ). La acción inhibitoria de las catecolaminas sobre la liberación de ACh fue observada por distintos autores para el ganglio cervical superior del conejo (Christ y Nishi, 1971;

Dawes y Vizi, 1973) y del cobayo (Dun y Karczmar, 1977). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el ganglio cervical superior del gato pueden ser considerados como una evidencia adicional acerca de que una fuente endógena de catecolaminas media un proceso inhibitorio presináptico en la transmisión ganglionar.

#### 4.1.6. Diferencias entre especies .

Cuando se analizan los fenómenos de transmisión ganglionar es muy importante tener presente que existen diferencias marcadas entre las distintas especies. A título ilustrativo cabe mencionar los ejemplos que se detallan a continuación:

1) A diferencia de lo encontrado en este trabajo para el G.C.S. del gato, en el G.C.S. de la rata las catecolaminas no son liberadas en respuesta a un estímulo nervioso de 10 pulsos por segundo y el aumento de su síntesis provocado por la estimulación no es afectado ni por el hexametonio ni por la atropina (Steinberg y Keller, 1978).

2) Estudios histoquímicos realizados en el G.C.S. del conejo (Green-gard y Keabian, 1974) y en el de la vaca (Chiba y cols., 1975) revelan que la incubación con dopamina provoca un aumento en el contenido de AMP cíclico que involucraría la participación de células SIF de tipo I. Sin embargo, en el G.C.S. del gato, luego de la incubación con dopamina o con noradrenalina no se modifican los niveles de AMP cíclico (Black y cols., 1974; Williams y cols., 1975).

3) En el G.C.S. del gato las células SIF del tipo I, que contienen dopamina son muy escasas o están ausentes, mientras que en los ganglios del

conejo y de la vaca son bastante frecuentes (Chiba y Williams, 1975).

Cabe destacar que las observaciones realizadas por Hervonen y cols. (1979) en los ganglios simpáticos humanos indican que, a semejanza de lo encontrado para los ganglios del gato (Chiba y Williams, 1975), la población de células SIF que contienen dopamina es muy escasa. En consecuencia, el ganglio cervical superior del gato parece ofrecer un modelo adecuado para estudiar la farmacología de los ganglios autónomos.

#### 4.2. CONCLUSIONES

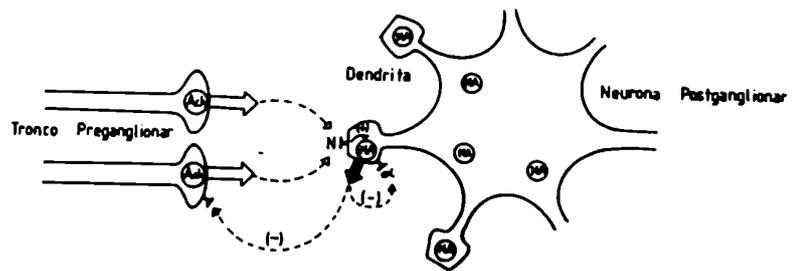
De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir lo siguiente (fig. 22):

- \* En el ganglio cervical superior del gato la ACh liberada por la estimulación del tronco preganglionar provoca la liberación de NA a partir de las dendritas de la neurona postganglionar.
- \* Esta liberación  $Ca^{++}$ -dependiente de NA sería provocada por la activación de receptores nicotínicos localizados en las dendritas.
- \* La liberación de NA posee un mecanismo de autorregulación por retroinformación negativa mediado por la activación de receptores  $\alpha$  del tipo presináptico.
- \* La NA liberada de las dendritas postganglionares en el ganglio del gato parece jugar un papel fisiológico en la transmisión ganglionar inhibiendo la liberación de ACh de las fibras preganglionares colinérgicas.



FIGURA 22

Esquema explicativo de las conclusiones



PARTE DE ESTOS RESULTADOS HAN SIDO PUBLICADOS EN LOS SIGUIENTES TRABAJOS:

- \* Effects of propranolol, methysergide and clonidine on the release of <sup>3</sup>H-noradrenaline from the rat cerebral cortex and the cat superior cervical ganglion.

Adler-Graschinsky, E. and Martínez, A.E.

In: "Presynaptic Receptors". Pergamon Press. pp. 299-304, 1979.

- \* Release of norepinephrine induced by preganglionic stimulation of the isolated superior cervical ganglion of the cat.

Martínez, A.E. and Adler-Graschinsky, E.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 212: 527-532, 1980.

- \* Modulatory role of alpha adrenoceptors on the release of <sup>3</sup>H-norepinephrine elicited by preganglionic stimulation of the cat superior cervical ganglion.

Martínez, A.E. and Adler-Graschinsky, E.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 212: 533-535, 1980.

5. REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS

ADLER-GRASCHINSKY, E. y LANGER, S.Z.

Possible role of a  $\beta$ -adrenoceptor in the regulation of noradrenaline release by nerve stimulation through a positive feed-back mechanism.  
Brit. J. Pharmacol. 53: 43 - 50, 1975.

ADLER-GRASCHINSKY, E., LANGER, S.Z. y RUBIO, M.C.

Metabolism of norepinephrine released by phenoxybenzamine in isolated guinea-pig atria.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 180: 286 - 301, 1972.

ADLER-GRASCHINSKY, E., PIMENTA, A.F. y DINIZ, C.R.

Comparison of the release of endogenous and of  $^3\text{H}$ -acetylcholine from slices of the rat cerebral cortex.  
Acta physiol. latinoamericana XXX(2): 89 - 96, 1980.

AHLQUIST, R.P.

A study of the adrenotropic receptors.  
Am. J. Physiol. 153: 586 - 600, 1948.

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

Reserpine-resistant uptake mechanism of noradrenaline in tissues.  
Life Sci. 2: 889 - 894, 1963.

ANTON, A.H. y SAYRE, D.F.

A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 138: 360 -375, 1962.

AXELROD, J., WEIL-MALHERBE, H. y TOMCHICK, R.

The physiological disposition of  $^3\text{H}$ -epinephrine and its metabolite metanephrine.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 127: 251 - 256, 1959.

BERNARD, C.

Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux  
vegetaux.

Baillièrè. Paris. 1878.

BIRKS, R.I. y MACINTOSH, F.C.

Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion.

Can. J. Biochem. Physiol. 39: 787 - 827, 1961.

BJÖRKLUND, A., CEGRELL, L., FALCK, B. RITZEN, M. y ROSENGREN, E.

Dopamine-containing cells in sympathetic ganglia.

Acta physiol. scand. 78: 334 - 338, 1970.

BLACK, A.C.jr., BHALLA, R.C. y WILLIAMS, T.H.

Mechanism of neural transmission in the superior cervical ganglia of  
the cat and rabbit: morphological and biochemical correlates.

Anat. Rec. 178: 311, 1974.

BLASCHKO, H.

The specific action of L-dopa decarboxylase.

J. Physiol. (Lond.) 96: 50 - 51 P, 1939.

BOONYAVIROJ, P., SEIDEN, A. y GUTMAN, Y.

PGE<sub>2</sub>, phenylephrine and dopamine-β-hydroxylase release from rat  
adrenal in-vitro.

Biochem. Pharmacol. 26: 351 - 352, 1977.

BOULLIN, D.J.

The action of extracellular cations on the release of the sympathetic  
transmitter from peripheral nerves.

J. Physiol. (Lond.) 189: 85 - 99, 1967.

BROWN, D.A. y CAULFIELD, M.P.

Hyperpolarizing " $\alpha_2$ "-adrenoceptors in rat sympathetic ganglia.  
Brit. J. Pharmacol. 65: 435 - 445, 1979.

BROWN, G.L.

Conduction in the cervical sympathetic.  
J. Physiol. (Lond.) 81: 228 - 242, 1934.

BÜLBRING, E.

The action of adrenaline on transmission in the superior cervical ganglion.  
J. Physiol. (Lond.) 103: 55 - 67, 1944.

CANNON, W.B.

Organization for physiological homeostasis.  
Physiol. Rev. 9: 399 - 431, 1929.

CARLSON, A., FUXE, K., HAMBERGER, B. y LINDQVIST, M.

Biochemical and histochemical studies on the effect of imipramine-like drugs and (+)-amphetamine on central and peripheral catecholamine neurons.  
Acta physiol. scand. 67: 481 - 497, 1966.

CHANG, H.C. y GADDUM, J.H.

Choline esters in tissue extracts.  
J. Physiol. (Lond.) 79: 255 - 285, 1933.

CHIBA, T.

Monoamine-containing paraneurons in the sympathetic ganglia of mammals.  
Arch. histol. jap. 40(Suppl.): 163 - 176, 1977.

CHIBA, T., BLACK, A.C. jr., WILLIAMS, T.H.

Biochemical and morphological studies on the small intensely fluorescent (SIF) cells of the bovine and feline superior cervical sympathetic ganglion.

Anat. Rec. 181: 331, 1975.

CHIBA, T. y WILLIAMS, T.H.

Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species.

Cell. Tiss. Res. 162: 331 - 341, 1975.

CHRIST, D.D. y NISHI, S.

Site of adrenaline blockade in the superior cervical ganglion of the rabbit.

J. Physiol. (Lond.) 213: 107 - 117, 1971.

CHUNGCHAROEN, D., de BINGH DALY, M. y SCHWEITZER, A. the late.

The blood supply of the superior cervical sympathetic and nodose ganglia in cats, dogs and rabbits.

J. Physiol. (Lond.) 118: 528 - 536, 1952.

COLLIER, B.

The preferential release of newly synthesised transmitter by a sympathetic ganglion.

J. Physiol. (Lond.) 205: 341 - 352, 1969.

COYLE, S.T. y SNYDER, S.H.

Antiparkinsonian drugs: inhibition of dopamine uptake in the corpus striatum as a possible mechanism of action.

Science (Wash. D C) 166: 899 - 901, 1969.

CROUT, R.J.

Standard Methods of Clinical Chemistry.

Academic Press. New York. Vol. 3, pp 62, 1961.

CSILLIK, B., KALMAN, G. y KNYIHÁR, E.

Adrenergic nerve endings in the feline cervical superior ganglion.

Experientia 23: 477 - 478, 1967.

DA CASTRO, F.

Sympathetic ganglia, normal and pathological.

In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System.

Edited by W. Penfield. New York: Haefuer.

Vol. I, pp 356, 1965.

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.

DAWES, P.M. y VIZI, E.S.

Acetylcholine release from the rabbit isolated superior cervical ganglion preparation.

Brit. J. Pharmacol. 48: 225 - 232, 1973.

DOUGLAS, W.W.

Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from chromaffin and other cells.

The First Gaddum Memorial Lecture. Cambridge, 1967.

Brit. J. Pharmacol. 34: 451 - 474, 1968.

DOUGLAS, W.W. y RUBIN, R.P.

The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine.

J. Physiol. (Lond.) 159: 40 - 57, 1961.

DOUGLAS, W.W. y 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.

DUN, N. y KARCZMAR, A.G.

The presynaptic site of action of norepinephrine in the superior cervical ganglion of guinea-pig.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 200: 328 - 335, 1977.

DUN, N. y NISHI, S.

Effects of dopamine on the superior cervical ganglion of the rabbit.

J. Physiol. (Lond.) 239: 155 - 164, 1974.

ECCLES, R. y LIBET, B.

Origin and blockade of the synaptic responses of curarized sympathetic ganglia.

J. Physiol. (Lond.) 157: 484 - 503, 1961.

ELFVIN, L.G.

The ultrastructure of the superior cervical sympathetic ganglion of the cat. I. The structure of the ganglion cell processes as studied by serial sections.

J. Ultrastructure Res. 8: 403 - 440, 1963.

ENERO, M.A., LANGER, S.Z., ROTHLIN, R.P. y STEFANO, F.J.E.

Role of the  $\alpha$ -adrenoceptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation.

Brit. J. Pharmacol. 44: 672 - 688, 1972.

ERANKO, O.

Small intensely fluorescent (SIF) cells and nervous transmission in sympathetic ganglia.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18: 417 - 430, 1978.

ERÄNKÖ, O. y HÄRKÖNEN, M.

Histochemical demonstration of fluorogenic amines in the cytoplasm of sympathetic ganglion cells of the rat.

Acta physiol. scand. 58: 285 -286, 1963.

ERÄNKÖ, O. y HÄRKÖNEN, M.

Monoamine-containing small cells in the superior cervical ganglion of the rat and an organ composed of them.

Acta physiol. scand. 63: 511 - 512, 1965.

EULER, U.S. y LISHAJKO, F.

Inhibitory action of adrenergic blocking agents on reuptake and net uptake in nerve granules.

Acta physiol. scand. 74: 501 -506, 1968.

FALCK, B., HILLARP, N.A., THIEME, G. y TORP, A.

Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde.

J. Histochem. Cytochem. 10: 348 -354, 1962.

FALCK, B., OWMAN, C. y SJÖSTRAND, N.O.

Peripherally located adrenergic neurons innervating the vas deferens and the seminal vesicle of the guinea-pig.

Experientia 21: 98 - 100, 1965.

FELDBERG, W. y GADDUM, J.H.

The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion.

J. Physiol. (Lond.) 80: 12 - 13 P, 1933.

FELDBERG, W. y GADDUM, J.H.

The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion.

J. Physiol. (Lond.) 81: 305 - 319, 1934.

- FELDBERG, W., MINZ, B. y TSUDZIMURA, H.  
The mechanism of nervous discharge of adrenaline.  
J. Physiol. (Lond.) 80: 15 - 16 P, 1933.
- FELDBERG, W. y VARTIAINEN, A.  
Further observations on the physiology and pharmacology of a sympathetic ganglion.  
J. Physiol. (Lond.) 83: 103 -128, 1935.
- FIELD, H.E. y TAYLOR, M.F.  
An atlas of cat anatomy.  
The University of Chicago Press. Chicago. Illinois. 1950.
- FILINGER, E. y RUBIO, M.C.  
Comparative study of the release of  $^3\text{H}$ -noradrenaline induced by potassium in the cell body and in the nerve-endings of the post-ganglionic sympathetic neuron.  
Acta physiol. latinoamericana 26: 76, 1976.
- FISCHER, J.E. y SNYDER, S.H.  
Disposition of tritiated noradrenaline in sympathetic ganglia.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 150: 190 - 195, 1965.
- FRIESEN, A.J.D., KEMP, J.W. y WOODBURY, D.W.  
The chemical and physical identification of acetylcholine obtained from sympathetic ganglia.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 148: 312 - 319, 1965.
- GEFFEN, L.B., JESSELL, T.M., CUFILLO, A.C. y IVERSEN, L.L.  
Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra.  
Nature (Lond.) 260: 258 - 260, 1976.

- GIACOBINI, E., KARJALAINEN, K., KERPEL-FRONIUS, S. y RITZEN, M.  
Monoamine and monoamine oxidase in denervated sympathetic ganglia  
of the cat.  
Neuropharmacology 9: 59 -66, 1970.
- GILLESPIE, J.S. y KIRPEKAR, S.M.  
The inactivation of infused noradrenaline by the cat spleen.  
J. Physiol. (Lond.) 176: 205 - 227, 1965.
- GIORGUIEF, M.F., LE FLOC'H, M.L., GLOWINSKY, J. y BESSON, M.J.  
Involvement of cholinergic presynaptic receptors of nicotinic and  
muscarinic types in the control of the spontaneous release of  
dopamine from striatal dopaminergic terminals in rat.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 200: 535 - 544, 1977.
- GOODMAN, L.S. y GILMAN, A.  
The pharmacological basis of therapeutics.  
Macmillan Publishing Co., Inc. 5<sup>th</sup> Ed. 1975.
- GRAEFE, K.H., STEFANO, F.J.E. y 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.
- GREENE, L.A. y REIN, G.  
Release of norepinephrine from neurons in dissociated cell cultures  
of chick sympathetic ganglia via stimulation of nicotinic and  
muscarinic acetylcholine receptors.  
J. Neurochem. 30: 579 - 586, 1978.
- GREENGARD, P. y KEBABIAN, J.W.  
Role of cyclic AMP in synaptic transmission in the mammalian  
peripheral nervous system.  
Fed. Proc. 33: 1059 - 1067, 1974.

GURIN, S. y DELLUVA, A.

The biological synthesis of radioactive adrenaline from phenylalanine.  
J. biol. Chem. 170: 545 -550, 1947.

HAMBERGER, B., MALMFORS, T., NORBERG, K.A. y SACHS, S.

Uptake and accumulation of catecholamines in peripheral adrenergic neurons of reserpinized animals, studied with a histochemical method.

Biochem. Pharmacol. 13: 841 - 844, 1964.

HAMBERGER, B., NORBERG, K.A.

Monoamines in sympathetic ganglia studied with fluorescence microscopy.

Experientia 19: 580 - 581, 1963.

HAMBERGER, B., NORBERG, K.A. y SJÖQVIST, F.

Cellular localization of monoamines in sympathetic ganglia of the cat.

Life Sci. 2: 659 - 661, 1963.

HÄRKÖNEN, M.

Carboxyle esterases, oxidative enzymes and catecholamines in the superior cervical ganglion of the rat and the effect of pre- and postganglionic nerve division.

Acta physiol. scand. 63 , Suppl. 237: 1 - 94, 1964.

HARVEY, J.A. y PENNEFATHER, J.N.

Effect of adrenaline infusions on the catecholamine content of cat and rat tissues.

Brit. J. Pharmac. Chemoter. 18: 183 - 189, 1962.

HEBB, C.

Biosynthesis of acetylcholine in nervous tissue.

Physiol. Rev. 52: 918 - 957, 1972.

HEDQVIST, P. y STJARNE, L.

The relative role of recapture and of de novo synthesis for the maintenance of neurotransmitter homeostasis in noradrenergic neurons.

Acta physiol. scand. 76: 270 - 283, 1969.

HERVONEN, A., ALHO, H., HELEN, P. y KANERVA, L.

Small intensely fluorescent cells of human sympathetic ganglia.

Neurosci. Lett. 12: 97 - 101, 1979.

HERVONEN, A. y KANERVA, L.

Catecholamine storing cells in human fetal superior cervical ganglion.

Acta physiol. scand. 84: 538 - 542, 1972.

HILLARP, N.-Å. y MALMFORS, T.

Reserpine and cocaine blocking of the uptake and storage mechanism in adrenergic nerves.

Life Sci. 3: 703 - 708, 1964.

HODGKIN, A.L. y HUXLEY, A.F.

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerves.

J. Physiol. (Lond.) 117: 500 - 544, 1952.

HORN, A.S., COYLE, J.T. y SNYDER, S.H.

Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain: Structure-activity relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurons.

Mol. Pharmacol. 7: 66 - 80, 1971.

IVERSEN, L.L.

The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves.

Cambridge University Press. 1967.

IVERSEN, L.L., GLOWINSKY, J. y AXELROD, J.

The physiological disposition and metabolism of norepinephrine in immunosympathectomized animals.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 151: 273 - 284, 1966.

IWANOW, G.

Das chromaffine und interneurale system des Menschen.

Z.Ges. Anat. 29: 87 - 280, 1932.

JACOBOWITZ, D

Histochemical studies of the relationships of chromaffin cells and adrenergic nerve fibres to the cardiac ganglia of several species.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 158: 227 -240, 1967.

JACOBOWITZ, D.

Catecholamine fluorescent studies of adrenergic neurons and chromaffin cells in sympathetic ganglia.

Fed. Proc. 29: 1929 - 1944, 1970.

KEBABIAN, J.W., STEINER, A.L. y GREENGARD, P.

Muscarinic cholinergic regulation of cyclic guanosine 3',5'- monophosphate in autonomic ganglia : Possible role in synaptic transmission.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 193: 474 - 488, 1975.

KIBJAKOW, A.W.

Über humorale Übertragung der Erregung von einem Neuron auf das Andere.

Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 232: 432 - 443, 1933,

KIRPEKAR, S.M., FURCHGOTT, R.F., WAKADE, A.R. y 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.

KOELLE, G.B.

Possible mechanism for the termination of the physiological actions of catecholamines.

Pharmacol. Rev. 11: 381 - 386, 1959.

KOELLE, G.B. y GILMAN, A.

Anticholinesterase drugs.

Pharmacol. Rev. 1: 166 - 216, 1949.

KOHN, A.

Die chromaffinen Zellen des Sympaticus.

Anat. Anz. 15: 399 - 400, 1898.

LANGER, S.Z.

The regulation of transmitter release elicited by nerve stimulation through a presynaptic feed-back mechanism.

In: Frontiers in Catecholamine Research.

E. Usdin y S. H. Snyder, eds. Pergamon Press. New York.

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.

LANGER, S.Z.

Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release.

Brit. J. Pharmacol. 60: 481 - 497, 1977.

LANGER, S.Z. y VOGT, M.

Noradrenaline release from isolated muscles of the nictitating membrane of the cat.

J. Physiol. (Lond.) 214: 159 - 171, 1971.

LANGLEY, J.N.

On the origin from the spinal cord of the cervical and upper thoracic sympathetic fibres with some observation on white and grey rami communicantes.

Phil. Trans. R. Soc. B 183: 85 - 124, 1892.

LANGLEY, J.N.

Note on regeneration of pre-ganglionic fibres of the sympathetic.

J. Physiol. (Lond.) 18: 280 - 284, 1895.

LAVERTY, R. y TAYLOR, K.M.

The fluorimetric assay of catecholamines and related compounds: Improvements and extension to the hydroxyindole technique.

Analyt. Biochem. 22: 269 -279, 1968.

LIBET, B.

Generation of slow inhibitory and excitatory postsynaptic potentials.

Fed. Proc. 29: 1945 - 1956, 1970.

LIBET, B y OWMAN, CH.

Concomitant changes in formaldehyde-induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory postsynaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion induced by stimulation of the pre-ganglionic nerve or by a muscarinic agent.

J. Physiol. (Lond.) 237: 635 - 662, 1974.

LIBET, B. y TOSAKA, T.

Dopamine as a synaptic transmitter and modulator in the sympathetic ganglia: A different mode of synaptic action.

Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 134 - 142, 1970.

LISAK, K.

Liberation of acetylcholine and adrenaline by stimulating isolated nerves.

Amer. J. Physiol. 127: 263 - 271, 1939.

LUCHELLI-FORTIS, M.A. y 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.

MACINTOSH, F.C.

Synthesis and storage of acetylcholine in nervous tissue.

Can. J. Biochem. Physiol. 41: 2555 - 2570, 1963.

MARRAZZI, A.S.

Adrenergic inhibition at sympathetic synapses.

Amer. J. Physiol. 127: 738 - 742, 1939a.

MARRAZZI, A.S.

Electrical studies on the pharmacology of autonomic synapses.

II. The action of sympathomimetic drug (epinephrine) on sympathetic ganglia.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 65: 395 - 404, 1939b.

MATTHEWS, M.R.

Evidence from degeneration experiments for the preganglionic origin of afferent fibres to the small-granule containing cells of the rat superior cervical ganglion.

J. Physiol. (Lond.) 218: 95 - 96 P, 1971.

MATTHEWS, M.R. y NASH, J.R.G.

An afferent synapse from a small granule containing cell to a principal neuron in the superior cervical ganglion.  
J. Physiol. (Lond.) 210: 11 - 13 P, 1970.

MATTHEWS, M.R. y RAISMAN, G.

The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion.  
J. Anat. 105: 255 - 282, 1969.

McCULLOCH, M.W. y STORY, D.F.

Antagonism of noradrenaline and histamine by desipramine in the isolated artery of the rabbit ear.  
Brit. J. Pharmacol. 46: 140 -150, 1972.

MEDGETT, J.C., McCULLOCH, M.W. y RAND, M.J.

Partial agonist action of clonidine on prejunctional and postjunctional  $\alpha$ -adrenoceptors.  
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304: 215 -221, 1978.

MUSCHOLL, E.

Effect of cocaine and related drugs on the uptake of noradrenaline by heart and spleen.  
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 16: 352 - 359, 1961.

NACHMANSOHN, B. y WILSON, I.B.

The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine.  
Adv. Enzymol. 12: 259 - 339, 1951.

NEFF, N.H. y COSTA, E.

The influence of monoamine oxidase inhibition on catecholamine synthesis.  
Life Sci. 5: 951 -959, 1966.

NJA, A. y PURVES, D.

Re-innervation of guinea-pig superior cervical ganglion cells by preganglionic fibres arising from different levels of the spinal cord.

J. Physiol. (Lond.) 272: 633 - 651, 1977.

NOON, J.P., McAFEE, D.A. y ROTH, R.H.

Norepinephrine release from nerve terminals within the rabbit superior cervical ganglion.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 291: 139 - 162, 1975.

NORBERG, K.Å. y HAMBERGER, B.

The sympathetic adrenergic neuron.

Acta physiol. scand. 63, Suppl. 238: 1 - 42, 1964.

NORBERG, K.Å., RITZEN, M. y UNGERSTEDT, U.

Histochemical studies on a special catecholamine-containing cell type in sympathetic ganglia.

Acta physiol. scand. 67: 260 - 270, 1966.

NORBERG, K.Å. y SJÖQVIST, F.

New possibilities for adrenergic modulation of ganglionic transmission.

Pharmacol. Rev. 18: 743 - 751, 1966.

OLSON, L.

Outgrowth of sympathetic adrenergic neurons in mice treated with nerve growth factor (NGF).

Z. Zellforsch. 81: 155 - 173, 1967.

PATON, D.M.

Mechanism of efflux of noradrenaline from adrenergic nerves in rabbit atria.

Brit. J. Pharmacol. 49: 614 - 627, 1973.

PELAYO, F., DUBOCOVICH, M.L. y LANGER, S.Z.

Inhibition of neuronal uptake reduces the presynaptic effects of clonidine but not of  $\alpha$ -methylnoradrenaline on the stimulation-evoked release of  $^3\text{H}$ -noradrenaline from rat occipital cortex slices.

Eur. J. Pharmacol. 64: 143 - 155, 1980.

PERRY, W.L.M.

Acetylcholine release in the cat's superior cervical ganglion.

J. Physiol. (Lond.) 119: 439 - 454, 1953.

POTTER, L.T.

Storage of norepinephrine in sympathetic nerves.

Pharmacol. Rev. 18: 439 - 451, 1966.

POTTER, L.T. y AXELROD, J.

Intracellular localization of catecholamines in tissues of the rat.

Nature (Lond.) 194: 581 - 582, 1962.

POTTER, L.T. y AXELROD, J.

Properties of norepinephrine storage particles of the rat heart.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 142: 299 - 305, 1963.

QUERIDO, A.

The function of the peripheral neurons in the conduction of impulses in the sympathetic nervous system.

Amer. J. Physiol. 70: 29 - 57, 1924.

QUERIDO, A.

Fréquence de décharge de ganglions sympathiques.

Arch. néerland. Physiol. 10: 542 - 543, 1925.

RAAB, W. y GIGEE, W.

Specific avidity of heart muscle to absorb and store epinephrine and norepinephrine.

Circulation Res. 3: 553 - 558, 1955.

RAAB, W. y HUMPHREYS, R.J.

Drug action upon myocardial epinephrine-sympathin concentration and heart rate ( nitroglycerine, papaverine, priscol, dibenamine-hydrochloride).

J. Pharmacol. Exp. Ther. 89: 64 - 76, 1947.

REINERT, H.

Role and origin of noradrenaline in the superior cervical ganglion.

J. Physiol. (Lond.) 167: 18 -29, 1963.

RUBIN, R.P.

The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones.

Pharmacol. Rev. 22: 389 - 428, 1970.

SCHMIDT, R.F.

Synaptic Transmission

IN: Fundamentals of Neurophysiology.

Ed. Robert F. Schmidt.

Springer- Verlag. 1978.

SIEGRIST, G., DOLIVO, M., DUNANT, J., FOROGLOU-KERAMEUS, O., De RIBAUPIERE, F. y ROUILLER, CH.

Ultrastructure and function of the chromaffin cells in the superior cervical ganglion of the rat.

J. Ultrastructure Res. 25: 381 - 407, 1968.

SMIRNOW, A.

Arch. Mikr. Anat. 35: 416, 1890.

In: The action of adrenaline on transmission in the superior cervical ganglion. By: E. Bülbbring.

J. Physiol. (Lond.) 103: 55 - 67, 1944.

SMITH, A.D. y WINKLER, H.

Fundamentals mechanism in the release of catecholamines.

Handb. Exp. Pharmacol. XXXIII: 538 - 617, 1972.

SNEDECOR, G.W. y COCHRAN, W.G.

Statistical Methods.

Iowa State Colledge Press, Ames. 1969.

STALLCUP, W.B.

Sodium and Calcium fluxes in a clonal nerve cell line.

J. Physiol. (Lond.) 286: 525 - 540, 1979.

STARKE, K.

Regulation of catecholamine release: alpha receptor mediated feed-back control in peripheral and central neurons.

In: Frontiers in Catecholamine Research.

Oxford: Pergamon Press. pp. 561 - 565, 1973.

STARKE, K.

Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems.

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 77: 1 - 24, 1977.

STARKE, K., MONTEL, H., GAYK, W. y 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., TAUBE, H. y BOROWSKI, E.

Presynaptic receptor systems in catecholaminergic transmission.

Biochem. Pharmacol. 26: 259 - 269, 1977.

STEFANO, F.J.E. y FILINGER, E.J.

Comparative study of monoamine-oxidase activity in ganglia and in nerve endings.

Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress on Pharmacology, Paris. p. 924, 1978.

STEINBERG, M.J. y KELLER, CH.E.

Enhanced catecholamine synthesis in isolated rat superior cervical ganglia caused by nerve stimulation: Dissociation between ganglionic transmission and catecholamine synthesis.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 204: 384 - 399, 1978.

STJÄRNE, L.

Mechanism of catecholamine secretion: dual feed-back control of sympathetic neurotransmitter secretion; role of calcium.

In: Frontiers in Catecholamine Research.

Oxford: Pergamon Press. pp. 491 - 496, 1973.

SVENSON, T.H. y USDIN, T.

Feedback inhibition of brain noradrenaline neurons by tricyclic antidepressants:  $\alpha$ -Receptor mediation.

Science (Wash. D C ) 202: 1089 - 1091, 1978.

TARLOV, S.R. y 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.

TRANZER, J.P. y THOENEN, H.

An electron microscopic study of selective acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxy-dopamine.

Experientia 24: 155 - 156, 1968.

TRENDELENBURG, U.

Pharmacology of autonomic ganglia.

Ann. Rev. Pharmacol. 1: 219 - 238, 1961.

TRENDELENBURG, U. y CROUT, J.R.

The norepinephrine stores of isolated atria of guinea-pig treated with reserpine.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 145: 151 - 161, 1964.

TRENDELENBURG, U., MAXWELL, R.A. y PLUCHINO, S.

Methoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of 1-norepinephrine in the cat's nictitating membrane.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 172: 91 - 99, 1970.

U'PRICHARD, D.C., GREENGARD, D.A., SHEEHAN, P.P. y SNYDER, S.H.

Tricyclic antidepressants: Therapeutic properties and affinity for  $\alpha$ -adrenergic receptor binding sites in the brain.

Science (W. DC) 199: 197 - 198, 1978.

VAN ORDEN, L.S. III, BURKE, J.P., GEYER, M. y LODOEN, F.V.

Localization of depletion-sensitive and depletion-resistant norepinephrine storage sites in autonomic ganglia.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 174: 56 - 71, 1970.

VOLLE, R.L.

Modifications by drugs of synaptic mechanism in autonomic ganglia.

Pharmacol. Rev. 18: 839 - 869, 1966.

VOLLE, R.L.

Ganglionic transmission.

Ann. Rev. Pharmacol. 9: 135 -146, 1969.

WEINER, N.

Regulation of norepinephrine biosynthesis.

Ann. Rev. Pharmacol. 10: 273 -290, 1970.

WESTFALL, T.C.

Local regulation of adrenergic neurotransmission.

Physiol. Rev. 57: 659 - 728, 1977.

WILLIAMS, T.H.

Electron microscopic evidence for an autonomic interneuron.

Nature (Lond.) 214: 309 - 310, 1967.

WILLIAMS, T.H. y PALAY, S.L.

Ultrastructure of the small neuron in the superior cervical ganglion.

Brain Res. 15: 17 - 34, 1969.

WILLIAMS, T.H., BLACK, A.C. jr., CHIBA, T. y BHALLA, R.C.

Morphology and biochemistry of small intensely fluorescent cells of sympathetic ganglia.

Nature (Lond.) 256: 315 - 317, 1975.

WILSON, W.S., SCHULZ, R.A. y COOPER, J.R.

The isolation of cholinergic synaptic vesicles from bovine superior cervical ganglion and estimation of their acetylcholine content.

J. Neurochem. 20: 659 - 667, 1973.

WHITBY, L.G., AXELROD, J. y WEIL-MALHERBE, H.

The fate of <sup>3</sup>H-norepinephrine in animals.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 132: 193 - 201, 1961.