

## Tesis de Posgrado

# Efecto de la estimulación nerviosa en la velocidad de síntesis de la noradrenalina : Posible regulación a través de receptores presinápticos

Luchelli, María Amalia

1984

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Luchelli, María Amalia. (1984). Efecto de la estimulación nerviosa en la velocidad de síntesis de la noradrenalina : Posible regulación a través de receptores presinápticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1832\\_Luchelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1832_Luchelli.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Luchelli, María Amalia. "Efecto de la estimulación nerviosa en la velocidad de síntesis de la noradrenalina : Posible regulación a través de receptores presinápticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1832\\_Luchelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1832_Luchelli.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EFECTO DE LA ESTIMULACION NERVIOSA EN LA VELOCIDAD DE SINTESIS DE LA  
NORADRENALINA: POSIBLE REGULACION A TRAVES DE RECEPTORES PRESINAPTICOS

MARIA AMALIA LUCHELLI

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas

Directora de Tesis: DRA. MARIA AMELIA ENERO

Lugar de Trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLOGICAS, CONICET

*Tesis.*  
*1832.*  
*y. 3.*

*A mi esposo*

*A mi hija*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Amelia Enero, por su constante dedicación y aliento que me permitieron llevar a cabo este trabajo de Tesis.

Al Dr. Salomón Z. Langer, quien me inició en el campo de la Farmacología y bajo cuya dirección realicé una gran parte del trabajo experimental aquí presentado.

Al Dr. Francisco J.E. Stefano, Director del Instituto de Investigaciones Farmacológicas, porque sin su permanente apoyo no hubiera sido posible la concreción de este trabajo.

Al Dr. Carlos P. Lantos, por sus consejos y apoyo para la realización de esta Tesis.

A las Srtas. Noemí Fernández, María J. Rodríguez y Susana Ingala, por su valiosa colaboración técnica.

A la Srta. Julia N. Morales, quien realizó el trabajo dactilográfico de la Tesis.

A todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Farmacológicas, quienes contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que posibilitó mi labor como Miembro del Instituto de Investigaciones Farmacológicas.

## I N D I C E

	Pag.
I      GENERALIDADES	1
II     MANTENIMIENTO DE LOS NIVELES ENDOGENOS DE NORADRENALINA	18
A.- Camino biosintético	
B.- Enzimas que participan en la biosíntesis de catecolaminas	
Tirosina hidroxilasa	
Dihidroxifenilalanina descarboxilasa	
Dopamina $\beta$ hidroxilasa	
Feniletanolamina-N-metiltransferasa	
C.- Origen de las enzimas de síntesis de la noradrenalina y de las vesículas sinápticas. Transporte axonal.	
III    ALMACENAMIENTO DE CATECOLAMINAS. PARTICULAS SUBCELULARES	56
A.- Médula adrenal	
B.- Nervios adrenérgicos	
C.- Captación de catecolaminas	
D.- Acción de drogas en el proceso de captación	
E.- Drogas que afectan el almacenamiento de noradrenalina.	
IV    LIBERACION: MECANISMOS FUNDAMENTALES	81
A.- Modos posibles de liberación	
B.- Evidencias de exocitosis en neuronas noradrenérgicas	
C.- Fusión de las membranas para la exocitosis	
D.- Liberación por otros medios: drogas e iones despolarizados.	

V	METABOLISMO DE LAS CATECOLAMINAS	101
	A.- Monoaminoxidasa	
	B.- Catecol-O-metiltransferasa	
VI	SINTESIS DE LOS PROCESOS QUE SE LLEVAN A CABO EN LA SINAP- SIS NEUROEFECTORA ADRENERGICA	112
VII	REGULACION DE LA LIBERACION DEL NEUROTRANSMISOR ADRENERGI- CO POR ESTIMULO NERVIOSO	115
	A.- Función de la frecuencia de estimulación	
	B.- Recaptación: su importancia	
	C.- Acción de la noradrenalina liberada sobre la post- sinapsis	
	D.- Regulación de la liberación de neurotransmisor por los receptores presinápticos.	
	1.- Receptores presinápticos $\alpha$ adrenérgicos	
	2.- Receptores presinápticos $\beta$ adrenérgicos	
VIII	OBJETIVOS	139
	A.- Antecedentes	
	B.- Desarrollo	
IX	METODOS	145
	A.- Preparación aislada de nervio infratroclear-membrana nictitante de gato	
	B.- Preparación aislada de nervio preganglionar-ganglio cervical superior de gato	
	C.- Determinación de noradrenalina endógena	

- A.- Dependencia de la activación de la tirosina hidroxilasa en el período de postestimulación de los parámetros y programas de estimulación
- B.- Variables relacionadas con la estimulación realizadas en las condiciones establecidas y expresión de los resultados
- C.- Modulación del incremento de actividad de la tirosina hidroxilasa posterior al estímulo nervioso, por los niveles citoplasmáticos de noradrenalina. Acción de drogas que modifican estos niveles
- D.- Modulación del incremento de actividad de la tirosina hidroxilasa durante el período de postestimulación por drogas que modifican la liberación de noradrenalina por estímulo nervioso
- E.- Relación entre liberación de noradrenalina-<sup>3</sup>H y actividad de TH

XI	DISCUSION	210
XII	CONCLUSIONES	238
XIII	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	243

## I- Generalidades

### A) Sistema Nervioso Autónomo

Al sistema nervioso se lo divide en dos grandes sectores: sistema nervioso de la vida de relación o cerebro espinal y sistema nervioso de la vida vegetativa o autónomo. Ambos sectores están íntimamente interconectados anatómica y funcionalmente.

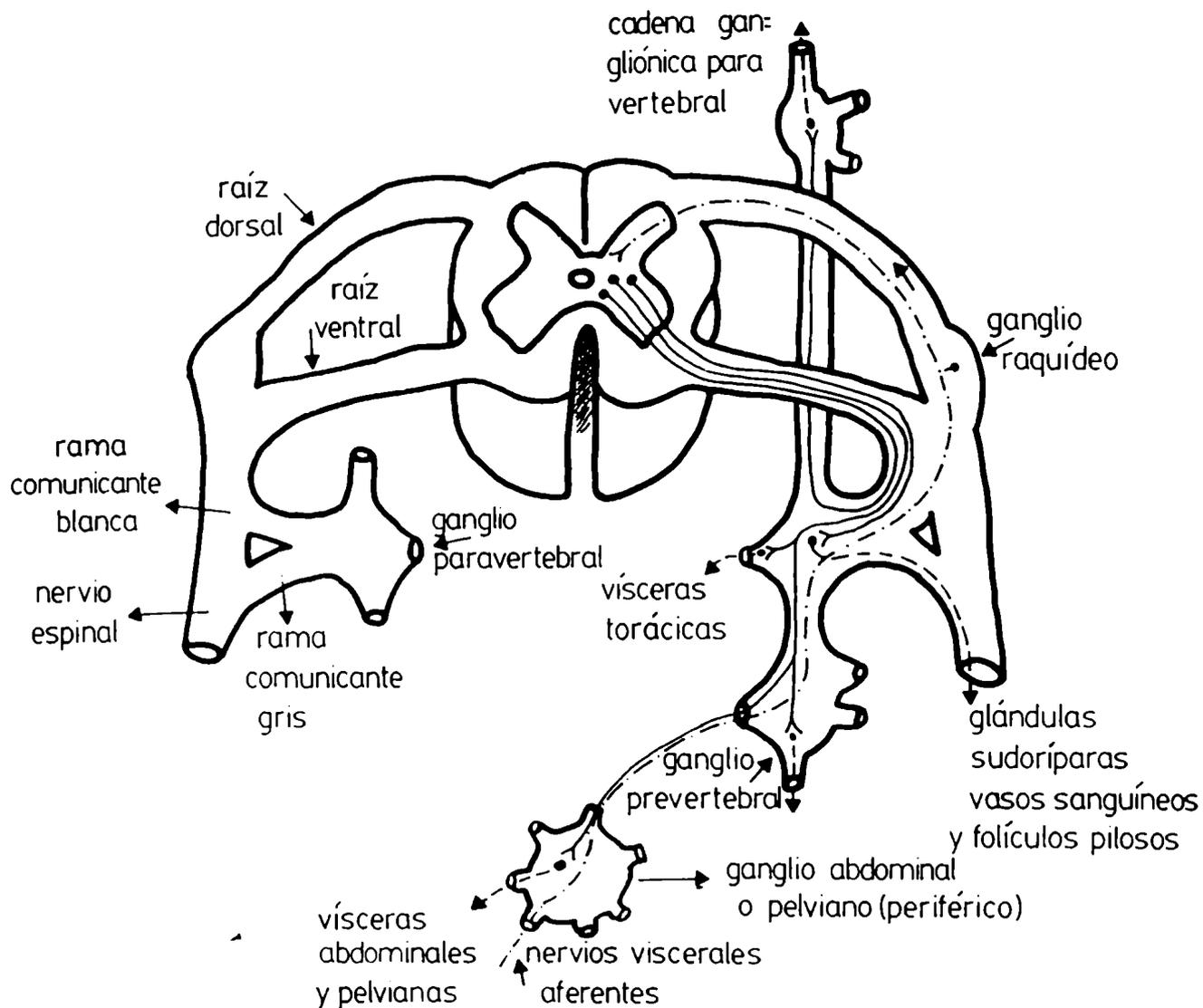
Desde el punto de vista anatómico, el sistema nervioso consta de dos partes: sistema nervioso central, situado en el interior del cráneo y del raquis, y sistema nervioso periférico.

El sistema nervioso central comprende el encéfalo y la médula espinal, en él las formaciones pertenecientes al sistema nervioso cerebroespinal y vegetativo están entremezcladas.

En el periférico, por el contrario, existe una separación más neta entre ellos, y puede decirse que el sector periférico del sistema nervioso se halla constituido por una porción que pertenece al sistema nervioso cerebroespinal y otra que corresponde al sistema autónomo.

El sistema nervioso autónomo, de la vida vegetativa o involuntario, comprende dos partes: el sistema simpático y el parasimpático.

El sistema simpático periférico se halla constituido por dos largos cordones uno a cada lado de la columna vertebral, desde la primera vértebra cervical hasta la última sacra. Estas cadenas o cordones se hallan formadas por 22 pares de pequeños ensanchamientos, los ganglios simpáticos primarios que se los conoce con el nombre de ganglios paravertebrales (Fig. 1).



**Fig. 1.** Detalle de las ramificaciones de las fibras adrenérgicas aferentes y eferentes en uno de los segmentos de la médula espinal.

Además de estos ganglios centrales, que son paravertebrales, existen otros dos grupos de ganglios, prevertebrales y periféricos. En la Fig. 1 se muestra la disposición de los distintos tipos de ganglios y sus conexiones con los órganos periféricos y la médula espinal.

Los axones de las neuronas que se encuentran en el asta lateral de la médula parten de la raíz anterior, pasan al nervio espinal y van a establecer sinapsis en el ganglio simpático correspondiente, pasando desde el nervio espinal al ganglio simpático, por la rama comunicante blanca. Las fibras que de la médula se dirigen al ganglio se denominan preganglionares. La sinapsis de esta neurona con la postsináptica puede efectuarse en el ganglio paravertebral, en uno prevertebral e incluso en los periféricos.

En las vísceras torácicas la fibra preganglionar hace sinapsis en un ganglio de la cadena del simpático (paravertebral) del cual parte la postsináptica que se dirige al órgano correspondiente (cardíaco, por ejemplo). Cuando deben ir a los órganos del abdomen o de la pelvis, las fibras hacen sinapsis en ganglios situados más cerca de ellos (por ejemplo, en el celíaco).

Las fibras de función pilomotor, vasoconstrictora, y que intervienen en la función sudoral, finalizan en el ganglio paravertebral como las de órganos torácicos para luego pasar por la rama comunicante gris al nervio raquídeo, para alcanzar su distribución periférica.

Fisiológicamente la estimulación del sistema simpático produce como respuestas más importantes:

- 1) aceleración de la frecuencia cardíaca
- 2) aumento de la fuerza de contracción del corazón
- 3) aumento de la presión arterial

- 4) disminución del tono y motilidad de estómago e intestinos
- 5) relajación de los músculos bronquiales
- 6) contracción de los esfínteres de estómago e intestinos
- 7) dilatación de la pupila
- 8) glucogenolisis

Por su parte el sistema parasimpático o parte cráneosacral del sistema nervioso autónomo está formado principalmente por el nervio vago y los pares sacros. Como en el sistema simpático, existe una neurona central y otra periférica ganglionar, la neurona central tiene origen craneal o sacra. A diferencia de lo que sucede en el simpático, la fibra preganglionar es muy larga, pues por lo común el ganglio es visceral; está en el interior del órgano al cual va a inervar.

Fisiológicamente el sistema simpático difiere del parasimpático no sólo en la respuesta (disminución de frecuencia cardíaca, aumento del tono y motilidad intestinal, etc.) sino en el tipo de respuesta, la del simpático se produce en forma masiva, difusa, mientras que el parasimpático está constituido de manera que produce respuestas discretas y localizadas.

A estas diferencias anatómicas y fisiológicas, debemos agregarle la diferencia en cuanto al neurotransmisor que liberan, si bien en ambos sistemas sus fibras preganglionares liberan acetilcolina (AcCh), las fibras postganglionares simpáticas y parasimpáticas liberan noradrenalina (NA) y AcCh respectivamente.

Aunque la mayor parte de los reflejos viscerales son mediados a través del sistema nervioso central, los reflejos autónomos se pueden producir a nivel medular. En este último caso, el primer paso del arco reflejo lo

dan las fibras aferentes sensoriales que parten de las vísceras y son llevadas al eje cerebroespinal por los nervios autónomos. Los cuerpos celulares de las fibras aferentes se hallan en el ganglio de la raíz dorsal de los nervios espinales (Fig. 1). El circuito lo cierran las fibras eferentes que ya hemos descripto.

El sistema nervioso central integra las funciones del sistema nervioso autónomo a distintos niveles superiores a la médula, si bien no están todavía suficientemente investigados se sabe que los principales núcleos se hallan a nivel del hipotálamo, el cuerpo estriado y la corteza.

#### B) La transmisión neurohumoral

El concepto de transmisión neurohumoral fue desarrollado para explicar observaciones relacionadas con la transmisión de impulsos a partir de fibras autónomas postganglionares hacia las células efectoras. Las evidencias en su apoyo incluían: 1) demostración de la presencia de un compuesto fisiológicamente activo y de las enzimas necesarias para su síntesis y degradación en sitios apropiados; 2) recuperación del compuesto a partir del perfusato de una estructura inervada durante períodos de estimulación, pero no en ausencia de estimulación, o en este caso en cantidades muy reducidas; 3) demostración de que el compuesto, cuando se administra apropiadamente es capaz de producir respuestas idénticas a la estimulación nerviosa y 4) demostración de que las respuestas a la estimulación nerviosa y al compuesto administrado son modificadas en la misma forma por varias drogas. Para los órganos efectores autónomos, el concepto de la neurotransmisión

fue aceptado muy pronto, porque estos sitios cumplían con los criterios enumerados.

Pero la aceptación de la transmisión neurohumoral, en lugar de la electrogénica en los ganglios autónomos y en la sinapsis neuromuscular del músculo esquelético fue negada por bastante tiempo principalmente por dos razones: 1) por los factores de tiempo extremadamente rápidos implicados, en contraste con aquellos en los sitios efectores autónomos; y 2) las discrepancias entre la cantidad de neurotransmisor putativo, la AcCh recogida durante la estimulación nerviosa y la requerida para producir respuestas características. Ambas objeciones han sido respondidas a través del desarrollo de técnicas modernas de registro intracelular y aplicación microiontoforética de drogas. La complejidad del sistema nervioso central es tan grande que ha sido sumamente dificultoso estimular fibras aisladas de grupos de neuronas seleccionadas y recoger el perfusato de ellas sin contaminarlo. Sin embargo, el estudio de neuronas individuales de la médula espinal y cerebro, particularmente en las investigaciones de Eccles y sus colaboradores, han dado evidencias cada vez más convincentes de la transmisión neurohumoral en el sistema nervioso central (Eccles, 1964, 1973).

Una característica importante de la transmisión sináptica que apoya el concepto de un mecanismo neurohumoral, es el período latente irreductible entre la llegada de un impulso al terminal del axón y la aparición de un potencial postsináptico. En investigaciones realizadas en la sinapsis gigante de calamar, Bullock y Hagiwara (1957) insertaron micropipetas registradoras de potencial (electrodos), en las fibras de la presinapsis y la postsinapsis y registraron simultáneamente en las dos, los cambios de poten

cial después de una estimulación presináptica. Hubo siempre invariablemente un retraso de 0.5 a 2.0 milisegundos, según la temperatura, entre la llegada del impulso al electrodo de la presinapsis y el registro de la actividad postsináptica; además, la despolarización o hiperpolarización del componente de la presinapsis no inducía ningún cambio detectable en el potencial de la postsinapsis, y viceversa, (Hagiwara y Tasaki, 1958). Estos hechos, responden o concuerdan sólo con la mediación química de la transmisión sináptica y no con la propagación directa de corriente eléctrica a través de la sinapsis.

En apoyo de la transmisión neurohumoral existe considerable evidencia indirecta que indica, como un fenómeno general, que la mayor parte de las membranas postsinápticas son eléctricamente inexcitables (Grundfest, 1957; Eccles, 1964).

Hay instancias donde indudablemente ocurre la transmisión sináptica por la propagación directa de la corriente a través de la sinapsis. Tales transmisiones tienen lugar en el sistema nervioso central a través de las llamadas "gap junctions", y podrían estar presentes también en el disparo sincrónico de las neuronas autonómicas periféricas (Schmitt y col., 1976).

### C) Etapas de la transmisión neurohumoral

Las etapas en que podemos dividir la transmisión neurohumoral son importantes y útiles no sólo para la descripción de los eventos que tienen lugar en la presinapsis, sinapsis y postsinapsis sino porque la acción de determinadas drogas terapéuticas o usadas en la investigación que afectan

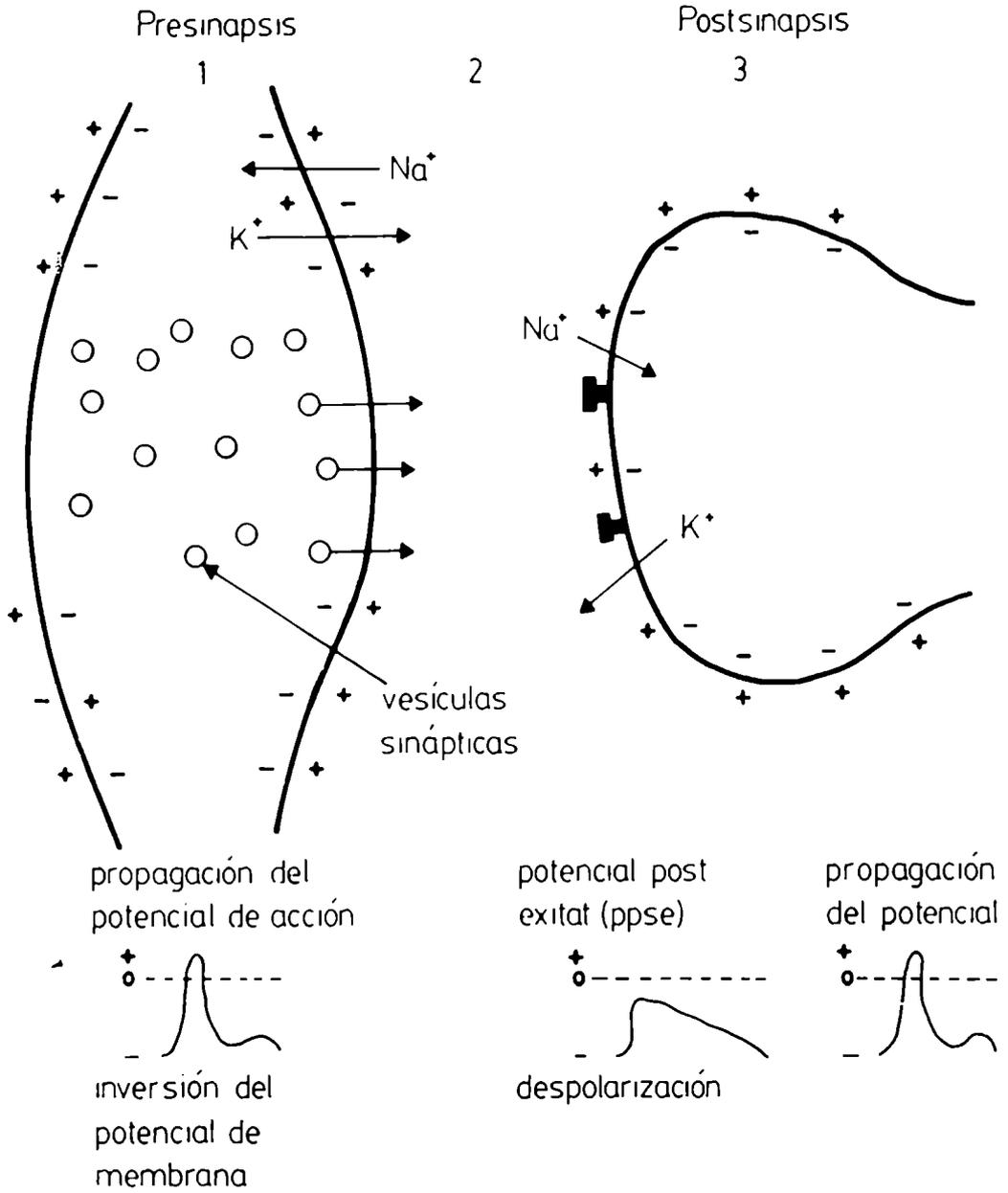
particularmente al sistema nervioso autónomo, están relacionadas directamente a alguno de estos niveles.

De acuerdo con las convenciones usuales, el término conducción significa el tránsito de un impulso a lo largo de un axón o fibra muscular y transmisión es el pasaje de un impulso a través de la sinapsis o unión neuroefectora.

a) Conducción axonal: su rol es el de desencadenar o disparar ("trigger") la primera etapa de la transmisión. Hasta el presente la hipótesis más aceptada de la conducción proviene de los trabajos de Hodgkin y Huxley (1952). En estado de reposo, el interior de un axón de mamífero es aproximadamente 70 mV negativo con respecto al exterior. El potencial de reposo es esencialmente un potencial de difusión basado principalmente en las 30 a 50 veces más alta concentración de iones potasio en el axoplasma con relación al fluido extracelular y la relativamente alta permeabilidad de la membrana axonal en reposo a este mismo ion. Los iones sodio y cloruro están presentes en más alta concentración en el fluido extracelular que en el axoplasma, pero sus gradientes de concentración a través de la membrana son un poco más bajos que el del potasio, y la membrana axonal en reposo es considerablemente menos permeable a estos iones; de allí que su contribución al potencial de reposo es relativamente menor. Estos gradientes iónicos son mantenidos por un mecanismo activo dependiente de energía (bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ), el cual compromete una adenosina trifosfatasa (ATPasa) activada por sodio en el interior y por potasio en el exterior de la superficie de la membrana (Armstrong, 1974; Grundfest, 1975).

En respuesta a un estímulo que supere un nivel umbral, se inicia un potencial de acción o impulso nervioso en una región localizada de la membrana. Este potencial de acción es detectable primero, por una rápida deflexión del potencial interno de reposo desde su valor negativo hacia cero, y de allí sin interrupción sobrepasa el cero y llega a valores positivos (overshoot). Esta reversión local del potencial de membrana se debe a un repentino y selectivo incremento de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio, los cuales fluyen rápidamente hacia adentro en la dirección de su gradiente de concentración (Fig. 2, parte 1). Inmediatamente se produce la repolarización de la membrana y se debe al rápido reemplazo de este cambio de permeabilidad al sodio, por un aumento de permeabilidad al potasio. La corriente iónica a través de la membrana produce corrientes de circuitos locales alrededor del axón. A causa de estas corrientes, las regiones inactivas adyacentes del axón son activadas y se produce así la excitación de la porción próxima de la membrana axonal. Esto provoca la propagación del potencial de acción, el cual es conducido sin disminución a lo largo del axón. En fibras mielinizadas, los cambios de permeabilidad tienen lugar sólo en los nodos de Ranvier, produciendo una conducción saltatoria. La tetrodotoxina, el veneno del pez globo, es uno de los pocos compuestos que selectivamente bloquea la conducción axonal; el mecanismo de acción de este bloqueante es prevenir el aumento de permeabilidad al ion sodio asociada con la fase ascendente del potencial de acción (Kao, 1966).

En contraste, la batracotoxina, un alcaloide esteroide extremadamente potente, secretado por un sapo sudamericano, produce parálisis a través de un aumento selectivo de la permeabilidad al sodio, el cual provoca una despolarización persistente (Albuquerque y col., 1973).



**Fig. 2.** Esquema de un tipo de transmisión neurohumoral.

b) Transmisión sináptica: la llegada de un potencial de acción a los terminales de un axón, inicia una serie de eventos que efectúan la transmisión neurohumoral de un impulso excitatorio o inhibitorio a través de la sinapsis (neurona-neurona) o la unión neuroefectora (neurona-órgano efector). Estos eventos (Fig. 2, parte 2), son los siguientes:

1) Liberación del transmisor: los transmisores neurohumorales son sintetizados probablemente en parte, en la región de los terminales del axón y almacenados allí dentro de vesículas sinápticas, ya sea en forma iónica altamente concentrada, como en el caso de la AcCh o como un complejo o sal rápidamente dissociable como el de la NA con la adenosina trifosfato (ATP),  $Mg^{++}$  y una proteína específica. Durante el estado de reposo, hay una liberación lenta y continua de pequeñas cantidades de transmisor (quanto), por lo general insuficiente para causar la iniciación de un impulso propagado, despolarización o hiperpolarización en el sitio postsináptico. Sin embargo, la liberación de estas pequeñas cantidades de transmisor produce respuestas eléctricas en la membrana postsináptica (potenciales de placa en miniatura, ppsm) que están asociados con el mantenimiento fisiológico de la capacidad de respuesta del órgano efector, en particular en tejido colinérgico (Rang, 1975).

El potencial de acción causa la liberación sincrónica de varios cientos de quanto o paquetes de neurotransmisor. La despolarización del terminal axónico dispara este proceso; sin embargo, los pasos intermedios no se conocen en forma total. Un paso es la entrada de iones calcio, el cual, se cree, promueve la fusión de las membranas vesicular y axoplásmica en el citoplasma axonal. El contenido de las vesículas se descarga entonces al exterior por un proceso llamado exocitosis en particular para el neurotransmisor simpático.

En este caso junto con la NA se descargan otros componentes de la vesícula, incluyendo enzimas y otras proteínas. La medición de estos componentes liberados nos puede dar información acerca de la intensidad y duración de la actividad presináptica.

2 y 3) Combinación del neurotransmisor con los receptores postsinápticos y producción de respuesta: el neurotransmisor liberado se fija a un receptor de naturaleza proteica o proteolipídica, que lo reconoce específicamente. El transmisor posee afinidad química por el receptor y actividad intrínseca, es decir capacidad para inducir un efecto o respuesta postsináptica. Las respuestas postsinápticas de un elemento neuronal pueden ser excitatorias o inhibitorias (Fig. 2, parte 3). La respuesta excitatoria se caracteriza por un potencial postsináptico excitatorio (EPSP) con propagación sin disminución a lo largo del axón. El fenómeno iónico de esta actividad bioeléctrica consiste en un aumento de conductancia a cationes monovalentes por parte de la membrana neuronal; al comienzo entra  $\text{Na}^+$  al interior de la neurona y a medida que se despolariza la membrana más  $\text{Na}^+$  fluye adentro, a favor de gradientes eléctricos y de concentración, hasta alcanzar un estado de equilibrio que es proporcional a las concentraciones intra y extracelulares de sodio. Al mismo tiempo que se incrementa la conductancia al  $\text{Na}^+$ , también lo hace la permeabilidad al  $\text{K}^+$ , cuyo flujo también se hace a favor de un gradiente de concentración; esto es, desde dentro hacia fuera de la célula en sentido inverso al del  $\text{Na}^+$ . Este proceso, que restringe el desarrollo de la despolarización, tiende a disminuir la conductancia al  $\text{Na}^+$  y convierte al fenómeno en autolimitante. El potencial de acción resultante al alcanzar un nivel umbral se propaga a lo largo del axón. Los niveles ba-

sales de concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , intra y extracelulares, son mantenidos gracias al funcionamiento de la "bomba de  $\text{Na}^+$ ", (ATPasa  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  dependiente) que opera mediante la traslocación de iones. De esta manera se recupera el potencial de membrana en reposo (-70 a -90 mV), que depende fundamentalmente de las concentraciones intra y extracelulares de  $\text{K}^+$ .

La respuesta de una neurona a un transmisor inhibitorio se caracteriza por un potencial postsináptico inhibitorio (IPSP), cuyo fenómeno iónico fundamental es un aumento de la conductancia al  $\text{Cl}^-$  que difunde hacia el interior de la célula, hiperpolarizándola. Esto tiende a oponerse a potenciales postsinápticos excitatorios que, al mismo tiempo, pueden ser inducidos en la misma neurona. Si el impulso consigue o no propagarse, ello dependerá de la suma algebraica de las influencias de signo opuesto, excitatorias e inhibitorias, que se ejercen en el elemento postsináptico a través de sus contactos sinápticos respectivos.

En cuanto a los eventos postsinápticos que suceden en las sinapsis neuroefectoras (terminal nervioso-músculo liso; terminal nervioso-glándula secretora), estos pueden ser también de estimulación o inhibición. Así, un neurotransmisor puede contraer o relajar una fibra muscular, dependiendo dicho efecto de los mecanismos postsinápticos activados por la unión del neurotransmisor con el receptor ubicado en la célula efectora. Estos mecanismos son muy complejos y han comenzado a develarse en años recientes.

Los receptores de células efectoras de tejidos inervados por el sistema noradrenérgico pueden ser del tipo  $\alpha$  ó  $\beta$ , y cada uno de ellos tiene su propio mecanismo, así está bien establecido que el receptor  $\beta$  estaría acoplado al sistema adenilciclase-AMPcíclico, mientras que hay mucha evidencia

de que la estimulación  $\alpha$  adrenérgica movilizaría  $Ca^{++}$  de sitios intracelulares o provocaría el influjo de  $Ca^{++}$  extracelular. Los sitios intracelulares serían probablemente mitocondrias, retículo endoplásmico y la superficie interna de la membrana plasmática. El mecanismo por el cual la activación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos conducen a la movilización del  $Ca^{++}$  no se conoce. Tampoco se sabe si está involucrado otro mensajero intracelular. Se ha propuesto también que la hidrólisis del fosfatidol inositol puede ser la respuesta primera a la estimulación de estos receptores. No se ha demostrado aún si el fosfatidil inositol es responsable de la movilización o influjo de  $Ca^{++}$ , o si es un efecto aparte de la estimulación  $\alpha$  adrenérgica.

4) Destrucción o disipación del transmisor: En las sinapsis donde la transmisión se realiza con una alta frecuencia de impulsos, debe haber lógicamente algún mecanismo que permita deshacerse del transmisor luego de cada impulso. En la mayoría de las sinapsis colinérgicas existe una enzima altamente especializada, la acetilcolinesterasa, que hidroliza la AcCh, terminando así su acción. En algunas pocas sinapsis colinérgicas, la difusión termina la acción de la AcCh.

En el sistema adrenérgico, no hay una enzima involucrada en la terminación de la acción del transmisor adrenérgico en la inmediata vecindad del sitio receptor, esto es probablemente efectuado por una combinación de recaptación del transmisor por el terminal adrenérgico y posterior metabolismo, y por simple difusión.

D) Neurotransmisores y neuromoduladores

Muchas son las sustancias que se discute si son neurotransmisores o no. La definición de neurotransmisor se basa en los siguientes aspectos de la transmisión que ya hemos descripto (Butcher, 1977): el arribo de un potencial de acción a un sitio presináptico, o la producción de otra actividad eléctrica, probablemente graduada, o de potenciales dendríticos ("spikes") en lugares presinápticos, lleva a la liberación de uno o más agentes químicos específicos, los neurotransmisores, que atraviezan el espacio sináptico y se combinan con porciones especializadas de la membrana postsináptica, llamadas receptores. La consecuencia de esta acción postsináptica es la respuesta de la neurona o célula efectora.

Una sustancia que se sospecha es un neurotransmisor, debe responder a ciertos criterios para su identificación (Renaud, 1978):

- 1) presencia del agente en el tejido nervioso junto con mecanismos específicos para su síntesis, recaptación y degradación.
- 2) liberación demostrable en terminales nerviosos, a través de la actividad de la vía donde está contenido.
- 3) demostración de receptores específicos sobre las membranas postsinápticas.
- 4) similitud de acción sobre el sitio postsináptico entre el transmisor natural y el agente sospechado.
- 5) bloqueo de la acción postsináptica del transmisor natural y del agente por los mismos antagonistas específicos.

Cabe mencionar que muy pocas de las sustancias consideradas como neurotransmisor (ejemplo: AcCh, ciertos aminoácidos, catecolaminas) demostraron llenar completamente estos criterios. Parte del problema es la naturaleza y complejidad de las estructuras neurales, particularmente en el sistema nervioso central.

Debido a la falta de información completa acerca de la función precisa sobre el tejido nervioso de una sustancia sospechosa de ser un neurotransmisor no se dudó en usar el término neuromodulador. Este término parece implicar la habilidad para influenciar la excitabilidad nerviosa en una forma menos directa que los neurotransmisores, tal vez interactuando o modificando los efectos de los transmisores aceptados tradicionalmente.

Los neuromoduladores pueden ejercer su acción a nivel presináptico modificando la síntesis o la liberación del transmisor en el mismo o en distintos terminales nerviosos (ejemplo: sinapsis axo-axónicas), y a nivel postsináptico posiblemente a nivel del receptor. Pero por sí mismos no iniciarán la secuencia de eventos que llevan a la generación de actividad eléctrica postsináptica. Dentro de los moduladores adrenérgicos se encuentran las prostaglandinas, la adenosina, varios polipéptidos como las encefalinas, etc.

Tanto neurotransmisores como neuromoduladores ejercen su acción localmente y en un período de tiempo relativamente corto, característica que los distingue de los agentes hormonales.

Por otro lado, si dos o más sustancias son liberadas presinápticamente de la misma neurona (cotransmisores) y cada una produce actividad eléctrica postsináptica independiente de la acción de la otra, aún siendo la acción de una más potente que la de la otra, las dos deben ser consideradas neurotransmisores.

E) La noradrenalina: neurotransmisor del sistema simpático a nivel post-ganglionar

El concepto de neurotransmisor descrito por Elliott, sugería que la adrenalina (A) sería la sustancia transmisora liberada por los terminales nerviosos simpáticos. La primera confirmación experimental de esta hipótesis la obtuvo Loewi y también Cannon y Uridil. A causa de la similitud entre los efectos de la estimulación simpática y los de la A, la teoría se aceptó hasta 1945 (Elliott, 1905; Loewi, 1921; Cannon y Uridil, 1921).

La evidencia de que la NA y no la A era la catecolamina predominante en los nervios adrenérgicos, resultó de los trabajos de von Euler (von Euler, 1946, 1950). von Euler postuló que la NA era el neurotransmisor simpático predominante en los órganos que él estudió (nervios esplénicos y bazo de buey y corazón de mamíferos), pero mantuvo el concepto de que podría haber dos sustancias neurotransmisoras, la NA y la A.

Falck, con su método de fluorescencia histoquímica hizo posible, por primera vez, demostrar la presencia de NA en los terminales nerviosos simpáticos de los mamíferos en una forma directa (Falck, 1962).

## II- Mantenimiento de los niveles endógenos de noradrenalina

### A) Camino biosintético

Las catecolaminas, NA, A, dopamina (DA) se forman en el cerebro, en las células cromafines y en los nervios y ganglios simpáticos a partir de su aminoácido precursor, la L-tirosina (p-hidroxifenilalanina), por medio de una serie de etapas biosintéticas (Fig. 3). Este camino de síntesis fue propuesto por Blaschko y confirmado por Nagatsu y colaboradores con la demostración de que la enzima tirosina hidroxilasa (TH) intervenía en la conversión de L-tirosina a L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) (Blaschko, 1939; Nagatsu y col., 1964). Es de destacar que algunas de las enzimas del camino de síntesis de las catecolaminas no son muy específicas, por consiguiente ellas pueden actuar sobre muchas otras sustancias endógenas así como también, y esto es importante, sobre ciertas drogas.

La L-tirosina está normalmente presente en la circulación en una concentración aproximada de  $8 \times 10^{-5}$  M. Es captada de la corriente sanguínea y concentrada dentro del cerebro y presumiblemente por otros tejidos inervados simpáticamente por un mecanismo de transporte activo. Los terminales nerviosos aislados de cerebro (sinaptosomas), tienen dos mecanismos para la captación de L-tirosina. Uno de estos mecanismos es de alta afinidad por transporte facilitado ( $K_m 8 \times 10^{-6}$  M); el otro es de baja afinidad y quizás de difusión simple. A concentraciones fisiológicas de aminoácidos, la mitad por lo menos de L-tirosina que pasa desde el fluido extracelular del ce

rebros a los terminales nerviosos, aparentemente lo hace a través del mecanismo de baja afinidad (Morre y Wurtman, 1981).

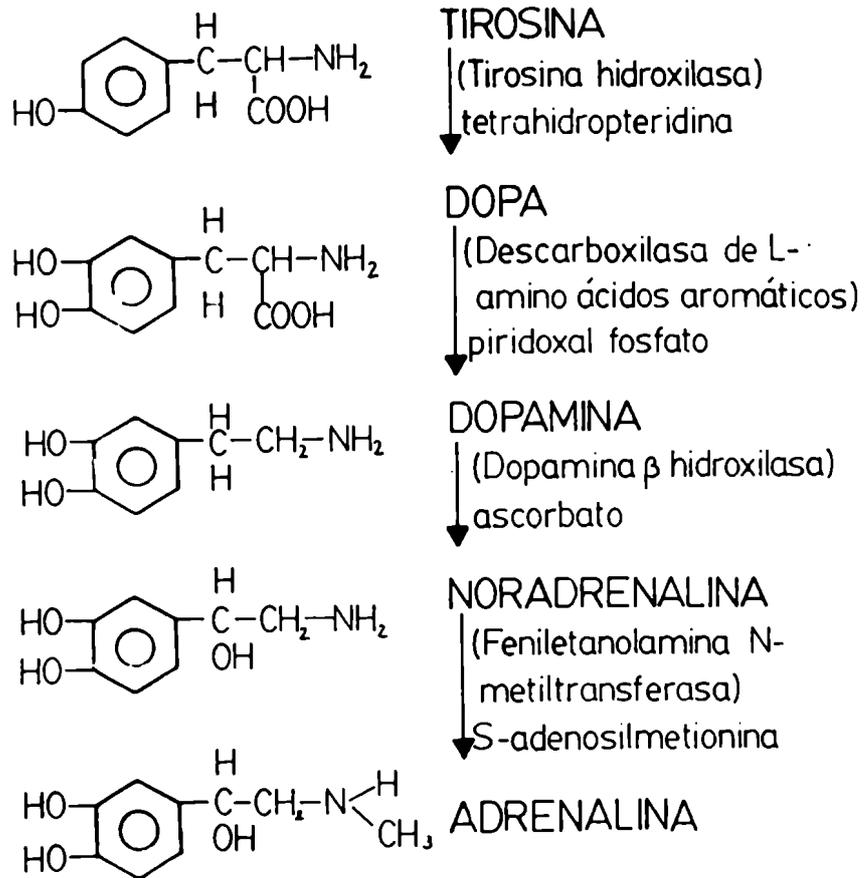


Fig. 3. Etapas de la síntesis enzimática de la dopamina, noradrenalina y adrenalina.

Una vez dentro del axón nervioso, la L-tirosina sufre una serie de transformaciones químicas que dan lugar, por último, a la formación de las catecolaminas, DA, NA o A, dependiendo de la disponibilidad en cada caso de la enzima específica del tejido. En la Figura 3 se han representado los pasos biosintéticos con sus correspondientes enzimas y cofactores para la formación de las distintas catecolaminas.

La conversión de L-tirosina a catecolaminas fue demostrada por primera vez en médula adrenal bovina. Se estableció que el tejido de médula adrenal, tanto "in vivo" como "in vitro" era capaz de convertir L-tirosina o L-DOPA marcadas en DA, NA y A (Demis y col., 1955).

Fue más difícil demostrar la síntesis de la NA en nervios simpáticos a causa de las pequeñas cantidades de esta sustancia presentes en tejidos periféricos. Ello fue posible más tarde con las técnicas cromatográficas para la separación de NA de sus precursores y metabolitos y por la disponibilidad de precursores radiactivos de alta actividad específica (Goodall y Kirschner, 1958).

En los mamíferos, la L-tirosina puede provenir en forma abundante de la dieta (proteínas) o puede derivar de la L-fenilalanina por hidroxilación de ésta por medio de la fenilalanina hidroxilasa que se encuentra principalmente en el hígado, y en una extensión más limitada en el cerebro (Ikeda y col., 1965). Ambos aminoácidos son constituyentes normales de los mamíferos. Sin embargo, la síntesis de la NA se considera generalmente que comienza con la L-tirosina la cual representa el punto inicial de muchos procesos biosintéticos importantes en los tejidos animales como podemos observar en la Fig. 4. Es necesario destacar que el porcentaje de L-tirosina

utilizado para la biosíntesis de catecolaminas con respecto a otros caminos bioquímicos, es mínimo.

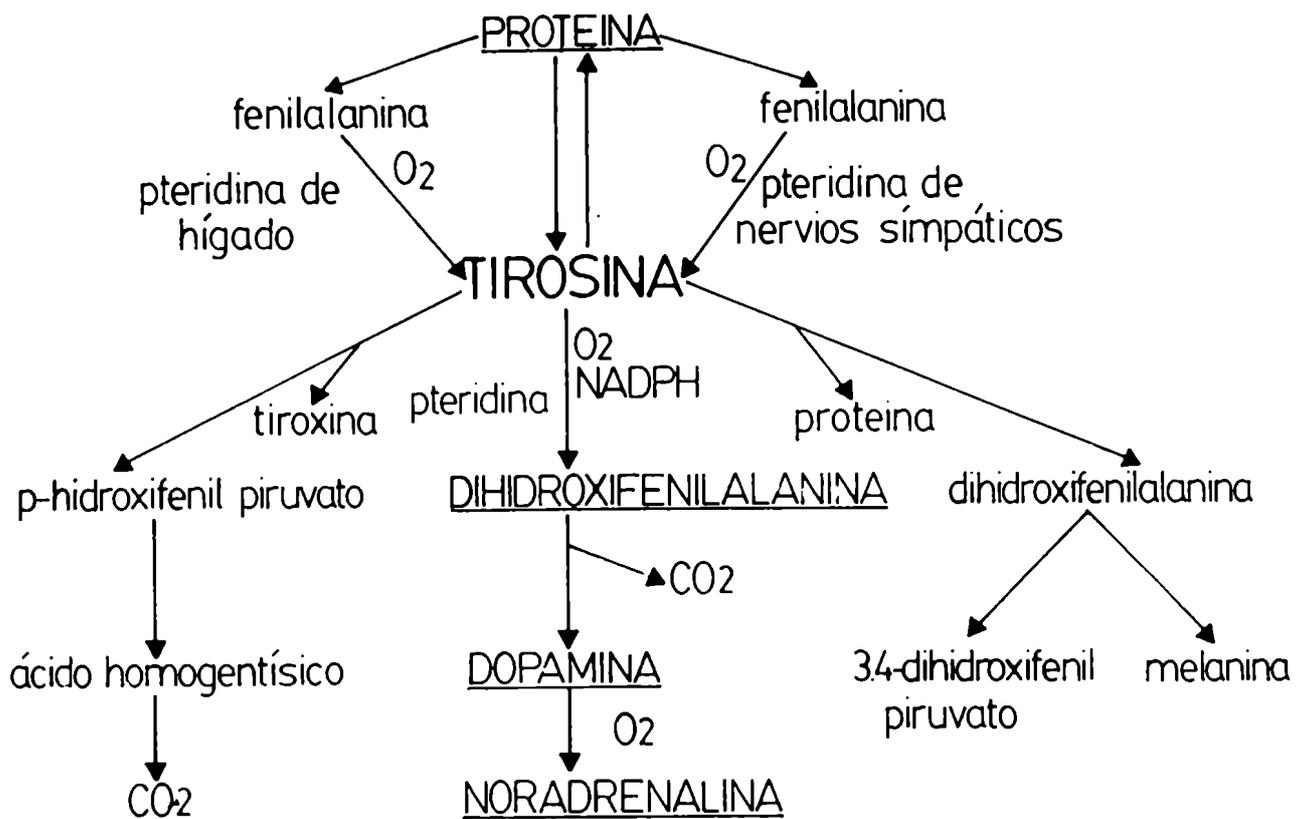


Fig. 4. Metabolismo de la L-tirosina.

## B) Enzimas que participan en la biosíntesis de catecolaminas

Todas las enzimas necesarias para la síntesis de NA a partir de la L-tirosina, están presentes dentro del tejido nervioso adrenérgico. Por ejemplo, después de la desnervación postgangliónica de los nervios simpáticos del corazón, Potter y col. comprobaron por primera vez, que éste pierde la habilidad de sintetizar NA ya sea a partir de la L-tirosina o de DA (Potter y col., 1965).

### Tirosina hidroxilasa

Es la primer enzima en el camino biosintético de las catecolaminas y fue la última enzima identificada. Fue demostrada por Udenfriend y sus colaboradores en 1964 (Nagatsu y col., 1964; Udenfriend, 1966). Está presente en la médula adrenal, cerebro y en todos los tejidos inervados adrenérgicamente estudiados hasta la fecha. La TH es capaz de catalizar la hidroxilación tanto de la L-tirosina como la de la L-fenilalanina (Ikeda y col., 1965) y es la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis del neurotransmisor adrenérgico (Levitt y col., 1965).

Aunque hay alguna controversia sobre la localización intracelular de la enzima, el grueso de la evidencia apoya la opinión de que la TH es una enzima soluble presente en el axoplasma de la neurona adrenérgica. Pe-track y col. (1968), han demostrado que una fracción importante de la actividad de TH en la médula adrenal bovina puede ser recuperada en la fracción

particulada y la enzima puede ser solubilizada por tratamiento del tejido con enzimas proteolíticas (tripsina). Por otro lado, Musacchio y colaboradores han acumulado suficiente evidencia, la cual sugiere que la localización en la fracción particulada de la enzima en médula adrenal bovina es un artefacto que resulta de la autoagregación de la TH y la facilidad con la cual la enzima se adsorbe irreversiblemente a las estructuras particuladas (Würzburger y Musacchio, 1971). Weiner y colaboradores confirmaron estos resultados, demostrando además que esto contrasta con la enzima soluble de adrenal de una variedad de otras especies incluyendo al hombre, cobayo, rata y conejo. La TH de las adrenales de estas especies se encuentra en su mayor parte o enteramente en el citosol y la enzima exhibe muy poca tendencia a agregarse o adsorberse a las membranas en una forma no específica (Weiner y col., 1971).

En los homogenatos de ganglio simpático y de nervios espléncicos bovinos, la TH parece hallarse en su mayor parte en la fracción sobrenadante soluble (Mueller y col., 1969 a).

Aunque hay trabajos donde se informa que una fracción considerable de la TH de cerebro está asociada con partículas (McGeer y col., 1965), los estudios de Kindwall y Weiner (1966) indican que la mayor parte de la enzima particulada del cerebro podría realmente estar presente en solución en la fracción del axoplasma la cual es atrapada dentro de los sinaptosomas. Kuczenzky y Mandell (1972) por otro lado, dicen que la TH de cerebro de rata existe en dos formas físicas distintas, una soluble y otra unida a la membrana. Las dos formas son específicas de distintas áreas del cerebro, predominando la forma unida a la membrana. En el cuerpo estriado, un

área rica en terminales nerviosos catecolaminérgicos, estaría en mayor parte asociada con una fracción específica de la membrana. Estas dos formas tienen propiedades cinéticas diferentes y la particulada puede ser activada por heparina. En síntesis, aunque los resultados no son conclusivos, parecería que pueden existir dos tipos de TH, los cuales muestran propiedades cinéticas distintas y pueden tener distribución celular diferente.

El peso molecular de la TH ha sido motivo también de resultados variables, ya que la enzima como dijimos (Wűrzburger y Musacchio, 1971; Weiner y col., 1971), sufriría agregaciones que modificarían su peso molecular. Las primeras determinaciones hechas por Musacchio y col. (1971), indican un peso para la TH nativa de adrenal bovina entre 135.000 y 155.000 determinado por gradiente de densidad de sacarosa y filtración por gel; este valor es de 4 a 4.4 veces el P.M. de la TH después de la digestión suave con tripsina (entre 32.000 y 38.000). A pesar de la amplia diferencia en los pesos moleculares de las diferentes formas de la enzima, estudios preliminares (Musacchio y Wűrzburger, 1969) determinaron que existen sólo mínimas diferencias cinéticas entre ambas, obviamente suponen que los fragmentos de la enzima, que serían cuatro, contienen por lo menos un sitio catalítico; debido a la homogeneidad de estos fragmentos, piensan que están unidos sólo por una unión peptídica. Por su parte Kuczenzki (1973), haciendo también hidrólisis controlada de TH soluble de cerebro de rata, encontró una alteración muy marcada en el peso molecular de la enzima (200.000 para la nativa y 50.000 para la hidrolizada) y concomitantemente, un aumento en la actividad enzimática. Sobre las bases de propiedades cinéticas similares de la enzima unida a membranas y la enzima tratada con tripsina, especulan que el

mecanismo de activación, mediado por la unión a membrana, implica un cambio en el equilibrio asociación-disociación de las subunidades y que la especie activa unida a membrana es un monómero, mientras que la enzima nativa soluble estriatal podría existir en un estado conformacional constreñido y relativamente inactivo. No obstante, sobre la base de los resultados obtenidos con la enzima estriatal particulada y luego solubilizada, el mismo autor sugiere que la activación que tiene lugar por unión de la enzima a membranas, implica una transición conformacional a un estado más activo, más bien que a un cambio en el equilibrio de asociación-disociación de la molécula. Además, comparando las propiedades cinéticas de la enzima estriatal, con la enzima adrenal, Musacchio y col. (1971) sugieren la existencia de isoenzimas específicas en los distintos órganos. Años después los datos de peso molecular (60 a 62.000 por subunidad y 240 a 250.000 para la nativa), fueron confirmados por otros investigadores (Joh y col., 1978; Vulliet y col., 1980).

La TH requiere oxígeno y pteridina reducida como cofactor para su actividad (Nagatsu y col., 1964). El cofactor, la pteridina de médula adrenal de bovino, ha sido aislado y purificado por Lloyd y Weiner (1971) y es similar o idéntico con la tetrahidrobiopteridina y se encuentra en muy baja concentración en los tejidos (10 ng/g de tejido).

Los estudios cinéticos sobre el mecanismo de la hidroxilación de la L-tirosina sugieren que durante la hidroxilación de la L-tirosina a DOPA, la enzima es oxidada a una forma inactiva. La pteridina reducida se combina con la forma inactiva, oxidada de la enzima, convirtiéndola en la forma hidroxilasa reducida y activa. La tetrahidropteridina es simultáneamente

convertida a la forma dihidro y debe ser reducida enzimáticamente antes de que pueda utilizarse de nuevo para regenerar la TH reducida (Ikeda y col., 1966). La pteridina reductasa, que cataliza la conversión de dihidropteridina a la forma tetrahidro, ha sido demostrada en glándulas adrenales (Musacchio, 1969).

El catión  $Fe^{++}$  parece que también es requerido para la hidroxilación enzimática de la L-tirosina a L-DOPA. Sin embargo, en este punto hay criterios dispares. Por un lado Shiman y col. (1971) dicen que la enzima es sensible al  $H_2O_2$  que se genera durante la oxidación no enzimática de la tetrahidropteridina, y puede ser protegida por catalasa, peroxidasa o  $Fe^{++}$ . El  $Fe^{++}$  no estimularía por sí la reacción sino que degradaría el  $H_2O_2$  que afecta a la enzima. Por otro lado, Nagatsu y col. (1964) y Petrack y col. (1968), dicen que se requiere  $Fe^{++}$  para la actividad óptima de la reacción como un cofactor esencial.

En la mayoría de los tejidos con neuronas adrenérgicas, las enzimas de las dos etapas siguientes, DOPA descarboxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (D $\beta$ H) tienen una actividad de 100 a 1000 veces la de la TH. Esta actividad más baja para la TH puede deberse a la presencia de menor cantidad de enzima o a un inferior número de recambio o "turnover" de la misma. Como esta enzima es la etapa limitante de la velocidad de biosíntesis, es lógico que se pueda afectar farmacológicamente para causar una disminución o aumento de la biosíntesis de las catecolaminas. Se realizaron muchos intentos para producir simpatectomía química por bloqueo de las otras dos etapas de la biosíntesis pero sin éxito.

Por otra lado, los experimentos con inhibidores de la TH han demostrado ser muy útiles para producir una marcada reducción de la NA y DA endógena en cerebro y de la NA en corazón, bazo y otros tejidos periféricos inervados simpáticamente. Estos inhibidores de la primera etapa de la biosíntesis pueden dividirse en cuatro tipos: 1) aminoácidos análogos; 2) derivados catecólicos; 3) tropolonas y 4) quelantes iónicos selectivos. Dentro del grupo de los aminoácidos análogos tenemos  $\alpha$ -metil-p-tirosina y su éster,  $\alpha$ -metil-3-iodo tirosina, 3-iodotirosina y  $\alpha$ -metil-5-hidroxitriptofano. En general, los  $\alpha$ -metil aminoácidos son más potentes como inhibidores que los análogos no metilados (Spector y col., 1965); el incremento en la capacidad inhibitoria de los análogos de la tirosina se obtiene halogenando la posición 3 del anillo bencénico. La mayoría de los compuestos dentro de esta categoría actúan como inhibidores competitivos del sustrato L-tirosina. Los análogos de la L-tirosina halogenados, como la L-3-iodotirosina, son alrededor de 100 veces más activos que la  $\alpha$ -metil-p-tirosina "in vitro", pero son mucho menos activos "in vivo" (Goldstein y Weiss, 1965). Esto se debe probablemente a la rápida desiiodinación de estos compuestos a L-tirosina o análogos de ella que tiene lugar "in vivo". Los inhibidores más ampliamente usados para demostrar los efectos del ejercicio, stress y la acción de drogas sobre el número de recambio de las catecolaminas ha sido la  $\alpha$ -metil-p-tirosina y su metil éster. También se han usado estos dos compuestos para disminuir la formación de NA en pacientes con feocromocitoma e hipertensión maligna.

### Regulación de la síntesis de noradrenalina

Udenfriend y sus colaboradores demostraron que las catecolaminas y otros catecoles son capaces de inhibir la actividad de la TH purificada de médula adrenal bovina (Udenfriend y col., 1965). Empleando como cofactor la 2-amino-4-hidroxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropteridina ( $\text{DMPH}_4$ ), una pteridina sintética, a una concentración de  $10^{-3}\text{M}$  obtuvieron un 50 % de inhibición de la actividad de la enzima con  $10^{-3}\text{M}$  de NA, y demostraron además que esta inhibición era competitiva respecto al cofactor. Esto fue confirmado por Ikeda y col. (1966) que presentaron también evidencias de que era una competición entre la catecolamina y la pteridina por la forma oxidada de la enzima. El mismo grupo de Udenfriend demostró que la actividad de la TH era la etapa limitante en la velocidad de la biosíntesis de la NA; el hallazgo de que podría ser inhibida por el producto final, fue de suma importancia para el estudio de la regulación de la síntesis de la NA (Levitt y col., 1965).

Alóusi y Weiner (1966) y Roth y col. (1967), comprobaron directamente que la estimulación nerviosa está asociada con un aumento en la síntesis de NA a partir de la L-tirosina. Alousi y Weiner con la preparación aislada nervio hipogástrico-conducto deferente de cobayo, demostraron que la estimulación intermitente en presencia de L-tirosina- $^3\text{H}$  estaba asociada con un 50 % de incremento en la formación de catecolaminas- $^3\text{H}$ , efecto que pareció estar en la etapa de hidroxilación de la tirosina ya que no se vio cuando se usó L-DOPA- $^3\text{H}$  como sustrato. Weiner y Rabadjija (1968 a,b) observaron que el efecto de la estimulación sobre la síntesis de catecolaminas

durante la estimulación podía ser reducido o bloqueado adicionando catecolaminas al medio, no así el incremento de actividad de la TH observado en el período de postestimulación. De estos experimentos concluyeron que el aumento en la síntesis por estímulo nervioso se debía a la reducción de la inhibición por el producto final. Al no encontrar diferencia en el contenido de catecolaminas entre el conducto deferente estimulado y el control no estimulado, propusieron que una pequeña cantidad o "pool" de NA en solución en el axoplasma de la neurona adrenérgica, regularía la actividad de la TH. Durante la estimulación nerviosa, presumiblemente, este compartimiento de NA disminuye, reduciendo así la inhibición de la enzima y aumentando la síntesis del neurotransmisor.

Esta teoría de la regulación de la actividad de la TH durante la estimulación nerviosa fue apoyada por varios estudios farmacológicos. Así, las aminas simpatomiméticas de acción indirecta, (actúan liberando NA al citoplasma desde los sitios de almacenamiento, las vesículas) como la tiramina y anfetamina, reducen marcadamente la actividad de la TH en tejidos intactos. Este efecto de la tiramina sobre la síntesis de la NA, es potenciado en presencia de un inhibidor de la monoamino oxidasa (MAO) (enzima que metaboliza a la NA) (Weiner y col., 1972). El bretilio, compuesto que es concentrado selectivamente en los terminales nerviosos adrenérgicos e inhibe la liberación de neurotransmisor inducido por estímulo nervioso (Boura y Green, 1959), inhibe también la síntesis de NA en conducto deferente aislado, mientras que la conversión de L-DOPA a catecolaminas no es afectada profundamente. Este compuesto inhibe asimismo a la MAO, pero esta inhibición no es la responsable de la marcada inhibición de la síntesis de

NA (Weiner y col., 1972). Similarmente, la administración aguda de reserpina, la cual inhibiría la captación de NA y DA por las vesículas adrenérgicas y llevaría a un incremento de catecolaminas citosólicas libres, también ejerce un efecto inhibitorio de la TH "in situ" (Weiner y col., 1972; Pfeffer y col., 1975). Tanto la tiramina como el bretilio y la reserpina, no poseen acción inhibitoria directa sobre la TH soluble (Pfeffer y col., 1975).

Se postuló entonces que la NA liberada de las vesículas intraneuronales al axoplasma de la neurona, interactúa con la TH e inhibe a la misma. Estos resultados están de acuerdo con el concepto de que el nivel de NA intraneuronal libre realmente regula la actividad de la TH en el tejido intacto.

Posteriormente, ha sido demostrado que no sólo la NA sino que otros catecoles como la DA (Zivkovic y col., 1974), en cuerpo estriado de rata, es tan potente inhibidor de la TH como la NA. En el sistema periférico, en aurícula aislada de cobayo, se demostró que la NA, DA, isoproterenol y el metabolito desaminado de la NA, el DOPEG (3,4-dihidroxifenilglicol), fueron equipotentes para inhibir la TH. Sin embargo, el ácido desaminado DOMA (ácido 3,4-dihidroximandélico), el cual es también un catecol, es muy pobre inhibidor de la TH. Consecuentemente, estos resultados indican que la presencia del grupo catecol no implica "per se" que la molécula sea un potente inhibidor de la enzima y que la cadena lateral debe estar implicada en la potencia del compuesto como inhibidor de esta enzima (Rubio y Langer, 1973; Rubio, 1976).

Weiner y Bjur (1972) demostraron que el cofactor, la pteridina redu-

cida, podía estimular la actividad de la TH en tejido intacto, presumiblemente penetrando en el terminal, esto sugirió que, o la concentración de pteridina en el terminal adrenérgico no satura la enzima, o que las catecolaminas libres intracitosólicas son capaces de antagonizar competitivamente la interacción de la enzima con concentraciones saturantes de cofactor. Estos autores demostraron que el efecto inhibitorio de las aminas simpato-miméticas de acción indirecta, del bretilio y de la reserpina sobre la actividad de la TH en conducto deferente o cortes de adrenal, era competitivamente antagonizado por la adición de cofactor sintético (DMPH<sub>4</sub>) a los sistemas de incubación. En contraste, la inhibición de TH no fue antagonizada por adición de cantidades mayores de L-tirosina.

Este hallazgo permitió a Cloutier y Weiner (1973) reexaminar la hipótesis de que la reducción de la inhibición por producto final sería la responsable de la síntesis acelerada de NA asociada con la estimulación nerviosa. Si la hipótesis fuera cierta, el efecto de la estimulación nerviosa sería homologado a la presencia de altas concentraciones de cofactor en el medio, ya que estas eliminarían toda inhibición por producto final en ambas preparaciones, control y estimulada. Sin embargo, Cloutier y Weiner demostraron que el aumento de síntesis de NA asociada con la estimulación nerviosa se observaba adicionando o no el cofactor, la pteridina, es decir la diferencia en la actividad de la TH entre la preparación control y la estimulada era al menos tan pronunciada como la vista en ausencia del cofactor exógeno. Este hecho está en contraste con los resultados antes mencionados (Weiner y Bjur, 1972), y sugieren que el efecto de la estimulación nerviosa sobre la actividad de la TH no se debe a una simple reducción en la inhibi-

ción por producto final, mecanismo que implica la interacción competitiva con la pteridina reducida, sino que debe existir algún otro mecanismo que la provoque.

En 1974, Morgenroth y col. informaron cambios en la actividad de TH soluble, preparada de conductos deferentes, después de la estimulación de campo comparada con la enzima preparada de órganos no estimulados. El tejido estimulado mostró una actividad de TH de  $185,9 \pm 18.2$  pmoles de dopa/mg de proteína contra  $58,8 \pm 4.5$  del tejido no estimulado, con una marcada reducción en el  $K_m$  para la  $DMPH_4$  (de  $280$  a  $50 \times 10^{-6}$  M) y para la L-tirosina (de  $47$  a  $8 \times 10^{-6}$  M) y un sustancial incremento en el  $K_i$  para la NA (de  $24$  a  $380 \times 10^{-5}$  M). Hallaron también un pequeño incremento en la velocidad máxima de reacción de la enzima cuando ponían la  $DMPH_4$  como sustrato variable, de  $238$  a  $361$  pmoles de dopa formada/mg de proteína.

Simultáneamente Zivkovic y col. (1974) demostraron que la TH de cuerpo estriado de ratas inyectadas 30 minutos antes con reserpina aumentó su actividad desde  $2,2 \pm 0.11$  (controles inyectados con NaCl) a  $6,3 \pm 0.73$  nmoles de  $CO_2$  formado/hr/mg de proteína. Un aumento similar hallaron inyectando con otros neurolépticos (butirofenonas, dibenzotepinas, difenilbutilaminas). El cambio cinético de la enzima estaba dado por un aumento de la afinidad por el cofactor, la  $DMPH_4$  desde un valor de  $K_m = 69 \pm 13 \times 10^{-5}$  M sin cambios en el  $K_m$  para la L-tirosina. No encontraron disminución del efecto inhibitorio de la DA por el tratamiento con reserpina, como si el incremento de la síntesis de DA por la reserpina no impidiera su control por su producto.

En el trabajo de Morgenroth y col., ya mencionado (1974), y en los

de Roth y col. (1974 y 1975) sobre estimulación nerviosa de neuronas adrenergicas del hipocampo de rata, en los que miden un aumento muy marcado de la afinidad de la TH por el cofactor y por la L-tirosina, concluyen que la activación de la enzima es una consecuencia de una interacción directa de la enzima con el calcio, cuya captación es aumentada durante la despolarización. Se basan para ello en su hallazgo de que cambios similares a los producidos en la cinética de la enzima por estimulación nerviosa, los encuentran exponiendo la enzima soluble, preparada a partir de tejidos no estimulados, a cloruro de calcio (Morgenroth y col., 1975 a). Sin embargo, otros investigadores han fallado en demostrar un efecto estimulante del calcio sobre la TH preparada ya sea a partir de tejido de origen central (Lerner y col., 1977) o periférico (Weiner y col., 1977) o de médula adrenal (Lerner y col., 1977).

Es a partir de 1975 (Morgenroth y col., 1975 b), que se tienen las primeras evidencias que la proteína kinasa dependiente de AMPcíclico está implicada en la activación de la TH. Ya se sabía por trabajos anteriores (Keen y Mc Lean, 1974; Roth y col., 1975; Harris y col., 1975) que el AMP cíclico producía activación de la TH tanto de terminales como de ganglios adrenérgicos. Morgenroth y col., en su trabajo demuestran que el agregado de AMPcíclico al sobrenadante de alta velocidad, obtenido de cerebro de rata (TH soluble), produce un aumento de 3 a 4 veces en la actividad de TH y que éste se incrementa mucho más por el agregado de proteína kinasa dependiente de AMPcíclico de cerebro, parcialmente purificada; esta activación requirió ATP y  $Mg^{++}$ , lo cual sugiere que la activación puede ser mediada por la proteína kinasa dependiente de AMPcíclico.

Estos hallazgos fueron corroborados luego por otros grupos de investigadores (Rubio, 1977; Weiner y col., 1977). Weiner y col. (1977) sugirieron que la activación de la TH, como consecuencia de la estimulación nerviosa, está mediada por una reacción de proteína kinasa dependiente de AMPcíclico y que la activación puede implicar directa fosforilación de la enzima.

Estos conceptos fueron ampliados por Weiner y col., en 1978; sostienen que la TH presente en las neuronas adrenérgicas parece existir en dos formas, una forma menos activa con una baja afinidad por el cofactor, la pteridina y un estado más activo en el cual la afinidad por el cofactor está aumentada. La incubación del conducto deferente sin estímulo nervioso está asociado a una conversión de la forma más activa, de alta afinidad a una forma menos activa que muestra afinidad reducida por el cofactor. La estimulación eléctrica del nervio hipogástrico del conducto deferente resulta en una casi completa activación de la enzima a la forma de alta afinidad. Igualmente cambios cinéticos se obtienen con la enzima aislada de conductos deferentes que han sido incubados intactos ya sea con el análogo del AMPcíclico el 8-metil<sup>1</sup> AMPcíclico o incubando la enzima soluble con AMP, ATP y  $Mg^{++}$  o con isobutilmetilxantina, un inhibidor de la fosfodiesterasa. Estos resultados están de acuerdo con la noción de que el incremento en la actividad de la TH "in situ", que está asociado con la estimulación nerviosa, resulta de una reacción de fosforilación de proteína dependiente del AMPcíclico. Hasta ese momento no puede decirse si la fosforilación es directa de la enzima o de un activador o inhibidor de la misma (Weiner y col., 1978).

En 1978 se consigue fosforilar la TH purificada de cuerpo estriado de rata (Joh y col., 1978). La TH purificada, incubada con el sistema fos-

forilante, da un único pico de  $^{32}\text{P}$  y una actividad de TH en una única banda de proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida. Por electroforesis en gel con dodecil sulfato de sodio hallaron 3 bandas de PM 52, 62 y 68.000. Sólo la banda de PM 62.000 tenía actividad de  $^{32}\text{P}$  que consideran una subunidad activa de la TH; esta subunidad sería la única que se fosforila. A diferencia de otros autores, que fosforilaron la enzima cruda (Lovenberg y col., 1975; Goldstein y col., 1975; Lloyd y Kaufman, 1975), con esta enzima pura, la fosforilación no les da cambio en la afinidad ni por la L-tirosina ( $K_m = 12.5 \times 10^{-5}$  M) ni por el cofactor, la pteridina reducida ( $K_m = 44.0 \times 10^{-5}$  M), solo un aumento de 2 veces la velocidad máxima ( $V_m$ ) de 78.6 a 171.4 pmoles de DOPA/20 min, para la actividad de TH usada. Esto lo explican diciendo que la diferencia entre la cinética obtenida usando preparaciones puras o impuras de TH, probablemente demuestra el hecho de que el  $K_m$  aparente en las preparaciones crudas de la enzima, es un parámetro cinético mixto de  $K_m$  y  $K_i$  ya que tales preparaciones contienen inhibidores naturales (Ames y col., 1978). Por lo tanto, el cambio en el  $K_m$  aparente por fosforilación sería debido a un cambio en los parámetros cinéticos mixtos más que a un cambio real en el  $K_m$  de la TH. El hallazgo de Ames y col. (1978), de que cuando se eliminan los inhibidores del sistema el cambio de  $K_m$  es mínimo, apoyaría esta teoría.

Para estos autores un modo de regulación de la TH sería vía la siguiente secuencia: incremento del AMPcíclico intracelular mediado por un receptor de membrana, activación de una proteína kinasa dependiente de AMP cíclico, aumento en las cantidades de la forma activa de la TH por fosfori

lación de la enzima inactiva y, por último, aumento en la biosíntesis y disponibilidad del neurotransmisor, la catecolamina.

En 1980, el grupo de Weiner (Vulliet y col., 1980), purifica y fosforila la TH aislada de feocromocitoma de rata; con su preparación obtienen también una sola banda por electroforesis de PM 60.000 que coincide con la actividad de  $^{32}\text{P}$ . Pero estos autores, contrariamente a Joh y col. (1978), encuentran cambio en el Km de la enzima para el cofactor, la 6-metiltetrahidropteridina de  $48.0$  a  $12.0 \times 10^{-5}$  M sin cambio en el Km para el sustrato, la L-tirosina ( $\text{Km} = 7.4 \times 10^{-5}$  M), ni cambio en la Vm de la reacción. Como la estimulación nerviosa induce una activación de la enzima similar a la obtenida por fosforilación, concluyen que es posible que este sea el mecanismo por el cual la TH es activada durante la estimulación nerviosa; la TH sería sustrato para la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico "in vitro" y presumiblemente "in vivo".

Resumiendo lo expuesto sobre regulación de la TH, podemos decir que: los inhibidores de la monoamino oxidasa, las aminas simpatomiméticas de acción indirecta y la reserpina y el bretilio, que no poseen efecto inhibitorio directo sobre la TH, inhiben a la misma en estructuras intactas, presumiblemente incrementando la concentración de NA libre intraneuronal. La NA libre aumentada en el axoplasma inhibe a la TH por antagonismo competitivo con el cofactor, la pteridina. Los efectos sobre la TH de los inhibidores de la monoamino oxidasa, las aminas simpatomiméticas de acción indirecta y el bretilio, pueden ser antagonizados por adición de exceso de cofactor, la pteridina, al medio. La estimulación del nervio hipogástrico de la pre-

paración del conducto deferente aislado del cobayo está asociado con aumento de la actividad de la TH durante la estimulación (Weiner y Rabadjija, 1968 a) y en el período inmediato a la postestimulación (Weiner y Rabadjija, 1968 b). El aumento en la postestimulación, de la síntesis de NA, no es antagonizado por NA. El aumento en la actividad de TH demostrable durante la estimulación nerviosa es parcialmente antagonizado por la NA pero no es revertido por la adición de exceso del cofactor, la pteridina reducida al medio. Este incremento en la actividad de la TH se debería a una fosforilación de la enzima por una proteína kinasa dependiente del AMPcíclico, que llevaría a la misma desde un estado inactivo de baja afinidad por el cofactor, a un estado activado de alta afinidad, o según otros investigadores, sin cambio en la afinidad que permitiría obtener una enzima que por estar activada, llevaría a una reacción de mayor velocidad máxima.

La Fig. 5 representa esquemáticamente los pasos que estarían involucrados en la activación de la TH por estímulo nervioso. Un aumento en el número de impulsos en la neurona noradrenérgica produciría un aumento en la frecuencia de despolarización del terminal nervioso, lo que provocaría un mayor influjo de iones calcio. Este incremento en el influjo de calcio activaría una adenilato ciclasa presináptica, lo que produciría un aumento en la acumulación de AMPcíclico en el terminal. El AMPcíclico activaría entonces, una proteína kinasa dependiente del mismo, la cual luego fosforilaría la TH directamente o a otra proteína todavía no identificada que actuaría como activador alostérico de la TH.

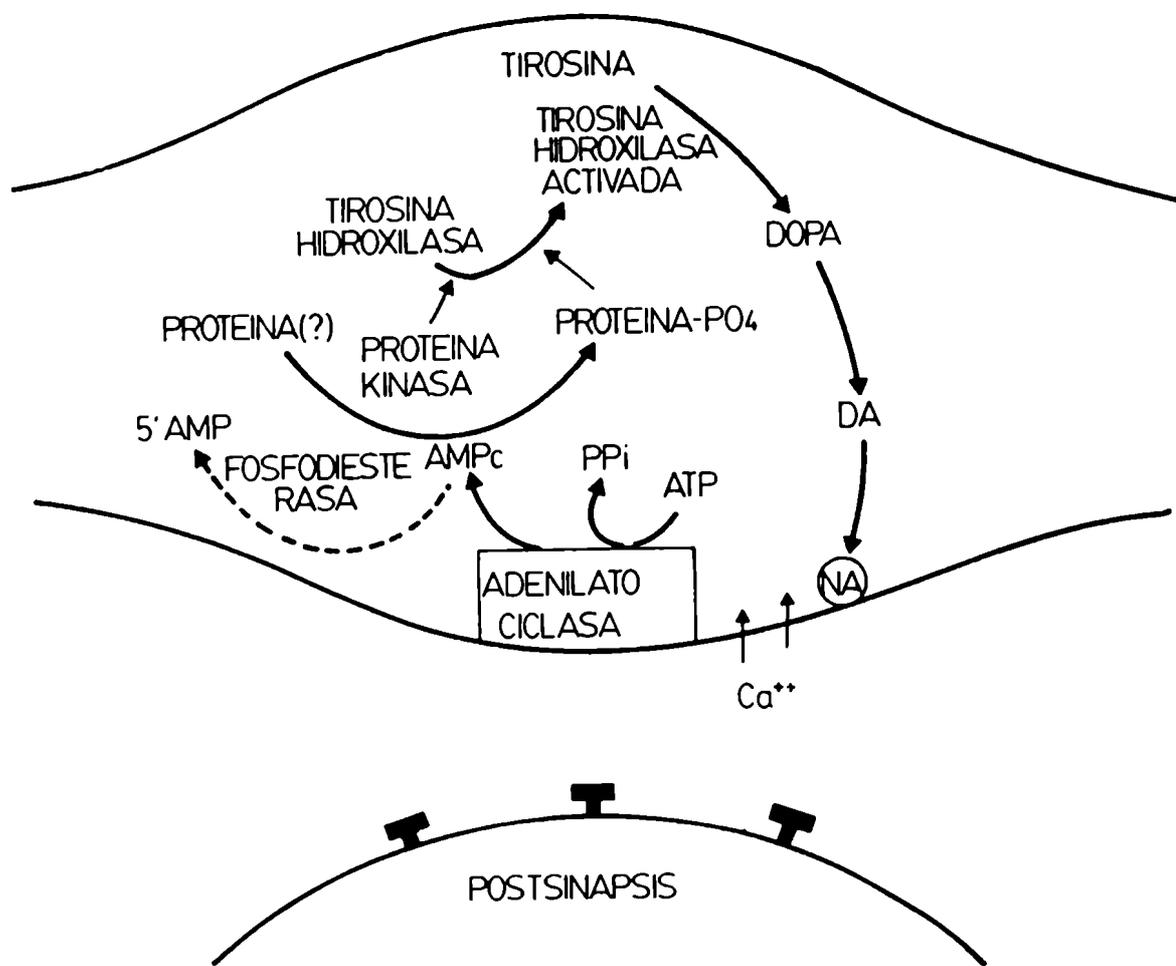


Fig. 5. Esquema de las etapas que involucrarían la activación de la TH por estímulo nervioso.

### Inducción de la TH

Estos mecanismos de regulación de la TH, tanto el de inhibición por producto final o catecoles, así como la fosforilación por proteína kinasa dependiente de AMPcíclico que conduce a la activación de la misma, son mecanismos regulatorios de forma rápida, de corto tiempo, mientras que existe otra forma de regulación a más largo plazo que implica la inducción de la enzima. Los cambios en los niveles (inducción) de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de las catecolaminas están caracterizados por los siguientes hallazgos: a) la actividad "in vitro" de las enzimas está alterada, ya sea aumentada o disminuída, sin que sean responsables de ello activadores, inhibidores o variaciones de cofactores; b) inhibidores de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos actúan en contra del incremento de la actividad de la enzima "in vivo", y c) los cambios en la velocidad de síntesis de las enzimas pueden ser detectados por métodos experimentales, por ejemplo, por inmunoabsorción se ha demostrado que la síntesis de DBH se acelera de 3 a 4 veces durante la estimulación neuronal inducida por drogas en la médula adrenal (Hartman y col., 1970).

Algunos de los factores que conducen a variaciones en los niveles de las enzimas de síntesis de las catecolaminas, la TH entre ellas, son los siguientes:

Hormonas: La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y los glucocorticoides, ejercen una profunda influencia sobre las enzimas que intervienen en el recambio o "turnover" de las catecolaminas. Por ejemplo, la TH y la

DBH de médula adrenal son disminuídas por hipofisectomía y pueden ser restablecidas, al menos parcialmente por ACTH, pero no por glucocorticoides (Mueller y col., 1970 a). El aumento de TH que se observa en situaciones de stress crónico (Kvetnasky y col., 1970), es parcialmente debido a influencias hormonales, principalmente ACTH, aunque también intervienen factores neuronales (Molinoff y Axelrod, 1971).

Entre otras hormonas, se ha observado que la insulina aumenta la TH y también a la DBH en la médula adrenal; este efecto, sin embargo, es debido probablemente a la activación neuronal de la médula adrenal, ya que la insulina no afecta a las adrenales desprovistas de su inervación (Patrick y Kirschner, 1970).

Influencia neuronal: Cambios en la actividad neuronal pueden también afectar el nivel de las enzimas. Se han usado diferentes métodos para modificar la actividad neuronal: estimulación directa de las estructuras como la estimulación eléctrica del hipotálamo (Molinoff y Axelrod, 1971); situaciones de stress artificiales como el stress por inmovilización (Kvetnasky y col., 1970), por exposición al frío (Thoenen, 1970); por ejercicio (Gordon y col., 1966) y por la aplicación de varias drogas, entre ellas 6-OH-dopamina (Mueller y col., 1969 b), reserpina (Mueller y col., 1969 a) o fenoxibenzamina (Dairman y Udenfriend, 1970).

Todos los estímulos utilizados, físicos, psíquicos o drogas, causan aumento de la actividad neuronal ya sea directamente como el estímulo nervioso o en forma refleja debido a la acción de la droga, por ejemplo, el bloqueo de los receptores  $\alpha$  por la fenoxibenzamina, aumenta la descarga de las fibras preganglionares simpáticas.

El aumento en los niveles de la enzima cuando este se produce por el propio impulso nervioso, no sólo se evita con inhibidores de la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos sino también aislando los tejidos. Así, la descentralización del ganglio cervical superior o el uso de agentes bloqueantes ganglionares, previenen el incremento de TH y de DBH inducido por drogas (Thoenen y col., 1969 a; Molinoff y col., 1970; Mueller y col., 1970 b). Similarmente, el aumento por drogas de la TH en adrenal es bloqueado por desnervación de la glándula (Thoenen y col., 1969 b; Patrick y Kirschner, 1970).

El denominador común en todas estas condiciones experimentales es una actividad incrementada de los nervios preganglionares colinérgicos (Thoenen y col., 1969 b). La relación causal entre este común denominador y el aumento en la actividad de TH puede deducirse del hecho de que la sección de las fibras colinérgicas preganglionares (descentralización), previene el incremento de la actividad de la enzima.

El incremento en la síntesis de TH o inducción transináptica no es una manifestación de un aumento general de la síntesis proteica (Mueller y col., 1969 b), condiciones experimentales que llevan a un aumento de 2 a 3 veces la actividad de TH no permiten detectar cambios en el contenido proteico total. De acuerdo con los trabajos disponibles, la inducción está confinada a la TH y a la DBH (Molinoff y col., 1970; Otten y col., 1973), mientras que la tercera enzima que interviene en la síntesis de la NA, la DOPA descarboxilasa, no cambia bajo ninguna condición experimental estudiada hasta ahora.

Dihidroxifenilalanina descarboxilasa (DOPA-descarboxilasa)

La segunda enzima que interviene en la síntesis de las catecolaminas es la DOPA descarboxilasa; fue la primer enzima en este camino biosintético en ser descubierta. La descarboxilación de la L-DOPA está bien documentada en los trabajos de Holtz (1959) y de Sourkes (1966). Aunque se creyó originalmente que removía grupos carboxilo sólo de la L-DOPA, el estudio con preparaciones de la enzima purificada e inhibidores específicos ha demostrado luego que esta DOPA descarboxilasa actúa sobre todos los L-aminoácidos aromáticos que se producen naturalmente, incluyendo histidina, tirosina, triptofano y fenilalanina, así como DOPA y 5-hidroxitriptofano (Lovenberg y col., 1962). Por lo tanto, es más apropiado llamar a esta enzima "descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos". No descarboxila ninguno de los compuestos de la serie D. Por otra parte, ni la L-leucina ni la L-serina son descarboxiladas.

No existe apreciable afinidad de esta enzima a partículas intracelulares, ya que cuando se centrifugan los tejidos a altas velocidades después de homogenizarlos, la actividad de la descarboxilasa permanece casi enteramente en la fracción sobrenadante (Blaschko y col., 1955). Sin embargo, hay evidencias de que esta enzima puede también estar débilmente asociada con las partículas intraneuronales de almacenamiento en los terminales simpáticos (vesículas) (Stjärne, 1966). Preparaciones purificadas de tales partículas de nervios esplénicos son capaces de sintetizar NA a partir de L-DOPA marcada, pero no de utilizar L-tirosina como sustrato, sugiriendo

que la TH no está presente en las partículas de almacenamiento.

En cerebro, algo de actividad de DOPA descarboxilasa está asociada con sinaptosomas (De Robertis, 1964), sin embargo, como los sinaptosomas son terminales nerviosos separados y vacíos, se puede esperar que retengan atrapado algo de citoplasma así como otras organelas intracelulares.

La DOPA descarboxilasa ha sido purificada por Fellman (1959) y Lovenberg y col. (1962); es, en relación a otras enzimas de la cadena biosintética de la NA, muy activa y requiere piridoxal fosfato (vitamina B<sub>6</sub>) como co-factor. El valor de Km aparente para esta enzima es de  $4 \times 10^{-4}$  M. La  $\alpha$ -metil DOPA ( $\alpha$ -metil dihidroxifenilalanina), es inhibidor de la DOPA descarboxilasa ya que inhibe la descarboxilación de todos los aminoácidos que son sustrato de esta enzima (Lovenberg y col., 1962). Sin embargo, potentes inhibidores in vitro de esta enzima, fallan en producir una caída del contenido de NA del tejido administrados in vivo (Drain y col., 1962). La elevada actividad de esta enzima puede explicar porqué ha sido tan dificultoso detectar DOPA endógena en tejidos inervados simpáticamente y en cerebro. La enzima se encuentra en altos niveles en el citoplasma de la mayor parte de los tejidos incluyendo el hígado, estómago, SNC y riñón, sugiriendo que su función en el metabolismo no está limitada solamente a la biosíntesis de las catecolaminas. La circunstancia de haberse encontrado la dopa descarboxilasa en el epitelio intestinal, así como en el endotelio de los capilares del sistema nervioso central, que forman la barrera hematoencefálica (Bertler y col., 1966), estaría indicando una función protectora de la enzima impidiendo el pasaje de los aminoácidos aromáticos. La DOPA descarboxilasa no es inducida en forma transináptica como la TH y la DBH.

### Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa

El último paso en la biosíntesis de la NA implica la  $\beta$ -hidroxilación de DA, catalizada por la enzima DBH. Aunque se sabía desde hacía mucho que en el cerebro, en los tejidos inervados simpáticamente, en los ganglios simpáticos y en la médula adrenal se podía transformar DA en NA, recién en 1960 se pudo aislar esta enzima de la médula adrenal bovina y fue purificada por Levin y Kaufman (1961).

La DBH de la adrenal de bovino es una glicoproteína tetramérica con un peso molecular de aproximadamente 290.000 (Kaufman y Friedman, 1965). Cada una de las cuatro subunidades tiene un peso molecular de alrededor de 75.000, y se ha sugerido que las subunidades están unidas por puentes disulfuro formando dímeros, los que están unidos por uniones no covalentes (Craine y col., 1973). Hay de 3 a 7 moles de cobre por mol de DBH, y el cobre es esencial para la actividad enzimática (Kaufman y Friedman, 1965). La DBH purificada de adrenal bovina contiene aproximadamente 4 % de hidratos de carbono (Wallace y col., 1973).

La DBH de adrenal bovina es una oxidasa de función mixta que requiere oxígeno molecular y ácido ascórbico o alguna otra fuente de electrones para catalizar la hidroxilación  $\beta$  de una gran variedad de feniletilaminas como sustrato. La enzima no es altamente específica y muchas alquilaminas aromáticas pueden servir como sustrato (Kaufman y Friedman, 1965). Así la tiramina pasa a octopamina, la  $\alpha$ -metil dopamina a  $\alpha$ -metil noradrenalina, etc. Algunos de estos compuestos, metabolitos estructuralmente análogos,

pueden reemplazar a la NA en los terminales nerviosos adrenérgicos y funcionar como "falsos neurotransmisores".

Los primeros estudios demostraron que el agregado de ácidos dicarboxílicos, como el fumárico, a la mezcla de reacción, dio como resultado un aumento en la velocidad de reacción (Kaufman y Friedman, 1965). Los ácidos dicarboxílicos parecen ser activadores de la enzima. Finalmente, la actividad de la DBH es incrementada en presencia de catalasa. Se piensa que la catalasa previene la inactivación de la enzima por los peróxidos (Kaufman y Friedman, 1965).

Los homogenatos de tejidos contienen potentes inhibidores de la DBH. Se han hecho varios intentos para inactivar a los inhibidores de la DBH de manera de poder medir adecuadamente la actividad de la enzima (Duch y col., 1968).

La DBH puede ser inhibida por una variedad de compuestos. Los más efectivos son los compuestos que quelan al cobre: D-cisteína y L-cisteína, glutatión, mercaptoetanol y coenzima A. La inhibición puede ser revertida por el agregado de N-etilmaleimida, que reacciona con los grupos sulfhidrilo e interfiere con las propiedades quelantes de estas sustancias. Los agentes quelantes del cobre como el disulfiram (dietilditiocarbamato) y el FLA-63 [bis-(4-metil-1-homopiperazinil-tiocarbonil)-disulfato] han resultado ser inhibidores efectivos "in vivo" e "in vitro". Así, ha sido posible tratar animales con disulfiram y producir una reducción en la NA y una elevación de la DA, en cerebro. Esto sirve como una herramienta útil para establecer los roles relativos de NA y DA en el sistema nervioso central (Goldstein y col., 1964).

Esta enzima generalmente desaparece después de la desnervación simpática crónica y, por lo tanto, está presente sólo en las neuronas adrenérgicas y en el tejido cromafin de la glándula adrenal. La DBH está altamente localizada en el gránulo cromafin de la médula adrenal (Kirshner, 1957), alrededor de la mitad de la enzima está presente en la forma unida y la otra mitad en forma soluble (Brimijoin y Molinoff, 1971). Se ha demostrado también que está presente en los cuerpos celulares y terminales nerviosos (Molinoff y col., 1970) y también muy concentrada en los gránulos que contienen catecolaminas en el corazón (Potter y Axelrod, 1963), en los nervios esplénicos (Stjärne y Lishajko, 1967) y en sinaptosomas de cerebro (Coyle y Axelrod, 1972). En cerebro, la mayor actividad de la enzima se encuentra en el tronco encefálico e hipotálamo, mientras que la más baja actividad está en el cuerpo estriado.

La enzima de la glándula adrenal y de los otros tejidos, muestra dos picos de actividad electroforéticamente distinguibles. Uno de estos picos es eliminado centrifugando a alta velocidad antes de la electroforesis y presumiblemente representa la enzima unida. El principal pico de actividad de DBH de especies diferentes tiene movilidad electroforética distinta, pero dentro de la especie, en todos los tejidos incluyendo el plasma, tiene la misma movilidad (Ross y col., 1972).

La DBH está también presente en el plasma de una variedad de especies mamíferas y proviene de las neuronas simpáticas, de donde es liberada junto con la NA por exocitosis. Las propiedades bioquímicas de la DBH plasmática son muy similares a las de la DBH aislada de la médula adrenal (Weinshilboum y Axelrod, 1971).

La formación de la NA a partir de la L-tirosina implica de esta forma, la participación de tres enzimas que catalizan las reacciones químicas (Fig. 3). Esta secuencia biosintética está complicada por la localización aparente de las enzimas en diferentes regiones de la célula. La L-tirosina, debe ser captada del fluído extracelular hacia la neurona adrenérgica antes de su hidroxilación aromática a DOPA. Como los nervios adrenérgicos comprenden una fracción tan pequeña de los tejidos inervados adrenérgicamente que han sido estudiados, la naturaleza y la cinética de la captación de tirosina dentro de las neuronas son virtualmente desconocidas. La hidroxilación aromática de la tirosina tiene lugar dentro de la neurona adrenérgica. El sitio intracelular exacto de esta reacción es desconocido, pero aparentemente no ocurre en la vesícula de almacenamiento. La L-DOPA que se forma, es descarboxilada dentro del axoplasma de la neurona (Stjärne y Lishajko, 1967), y el producto, la DA, debe ser captado por las vesículas de almacenamiento antes que pueda ser convertido en NA por la enzima DBH, la cual está localizada dentro de la vesícula noradrenérgica (Kirshner, 1957). La NA recientemente sintetizada está probablemente presente en una forma lábil, no unida dentro de la vesícula de almacenamiento, al menos por un breve período de tiempo (Stjärne, 1966). Si ella no escapa de la vesícula ya sea por una salida espontánea o como una consecuencia de la estimulación nerviosa o como el resultado de la acción de alguna droga, es finalmente incorporada en el complejo de almacenamiento de la vesícula.

### Feniletanolamina-N-metiltransferasa

En la médula adrenal, la metilación de la NA, etapa final en la síntesis de la A, es catalizada por la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), en presencia del dador de metilos, la S-adenosilmetionina. Esta enzima fue parcialmente purificada de glándula adrenal de mono por Axelrod en 1962, quien encontró que tenía una especificidad exclusiva para las feniletanolaminas sustituidas y no sustituidas en el anillo (Axelrod, 1962). Estudios posteriores (Axelrod y Vesell, 1970), indicaron que las  $\beta$ -hidroxifeniletilaminas (feniletanolaminas) son mucho mejores sustratos que las feniletilaminas derivadas no sustituidas (100:1). En 1975, Hoffman y col., hicieron un estudio cinético con enzimas más purificadas de bovino y encontraron que mientras las feniletanolaminas son claramente los sustratos preferidos, la feniletilamina, tiramina y DA son también sustratos para la PNMT. El sustrato que se encuentra naturalmente con el más bajo  $K_m$  es considerado generalmente como el sustrato natural de la enzima ( $K_m = 9 \times 10^{-6}$  M para la L-NA). Los datos obtenidos indican que el orden de preferencia para las catecolaminas adrenales es: NA > A  $\gg$  DA (Hoffman y col., 1975).

La NA, octopamina, feniletanolamina y normetanefrina inhiben la PNMT a altas concentraciones de sustrato. Feniletilaminas y feniletanolaminas inhiben la metilación de feniletanolamina. Hoffman y col., en su trabajo cinético (1975), demuestran que los valores de  $K_i$  para las feniletanolaminas son 1000 veces más bajas que los valores de  $K_i$  para las feniletilaminas.

Los niveles de la PNMT en la glándula adrenal están sujetos a una dual regulación por los impulsos del nervio esplénico y por los glucocorticoides de la corteza adrenal (Ciaranello y col., 1975). Después de la hipofisectomía, los niveles de PNMT caen marcadamente; la actividad enzimática puede ser restablecida al valor control por la administración de adrenocorticotrofina o dexametasona, pero ninguna droga eleva la enzima por arriba del nivel control de las ratas intactas.

En contraste, la estimulación del nervio esplénico por reserpina o fenoxibenzamina eleva efectivamente el nivel de PNMT en ratas intactas e hipofisectomizadas (Ciaranello y col., 1975). Estas drogas aumentan la descarga del nervio esplénico y doblan o triplican la actividad de la enzima. La efectividad de la estimulación neural para elevar el nivel de esta enzima en ratas normales está en marcado contraste con la ineficacia de la ACTH o dexametasona, y sugiere que los sistemas de control hormonal y neural que regulan el nivel de PNMT, lo hacen por mecanismos bioquímicos diferentes.

La regulación de la degradación "in vivo" de la PNMT es mediada vía los glucocorticoides adrenales. La S-adenosilmetionina es muy efectiva en estabilizar la PNMT contra la degradación térmica y tróptica, mientras el AMPcíclico es inefectivo (Berembein y col., 1979).

Esta enzima, aunque restringida en alto grado a la médula adrenal, se ha encontrado en bajos niveles de actividad en corazón de rata (Axelrod, 1962) y cerebro de mamíferos especialmente en áreas relacionadas con el olfato (Mc Geer, y Mc Geer, 1964).

Como la descarboxilasa, esta enzima aparece en el sobrenadante de los homogenatos; esta es la razón por la cual siempre se ha considerado una enzima soluble y, por lo tanto, ubicada libre en el citoplasma y no unida a ninguna de las partículas del mismo. En consecuencia, estando la NA, su sustrato, localizada en la vesícula, lugar donde se originó por acción de la DBH, se supone que debe salir al citoplasma para su metilación. Sin embargo, algunos investigadores han informado que hay una cantidad significativamente importante de PNMT particulada de 15 a 20 % en la adrenal bovina (Joh y Goldstein, 1973). van Orden y col. (1977), en estudios inmunocitoquímicos con microscopio electrónico, han encontrado una localización particulada de la PNMT asociada a los gránulos cromafines en la adrenal bovina y sugieren que una parte y posiblemente la mayor de la enzima, pueda estar en forma particulada en el tejido intacto y que la solubilización se produzca durante la preparación del tejido. Esta localización vesicular de la PNMT, evitaría la salida de la NA de la vesícula para su metilación.

C)

Origen de las enzimas de síntesis de la NA y de las vesículas sinápticas.

Transporte axonal

La neurona o célula nerviosa se halla especializada en la conducción y transmisión de impulsos nerviosos. En el tiempo, las neuronas pueden experimentar cambios en el volumen y en la cantidad y complejidad de sus prolongaciones y contactos funcionales, pero su número no aumenta por divisio-

nes celulares. El cuerpo celular o pericarion emite una o más prolongaciones cortas, las dendritas, que transportan los impulsos nerviosos centrípetamente, y una más larga, el axón, que conduce los impulsos en sentido centrífugo a la neurona siguiente o al efector. El axón concluye ramificándose en la terminación nerviosa.

El estudio con los microscopios de polarización y electrónico ha permitido observar en la neurona, además de mitocondrias, canalículos y vesículas del retículo endoplásmico, finos filamentos formados principalmente por elementos tubulares de 200 a 300 Å de diámetro, los neurotúbulos o microtúbulos neuronales, que fueron reconocidos previamente en homogenatos de fibras nerviosas (De Robertis y Franchi, 1953). En un corte transversal de una fibra se ven gran número de neurotúbulos, en forma de anillo, y entre estos anillos se distinguen corpúsculos que corresponden al corte transversal de neurofilamentos. El aglutinamiento de neurotúbulos y neurofilamentos forma las neurofibrillas de la histología óptica.

El cuerpo celular de la neurona (pericarion nervioso), se caracteriza por la presencia de cantidades considerables de material basófilo, que como en otras células, está constituido por ribosomas y retículo endoplásmico. Es también característico de la neurona tener un complejo de Golgi bien desarrollado. La gran abundancia de ribosomas se halla en relación con las propiedades biosintéticas del pericarion. En el axón y en los terminales nerviosos no existen polisomas, por lo tanto, no pueden sintetizar proteínas; por esta razón, la mayor parte de las proteínas sinápticas y axónicas deben ser sintetizadas primero en el cuerpo celular y transporta-

das luego hasta las terminaciones nerviosas; este transporte es el denominado flujo axónico. Weiss (1961), resumió las primeras evidencias, de que el axón además de conducir los impulsos nerviosos, era la ruta para el flujo continuo de sustancias desde el cuerpo neuronal hasta el terminal nervioso.

La existencia de tales flujos se hizo más evidente después de la introducción de técnicas isotópicas que consisten en el empleo de precursores radiactivos de las proteínas o glucoproteínas (lisina- $H^3$  o fucosa- $H^3$ ) y el seguimiento del producto final mediante la radioautografía a nivel del microscopio electrónico (Droz y col., 1973).

Macromoléculas como las proteínas, glucoproteínas y enzimas, solubles en el axoplasma o que integran las distintas estructuras axónicas y sinápticas (es decir, la membrana del axón, neurotúbulos, neurofilamentos, mitocondrias, vesículas sinápticas, membranas del terminal, etc.), son sintetizadas en el cuerpo neuronal y se distribuyen después en las dendritas, el axón y las terminaciones nerviosas, a distancias variables que alcanzan milímetros y aún metros. La vida media de las proteínas presentes en las terminaciones nerviosas varía entre 12 horas y 50 a 100 días (Cuenod y Schonbach, 1971); por lo tanto, deben ser reemplazadas con nuevas proteínas para compensar las pérdidas.

Es evidente ahora, que existe un flujo axónico rápido y un flujo axónico lento de proteínas (Weiss, 1970). El flujo axónico rápido (aproximadamente 280 mm por día), lleva las proteínas sintetizadas por los polisomas unidos al retículo endoplásmico; estas proteínas contribuyen a la re-

novación de la membrana del axón y de las macromoléculas asociadas con las vesículas sinápticas y la membrana presináptica. Otra fracción se encuentra relacionada con las mitocondrias del axón y del terminal. Las proteínas que se mueven rápidamente son así las ligadas a componentes membranosos.

El flujo axónico lento transporta proteínas de la fracción soluble del tejido nervioso. Estas proteínas son sintetizadas sobre todo por los ribosomas libres y probablemente no pasan por el complejo de Golgi. Las enzimas solubles como la acetiltransferasa, las subunidades de tubulina que integran los neurotúbulos y las proteínas de los microfilamentos, son transportadas por el flujo axónico lento (1-15 mm por día).

Pese a que los estudios sobre ligamento de axones simpáticos dieron como resultado la acumulación de catecolaminas del lado proximal del sitio de ligamento (Dahlstrom y Haggendal, 1966; Geffen y Rush, 1968), la mayor parte de la NA liberada por los nervios simpáticos, es sintetizada en las varicosidades terminales (Gewirtz y Kopin, 1970). Las enzimas necesarias para la conversión de L-tirosina a L-NA y las estructuras en las cuales se almacena la catecolamina, sin embargo, son, como dijimos, sintetizadas en el cuerpo neuronal y deben ser transportadas a los terminales nerviosos vía el axón. En las neuronas simpáticas de mamíferos, el transporte axonal de NA y las enzimas que toman parte en la síntesis de catecolaminas, han sido estudiados por numerosos investigadores. Se ha demostrado que las vesículas granulares que contienen NA se transportan en una dirección próximo-distal a una velocidad de 5-10 mm/hora (Dahlstrom y Haggendal,

1966). Esta velocidad de transporte es similar a la de otras sustancias unidas al gránulo tales como DBH (Wooten y Coyle, 1973; Brimijoin, 1975) y cromogranina A (Geffen y col., 1969). Las enzimas no granulares como la DOPA descarboxilasa, se transportan a una velocidad más baja 0.6-3.0 mm/hora (Wooten y Coyle, 1973). Oesch y col., en 1973 sugirieron que las velocidades del transporte axonal de las enzimas que toman parte en la biosíntesis de NA, se correlacionan con su distribución subcelular (Oesch y col., 1973). Sin embargo, Wooten y Coyle (1973) no pudieron confirmar la sugestión de que las enzimas particuladas son transportadas rápidamente y las enzimas solubles lentamente, y Brimijoin y Wiermma (1977), estudiando el transporte axonal de TH, no encontraron evidencias de que la fracción transportada rápidamente tuviera distribución subcelular diferente de la que es transportada más lentamente o fracción estacionaria.

Los trabajos experimentales con colchicina y vinblastina, demostraron que el transporte axónico está relacionado con los microtúbulos. En realidad, la integridad de estos organoides axónicos es imprescindible para la existencia de un flujo axónico normal. Dahlstrom (1970) demostró que la colchicina y la vinblastina inhiben la migración próximo-distal de las vesículas de almacenamiento de NA. Como la colchicina y la vinblastina se sabe que interactúan con los microtúbulos y los desorganizan (Weiss, 1970), estas estructuras han sido implicadas en el transporte de las vesículas (Banks y col., 1971), pero el mecanismo del transporte vesicular es desconocido.

Además del transporte centrífugo de las macromoléculas, hay un flu-

jo axónico en sentido opuesto, retrógrado o centrípeto. La importancia fisiológica de este tipo de flujo fue reconocida cuando se demostró que el factor nervioso de crecimiento (nerve growth factor) era transportado por un mecanismo retrógrado. El mismo, es una proteína de bajo peso molecular, indispensable para el crecimiento de las neuronas adrenérgicas (Levi-Montalcini y Angeletti, 1968).

Una de las más potentes neurotoxinas, la toxina tetánica, es transportada por los axones hasta las células del asta anterior de la médula mediante un flujo retrógrado similar al usado por el factor nervioso de crecimiento. Sin embargo, esta toxina queda confinada al pericardio y las dendritas de la motoneurona y se la encuentra también en los terminales nerviosos que llegan a la neurona (Schwab y Thoenen, 1976).

### III- Almacenamiento de catecolaminas. Partículas subcelulares

#### A) Médula Adrenal

En 1953, Blaschko y Welch, y Hillarp y col., demostraron que dentro de las células de la médula adrenal, las catecolaminas están almacenadas en gránulos densos, los cuales pueden ser separados de las mitocondrias y otras partículas intracelulares por centrifugación en gradiente de concentración. Muchos estudios se han realizado posteriormente sobre las propiedades de estas partículas de almacenamiento de la médula adrenal, y en ellos se analizaron la composición química y los mecanismos por los cuales ellas captan, almacenan y liberan sus componentes (ref. en von Euler, 1972).

Las vesículas o gránulos cromafines tienen un contenido de agua, de acuerdo con los distintos informes, del 60 % de su peso húmedo. Las catecolaminas (especialmente NA y A), constituyen el 21 % de su peso seco. Esto implica que la concentración de las aminas en el gránulo es del mismo rango que la de las proteínas (35 %) y la de los lípidos (22 %), ambos expresados también en por ciento de peso seco, lo cual hace improbable que las aminas puedan ser almacenadas exclusivamente por unión ya sea a las proteínas o a los lípidos. La característica más sobresaliente de la composición química de las vesículas cromafines es su alto contenido en nucleótidos de adenina, principalmente en la forma de ATP, el cual constituye el 15 % del peso seco, con una relación molar amina/ATP muy cerca de 4/1.

Esta relación se mantiene durante varios estados de depleción y repleción de la amina y tanto "in vivo" como "in vitro" (Stjärne, 1972). La relación molar relativamente fija más la inactividad metabólica del ATP granular, han llevado a la proposición de que los nucleótidos de adenina en las vesículas o gránulos cromafines, están para balancear las cargas positivas de las catecolaminas y mantener la electroneutralidad. A pesar de los esfuerzos hechos, no se ha podido demostrar convincentemente tal complejo amina-ATP.

En el gránulo también hay proteínas; ellas incluyen por lo menos dos con funciones enzimáticas conocidas, DBH y ATPasa. La primera ya dijimos que existe en dos formas, soluble y particulada, mientras que toda la actividad de la ATPasa se encuentra en la fracción de proteínas de "membrana" insoluble.

Sin embargo, el grueso de la proteína del gránulo, parece no tener actividad enzimática. El rasgo más llamativo de esta proteína estructural es la alta proporción de material soluble en agua, estimado en 63 a 77 % del total de proteína. El 50 % de esta fracción es una proteína fuertemente acídica, o grupo de proteínas, llamadas cromograninas, las cuales parecen ser específicas para el almacenamiento de catecolaminas en la médula adrenal y en nervios simpáticos.

En cuanto a la composición en aminoácidos de las cromograninas hay coincidencia en que hay un gran exceso de residuos acídicos, principalmente ácido glutámico y bajo contenido de cistina y cisteína, indicando esto último considerable flexibilidad. El alto contenido de prolina, un amino ácido desorganizador de la hélice proteica, así como la medición de las

propiedades hidrodinámicas de la cromogranina A purificada, uno de los tipos de cromogranina, ha sido interpretado como una indicación más de la estructura al azar y de la alta flexibilidad de su conformación. Sin embargo, no hay total acuerdo en cuanto al grado de azar de la estructura (Stjärne, 1972).

Estas consideraciones bioquímicas han servido para proponer mecanismos de almacenamiento y liberación de catecolaminas. Por ejemplo, la espiral al azar característica de esta proteína, significa que su volumen hidrodinámico está determinado por repulsión electrostática entre el exceso de residuos de aminoácidos cargados negativamente, y por lo tanto, el volumen estará inversamente relacionado a la fuerza iónica del medio. Esto implica contractilidad, lo cual puede ser relevante fisiológicamente para la liberación de aminas, ya que un cambio en el estado físico de las catecolaminas y el ATP en los gránulos desde una forma unida a un estado ionizado libre, produciría un aumento local de osmolaridad.

Los lípidos constituyen el 22 % del peso seco de las vesículas o gránulos cromafines, estos lípidos difieren de los lípidos de otras organelas como las mitocondrias o microsomas en que tienen una alta relación colesterol/fosfolípidos y una muy alta proporción de lisolecitinas.

Otro componente de las vesículas de almacenamiento de las células cromafines es el calcio; éste se encuentra en una cantidad 6 veces mayor por unidad de proteína que en la mitocondria. También se ha detectado la presencia de RNA pero no se ha descartado que sea una contaminación.

Los gránulos a 0°C mantienen su contenido en catecolaminas por varios

días, lo que indica que el complejo no depende del continuo aporte de energía, por lo menos no a temperaturas bajas. Además, la membrana de la vesícula es permeable a las catecolaminas así como también al ATP a 0°C, la conclusión es que las aminos y el ATP no existen en el gránulo en una forma difusible. Esto es apoyado por el hecho de que no hay intercambio de catecolaminas endógenas por exógenas a esta temperatura. La hipótesis del complejo de almacenamiento postula así que las catecolaminas son guardadas en las vesículas en una forma no difusible por unión a cantidades equivalentes de ATP y alguna macromolécula o proteína específica, junto con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .

Sin embargo, este complejo estable, es rápidamente desorganizado por tratamientos que dañan las membranas de la vesícula, congelamientos y descongelamientos, disminución del pH, detergentes, etc. La suspensión en agua destilada, medio hipotónico, es el método que se usa de rutina para la extracción de los gránulos, que pierden rápidamente su contenido soluble: catecolaminas, ATP y proteínas solubles. Los efectos del shock osmótico, son estrictamente proporcionales al gradiente de osmolaridad y se completan en cuestión de minutos (eflujo de catecolaminas y ATP).

A temperaturas mayores, las suspensiones de gránulos cromafines en medio isotónico sufren una gradual y paralela pérdida de catecolaminas, ATP, proteínas solubles y aún  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  a una velocidad que aumenta con la temperatura (Stjärne, 1972).

## B) Nervios Adrenérgicos

A partir de datos analíticos, basados en las cantidades relativas de

NA en nervios esplénicos y tejido esplénico y la cantidad probable de tejido nervioso en el bazo, von Euler infirió en 1954, que la amina está acumulada en los terminales nerviosos. Experimentos posteriores de von Euler de 1956, con nervios esplénicos bovinos, mostraron que la NA estaba unida a una fracción particulada subcelular pequeña, obtenida en el sedimento de homogenatos de órganos y nervios adrenérgicos por centrifugación a alta velocidad. La NA presente en las partículas, llamadas gránulos, estaba unida a ellos, como lo mostraba el hecho de que no era susceptible a los oxidantes y no era adsorbida al pasarla a través de alúmina. Además, no era biológicamente activa hasta no ser liberada de los gránulos (von Euler, 1972).

La citología de estas partículas ha sido estudiada por microscopía electrónica. Después de exprimir los nervios esplénicos bovinos y remover las partículas más grandes, se obtuvo una suspensión de gránulos osmiofílicos con un diámetro de 0.03-0.15  $\mu$  (von Euler, 1972). Estos gránulos osmiofílicos son los aislados también de médula adrenal y de varias regiones del sistema nervioso central. Ellos se corresponden con estudios similares de micrografías electrónicas de secciones de tejido (De Robertis y de Iraldi, 1961; Bloom, 1973). Después de la administración de NA radiactiva a los animales, ha sido posible mostrar que los granos de plata se ubican sobre las partículas del nervio en preparaciones estudiadas por combinación de autoradiografía y microscopía electrónica.

Estas partículas o gránulos, llamadas vesículas granulosas pequeñas con centro de densidad electrónica alta, típicas de los terminales adrenérgicos, (hay también vesículas granulosas grandes con centro denso), pueden

perder su granulaci3n interna usando agentes farmacol3gicos que liberan las catecolaminas. Adem3s, esta granulaci3n interna aumenta en presencia de inhibidores de monoamino oxidasa o cuando se administran precursores de las catecolaminas. Todos estos resultados indican que las ves3culas granulosas peque1as contienen el transmisor adren3rgico. Tambi3n mediante t3cnicas citoqu3micas, se pudo demostrar que contienen NA y en algunos casos, tambi3n 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Jaim-Etcheverry y Zieher, 1971).

Estas ves3culas o gr3nulos de almacenamiento del transmisor, aparecen en muy alto n3mero en el engrosamiento o varicosidad del terminal nervioso adren3rgico, algunas veces agrupadas estrechamente. En el ax3n se las encuentra mucho m3s espaciadamente y son en su mayor3a del tipo de ves3culas grandes. De la dispersi3n relativa y considerando el mismo contenido relativo de NA en las part3culas, la concentraci3n del transmisor ser3a alrededor de 100 veces mayor en la varicosidad del terminal que en el ax3n. Como el tronco nervioso espl3nico contiene alrededor de 10 ug/g, la concentraci3n en las varicosidades ser3a del orden de 1 mg/g, la cual es similar a la del tejido cromafin (gl3ndula adrenal).

La NA de los nervios espl3nicos bovinos se recupera alrededor de 30-40 % en el sedimento de alta velocidad y el resto en la fracci3n soluble. Este resultado pareci3 indicar que una proporci3n de la NA es libre o est3 d3bilmente unida, pero el estudio de von Euler, de la influencia de la homogenizaci3n del tejido sobre la distribuci3n de la NA, demostr3 que si se prolonga el tiempo de homogenizaci3n, disminuye el porcentaje de NA unida a part3culas. Por extrapolaci3n, la proporci3n original de NA libre ser3a

10 % o menos. Este concepto es apoyado por la observación de que la NA recientemente sintetizada, la cual no puede ser almacenada, por ejemplo después de reserpina, es rápidamente metabolizada o abandona el axón (von Euler, 1972).

Las partículas de almacenamiento de los nervios adrenérgicos son similares en muchos aspectos a aquellas aisladas de la médula adrenal. Dentro de las partículas de los nervios, la NA puede estar complejada con nucleótidos de adenina, pero la relación NA/ATP hallada en nervios esplénicos es mayor, 18-19/1 (Lagercrantz y col., 1975). La NA es liberada espontáneamente de las partículas de los nervios esplénicos incubadas a 37°C en buffer fosfato con una vida media de 5 minutos, mientras que a 0°C permanece firmemente unida y no se libera. La liberación es acelerada por ácidos, detergentes y medios hipotónicos. Las partículas de almacenamiento de los nervios adrenérgicos difieren de las partículas de almacenamiento de la médula adrenal en tamaño y densidad. Las partículas de médula adrenal pueden tener 1  $\mu$  de diámetro y sedimentan en un gradiente de densidad de sacarosa en una capa de aproximadamente 1,8 M, debajo de las mitocondrias, las partículas de los nervios adrenérgicos son aproximadamente de 450 Å de diámetro y se encuentran en la capa de aproximadamente 0,3 M de sacarosa, bien por arriba del nivel de las mitocondrias.

Aunque la mayor parte de la NA en los terminales puede, normalmente, encontrarse almacenada en las vesículas, varias observaciones apoyan la idea de que hay más de un compartimiento o "pool" de la misma. Existiría así, una pequeña fracción, la cual parece que es la que se libera por esti

mulación nerviosa y varios agentes como la tiramina, esta sería la "NA disponible", término que usó Trendelenburg para designarla. Este pequeño compartimiento podría ser rellenado a partir de un compartimiento más grande. Se ha sugerido también que las vesículas de almacenamiento que se encuentran cerca de la membrana de la sinapsis forman un compartimiento que se libera por tiramina y capta  $NA-H^3$  preferencialmente; este "pool" o compartimiento podría estar asociado con la membrana axonal o aún formar parte de ella (von Euler, 1972).

### C) Captación de Catecolaminas

Normalmente los nervios adrenérgicos, como los órganos a los que ellos inervan, contienen una cantidad de neurotransmisor característico, sujeto a moderados cambios aún bajo condiciones de muy variada actividad. Esto sugiere una limitada capacidad de almacenamiento, lo que permite una limitada captación. Raab y Humpreys (1947) fueron los primeros en demostrar un aumento en el contenido de catecolaminas en los corazones de perro y gato, después de la administración de grandes dosis de NA o A "in vivo".

La disponibilidad de NA radiactiva de alta actividad específica proveyó un método que permitió similares estudios pero, inyectando dosis más pequeñas, y similares a las encontradas en condiciones fisiológicas.

Un problema que no ha sido del todo dilucidado es si cantidades trazadoras de aminos marcadas se distribuyen en una forma representativa de la distribución endógena en el organismo bajo todas condiciones.

Para el estudio de los experimentos de captación es preciso hacer una distinción entre la captación a través de la membrana axonal y la captación por los gránulos a través de su membrana, particularmente porque algunas drogas tienen diferentes acciones sobre la captación de estos dos sitios. Como no hay un método directo que permita estudiar los efectos de las drogas sobre la captación a través de la membrana axonal, lo que se hace es comparar el efecto de las drogas sobre la captación total por los nervios (por fluorescencia histoquímica, por ejemplo), con la captación por las partículas de almacenamiento y así es posible, algunas veces, determinar si una inhibición de la captación está localizada en uno u otro sitio.

La primera demostración de la importancia de la captación por el tejido en la distribución de las catecolaminas circulantes, fue hecha por Axelrod y col. (1959). La A-H<sup>3</sup>, 0.1 mg/kg administrada en forma intravenosa a los ratones, desaparecía en dos fases. En los primeros 5 minutos había un rápido metabolismo del 70 % de la dosis, principalmente O-metilación, el 30 % restante desaparecía muy lentamente y detectaban A intacta en los tejidos del animal, muerto varias horas después de la inyección.

La presencia de la barrera hematoencefálica había impedido el estudio de la captación de catecolaminas por el cerebro "in vivo" hasta que Glowinsky y col. (1965) administrando directamente la amina tritiada en el ventrículo lateral, realizaron los estudios de captación, almacenamiento y metabolismo.

En los experimentos de Iversen se encontró que la captación de NA fue mayor en tejidos con rica inervación simpática, midiendo ésta como contenido

endógeno de NA en el tejido y la correlación se hace aún mayor si se tiene en cuenta además la irrigación sanguínea del tejido.

En los tejidos que por algún medio pierden la inervación simpática, la captación de NA se encuentra fuertemente reducida. Esto ha sido demostrado luego de simpatectomía quirúrgica, química o de inmunosimpatectomía (Iversen y col., 1966). La captación residual de los tejidos desnervados representaría una acumulación en un sitio extraneuronal del mismo y esta acumulación se haría importante en determinadas condiciones, como por ejemplo, en condiciones de inhibición del metabolismo del neurotransmisor.

La evidencia directa de la localización en los nervios simpáticos de la NA captada se ha hecho por dos métodos, uno que combina radioautografía y microscopía electrónica después de una inyección de  $NA-H^3$ , y se hizo en corazón y glándula pineal de rata (Wolfe y col., 1962), y otro mediante una técnica de fluorescencia histoquímica para visualizar las catecolaminas en los tejidos (Hamberger y col., 1964). Estos últimos experimentos mostraron que la captación de NA tiene lugar no sólo en los terminales simpáticos sino también en los axones preterminales y en los cuerpos celulares nerviosos simpáticos postganglionares del ganglio cervical superior. Es decir, la captación se realiza en cualquier punto de la superficie de la neurona simpática postganglionar.

Además de captarse la NA debe estar almacenada posiblemente en el mismo compartimiento que la NA endógena ya que experimentos realizados administrando  $NA-^3H$ , ésta puede ser liberada del bazo de gato por estimulación del nervio esplénico (Hertting y Axelrod, 1961).

### Propiedades del Proceso de Captación

Muchos estudios demostraron que la captación de NA se realiza en contra de un considerable gradiente de concentración. En animales enteros, la NA-<sup>3</sup>H captada por los tejidos después de la inyección intravenosa, alcanza un nivel considerablemente más grande que el del plasma. En cortes de tejido de corazón y cerebro, la incubación con la amina eleva los niveles más de 5 veces con respecto al medio de incubación, y la perfusión de órganos aislados como corazón de rata perfundido con bajas concentraciones (10-20 ng/ml) de NA, la acumulación es de 30 a 40 veces la concentración del medio de perfusión. Si se considera que la captación es sólo en los plexos nerviosos simpáticos, en el corazón, la relación entre los terminales y el medio externo es quizás mayor de 10.000:1.

En cuanto a la cantidad de NA exógena que se puede retener, los experimentos revelan que por lo general los tejidos acumulan hasta el doble de su contenido endógeno.

La captación de NA-<sup>3</sup>H por cortes de cerebro y corazón, se satura cuando la concentración en el medio de incubación está por arriba de 25 ng/ml. Dengler y col., en 1961 fueron los primeros en sugerir que la captación de NA estaba mediada por un proceso de transporte de membrana saturable. Haciendo mediciones de velocidad inicial de captación para diferentes concentraciones de perfusión, encontraron que los valores respondían a la ecuación de Michaelis-Menten que describe las interacciones enzima-sustrato saturables y pudieron calcular la velocidad máxima de captación ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y la

constante de disociación para la interacción de la NA con el sitio de captación ( $K_m$ ). Los valores para la (-)-NA fue  $0.27 \times 10^{-6}$  M y 0.20 ug/min/g para  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente, en corazón de rata.

El proceso de captación es estereoespecífico, habiendo marcada preferencia por la (-)-NA, que es la natural. A los pocos minutos después de una inyección de (+)-NA, se acumula en el corazón de la rata 10 veces más (-)-NA- $^3H$  que (+)-NA- $^3H$ . En cuanto a la velocidad de captación, la (-)-NA es varias veces más rápida que la (+)-NA, cuando los corazones se perfunden con bajas concentraciones de los dos isómeros. La afinidad del proceso de captación es también mayor para la (-)-NA,  $0.27 \times 10^{-6}$  M y  $1.39 \times 10^{-6}$  M el valor de los  $K_m$  para la (-) y (+)-NA respectivamente.

Esta especificidad estructural en la captación se estudió en otros compuestos, así el isoproterenol es captado en cantidades despreciables, lo que indica que el crecimiento del residuo alifático en el grupo  $NH_2$ , disminuye la afinidad.

La  $\alpha$ -metil NA es captada por el corazón de rata aislado por un proceso similar a la NA y más rápidamente que ésta. La tiramina es también captada por el proceso de captación de catecolaminas y anulado también por desnervación. El metaraminol es ávidamente acumulado por tejidos de rata e inhibido por drogas que inhiben la captación de NA (Iversen, 1967a, ref. en el mismo).

#### Distribución subcelular de la NA acumulada

Las catecolaminas que han penetrado en la fibra nerviosa simpática su

fren una redistribución. Potter y Axelrod estudiaron la distribución subcelular de la  $NA-^3H$  en varios tejidos de rata, después de la administración de pequeñas dosis de  $NA-^3H$ . Por centrifugación en gradiente de densidad de los homogenatos, la mayor proporción de NA se ubica en las partículas microsomales que contienen las vesículas de almacenamiento que liga la mayor parte de la NA endógena del tejido. En 1963, Iversen y Whitby, demostraron que la  $NA-^3H$  de la fracción microsomal, después de la inyección de la amina- $^3H$ , permanece constante desde 3 minutos hasta 24 horas después de la misma, aunque cambia el contenido total de la  $NA-^3H$  durante ese tiempo. Esto indica que las catecolaminas acumuladas son rápidamente distribuidas dentro de las partículas de almacenamiento del nervio simpático (Iversen, 1967 a).

#### Intercambio de catecolaminas exógenas con endógenas

Hay considerable evidencia de que el almacenamiento de NA en los terminales nerviosos adrenérgicos no se realiza en un solo compartimiento, hay también evidencia de que las catecolaminas acumuladas no se mezclan libremente con la NA endógena almacenada. La  $NA-^3H$ , inicialmente acumulada después de la exposición en corazón de rata, representa una neta captación que se agrega a los depósitos endógenos. Esta amina acumulada se intercambia muy lentamente con la endógena y no pasa del 30 % después de 1 hora de perfusión. La estimulación nerviosa libera NA con más alta actividad específica que la del tejido total, lo que indica una preferencial liberación; esta libera-

ción preferencial según Fischer y Iversen, prosigue más allá de las 6 horas, lo que hablaría a favor de un lento intercambio, (Iversen, 1967 a).

Sin embargo, Langer y Vogt (1971), marcando el tejido con  $\text{NA-}^3\text{H}$  y equilibrándolo durante 90 minutos, encontraron que cuando estimulaban a una frecuencia de 25 Hz, la relación de  $\text{NA-}^3\text{H}$ /endógena no era significativamente diferente entre lo liberado al baño y el tejido. Esto muestra que los períodos de incubación y lavado prolongados, producen una casi homogénea marcación dentro de los nervios simpáticos, y que en ciertas condiciones experimentales, se logra una homogénea marcación del tejido.

#### Desaparición de las catecolaminas acumuladas

La  $\text{NA-}^3\text{H}$  acumulada desaparece aparentemente en una forma compleja. La  $\text{NA-}^3\text{H}$  acumulada en los tejidos de la rata después de la inyección, es liberada de los tejidos en dos fases, estudiada en la excreción urinaria: la primera fase tiene una vida media de alrededor de 1 hora y es debida a la liberación de  $\text{NA-}^3\text{H}$  libre o normetanefrina- $^3\text{H}$ , y la segunda fase de liberación con una vida media de 6 horas, es debida principalmente a los metabolitos desaminados. Sin embargo, esto no puede ser confirmado ya que otros investigadores han informado que luego de dosis trazadoras de  $\text{NA-}^3\text{H}$ , la desaparición de la misma del corazón de rata no es multifásica sino un solo componente con decaimiento exponencial simple (Iversen, 1967 a).

### Entrada bifásica de las catecolaminas en los nervios simpáticos

Los estudios de la captación de NA en función del tiempo por el corazón aislado de rata, muestra dos fases en la curva de captación. Esto sugiere la existencia de por lo menos dos compartimientos o sitios distintos, uno muy rápido con una vida media de 5 minutos y uno más lento con una vida media de 20 minutos. En los animales reserpinizados está ausente esta segunda fase. Como la reserpina impide el almacenamiento del neurotransmisor en los gránulos, esto significaría que la segunda fase de la curva de captación representaría la acumulación lenta de la amina dentro de los gránulos y la primera fase rápida, la entrada al axoplasma (Iversen, 1967 a).

### El segundo proceso de captación (uptake<sub>2</sub>)

Perfundiendo corazones con concentraciones de NA por arriba de 0,5 ug/ml, Iversen encontró una rápida captación que no pudo explicarse en términos del mecanismo descrito y tampoco se puede explicar en términos de difusión, ya que la acumulación que se alcanzó fue varias veces más elevada que el medio de perfusión. Las velocidades iniciales de captación a diferentes concentraciones respondieron a la ecuación de Michaelis-Menten con un Km de  $252 \times 10^{-5}$  M para la (+)-NA. Esta captación tenía más afinidad por la A. Las catecolaminas acumuladas por esta captación desaparecían rápidamente por lavado (Iversen, 1967 a). De estos resultados y de los estudios de fluores

cencia histoquímica con el método de Hillarp-Falck, que demostraron la acumulación de NA extraneuronal, junto con el hallazgo de inhibidores de la captación extraneuronal (catecolaminas O-metiladas, esteroides, etc.) que no producían supersensibilidad a la NA, se concluyó que la captación extraneuronal ( $\text{uptake}_2$ ) no jugaba ningún rol en la regulación de la concentración de NA en los receptores del órgano efector.

Es a partir de 1973, con los estudios de Kaumann sobre la sensibilidad a las catecolaminas de la aurícula aislada de gato después de la inhibición de la catecol O-metil transferasa (COMT) o de la captación extraneuronal, que se tuvieron las primeras evidencias de la función de la captación extraneuronal. Estos estudios demostraron que existe una relación entre la sensibilidad de la preparación a las catecolaminas antes del inhibidor y la habilidad de los mismos para causar supersensibilidad: esta supersensibilidad inducida por inhibidores de COMT o de la captación extraneuronal, se detectaba solo cuando la sensibilidad de la preparación a la catecolamina era aproximadamente de una  $DE_{50}$  por debajo de  $10^{-5}M$ . Esto fue interpretado de la siguiente forma: cuando la  $DE_{50}$  es baja, el sistema inactivador extraneuronal (captación y O-metilación) no está saturado y su inhibición causa supersensibilidad; si la  $DE_{50}$  es alta, el sistema está saturado y la inhibición del sistema no produce supersensibilidad. Tal sistema tendría entonces un  $K_m$  bajo para las catecolaminas de  $10 \mu M$  o menor ( $1 \times 10^{-5} M$ ).

Estos resultados contrastaron con los de Iversen, que demostró un  $K_m$  de  $25.2 \times 10^{-5} M$  para la captación extraneuronal de la NA. Esta controversia fue resuelta por Trendelenburg y col., analizando la O-metilación de las ca

tecolaminas en tejidos intactos, en condiciones experimentales similares a las usadas en los estudios de sensibilidad. Primero, observaron que la perfusión de corazón de rata con bajas concentraciones de  $\text{NA-}^3\text{H}$  ( $10^{-6}$  M), los metabolitos se formaban casi en su mitad en el sistema extraneuronal y segundo que la O-metilación extraneuronal de isoproterenol-  $^3\text{H}$  o  $\text{NA-}^3\text{H}$  que eran sensibles a la inhibición por esteroides de la captación extraneuronal respondían a la ecuación de Michaelis-Menten y se caracterizaban por un  $K_m$  entre  $3$  y  $12 \times 10^{-6}$  M. De sus resultados concluyeron que en todos los órganos que tienen una captación extraneuronal bien desarrollada y que se han analizado cinéticamente, las constantes cinéticas de estos sistemas están de acuerdo con el punto de vista de que ellos constituyen sitios de pérdida para la amina en el espacio extracelular. Estos sitios de pérdida son capaces de regular la concentración de catecolaminas en el receptor, ya que su inhibición causa una supersensibilidad característica. Como ellos funcionan óptimamente a bajas concentraciones de sustrato, deben tener un rol fisiológico (Trendelenburg, 1979).

#### D) Acción de drogas en el proceso de captación

Se han hecho innumerables estudios de la acción de drogas sobre la captación de NA, tanto en órganos como en partículas aisladas de nervios. Estas drogas son:

- a) Cocaína: Blaschko, en 1954, fue el primero en mencionar la posi-

bilidad de que la potenciación de la acción de la NA por cocaína se podría deber a una acción inhibitoria de ésta sobre la captación de la catecolamina por el tejido.

En 1959, Mc Millan sugirió que la cocaína, inhibiendo la captación de NA por los tejidos, aumentaría la cantidad disponible para los receptores y de esa manera potenciaría el efecto. Posteriormente, fueron encontradas muchas evidencias sobre la validez de esta teoría (ref. en von Euler, 1972).

b) Bloqueantes adrenérgicos: La acción inhibitoria de la captación se encontró también en varios bloqueantes adrenérgicos; estos tienen la mayoría de las propiedades que se pueden esperar como consecuencia de su habilidad de inhibir la captación de NA. Así, la fenoxibenzamina potencia la acción de la NA y la A en la aurícula de conejo y aumenta la liberación de NA del bazo de gato estimulado a bajas frecuencias de estimulación (Iversen 1967 b). Esta última acción puede deberse a la acción combinada de la inhibición de la captación y al bloqueo de los receptores presinápticos a que aumenta la liberación por estímulo nervioso (Langer, 1974).

c) Aminas simpatomiméticas: Se encontró que las aminas simpatomiméticas, tiramina, anfetamina y efedrina, actuaban como inhibidores de la captación de NA. Esto llevó a Burgen y Iversen en 1965, a un detallado estudio de la inhibición de la captación de NA por aminas relacionadas estructu<sup>ra</sup>lmente con ella. Los resultados que obtuvieron fue que casi todas las aminas probadas, tenían alguna actividad inhibitoria y que las de mayor potencia inhibitoria eran también las que eran captadas más fácilmente (Iversen, 1967 b).

En el caso de aminas simpatomiméticas de acción indirecta, como la tiramina, la captación por los nervios debe ser preliminar al desplazamiento posterior de la NA desde los sitios de almacenamiento dentro del nervio. Esto indicaría porqué la cocaína bloquea la acción de la tiramina (Iversen, 1967 b).

d) Otros inhibidores de la captación: La imipramina inhibe la captación de  $NA-^3H$  en el corazón y bazo; en el cerebro la inhibe después de la administración de la imipramina en el ventrículo lateral. La desipramina y la amitriptilina actúan similarmente. La más potente en inhibir la captación, de estas tres drogas psicotrópicas y quizás de todas las drogas hasta ahora conocidas, es la desipramina.

El haber podido aislar, tanto de médula adrenal como de nervios adrenérgicos periféricos, las partículas de almacenamiento de las catecolaminas, ha permitido estudiar la acción de drogas sobre la captación y almacenamiento por estas partículas. Este sistema presenta la ventaja de su simplicidad.

Las partículas aisladas de nervios adrenérgicos liberan catecolaminas espontáneamente si se incuban en sacarosa isotónica o cloruro de potasio. Esta liberación es más rápida a  $37^{\circ}C$  que a  $4^{\circ}C$ . La presencia de bajas concentraciones de reserpina ( $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  M) inhibe esta liberación espontánea. A bajas concentraciones la reserpina también inhibe la captación de catecolaminas exógenas, a concentraciones entre  $2 \times 10^{-7}$  y  $7 \times 10^{-7}$  M, la reserpina produjo 50 % de inhibición de la captación de NA en las partículas del nervio esplénico, indicando que la droga actúa sobre la captación de estas partículas (Stjærne, 1964). Stjærne también encontró que una molécula de

reserpina podría inhibir la captación de varios cientos de moléculas de catecolaminas, indicando que la droga probablemente interfiere con algún mecanismo específico de captación de las partículas, más bien que compitiendo con las catecolaminas por sitios de almacenamiento intraparticulares.

Como la captación y la liberación espontánea son dependientes de la temperatura y ambas son inhibidas por la reserpina, parece más bien que no sólo la captación sino también la liberación estuvieran mediadas por un mecanismo químico especial.

von Euler y Lishajko, encontraron que las aminas de acción indirecta como la tiramina, aumentan la velocidad de liberación de NA de las partículas incubadas en fosfato de potasio. La mayor parte de este efecto se debió a la inhibición de la recaptación. La tiramina también inhibe la captación neta, facilitada por el ATP, y la recaptación de la NA. La captación de la tiramina misma, es pequeña (von Euler y Lishajko, 1968).

Un buen número de bloqueantes adrenérgicos ha sido estudiado desde el punto de vista de su acción sobre la captación de la NA en partículas aisladas de nervio. Todos los  $\alpha$  bloqueantes probados y la mayoría de los  $\beta$  bloqueantes inhibieron la recaptación así como también la captación neta estimulada por ATP en diferente grado, sugiriendo que los gránulos poseen un mecanismo de captación con ciertas propiedades en común con los receptores adrenérgicos (von Euler y Lishajko, 1968).

#### E) Drogas que afectan el almacenamiento de NA

a) Reserpina: Desde el descubrimiento de que la reserpina produce una de

pleción de las catecolaminas de larga duración tanto en el cerebro como en otros tejidos de animales de experimentación, se han encontrado muchas drogas que producen cambios en los niveles de las catecolaminas almacenadas por los mismos. En la mayoría de los casos, no se conoce el mecanismo de acción.

Pequeñas dosis de reserpina (0.1 mg/kg) producen una casi completa depleción del contenido de NA de tejidos como el corazón y el bazo; esta tiene lugar lentamente y se completa en 24 horas. La depleción dura varios días y el contenido de NA vuelve a los niveles normales en 7 a 14 días después del tratamiento. Los tejidos tratados con reserpina no responden a aminas de acción indirecta como la tiramina.

En el animal intacto, la administración de reserpina produce la liberación no de NA sino principalmente de metabolitos desaminados de las catecolaminas a la circulación.

En tejidos reserpinizados, la NA exógena no se acumula cuando los tejidos son expuestos a la catecolamina. Esto que pareció ser una demostración de la habilidad de la reserpina de inhibir la captación, parece no ser tan simple. El principal efecto de la reserpina es en el proceso de almacenamiento, en los sitios intraneuronales de NA (gránulos). En tejidos reserpinizados la captación de catecolaminas puede tener lugar a velocidad normal, pero como las catecolaminas acumuladas no pueden ser retenidas en los sitios de almacenamiento intraneuronales, son rápidamente metabolizados y abandonan el tejido.

Otra evidencia que prueba que la reserpina no impide la captación es

que no produce supersensibilidad a catecolaminas exógenas, similar a la que produce la cocaína. Esta supersensibilidad se desarrolla lentamente con la reserpina pero no es semejante a la de la cocaína (Trendelenburg, 1963).

Queda así bien establecida la conclusión de que la reserpina no interfiere con la captación de las catecolaminas en los nervios simpáticos; las acciones de la droga parecen estar restringidas a los mecanismos de almacenamiento intraneuronal. Lo que dijimos anteriormente de que la reserpina potencialmente inhibe la captación y la liberación de catecolaminas en las partículas de almacenamiento de los nervios adrenérgicos, sugiere que estos representan los sitios de acción de la droga. Sin embargo, los mecanismos implicados en la depleción producida por la droga, no se conocen exactamente, aunque hay muchas teorías (Iversen, 1967 b).

Compartimiento reserpino-resistente: La velocidad de depleción de la NA de los nervios simpáticos inducidos por reserpina es dependiente, en muchos tejidos, del flujo de impulsos en tales nervios. La descentralización simpática, la desnervación aguda postgangliónica o las drogas bloqueantes ganglionares retardan la desaparición de NA después de la reserpina según Hertting y col. (1962). Después de la desnervación pregangliónica de la inervación simpática del músculo gastronemios del gato, la NA desaparece del tejido en respuesta a la reserpina en dos fases. En la primera fase, 5 horas después del tratamiento, el 85 % de las catecolaminas desapareció. El 15 % remanente, pareció ser resistente a la depleción por reserpina y desapareció lentamente durante las próximas 19 horas. La segunda fase más lenta se pudo detectar también en músculos inervados pero fue mucho más pe-

queña. El compartimiento de NA resistente en el músculo descentralizado no se pudo depletar con una segunda dosis de reserpina. Sin embargo, esta fracción de NA resistente a la reserpina fue rápidamente depletada por estimulación eléctrica de los nervios adrenérgicos descentralizados. Este resultado implica la existencia de dos formas de depósito o almacenamiento de la NA en los nervios simpáticos: un gran compartimiento que tiene el 85 % del total de catecolaminas y que es rápidamente depletado por reserpina, el 15 % remanente está almacenado en un compartimiento resistente a la reserpina, el cual puede ser liberado por estímulo nervioso.

b) Aminas simpatomiméticas de acción indirecta: La opinión corriente sostiene que la tiramina y aminas similares ejercen sus acciones simpatomiméticas a través de la liberación de NA desde sus sitios de almacenamiento en los tejidos periféricos.

La evidencia directa del desplazamiento de NA desde los tejidos periféricos es de dos tipos. Primero, se ha demostrado que la tiramina promueve un incremento en la liberación de NA en el flujo venoso o en el perfusato de varios órganos; esto ha sido demostrado por Stjärne en 1961 para la tiramina en el bazo de gato y para la aurícula aislada de gato por Burn y Burn en 1961. Otra evidencia es que la administración de grandes dosis de tiramina "in vivo" causan una parcial depleción de los depósitos en varios tejidos como lo demostraron Weiner y col., en 1962 (ref. en Iversen, 1967b).

Así, varios hechos parecen confirmar la hipótesis de que la tiramina actúa desplazando la NA de los sitios de depósito. No hay, sin embargo, una clara idea del mecanismo de este desplazamiento y liberación. Para

Trendelenburg (1972), el modelo sugerido por Crout en 1964, sería el más útil. Según Crout la población de vesículas y sitios de unión es homogénea, el factor decisivo sería la distancia de las vesículas a la membrana celular, a consecuencia de la alta velocidad de captación de la tiramina, las vesículas periféricas estarían expuestas a más altas concentraciones de tiramina, a consecuencia de la alta desaminación de la tiramina en el citoplasma, solo un pequeño compartimiento periférico sería alcanzado por la misma.

c) Acción de otras drogas sobre los depósitos de NA: La 5 ó 6-hidroxidopamina pueden producir también una depleción de larga duración y casi completa de los órganos periféricos inervados simpáticamente. Se las utiliza para realizar simpatectomía química. Thoenen, en sus estudios de microscopía electrónica ha demostrado que las altas dosis de 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) causan una destrucción selectiva de los terminales nerviosos adrenérgicos. La 5-hidroxidopamina (5-OH-DA), el isómero químico de la 6-OH-DA, es también un potente depletor de los depósitos periféricos de NA en varias especies.

Los cambios en la microscopía electrónica producidos por la 6-OH-DA son diferentes de los de la 5-OH-DA. Los terminales nerviosos adrenérgicos sufren por la 6-OH-DA alteraciones degenerativas severas y finalmente desaparecen a los 10 días. Los nervios colinérgicos no cambian en ningún momento. Los ganglios simpáticos, correspondientes a los terminales destruídos, no sufren alteración morfológica.

Por su parte, la 5-OH-DA se acumula en los órganos inervados simpáticamente y se libera como un falso transmisor adrenérgico, junto con sus metabolitos  $\beta$ -hidroxilado y O-metilado. Todas las vesículas del terminal nervioso adrenérgico están llenas con un material osmiofílico denso, el cual representa la localización ultramorfológica del falso transmisor, la 5-OH-DA, <sup>¡dopamina!</sup> y posiblemente también de sus metabolitos (Thoenen, 1972).

La guanetidina, representa a las drogas que deprimen la función de los nervios adrenérgicos postganglionares; el mayor efecto de ella es la inhibición de las respuestas a la estimulación de los nervios simpáticos. Esta acción es presináptica y la inhibición completa de las respuestas se desarrolla muy rápidamente y este fenómeno precede a la detección de un cambio en los depósitos de catecolaminas, los cuales declinan posteriormente en forma lenta (Weiner, 1980 b).

IV-

Liberación: mecanismos fundamentales

La liberación del transmisor NA a partir de los terminales adrenérgicos periféricos así como la liberación de NA y A de la glándula adrenal pueden ser inducidas por distintos medios experimentales: por drogas, por despolarización o por estímulo nervioso. Estos distintos medios experimentales inducen formas diferentes de liberación así como también diferencias en la composición del material liberado. Aunque algunos aspectos de la liberación de catecolaminas pueden ser estudiados sin referencia a los sitios de almacenamiento de las mismas, la comprensión de los mecanismos fundamentales que toman parte de ella, requieren el conocimiento detallado de la naturaleza de esos depósitos.

Ya ha sido bien determinado, como dijimos anteriormente, que las catecolaminas de los nervios simpáticos y de la médula adrenal están depositadas o almacenadas en partículas subcelulares que han sido identificadas "in situ" como vesículas esféricas encerradas en una membrana con un centro o núcleo denso. Lo que se sabe hasta el presente, podemos sintetizarlo así:

1. La mayor parte de la NA está depositada en partículas; por fraccionamiento subcelular, las catecolaminas que se detectan en la capa sobrenadante, serían la parte libre en el citoplasma. von Euler, en 1969, consideró que un sitio de almacenamiento o depósito extravesicular de carácter transiente podría ser la membrana axonal o el estroma intraaxonal (von Euler, 1972).

2. Las partículas que contienen NA en los axones preterminales del nervio esplénico pueden ser distinguidas de otras partículas celulares, como mitocondrias, lisosomas y fragmentos de membranas.

3. Los depósitos particulados (vesículas) son heterogéneos: la NA se encuentra en las vesículas noradrenérgicas livianas (vesículas pequeñas de centro denso) y en las vesículas noradrenérgicas pesadas (vesículas grandes de centro denso), según fueron descritas por microscopía electrónica.

4. En el cuerpo celular y en los axones no terminales predominan las vesículas pesadas.

5. En las varicosidades terminales hay vesículas livianas y pesadas pero las livianas almacenan la mayor parte de la NA.

6. Las vesículas noradrenérgicas pesadas de los axones no terminales contienen ATP, cromogranina A y DBH. Las vesículas pesadas en los terminales también contienen DBH, pero no está aún bien establecido si las vesículas livianas tienen esta enzima. Para Nelson y Molinoff, todas las poblaciones de vesículas de bazo, corazón y ganglio de rata así como el bazo de perro, tienen NA y DBH (Nelson y Molinoff, 1976).

7. Las observaciones preliminares sugieren que las vesículas pesadas en los terminales nerviosos tienen más alta concentración de NA que las vesículas pesadas en los axones no terminales (Smith y Winkler, 1972).

Como ya dijimos también, lo que no se sabe aún es cómo los gránulos cromafines y las vesículas noradrenérgicas mantienen sus depósitos de catecolaminas. Varios mecanismos se han sugerido para mantener este depósito in travesicular de catecolaminas, ellos incluyen: a) una captación activa de

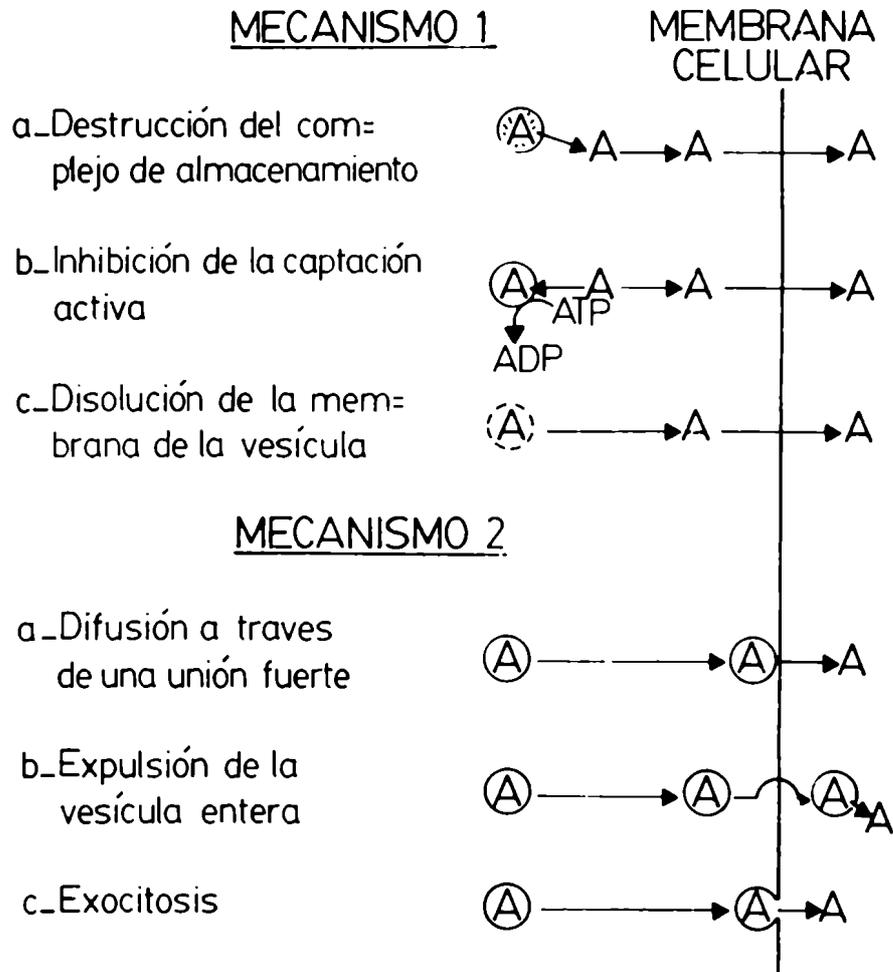
catecolaminas mediada por un carrier acoplado a la hidrólisis de ATP según Carlsson y col. (1963), b) un influjo de catecolaminas acoplado a un gradiente de protones a través de la membrana, el cual se mantiene por hidrólisis de ATP; estos permitirían mantener a la amina en forma ionizada no permeable (Johnson y col., 1978) y c) unión de la amina a algún o algunos compuestos intravesiculares para formar un complejo no-difusible (Hillarp, 1958).

Otra característica a tener en cuenta para la comprensión de los mecanismos fundamentales de la liberación es que los depósitos de catecolaminas en la médula adrenal y los terminales nerviosos adrenérgicos, parecen estar compartamentalizados funcionalmente en depósitos liberables fácilmente y otros depósitos más estables como ya hemos mencionado.

A)

Modos posibles de liberación: Tanto en la médula adrenal como en los terminales nerviosos simpáticos, hay dos mecanismos posibles para la salida de las catecolaminas de los depósitos contenidos en las vesículas: 1) los depósitos pueden ser liberados desde las vesículas al citosol y las aminas en el citosol pueden luego difundir fuera de la célula; 2) el depósito de las vesículas puede ser liberado directamente hacia el exterior de la célula, es decir, sin que los componentes de ese depósito pasen libres por el citoplasma.

Estas dos posibilidades están esquematizadas en la Fig. 6. La liberación de las catecolaminas al citosol puede producirse por destrucción del complejo de almacenamiento, por inhibición del mecanismo de captación o por



**Fig. 6.** Modos posibles de liberación de una amina (A) desde una vesícula sináptica.

disolución de la membrana de la vesícula (mecanismo 1). La liberación del de pósito directamente al espacio extracelular se lograría por formación de una unión muy estrecha entre la membrana del gránulo o vesícula y la membrana de la célula a través de la cual difundirían las catecolaminas, por expulsión de la vesícula intacta desde la célula o por exocitosis (mecanismo 2).

Las diferencias más importantes entre los dos mecanismos son: primero, el mecanismo 2 no depende o no está relacionado con el proceso por el cual se mantienen las altas concentraciones de aminas dentro de la vesícula, y se gundo, en el mecanismo 1 tiene lugar una difusión de aminas a través del citoplasma, mientras que en el mecanismo 2 se mueve la vesícula entera a través del mismo. Otra diferencia muy importante entre ambos mecanismos es que en el mecanismo 2 (b y c) tiene lugar la liberación simultánea de otros componentes del depósito además de las catecolaminas, mientras que la liberación de estos componentes no es obligatoria en el mecanismo 1. En virtud de estas diferencias es que se ha podido distinguir los dos mecanismos experimentalmente. Cuando las aminas se liberan al citosol, actúa sobre ellas la monoamino oxidasa de las mitocondrias, dando lugar a la liberación de metabolitos desaminados. Por otra parte, buscando los componentes de las vesículas en los productos liberados, ha sido posible identificar la liberación por el mecanismo 2 y distinguir a) de b) y c). Este mecanismo lo adoptaron Carlsson y Hillarp; también Douglas y sus colaboradores en los primeros es tudios en médula adrenal y se ha aplicado también en trabajos posteriores en nervio esplénico. Correlacionando estos resultados bioquímicos con aspectos de la ultraestructura de la célula cromafin por microscopía electrónica, se

concluyó que la mayor parte, si no toda, de las catecolaminas secretadas por la médula adrenal, en respuesta a drogas colinérgicas o estimulación nerviosa esplénica, son liberadas por exocitosis (ref. en Smith y Winkler, 1972). En la exocitosis, después de la fusión de las membranas vesicular y plasmática, se abriría una comunicación que permitiría vaciar el contenido total de las vesículas en el espacio extracelular, sin pasar por el citoplasma.

B)

Evidencias de exocitosis de las vesículas de almacenamiento en neuronas noradrenérgicas

La principal evidencia de una liberación directa de NA desde las vesículas de almacenamiento en las neuronas noradrenérgicas hacia el exterior de la neurona ha sido la falta de liberación por estímulo nervioso de la NA acumulada en el citosol de las neuronas en animales reserpinizados.

La teoría de la liberación del transmisor por un mecanismo exocitótico en las neuronas adrenérgicas, se apoya además sobre las bases siguientes:

a) Aumento en el eflujo de cromogranina y DBH del bazo durante la estimulación de los nervios esplénicos (tanto "in situ" como en bazo perfundido aislado). Se ha estudiado el destino de estas dos proteínas marcadas por estimulación del nervio esplénico. Geffen y Livett en 1968, encontraron mínimas cantidades de proteína radiactiva y NA que se liberaban al efluente venoso desde el bazo por estimulación del nervio. Geffen y col., en 1969, por métodos inmunoquímicos demostraron el transporte axonal rápido en el nervio esplénico de oveja, de DBH y cromogranina A y la liberación de estas proteí-

nas por estimulación del nervio esplénico. Estudios independientes de De Potter y col. en 1969, establecieron que la actividad de D $\beta$ H se liberó en el perfusato de bazo por estimulación del nervio esplénico de perro y de ternero a 30 Hz (ref. en Smith y Winkler, 1972).

b) Cubeddu y col. (1974), estimulando por un corto período a baja frecuencia el bazo de gato, en presencia y en ausencia de fentolamina y fenoxibenzamina, demostraron una correlación positiva, altamente significativa para el eflujo de NA endógena y actividad de D $\beta$ H. Estos resultados apoyan el concepto de que la liberación del transmisor tiene lugar por el mecanismo de exocitosis a frecuencias fisiológicas de estimulación en el bazo de gato aislado y perfundido, sobre un rango grande de liberación (la fentolamina y la fenoxibenzamina aumentan la liberación de NA por estímulo nervioso).

c) Aumento de las cantidades de D $\beta$ H en el fluido de incubación de conducto deferente de cobayo por estimulación del nervio hipogástrico de cobayo. Weinshilboum y col. (1971), trabajando con conducto deferente de cobayo "in vitro", demuestran que la D $\beta$ H es liberada con la NA cuando se estimula el nervio hipogástrico de la preparación y la cantidad de enzima descargada aumenta cuando aumenta el tiempo durante el cual se estimula. Además, la cantidad de D $\beta$ H liberada es proporcional a la cantidad de NA liberada, y la relación de NA a D $\beta$ H en el medio de incubación es similar aunque no igual, al de la proporción soluble de los contenidos de las vesículas sinápticas del conducto deferente. Estos datos son compatibles con un proceso de exocitosis en el conducto deferente.

La incubación de tejidos "in vitro" en presencia de reserpina o de las

aminas simpatomiméticas tiramina, d-anfetamina o metaraminol, dio por resultado la liberación, dependiente de la concentración, de NA pero no de DBH. Cuando se omite el  $\text{Ca}^{++}$  del medio de incubación, se bloquea la liberación (exocitótica) de NA y DBH inducida por agentes despolarizantes y por estímulo nervioso, pero no se afecta la liberación de NA por aminas simpatomiméticas. Más aún, la tetrodotoxina, antagonista de los canales de  $\text{Na}^+$ , bloquea la liberación inducida por veratridina pero no la inducida por tiramina (Thoa y col., 1975).

d) En conducto deferente de animales tratados con reserpina y un inhibidor de la monoamino oxidasa, aumentó al doble la relación soluble a particulada de NA con respecto a los tejidos normales, sugiriendo una liberación de NA de las vesículas al citoplasma. En estas condiciones la tiramina aumenta al doble la liberación de NA al baño de incubación con respecto a su efecto sobre tejidos provenientes de animales normales. Por otro lado, después del tratamiento "in vivo" con reserpina, la estimulación eléctrica del nervio hipogástrico produce liberación de DBH pero no de NA. Estos hallazgos sugieren que la liberación por exocitosis puede tener lugar en un depósito depletado de la amina y que cuando se libera NA, deriva predominantemente de depósitos vesiculares sensibles a la reserpina (Thoa y col., 1975).

Todos estos resultados que hemos descripto apoyan la hipótesis de la liberación por exocitosis de la NA en los terminales simpáticos, al menos en bazo y conducto deferente, cuando son despolarizados por estímulo nervioso o drogas despolarizantes.

Sin embargo, varias observaciones y consideraciones parecen ser inconsistentes con una exocitosis completa en neuronas adrenérgicas, ellas son:

1) La discrepancia entre las cantidades de NA y DBH liberadas comparadas con sus relaciones en el nervio, como se desprende del trabajo de Weinshilboum y col. (1971), esta discrepancia podría ser aún más grande si las relaciones en el tejido se corrigieran con las cantidades exactas de DBH soluble en los tejidos.

2) La estimulación del nervio esplénico produce liberación de NA pero no de ATP del bazo (Stjärne y col., 1970).

3) La comparación de la cantidad de NA liberada por impulso nervioso, que es de aproximadamente 400 moléculas, con el contenido de una vesícula, que es de 15.000 moléculas (determinado en el iris de la rata), indica que el quantum de transmisor podría ser sólo una fracción del contenido de la vesícula (Folkow y col., 1967).

4) La liberación de un quantum de transmisor en fracciones de un milisegundo contrasta con la relativamente lenta transformación de membranas por fusión y subsecuente formación de un canal (Pfenninger, 1973).

5) La existencia de distintos compartimientos funcionales de los depósitos de NA es difícil de conciliar con una exocitosis completa, a menos que los depósitos estén identificados con las vesículas en alguna disposición especial dentro del terminal.

Como se desprende de estas investigaciones, lejos estamos aún de poder afirmar que realmente la liberación de la NA, de los terminales nerviosos

adrenérgicos se realiza por exocitosis como consecuencia del estímulo nervioso, cationes o drogas despolarizantes.

### El calcio en la exocitosis

Harvey y Mac Intosh en 1940, demostraron por primera vez en ganglios simpáticos que la liberación del neurotransmisor colinérgico requiere calcio en el medio de incubación. Desde entonces, numerosos fueron los investigadores que documentaron este efecto y demostraron que los iones Ca juegan un papel central en la liberación de sustancias neurotransmisoras en una variedad de sinapsis.

Sobre la base de numerosos estudios electrofisiológicos, Katz y Miledi propusieron en 1967 la "hipótesis del calcio", que daba cuenta de la secuencia de etapas que relacionan al Ca con la liberación del transmisor. De acuerdo con esta hipótesis, los pasos principales en el acople excitación del nervio-liberación del transmisor, son: 1) despolarización del terminal nervioso, por un potencial de acción que aumenta la conductancia al  $\text{Na}^+$ ; 2) esta despolarización aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática al  $\text{Ca}^{++}$ ; 3) el  $\text{Ca}^{++}$  entra al terminal moviéndose por gradiente electroquímico y 4) el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  ionizado dentro del terminal desencadena la liberación del transmisor por un mecanismo no conocido.

Los hechos esenciales de esta hipótesis han sido demostrados por numerosos experimentos.

Las evidencias más importantes en apoyo a esta hipótesis provienen de

los estudios realizados en la sinapsis gigante de calamar. Bloqueando la conductancia al sodio con tetrodotoxina (TTX) y la conductancia al potasio con tetraetilamina, la liberación del transmisor (AcCh) en esta sinapsis aumenta con el aumento de la despolarización presináptica (+10 - +30 mV). Sin embargo, con una posterior despolarización, la liberación disminuye gradualmente y se suprime totalmente cerca del potencial de equilibrio del  $\text{Ca}^{++}$   $E_{\text{Ca}}$  (+120 - +140 mV). Además, la liberación depende de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  externo.

Estos resultados concuerdan con la idea de que la despolarización de los terminales en el rango fisiológico (hasta +50 mV) aumenta la permeabilidad al  $\text{Ca}^{++}$  y que la entrada resultante provoca la liberación del transmisor. A potenciales iguales o mayores que el  $E_{\text{Ca}}$  no habrá entrada neta de  $\text{Ca}^{++}$  durante la despolarización y por lo tanto, se suspenderá la liberación, aún cuando la permeabilidad del  $\text{Ca}^{++}$  está incrementada.

En otro tipo de experimentos, Miledi en 1973, demostró que la inyección de  $\text{Ca}^{++}$ , pero no de  $\text{Mg}^{++}$ , directamente en el citoplasma de los terminales presinápticos del calamar, promueven la liberación del transmisor.

En resumen, los experimentos mencionados indican que el aumento en  $\text{Ca}^{++}$  intracelular es necesario y suficiente para provocar la liberación del transmisor.

Los canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes del voltaje han sido identificados en una variedad de células. Todas ellas muestran varias propiedades comunes: el Sr y el Ba pueden entrar a través de los canales en lugar del  $\text{Ca}^{++}$ ; la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  es bloqueada por muchos cationes divalentes y no es afectada

por la TTX. Llinas y sus col. demostraron en 1967 que la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  hacia dentro del terminal está relacionada con la despolarización presináptica en una forma similar a la de la liberación del transmisor. Además, la liberación del transmisor aumenta linealmente con la corriente intracelular del  $\text{Ca}^{++}$ ; esto sugiere que la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  es la etapa limitante en la liberación (ref. en Drapeau y Blaustein, 1982). Que el  $\text{Ca}^{++}$  se requiere para la secreción de catecolaminas provocada por activación de receptores colinérgicos de la médula adrenal fue demostrado por Douglas y Rubin en 1961, y en los terminales nerviosos del corazón por Hukovich y Muscholl en 1962.

Douglas y Rubin, encontraron en 1961, que la omisión de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  o  $\text{Cl}^-$  de los fluidos de perfusión no evitan la liberación de catecolaminas provocadas por acetilcolina de la glándula adrenal de gato; la omisión de  $\text{Ca}^{++}$ , sin embargo, inhibía completamente la liberación de catecolaminas. El requerimiento de  $\text{Ca}^{++}$  se ha demostrado que se extiende a la secreción provocada por otros estímulos como iones  $\text{K}^+$  y angiotensina. Otra evidencia de que los iones sodio no se requieren para la secreción en este tejido es que la tetrodotoxina ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  g/ml), la cual como dijimos, bloquea la entrada de sodio a la célula, no inhibe la liberación de catecolaminas de la glándula adrenal de buey perfundida con carbamilcolina.

Esta teoría fue fuertemente apoyada por los estudios electrofisiológicos de Douglas y col. de 1967, los cuales muestran que aunque la despolarización de la célula cromafin por acetilcolina es principalmente debida a una corriente de sodio que entra; tiene lugar una pequeña despolarización (alrededor de 5 mV) cuando el sodio está ausente y ésta es principalmente debida

a un movimiento de los iones  $\text{Ca}^{++}$  hacia adentro. De esta y otras observaciones se concluyó que es la entrada de iones  $\text{Ca}^{++}$  más bien que la despolarización per se, que se requiere para la secreción.

La demostración de que se requiere la entrada de iones  $\text{Ca}^{++}$  a la célula para la secreción por exocitosis, no nos dice en qué paso está implicado en el acoplamiento estímulo secretorio, o si realmente, este requerimiento está relacionado específicamente a la exocitosis. Podría ser que el  $\text{Ca}^{++}$  tomara parte en la interacción de la acetilcolina con la célula a nivel de los receptores colinérgicos, pero esto es improbable ya que el  $\text{Ca}^{++}$  se requiere para la secreción provocada por otros medios. Otra alternativa es que produzca algún cambio en las propiedades de la membrana celular, lo cual tiene lugar en todas las formas de secreción, no sólo en la exocitosis.

Si el  $\text{Ca}^{++}$  toma parte directa en la exocitosis, la liberación de catecolaminas por otros mecanismos podría ser independiente de los iones calcio, aunque no obligadamente. Hay demostraciones de que es así porque la liberación de catecolaminas de la médula adrenal perfundida con reserpina es, como lo demostraron Philippu y Schümann en 1966, independiente del  $\text{Ca}^{++}$ , como también independiente de los iones calcio, la liberación por aminas simpatomiméticas de acción indirecta como la tiramina.

El calcio se requiere también como lo demostraron De Potter y col. en 1969, para la liberación de NA de los nervios simpáticos por estímulo eléctrico y para la liberación de DBH del nervio esplénico estimulado a 30 Hz (ref. en Smith y Winkler, 1972).

C)

Fusión de las membranas para la exocitosis

Si los iones calcio están implicados en la exocitosis, se podrían necesitar para la unión de la membrana de la vesícula a la membrana plasmática o para la fusión de las dos membranas. Esto ha sido a menudo discutido pero no hay evidencias directas para esta hipótesis. Otra posibilidad es que los iones calcio, luego de cruzar la membrana, podrían permanecer en el lado de adentro de la membrana plasmática y de esta manera formar parte de un sitio de unión específico para el gránulo cromafin cargado negativamente. De esta forma se requeriría la entrada de muy pocos iones calcio a la célula (Banks, 1966).

Sin embargo, parece improbable que este solo ión sea responsable de la especificidad de la unión de la vesícula de almacenamiento a la membrana celular. Presumiblemente, macromoléculas de la membrana plasmática o de la membrana de la vesícula, o ambas, marquen el camino para que la vesícula reconozca el sitio de unión. El hecho de que la médula adrenal de distintas especies y de feocromocitomas humanos tengan a la lisolecitina como un componente característico de la membrana de las vesículas, hizo pensar que este compuesto podría estar implicado en la fusión de las membranas plasmática y vesicular. Esta sugestión proviene de las propiedades líticas sobre la membrana, de la lisolecitina. Esto fue sólo una hipótesis hasta que Howell y Lucy (1969), demostraron que la lisolecitina podría provocar la fusión de membranas. Un modelo de cómo la lisolecitina podría participar en la fusión de las

membranas fue propuesto por Lucy (1969); de acuerdo con él, sólo se fusionarán aquellas regiones de dos membranas que interactúan, que contengan suficiente proporción de lípidos en forma miscelar.

Este modelo de fusión de membranas, como la hipótesis de la permanencia de los iones  $\text{Ca}^{++}$  que penetran a la célula, en la cara interna de la membrana celular para formar parte del sitio de unión de las membranas, queda aún por verificarse.

Más recientemente, se ha demostrado que el calcio estimula la fosforilación de proteínas en preparaciones de sinaptosomas tanto intactos como rotos (de Lorenzo y Freedman, 1977), sugiriendo que la fosforilación, dependiente de calcio de estas proteínas, tendría alguna participación en la función sináptica mediada por los iones calcio. Los autores encontraron que de todas las proteínas algunas dependían significativamente del  $\text{Ca}^{++}$  para su fosforilación y otras no, que la fosforilación era más dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  en esta preparación por mg de proteína que en la preparación de sinaptosomas y que los efectos del calcio sobre la fosforilación de las proteínas era independiente de la concentración de ATP ( $0.5 - 50 \times 10^{-6} \text{M}$ ). Además, el  $\text{Ca}^{++}$  estimuló la velocidad inicial así como el nivel neto de fosforilación de dos fracciones proteicas que los autores llamaron DPH-L y DPH-M y que habían identificado con un P.M. de 63.000 y 53.000, respectivamente.

Los autores dicen que aunque todavía debe ser determinado el significado funcional de la fosforilación dependiente del  $\text{Ca}^{++}$  de estas proteínas en la mediación de la función de la vesícula sináptica y la liberación del neurotransmisor, los resultados obtenidos muestran evidencias de que la fosforila-

ción de proteínas específicas asociadas a la vesícula sináptica pueden tener un papel mediando la fusión de la vesícula sináptica y la liberación del transmisor (de Lorenzo y Freedman, 1977).

Thureson-Kleim y col. en 1979, pudieron demostrar en vena mesentérica humana, la presencia en los terminales adrenérgicos de las tres clases de vesículas: grandes y pequeñas de centro denso y pequeñas vesículas claras. El estímulo eléctrico aumentó el número total de vesículas pequeñas en un 30 % comparado con controles sin estimular, siendo las claras las que presentaban un incremento mayor. Asimismo pudieron observar un marcado incremento en las vesículas fusionadas a la membrana y los perfiles en forma de omega que presentan las vesículas abiertas hacia el espacio sináptico.

El aumento de vesículas terminales pequeñas después de la estimulación, lo interpretan como resultado de una formación local y puede reflejar la respuesta a la recaptación del transmisor liberado (Thureson-Kleim y col., 1979).

D)

#### Liberación por otros medios

Ya hemos nombrado, al hablar de liberación por estímulo nervioso, algunos otros medios que producen liberación del neurotransmisor adrenérgico. Dijimos también que los diferentes medios que inducen liberación pueden liberar materiales diferentes. Estas formas son las siguientes:

1. Liberación por drogas

a) Aminas simpatomiméticas de acción indirecta

Muchas drogas como la tiramina, anfetamina y efedrina ejercen una gran parte de sus efectos liberando NA desde los sitios de almacenamiento en los nervios simpáticos hacia el citoplasma y luego al fluido extracelular, donde el transmisor endógeno liberado actúa entonces en los sitios receptores (post sinapsis). Las respuestas que ellas producen son por lo tanto similares a la de la NA pero más lentas en establecerse y generalmente de más larga duración que aquella a una dosis equipotente.

La incubación de órganos aislados, como conductos deferentes de cobayo "in vitro" en presencia de tiramina, da por resultado la liberación, dependiente de la concentración, de NA. Esta liberación de neurotransmisor no va acompañada, como en el estímulo nervioso de proteínas como la DRH. Es un desplazamiento del neurotransmisor de su sitio de almacenamiento y no se presume que implique excitosis.

Cuando se omite el  $Ca^{++}$  del medio de incubación no se afecta la liberación de NA por tiramina, como ya dijimos, es independiente de la presencia de  $Ca^{++}$ . Tampoco se inhibe la liberación del neurotransmisor por tiramina cuando están bloqueados los canales de  $Na^+$  por tetrodotoxina (Thoa y col., 1975).

La acción de la tiramina, y de todas las llamadas aminas simpáticas de acción indirecta, está asociada con el fenómeno farmacológico de taquifilaxis. Este fenómeno que resulta de la administración repetida de tiramina, produce una rápida disminución de su efectividad, mientras que el efecto de

la administración repetida de NA no es reducido, y revierte la taquifilaxis a la tiramina. Una explicación de la taquifilaxis a la tiramina y agentes similares, postula que el compartimiento del neurotransmisor disponible para el desplazamiento por estas drogas es bastante pequeño en relación a la cantidad total almacenada en los terminales nerviosos simpáticos (Crout y col., 1962).

b) Liberación por drogas que depletan los depósitos endógenos de NA

La reserpina depleta los depósitos de catecolaminas y 5-HT en muchos órganos, incluidos el cerebro y la médula adrenal, y la mayor parte de sus efectos farmacológicos han sido atribuidos a esta acción. La depleción es más lenta y menos completa en la médula adrenal que en otros tejidos.

Una hora después de la administración de reserpina ya se puede medir una concentración reducida de las catecolaminas y esta depleción es máxima alrededor de las 24 horas. La mayor parte de las catecolaminas son desaminadas intraneuronalmente antes de abandonar el terminal, y por lo tanto, el efecto farmacológico de lo liberado es mínimo (metabolitos desaminados en su mayor parte). El mayor impedimento para la función nerviosa adrenérgica comienza a niveles de NA por debajo del 30 % del contenido normal, y está relacionado aproximadamente al grado de depleción debajo de ese valor.

Estudios con la droga radiactiva indican que la reserpina no es liberada por actividad nerviosa, aún en el período de 18 horas después de la administración, toda la reserpina que queda en los tejidos después de 24 a 30

horas está firmemente unida y puede persistir por muchos días (Norn y Shore, 1971).

La guanetidina puede considerarse como la representante de drogas que deprimen la función de los nervios adrenérgicos postganglionares. El mayor efecto de la guanetidina es la inhibición de las respuestas a la estimulación de los nervios simpáticos. El sitio de esta inhibición es claramente presináptico y durante la administración crónica de guanetidina, se reduce la liberación del neurotransmisor desde las neuronas adrenérgicas periféricas.

Administrada en forma aguda produce inicialmente la liberación de NA sin desaminar en cantidades suficientes para producir efectos simpatomiméticos. Posteriormente, esta liberación es en su mayor parte de metabolitos desaminados (Weiner, 1980 b; ref. en el mismo).

## 2. Liberación por drogas e iones despolarizantes

Veratridina e iones  $K^+$ : las soluciones hipertónicas de KCl causan despolarización de la membrana en las células nerviosas porque reducen el gradiente de concentración de potasio entre el espacio intracelular y extracelular; la veratridina produce despolarización porque aumenta la permeabilidad de la membrana celular a una variedad de iones, incluyendo al sodio (Shanes, 1958). La despolarización de las neuronas noradrenérgicas en el conducto de ferente de cobayo por uno u otro compuesto, dio por resultado la liberación de una cantidad de NA y DBH, en proporción similar a la producida por estímulo nervioso del nervio hipogástrico. La similitud de la relación de NA a la

enzima, liberada por estimulación eléctrica o por compuestos despolarizantes con la relación de las vesículas en los nervios simpáticos del conducto deferente, presenta otra evidencia de que la NA se libera en los terminales simpáticos despolarizados, por exocitosis (Weinshilboum y col., 1971).

La tetrodotoxina bloquea los mecanismos que producen el aumento de permeabilidad de  $NA^+$  por estimulación nerviosa. Como la tetrodotoxina bloquea la exocitosis producida por veratridina, la acción de la veratridina debe implicar aumento de la permeabilidad al  $Na^+$  en algún sitio de la membrana celular. Como la estimulación nerviosa, la veratridina solo produce liberación de NA en presencia de  $Ca^{++}$  (Thoa y col., 1975).

V-

Metabolismo de las catecolaminas

Las acciones de la NA y A finalizan por tres medios diferentes: 1- recaptación por los terminales nerviosos; 2- difusión fuera de la sinapsis y 3- por transformación metabólica. Dos enzimas son importantes en las etapas iniciales de la transformación metabólica de las catecolaminas, la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La MAO produce una desaminación oxidativa con producción de un aldehído y amoníaco. El aldehído es subsecuentemente oxidado o reducido por una aldehído deshidrogenasa (ADH) o aldehído reductasa (AR), dando lugar a la formación respectiva de ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA) o dihidroxifenilglicol (DOPEG), si actuó sobre la NA.

Por su parte, la COMT metila el OH de la posición 3 del anillo bencénico produciendo a partir de la NA normetanefrina (NMN). A pesar de la actividad de estas dos enzimas, la transformación metabólica es de poca importancia en la terminación de las acciones del neurotransmisor liberado endógenamente, en comparación con el neurotransmisor colinérgico, la acetilcolina. Hace más de 30 años que se reconoció que un mecanismo enzimático de tanta fuerza como el que provee la acetilcolinesterasa, estaba ausente en el sistema nervioso adrenérgico y Blaschko, en 1952, señaló que las limitaciones en el espacio y en el tiempo de la acción de la AcCh no se aplican a los sitios neuroefectores adrenérgicos.

Axelrod y col., en 1966 y 1973 demostraron la importancia del mecanismo de recaptación en los terminales nerviosos simpáticos. Coincidentemente, la

inhibición de este mecanismo de captación por cocaína, imipramina, etc., potencia los efectos del neurotransmisor, mientras que la inhibición de MAO y de COMT tiene poco efecto. Sin embargo, el transmisor que es liberado dentro del terminal nervioso desde las vesículas es metabolizado por MAO; mientras que particularmente en el hígado, la COMT es importante para terminar la acción de las catecolaminas endógenas circulantes y las administradas.

Ambas enzimas están ampliamente distribuídas a través de todo el organismo incluyendo el cerebro, encontrándose las más altas concentraciones de ambas en el hígado y los riñones. Sin embargo, hay diferencias en sus ubicaciones citológicas; mientras la MAO está asociada principalmente con la mitocondria, incluyendo las de los terminales de las fibras adrenérgicas, la COMT está confinada en su mayor parte en el citoplasma y aparentemente no tiene una selectiva asociación con los nervios adrenérgicos.

Estos factores son importantes para determinar los pasos metabólicos seguidos por las catecolaminas en circunstancias variadas y para explicar los efectos de determinadas drogas.

En la Fig. 7, hemos presentado las etapas metabólicas seguidas por el neurotransmisor adrenérgico, la NA. La mayor parte de ella que entra a la circulación proveniente de las fibras adrenérgicas o de la médula adrenal o por administración exógena, se metila por la COMT a NMN. La NA que se libera lentamente por drogas como la reserpina, es probablemente primero desaminada oxidativamente por la MAO al aldehído y este seguidamente oxidado o reducido por la ADH o AR respectivamente, antes que deje el terminal nervioso, a los productos que hemos ya mencionado DOMA y DOPEG.

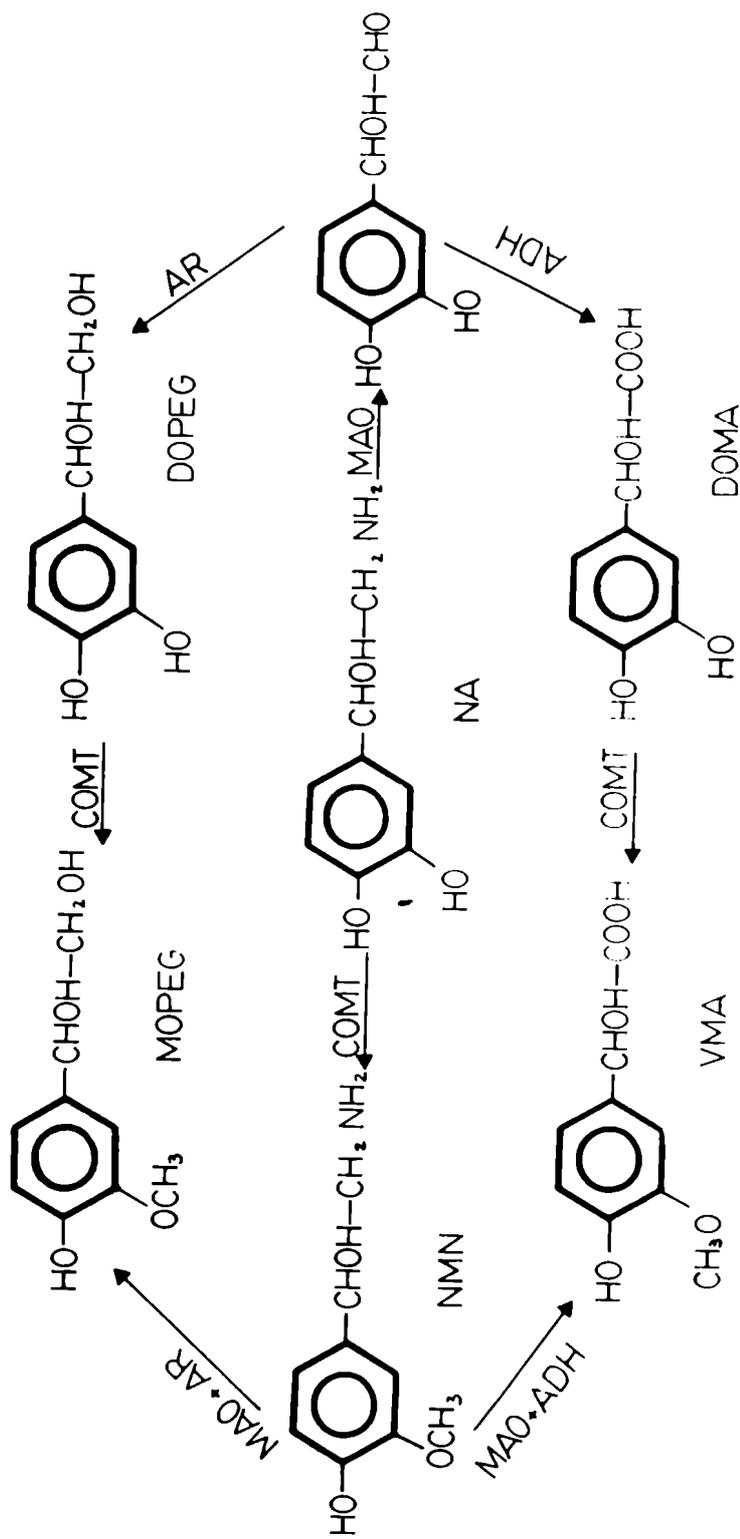


Fig. 7. Acción de la monoaminooxidasa y la catecol-O-metiltransferasa sobre la noradrenalina. NA: noradrenalina; NMN: normetanefrina; DOPFG: 3,4-dihidroxi-fenilglicol; DOMA: ácido 3,4-dihidroxi-mandélico; MOPEG: 3, metoxi-4, hidroxi-fenilglicol; VMA: ácido vainillil mandélico; MAO: monoaminooxidasa; COMT: catecol-O-metiltransferasa; ADH: aldehído deshidrogenasa; AR: aldehído reductasa.

Sobre los productos de desaminación oxidativa de la MAO, y posterior acción de la ADH y AR, el DOPEG y el DOMA, actúa luego la COMT dando lugar a la formación del 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MOPEG) a partir del DOPEG y al ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) a partir del DOMA.

Inversamente sobre la NMN, producto de la COMT sobre la NA, puede actuar luego la MAO y la ADH y AR dando lugar al VMA y al MOPEG.

Es decir que en ambos casos, sobre los metabolitos resultantes del ataque de una enzima, puede luego actuar la otra.

El VMA, incorrectamente llamado vainillil mandélico, es el metabolito de las catecolaminas que en mayor cantidad se elimina por orina, y su determinación en los análisis sirve para el estudio de cuadros clínicos vinculados con la NA (Mayer, 1980).

A) MAO: Aunque se sabía desde 100 años atrás que las monoaminas son desaminadas en el organismo, la enzima específica para la catálisis de este tipo de conversión "in vivo" fue descubierta por Mary Hare, que identificó en 1928 a la "tiramina oxidasa" como un nuevo sistema enzimático en el hígado para la oxidación de la tiramina. Blaschko y col. en 1937, en los estudios que hicieron sobre la inactivación de la A, llevaron al concepto de amino oxidasa, un sistema enzimático que cataliza la oxidación de un gran número de aminas. Zeller en 1938, propuso el nombre de "monoamino oxidasa" (MAO) para la clase de enzimas responsables de la desaminación oxidativa de las monoaminas.

La MAO mitocondrial, es una proteína ampliamente distribuída en diferentes tipos de neuronas, glia, hígado, riñón, corazón, intestino, pulmones, glán

dulas salivales, gonadas y varias clases de músculo liso. Está unida a la membrana mitocondrial externa como lo determinó Schnaitman y col. en 1967 e inactiva aminas tanto exógenas como las formadas endógenamente. Las aminas presoras de los alimentos son inactivadas por la MAO intestinal, la MAO de los vasos sanguíneos protege los órganos de los efectos tóxicos de las aminas circulantes y la MAO en los tejidos ayuda a regular la concentración intracelular de diferentes monoaminas. El significado funcional de amino oxidasas no mitocondriales, como la espermina oxidasa y la benzilamina oxidasa en el plasma sanguíneo de los mamíferos, no es claro, mientras que Blaschko en 1972, demostró que las monoamino oxidasas del tejido conectivo producen el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y las elásticas.

El concepto de que la MAO mitocondrial desempeña un papel fisiológico en la inactivación biológica de transmisores como NA, DA y 5-HT, es apoyado por numerosa evidencia experimental. La actividad sustancial de MAO está asociada con los sinaptosomas, como lo demostraron De Lores Arnaiz y De Robertis en 1962, y la actividad de la enzima es reducida después de la desnervación de diferentes órganos como lo confirmaron Snyder y col. en 1965; Klingman en 1966 y Goridis y Neff en 1971. La inhibición de MAO lleva a un incremento en la concentración de NA, DA y 5-HT en el cerebro hasta nuevos niveles de equilibrio, según los informes de Brodie y col. de 1956 y de Spector y col. en 1957, y aumenta los depósitos de estas aminas en los animales reserpinizados.

MAO es una enzima muy estable. Aún después de la muerte, los cambios son despreciables hasta 120 horas a 5°C. La MAO en las plaquetas parece ser una característica del individuo y está muy correlacionada con la actividad

en diferentes partes del cerebro humano en cada individuo en particular. La enzima del cerebro y de las plaquetas han sido extensivamente estudiadas bajo diferentes condiciones psiquiátricas por muchos investigadores desde el año 1972. De estos estudios parece establecerse que una baja actividad de MAO en cerebro y plaquetas, refleja una predisposición constitucional del individuo que lo hace vulnerable al comportamiento suicida, al abuso del alcohol y a las enfermedades maníaco-depresivas.

El descubrimiento por Zeller y col. en 1962, de la iproniazida como inhibidor de la actividad de MAO, abrió el camino a la síntesis de cientos de inhibidores irreversibles de la enzima y fomentó el desarrollo de los conocimientos actuales sobre el papel fisiológico de la MAO mitocondrial. Las que parecen ser, al presente, las más importantes funciones fisiológicas de la MAO mitocondrial y las consecuencias de la inhibición de esta enzima se pueden resumir así: entre las primeras, a) inactivación intraneuronal del transmisor en las neuronas noradrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas; b) inactivación gastrointestinal de las aminas presoras presentes en los alimentos y c) inactivación de una gran variedad de aminas exógenas y endógenas en el hígado y en los vasos sanguíneos. Entre las segundas, a) aumento de los transmisores hasta un nuevo nivel de equilibrio en las neuronas catecolaminérgicas y serotoninérgicas; b) acceso facilitado de las aminas presoras a la circulación y c) aumento de los niveles de aminas que se encuentran en mínimas cantidades (feniletilamina, octopamina, triptamina, etc.). Las aminas presoras formadas endógenamente así como también las absorbidas por los intestinos, circulan y alcanzan los órganos sin control (Knoll, 1980, ref. en el mismo).

Propiedades: La MAO es una proteína de membrana que está fuertemente unida a la membrana externa de la mitocondria, y se necesitan procedimientos extremadamente rigurosos como tratamiento con detergentes, sonicación y extracción con solventes orgánicos, para solubilizarla.

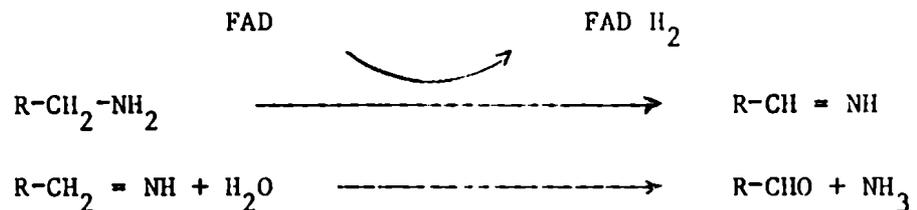
La enzima es una flavoproteína que contiene una molécula de FAD cada 110.000 g según Salach, 1979, covalentemente unida a un residuo de cisteína de la proteína en una unión tioéter a la posición 8, demostrado por Walker y col. en 1971.

Especificidad de sustrato: La enzima puede catalizar una amplia variedad de aminas incluyendo aminas secundarias y terciarias en las cuales los sustituyentes son grupos metilo. El grupo amino debe estar unido a un grupo metileno no sustituido; la anilina y anfetamina no son sustrato. La enzima no puede catalizar la oxidación de la metilamina, pero la etilamina es un sustrato pobre en algunas especies. La actividad aumenta con el aumento del largo de la cadena alifática hasta un óptimo de C<sub>5</sub> ó C<sub>6</sub>, según Blaschko, 1952 y Tipton, 1975. La enzima de hígado de rata muestra una alta afinidad para las aminas aromáticas como la 2-fenetilamina, 4-metoxi-2-fenetilamina, triptamina y 5-metoxitriptamina.

La MAO parece diferir de otras monoamino oxidasas (diamino oxidasas, amino oxidasas del plasma, etc.), en los siguientes aspectos: 1- en que es una flavoproteína; 2- en su insensibilidad a la inhibición por reactivos carbonílicos como semicarbazida y 3- en su localización mitocondrial. La sensibilidad a los reactivos carbonílicos de las otras monoamino oxidasas sugiere que tales grupos juegan un papel esencial en su mecanismo catalítico.

Inhibidores: Un número de inhibidores reversibles e irreversibles de la MAO se han encontrado que son farmacológicamente útiles. Los inhibidores irreversibles más comúnmente usados, son de tres clases: propargilaminas (pargilina, clorgilina y deprenil), derivados de ciclopropilamina (Lilly 51641 y tranilcipromina) e hidrazinas sustituidas como la fenetilhidrazina. Los reversibles son aquellas feniletilaminas que por poseer un metilo en posición  $\alpha$ , no son sustratos pero sí inhibidores competitivos.

Cinética y mecanismos: El pH óptimo de la reacción que cataliza la enzima que varía con el sustrato utilizado y su concentración, así como la concentración del oxígeno, fue determinado por Gabag y col. en 1976 y Roth en 1979. En varios estudios realizados por Mc Ewen y col. en 1969 y Williams en 1974, se indicó que el verdadero sustrato para la enzima es probablemente la forma no ionizada de la amina, y se cree que la reacción procede por medio de la imina, la cual es subsecuentemente hidrolizada.



El  $K_m$  de la enzima por el sustrato, la amina, varía desde  $16 \times 10^{-6}$  M para la 5-metoxitriptamina o la triptamina hasta  $25 \times 10^{-4}$  M para la p-hidroxibenzilamina; en cuanto al  $K_m$  para el oxígeno, aunque varía un poco con la amina empleada, es relativamente alto, alrededor de  $15.6 \times 10^{-5}$  M (ref. en Tipton, 1980).

Para la mayor parte de los tejidos, hígado, riñón, corazón, glándulas salivales, etc., la actividad de COMT se determina en el sobrenadante de 100.000 x g del homogenato.

Hay pocos trabajos en la literatura que contengan datos cinéticos de COMT; Crout mostró en 1961, que después de purificada 30 veces, la COMT del hígado, cerebro y corazón de rata, el  $K_m$  para la (-)NA es de alrededor de  $3 \times 10^{-4}$  M, no importa el origen de la enzima. El mismo  $K_m$  para la (-)NA ( $2 \times 10^{-4}$  M), tiene la enzima en el hígado y los eritrocitos humanos, según lo demostraron Axelrod y Cohn en 1971.

Hay también considerable variación en los datos cinéticos dados en la literatura para describir la dependencia de la velocidad de la reacción de O-metilación con la concentración de la SAM. Con una preparación de enzima purificada y A en el rango de concentración de  $0.5 \times 10^{-4}$  M a  $10^{-3}$  M, el  $K_m$  para la SAM, calcularon Flohé y Schwabe en 1970, que era de  $3,2 \times 10^{-6}$  M. El valor del  $K_m$  para la SAM se mantenía constante entre  $10^{-6}$  M y  $3 \times 10^{-6}$  M entre pH 6,5 y 9,5, mientras que a valores de pH por arriba de 7 era influenciado por la concentración de  $Mg^{++}$ .

Por muchos años la COMT se consideró como exclusivamente extraneuronal. Sin embargo, Crout y Cooper en 1962, demostraron una caída en la actividad de COMT en el corazón desnervado de gato y la publicación de Jarrott y Langer de 1971, indicó que la actividad de COMT disminuye en la membrana nictitante de gato desnervada. Por lo tanto, las evidencias indican una localización tanto neuronal como extraneuronal (ref. en Guldberg y Marsden, 1975).

Múltiples formas de la enzima: A partir del hallazgo de Sandler y Youdin en 1972, de que la MAO existe en diferentes formas enzimáticas (isoenzimas) con diferente especificidad de sustrato y que éstas pueden ser inhibidas selectivamente, se ha considerado que la enzima existe en dos formas que se han denominado MAO tipo A y tipo B.

La MAO A desamina preferencialmente sustratos fisiológicos como la 5-HT, NA, A, metanefrina y normetanefrina. Los sustratos preferenciales para la MAO B incluyen bencilamina, triptamina, 5-O-metiltryptamina y feniletilamina. La tiramina, DA y 3-O-metiltiramina son metabolizadas por ambas enzimas en grado similar.

La clorgilina estrechamente relacionada en forma estructural con la pargilina, es un inhibidor más selectivo de la MAO tipo A, mientras que el deprénil, un compuesto químicamente similar, es más selectivo para la MAO tipo B. La pargilina muestra ser algo más selectiva para la MAO tipo B, pero su selectividad no es muy grande (ref. en Tipton, 1980).

B) Catecol-O-metiltransferasa: Fue descubierta por Axelrod en 1957, cuando estudiaba el metabolismo de la NA y A. La enzima responsable de la O-metilación de las catecolaminas fue parcialmente purificada y preliminarmente caracterizada por Axelrod y Tomchick, en 1958.

Los métodos usados para la determinación de la actividad de la COMT, están basados sobre el principio de que la enzima cataliza la transferencia de grupos metilo a sustratos que contienen el grupo catecol en presencia de la S-adenosilmetionina (SAM) como donador de metilos e iones magnesio ( $Mg^{++}$ ) como activador.

Inhibidores de COMT: Podemos agrupar a los inhibidores de la enzima en 4 grupos: 1- pirogalol y derivados; 2- catecoles y derivados; 3- tropolonas y 4- varios.

Tanto el pirogalol y sus derivados así como los catecoles y sus derivados, son sustratos para la COMT. Todos ellos comparten además la toxicidad, que los hace no aptos para el hombre.

In vivo, la inhibición de COMT por las tropolonas, ha sido estudiada midiendo el efecto sobre las concentraciones in vivo de los metabolitos O-metilados. Los resultados indican que las tropolonas y sus derivados inhiben la COMT in vivo pero por un corto período, presumiblemente debido a la reversibilidad y a la unión lábil del inhibidor a la enzima.

Entre otros inhibidores de la COMT sin relación estructural, se encuentran la 8-hidroxiquinolina, 3-mercaptotiramina, piridoxal-5'-fosfato, ácido ascórbico, agentes que se unen a los grupos SH-, ioduros, pironas y piridonas (ref. en Guldberg y Marsden, 1975).

VI-

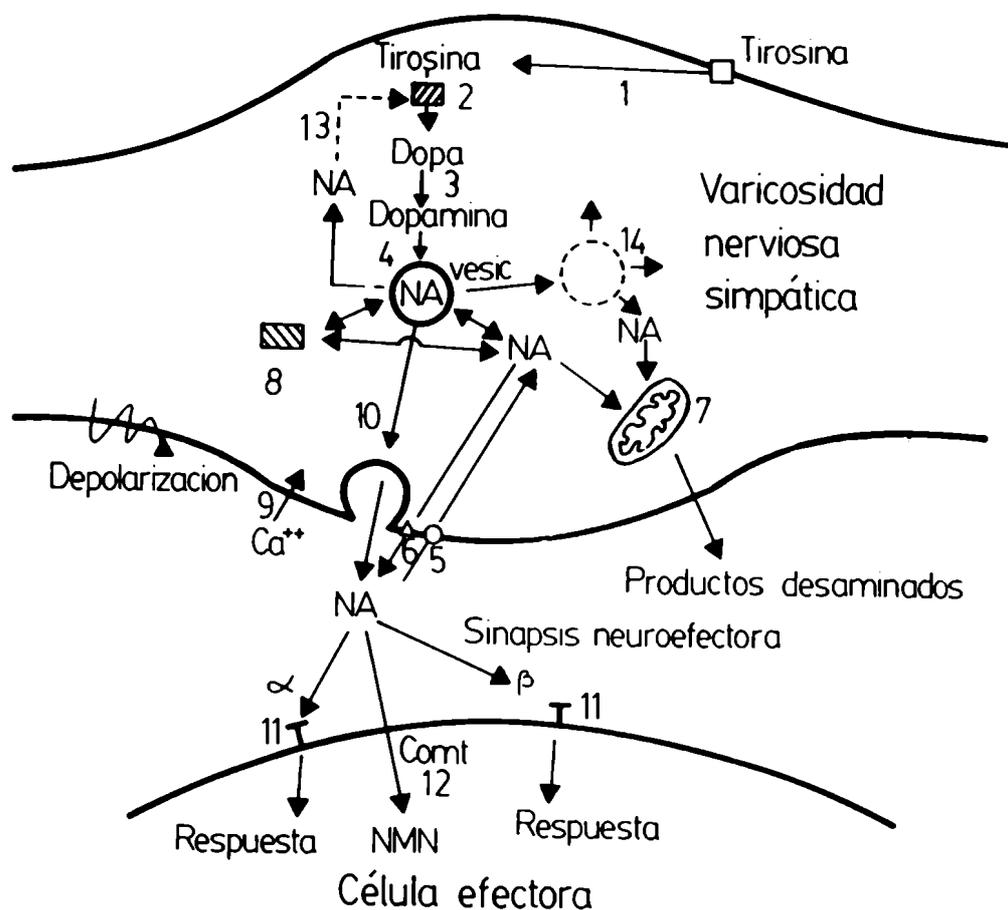
Síntesis de los procesos que se llevan a cabo en la sinapsis neuroefectora adrenérgica

En la Fig. N° 8 hemos esquematizado los procesos descritos hasta ahora, de síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y metabolismo del neurotransmisor adrenérgico, que tienen lugar en la sinapsis neuroefectora adrenérgica como así también las drogas que tienen acción sobre los mismos.

La L-tirosina es captada por la neurona(1) y convertida en el citoplasma a DOPA por la TH (2) y luego a DA por la enzima DOPA-descarboxilasa (3). La DA es transportada dentro de las vesículas del terminal donde se realiza la síntesis de la NA por la DBH y allí permanece almacenada (4).

La NA puede ser desplazada de las vesículas de almacenamiento por aminas simpatomiméticas, como la tiramina, que penetran dentro del terminal por un proceso de captación activa (5). Una parte de la NA desplazada difunde fuera del terminal (6) y reacciona con los receptores; otra parte de la NA liberada al citoplasma por la amina simpatomimética o por difusión espontánea, es desaminada por la MAO mitocondrial (7). Como se ha observado que sólo parte del contenido total de NA se puede liberar por estímulo nervioso o por tiramina, ello indica que hay compartimientos del transmisor que se mantienen en reserva (8).

Cuando un potencial de acción llega al terminal, se produce un influjo de  $Ca^{++}$  dentro del mismo (9), que lleva a la fusión de la vesícula con la membrana plasmática y a la exocitosis de NA (10). El transmisor liberado activa



**Fig. 8.** Síntesis de los procesos que se llevan a cabo en la sinapsis neuroefectora adrenérgica.

los receptores  $\alpha$  ó  $\beta$  localizados en la membrana plasmática de la célula post sináptica (11). La NA que penetra dentro de esta célula es probablemente inactivada por la COMT a NMN (12). El mecanismo más poderoso para la terminación de la acción de la NA en el espacio sináptico es la recaptación activa (5) por el terminal nervioso y la vesícula de almacenamiento (4).

Uno de los más importantes mecanismos de la regulación de la síntesis de NA tiene lugar en la hidroxilación de la L-tirosina, etapa que fija la velocidad de síntesis. Esta regulación como hemos visto, es compleja pero parte de ella se realiza por inhibición de la TH por la NA, producto de la síntesis (13).

Los sitios de acción de las diferentes drogas que hemos visto son:

- 1- Inhibición de MAO por pargilina (7) y de COMT por tropolonas (12).
- 2- Inhibición del mecanismo de captación de NA a través de la membrana plasmática por la cocaína y antidepresivos tricíclicos como la desipramina (5), de forma tal que se dispone de más neurotransmisor en el espacio sináptico para unirse a los receptores.
- 3- Inhibición del almacenamiento de NA en las vesículas por la reserpina y en parte por la guanetidina (14). El neurotransmisor es por lo tanto, liberado al citoplasma y normalmente inactivado por la MAO, en particular en el caso de reserpina.
- 4- Cuando el desplazamiento de NA se realiza por aminas simpatomiméticas de acción indirecta, la liberación no se realiza por exocitosis (6).
- 5- Inhibición de la TH por  $\alpha$ -metil-p-tirosina (2).
- 6- Inhibición de la DBH por el FLA-63 (4).

## VII-

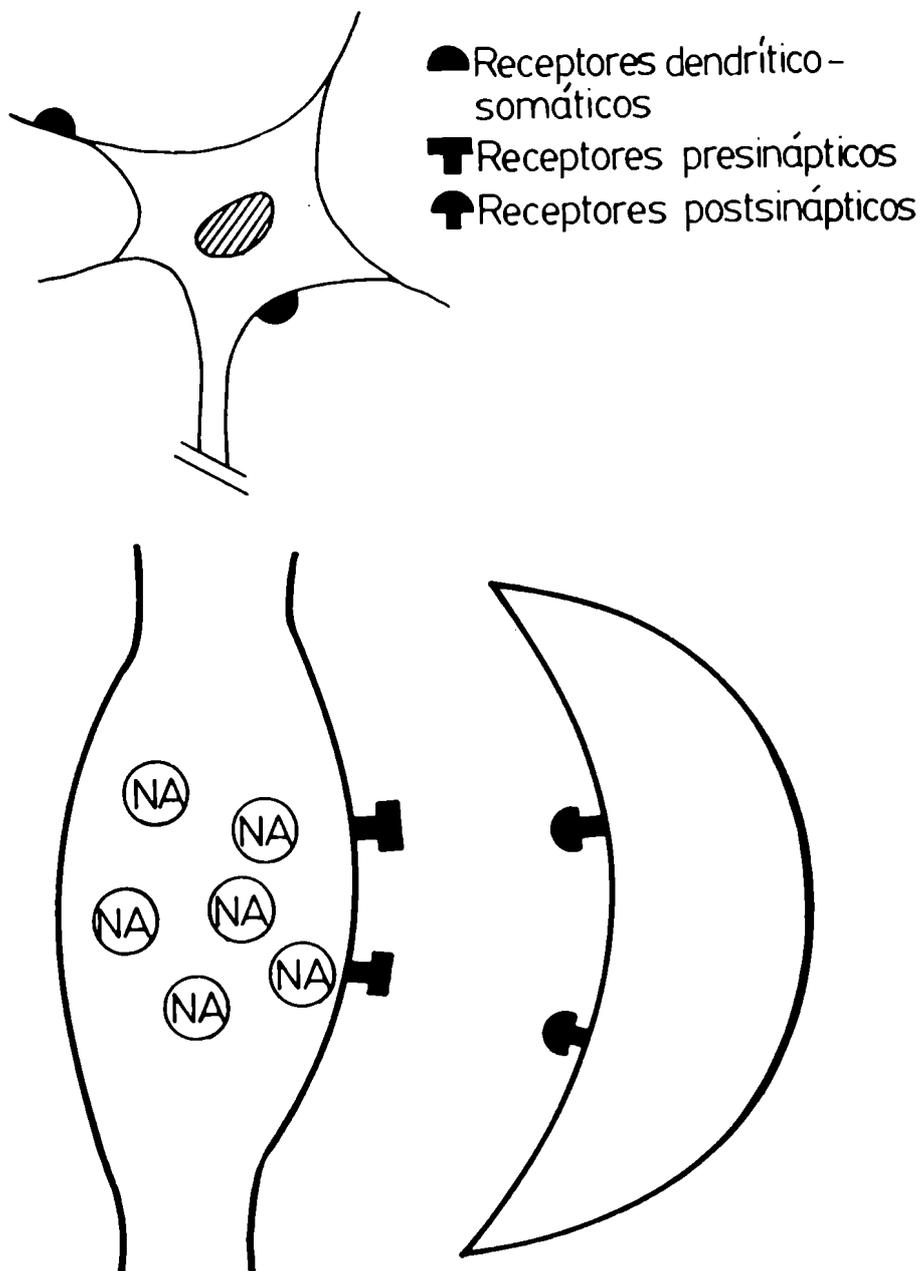
Regulación de la liberación del neurotransmisor adrenérgico por estímulo nerviosoA- Función de la frecuencia de estimulación

La liberación del transmisor desde los terminales nerviosos adrenérgicos está controlada en forma central y periférica. El control central consiste en la variación del número de neuronas activas así como también de la frecuencia de disparo o descarga en cada una de ellas. La cantidad del transmisor liberado desde los terminales adrenérgicos por unidad de tiempo depende de la velocidad del flujo de impulsos, por una parte y, por otra parte, de la cantidad del neurotransmisor liberado por impulso. La frecuencia de los potenciales de acción que viajan a través del axón hacia los terminales nerviosos está regulada por neurotransmisores excitatorios o inhibitorios y quizás por sustancias circulantes que actúan sobre receptores ubicados en la parte dendrítico-somática de la neurona. El quantum de NA liberado por un impulso está lejos de ser constante. Las causas de su variación se conocen parcialmente; en los últimos diez años se ha reconocido sólo un mecanismo que sería el causante de esta variación, mediado a través de los receptores presinápticos. Es muy probable que las sustancias que se encuentran naturalmente en el organismo sean capaces de aumentar o disminuir la liberación por pulso, y que ellas lo hagan actuando sobre receptores que se encontrarían en la varicosidad del terminal (terminal nervioso adrenérgico), donde se acepta que tiene lugar la liberación. De esta forma hay una regulación doble mediada por receptores. Como se ve en la

Fig. N° 9, los receptores dendrítico-somáticos controlarían la generación de impulsos, serían la señal eléctrica, y los receptores presinápticos controlarían la secreción provocada por impulso, serían la señal química.

Como ya hemos descripto, las varicosidades de los terminales axónicos noradrenérgicos contienen toda la maquinaria bioquímica para la síntesis, almacenamiento e inactivación del transmisor y parece que son las estructuras desde las cuales es secretado. Dentro de las varicosidades, la NA se almacena en vesículas granulares junto con el ATP y al menos dos proteínas solubles, cromogranina A y DBH. Cuando llega un potencial de acción, la liberación es iniciada por despolarización de la membrana de la varicosidad, lo cual conduce a un influjo de calcio. El calcio, como sabemos, es indispensable para la liberación por impulso nervioso, pero no se sabe en qué etapa del acoplamiento electro-secretorio toma parte. Se sabe también que al menos parte del transmisor es secretado por exocitosis, la vesícula y la membrana plasmática se funden y forman una abertura a través de la cual difunde el contenido de la vesícula al espacio extracelular. De acuerdo con la hipótesis de la exocitosis, la liberación de NA está acompañada por la liberación de cromogranina A y de DBH. La NA liberada induce la respuesta de las células postsinápticas interactuando con receptores adrenérgicos postsinápticos.

Cuando las fibras noradrenérgicas son estimuladas por grupos de pulsos, los pulsos precedentes modifican la liberación de los siguientes. Los estudios bioquímicos y electrofisiológicos indican que la liberación aumenta con sucesivos impulsos ("facilitación") en la arteria uterina y en el conducto deferente de diferentes especies, como lo demostraron Burnstock y col. en 1964; Bell en



**Fig. 9.** Representación esquemática de una neurona noradrenérgica periférica y el órgano que inerva.

1972; Rand y col. en 1973 y Hughes y Roth en 1974. Inversamente, la disminución de la liberación por impulso con sucesivos impulsos (depresión) en la aurícula de cobayo, fue demostrada por Rand y col. en 1973. En algunos casos, como el conducto deferente de ratón, la facilitación es prontamente seguida por depresión a frecuencias mayores que 1 Hz (1 Hz = 1 pulso/seg).

La facilitación y la depresión por los pulsos precedentes, probablemente expliquen que la liberación sea, como se sabe, dependiente de la frecuencia de los estímulos. En muchos tejidos, el promedio de lo que se libera por pulso, aumenta con el aumento de la frecuencia de estimulación, quizás porque la facilitación se hace más pronunciada a medida que se hacen más cortos los intervalos entre pulsos, demostrado en bazo de gato por Brown y Gillespie en 1957 y Cubeddu y Weiner en 1975; en arteria uterina de cobayo por Bell y Vogt en 1971 y vena porta y conducto deferente de conejo por Hughes en 1972. En otros tejidos, como la membrana nictitante de gato y conducto deferente de ratón, el promedio de liberación por pulso es constante a través de un ancho rango de frecuencias, según lo confirmaron Farnebo y Malmfors en 1971; Henderson y Hughes en 1974 y Henderson y col. en 1975. En la corteza cerebral de rata, Montel y col. en 1974, y en el ganglio cervical superior de conejo, Noon y Roth en 1975, demostraron que la liberación por pulso disminuye con el aumento de la frecuencia. Parece probable que en estos tejidos la facilitación es pronto superada por la depresión, siendo la depresión más pronunciada cuanto más cortos son los intervalos entre pulsos.

Cualquier teoría sobre la secreción de la NA que se enuncie tiene que explicar estas observaciones. Las teorías que explican la facilitación y la

depresión han sido enunciadas, pero todavía es oscura la razón de las diferencias entre tejidos y entre pendientes de las curvas frecuencia-liberación.

La hipótesis del residuo de calcio, desarrollada primero para los nervios colinérgicos por Younkin en 1974, ha permitido explicar la facilitación. Cada impulso, se supone que deja algo de calcio unido a un sitio activo. Este calcio se agrega al calcio que entra durante los siguientes pulsos de manera que la liberación por pulso aumenta con los sucesivos pulsos (o "shocks"). Para Bennett y Florin, 1975 y Stjärne, 1975, cuanto más corto sea el intervalo entre ellos, más calcio queda unido y más grande será la facilitación, de manera que la liberación por pulso aumenta con el aumento de la frecuencia de estimulación.

Esta hipótesis, también ayuda a comprender la dependencia con la frecuencia de los efectos que sobre la liberación producen muchas drogas y el calcio externo. Parece probable que la liberación aumenta rápidamente al aumentar el calcio intracelular pero sólo en el rango que se produce durante el flujo de pulsos de bajas frecuencias. Es decir que a altas concentraciones de calcio dentro de la neurona, como las que se producen a frecuencias altas, los "receptores de calcio para la liberación" se hallarían totalmente ocupados. Por lo tanto, cerca de la saturación de estos "receptores", las variaciones con el calcio no producirían variaciones de liberación o podrían producir más bien inhibición, según Stjärne, 1973 y Kirpekar y col., 1975.

Estas relaciones entre calcio intraneuronal, frecuencia de estimulación y liberación, puede explicar porqué en los experimentos de Henderson y Hughes de 1974, las variaciones en la concentración del calcio extracelular (entre

1, 3 y 5.1 mM) tienen marcado efecto sobre la liberación por pulso a bajas pero no a altas frecuencias o si los producen, son insignificantes. Esto resulta así porque a altas frecuencias, los cambios en el calcio intraneuronal siempre son en el rango de saturación. Esto también explicaría, como vamos a ver más adelante, porqué los moduladores presinápticos no tienen mayor influencia cuando la frecuencia de estimulación es alta (ref. en Starke, 1977).

B- Recaptación: su importancia como ahorro y como medio para la terminación de la acción del neurotransmisor en la biofase

Ya hemos dicho que la NA liberada así como también la NA exógena, son inactivadas removiéndolas de la zona de los receptores, región llamada algunas veces "biofase". Esta inactivación o remoción se lleva a cabo por tres procesos. Primeramente, una fracción es captada de nuevo por la neurona por un sistema de transporte de alta afinidad ubicado en la membrana axonal. La magnitud de esta recaptación varía según los órganos pero llega hasta el 70-80 % de lo liberado en los tejidos densamente inervados. Por este mismo mecanismo pueden ser captadas como hemos dicho, aminoras químicamente relacionadas con NA, DA, metaraminol y tiramina. Este mecanismo de captación se bloquea con bajas concentraciones de cocaína o desipramina. Otra fracción de lo liberado es inactivada por captación de la NA por las células extraneuronales a través de un sistema de transporte de membrana de baja afinidad. Esta captación extraneuronal se bloquea con bajas dosis de NMN o esteroides como la corticosterona y el estradiol. La tercera fracción de lo liberado, es lo que escapa a la recapta-

ción neuronal o extraneuronal y difunde por las cercanías (es el "overflow", lo que se recoge en el medio de incubación en un órgano aislado).

Después de la captación neuronal, el destino de la NA difiere de la que es captada extraneuronalmente. Luego de la entrada al axoplasma, parte de la NA se redistribuye en las vesículas de almacenamiento. El resto de la NA del axoplasma y la mayor parte de la NA extraneuronal, sufren catabolismo. En muchos tejidos, el principal metabolito formado a partir de la NA liberada es DOPEG (Cubeddu y col., 1974; Langer y Enero, 1974). Lo que se supone como más probable es que se origina de la desaminación intraneuronal de la NA recapturada, seguida por reducción del aldehído al alcohol. La inhibición de la recaptación por cocaína disminuye la formación de DOPEG. Por otra parte, la O-metilación a NMN tiene lugar en sitios extraneuronales y es inhibida por los inhibidores de la captación extraneuronal. De esta forma, los cambios en el cuadro de metabolitos se puede usar para reconocer los cambios en la captación neuronal y extraneuronal (Starke, 1977).

#### C- Acción de la NA liberada sobre los receptores $\alpha$ y $\beta$ postsinápticos

En 1948, Ahlquist llevó a cabo un examen sistemático de los efectos de la A, NA e isoproterenol sobre una variedad de órganos blanco. Observó en particular que el rango de orden de potencia de estos compuestos dependía del órgano blanco examinado. El análisis de los datos lo llevaron a proponer que las diferencias de las acciones de estas catecolaminas podrían ser explicadas por la presencia de dos receptores distintos con diferente sensibilidad a las

mismas, y los llamó  $\alpha$  y  $\beta$ . Más recientemente, el desarrollo de agonistas y antagonistas aún más selectivos ha permitido su subclasificación. Lands y col., en 1967, clasificaron a los receptores  $\beta$  en  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ; los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  predominan en tejidos cardíacos, mientras que los  $\beta_2$  están presentes predominantemente en músculo liso y células glandulares. Sin embargo, Minneman y col., demostraron en 1979 que diferentes tejidos poseen ambos receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en proporciones variadas. Los receptores  $\alpha$  también son heterogéneos. Originalmente se designaron  $\alpha_1$  a los que predominan en los sitios efectores postsinápticos del músculo liso y las células glandulares; y los  $\alpha_2$  fueron propuestos por Langer en 1974 para el terminal nervioso; median la inhibición por retroalimentación negativa, ("feed back negativo"), de la liberación neuronal de la NA y quizás de la acetilcolina. Esta clasificación anatómica de los receptores  $\alpha$ , pronto se vio que no era correcta ya que los receptores  $\alpha_2$  estaban ubicados también en las células postsinápticas de diferentes tejidos incluyendo corteza cerebral, plaquetas, útero, etc. (ref. en Weiner, 1980 a).

La sensibilidad relativa de estos receptores adrenérgicos a la A, NA e isoproterenol, que son las tres catecolaminas principales, es la siguiente:

1°: en los receptores  $\alpha_1$  la A es igual o más potente que la NA, la cual a su vez es mucho más potente que el isoproterenol; 2°: en los receptores  $\alpha_2$  la A es en algunos casos más potente, en otros menos potente que la NA, dependiendo del tejido y el isoproterenol es inefectivo; 3°: en los receptores  $\beta_1$  el isoproterenol es más potente que la A, la cual es equipotente con la NA; 4°: en los receptores  $\beta_2$ , el isoproterenol es igual o más potente que la A, la cual es mucho más potente que la NA.

En general, el efecto de la activación de los receptores  $\alpha_1$  en el músculo liso es excitatorio mientras que la de los receptores  $\beta_2$  en estos sitios es inhibitoria, aunque no es una regla absoluta. En otros tejidos, los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos pueden mediar efectos estimulantes; la activación de los receptores  $\beta_2$  produce la estimulación de varias secreciones, como por ejemplo insulina, y los efectos estimulantes de las catecolaminas sobre el corazón son mediados por receptores  $\beta_1$ .

Un factor importante en la respuesta de un órgano a las aminas simpato miméticas es la proporción y densidad de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en el tejido. La NA, por ejemplo, tiene un efecto pequeño sobre el flujo de aire en los bronquios, porque los receptores en el músculo liso bronquial son en su mayor parte del tipo  $\beta_2$ . Por lo tanto, el isoproterenol y la A son potentes bronco dilatadores. Los vasos sanguíneos cutáneos poseen receptores  $\alpha$  casi exclusivamente; por lo tanto la NA y la A producen una constricción muy marcada en esos vasos mientras que el isoproterenol tiene muy poco efecto. Los vasos sanguíneos que llevan la sangre a los músculos esqueléticos están provistos de músculo liso que tiene receptores del tipo  $\beta$   $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ ; la activación de los primeros por bajas concentraciones de A provoca vasodilatación y por los segundos, la A produce constricción de los mismos. En este tejido la concentración umbral de la A para la activación de los receptores  $\beta_2$  es más baja, pero cuando se activan los dos tipos de receptores, predominan los  $\alpha$  (Weiner, 1980 a).

D-La regulación de la liberación de neurotransmisor por los receptores presinápticos durante el estímulo nervioso

Hemos dicho anteriormente que hasta hace unos diez años, estaba bien aceptado que la activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha$  ó  $\beta$  ubicados en la membrana de las células postsinápticas por la NA liberada por impulsos nerviosos, daba lugar a la respuesta fisiológica del órgano efector. También era sabido que a los terminales nerviosos adrenérgicos les correspondía sólo la síntesis, almacenamiento, liberación e inactivación de la NA y no había indicios que hicieran suponer la presencia de receptores a las catecolaminas u otros neurotransmisores en la superficie exterior de la membrana del terminal nervioso. Sin embargo, hace más de 20 años, Brown y Gillespie en 1957, encontraron que la fenoxibenzamina, un bloqueante de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos aumenta la liberación de la NA producida por estimulación nerviosa en el bazo perfundido de gato. Esto se consideró que era debido al bloqueo de los receptores  $\alpha$  del órgano efector. Cuando se supo que la fenoxibenzamina inhibe la captación neuronal, por los trabajos de Hertting de 1965, y Iversen del mismo año, así como la captación extraneuronal de la NA, demostrada por Iversen en 1965; Eisenfeld y col. en 1967 y Iversen y Langer en 1969, se postuló que el aumento en la liberación del transmisor producido por el bloqueante  $\alpha$  adrenérgico, se debía a la inhibición de la inactivación de la NA liberada por estar inhibida la recaptación (ref. en Langer, 1980).

Para probar esta hipótesis se usaron drogas como la cocaína, que inhibe la captación neuronal de la NA sin bloquear los receptores  $\alpha$  adrenérgicos en la neurotransmisión adrenérgica periférica. Se encontró que estas drogas no producían incremento en la liberación provocada por estimulación aún en concentraciones que producen el máximo de inhibición de la captación (Enero y

col., 1972; Dubocovich y Langer, 1973; Langer y Enero, 1974). Estos resultados no apoyaban la teoría del incremento en la liberación de NA como debido a la inhibición de su captación neuronal.

La fenoxibenzamina y otros bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos como la fentolamina producen un real incremento en la liberación de NA durante la estimulación nerviosa porque estas drogas aumentan la liberación del neurotransmisor provocada por estimulación en concentraciones que no inhiben la captación de NA (Enero y col., 1972; Cubeddu y col., 1974; Langer, 1974; Starke, 1977). Además, de Potter y col. (1971) y Cubeddu y col. (1974), informaron que la liberación de DBH aumentó en el bazo perfundido de gato cuando se estudió la neurotransmisión en presencia de fenoxibenzamina o fentolamina. Sin embargo, se excluyó una relación causal entre el bloqueo de las respuestas del órgano efector y el incremento en la liberación del transmisor porque los bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos aumentaban la liberación de NA de la aurícula de cobayo (Langer y col., 1971), corazón de conejo (Starke y col., 1971) y corazón de gato (Farah y Langer, 1974), donde los receptores adrenérgicos que median las respuestas del órgano efector son del tipo  $\beta$ .

Estos resultados condujeron a la hipótesis de que los receptores  $\alpha$  están presentes en la superficie de la membrana de los terminales nerviosos noradrenérgicos. De acuerdo con esta proposición, los receptores adrenérgicos  $\alpha$  presinápticos participarían en la regulación de la liberación de NA a través de un mecanismo de retroalimentación negativo mediado por el mismo neurotransmisor (Langer, 1974, 1977; Starke, 1977). Una vez que el transmisor liberado alcanza una concentración umbral en el espacio sináptico, acti-

va los receptores adrenérgicos  $\alpha$  presinápticos disparando un mecanismo de retroalimentación negativo que inhibe la posterior liberación del neurotransmisor (Enero y col., 1972; Starke, 1972; Langer, 1974). En apoyo de esta hipótesis se ha demostrado que los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos inhiben la liberación de NA producida durante la estimulación nerviosa (Starke, 1971 y 1972; Kirpekar y col., 1973; Langer y col., 1975), mientras que un aumento en la liberación provocada por estimulación se obtiene en presencia de agentes bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos (Langer y col., 1971; Starke y col., 1971; Enero y col., 1972; Cubeddu y col., 1974; Dubocovich y Langer, 1976). Estos efectos se observan independientemente de la naturaleza  $\alpha$  ó  $\beta$  de los receptores adrenérgicos postsinápticos de la célula efectora.

Los receptores inhibitorios presinápticos  $\alpha$  adrenérgicos regulan la liberación del neurotransmisor a través de un mecanismo dependiente del calcio que opera más efectivamente en el rango de frecuencias de estimulación bajas e intermedias (Dubocovich y Langer, 1976).

Existen autorreceptores presinápticos a través de los cuales el neurotransmisor puede regular su propia liberación, no sólo para la NA sino también para otros transmisores como la AcCh, DA, GABA (ácido  $\gamma$  aminobutírico) y 5-HT (Langer, 1980).

Además de los autorreceptores presinápticos implicados en el mecanismo de retroalimentación negativo para diferentes neurotransmisores, se han descrito receptores presinápticos sensibles a compuestos endógenos diferentes de los transmisores propios de la neurona. Sobre estos receptores presinápticos pueden actuar sustancias liberadas por terminales adyacentes o produ-

cidas localmente o sustancias llevadas por la sangre, para modular la neurotransmisión en el sistema nervioso periférico, así como también en el central (Langer, 1977; Starke, 1977).

### Los receptores $\alpha$ adrenérgicos inhibitorios presinápticos y la regulación de la neurotransmisión noradrenérgica

#### 1- Modulación de la neurotransmisión noradrenérgica mediada por los receptores adrenérgicos $\alpha$ presinápticos

La Fig. N° 10 muestra como toman parte los receptores adrenérgicos  $\alpha$  presinápticos en el mecanismo de retroalimentación negativo para la autoregulación de la liberación de NA durante la estimulación nerviosa que hemos descrito.

La respuesta del órgano efector puede estar mediada por receptores postsinápticos de tipo  $\alpha$  ó  $\beta$ . En los tejidos, en los cuales la respuesta está mediada por receptores  $\alpha$  (como el bazo y la membrana nictitante de gato), el aumento en la liberación de NA provocada por estimulación en presencia de bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos está acompañada por una reducción en las respuestas postsinápticas a la estimulación nerviosa (Enero y col., 1972; Dubocovich y Langer, 1976). Cuando el aumento en la liberación por bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos se estudia en tejidos en los cuales la respuesta postsináptica es mediada por receptores  $\beta$ , como en el corazón, se obtiene una potenciación de la

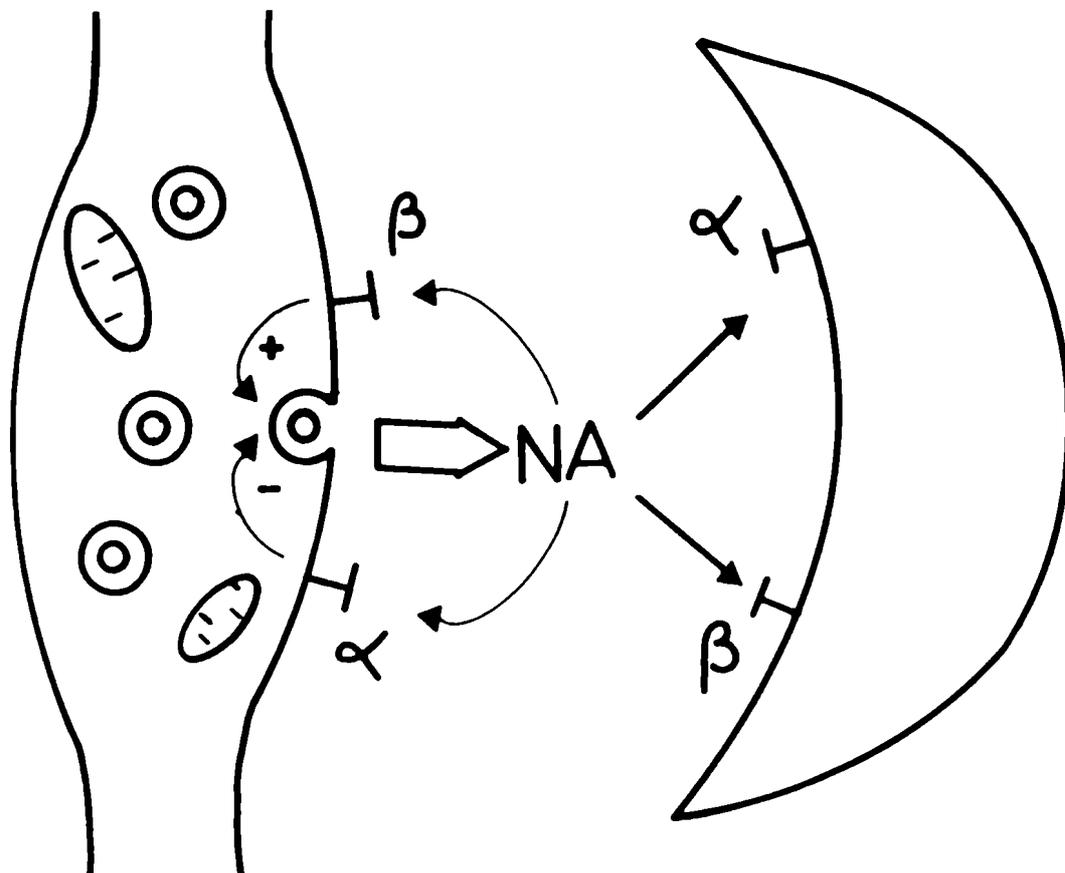


Fig. 10. Representación esquemática de los receptores presinápticos  $\alpha$  y  $\beta$  sobre una varicosidad del terminal nervioso noradrenérgico periférico. Mecanismos inhibitorios y facilitatorios de la liberación de NA por estímulo nervioso, mediados por los mismos.

respuesta (Langer y col., 1977). Las respuestas cronotrópicas a la estimulación del nervio acelerador en aurículas de cobayo, mediadas por receptores  $\beta$  (Fig. N° 10), se potencian durante la exposición a una concentración de fentolamina que produce un aumento de 3 veces en la liberación del neurotransmisor (Langer y col., 1977). Estos mismos resultados fueron obtenidos "in vivo"; el bloqueo de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos potenció las respuestas cronotrópicas positivas a la estimulación nerviosa del nervio cardioacelerador en el gato anestesiado (Lokhandwala y Bucklay, 1976; Yamaguchi y col., 1977; Cavero y col., 1979). Cuando se determina junto con los cambios de frecuencia del corazón, la liberación de NA en el seno coronario del perro espinalizado, se ve que la clonidina, un agonista  $\alpha$  adrenérgico, disminuye la liberación y los efectos cronotrópicos positivos de la estimulación nerviosa del nervio acelerador (Yamaguchi y col., 1977; Cavero y col., 1979). En estas condiciones la fentolamina bloquea los efectos de la clonidina y aumenta la liberación del transmisor así como también las respuestas cardioaceleradoras de la estimulación nerviosa (Cavero y col., 1979). Estos resultados apoyan la hipótesis de que este mecanismo presináptico juega un papel fisiológico en la regulación de la liberación de NA durante la estimulación nerviosa tanto "in vitro" como "in vivo".

Este mecanismo presináptico requiere para operar, una concentración umbral en el espacio sináptico del transmisor liberado por impulsos nerviosos. Cuando los depósitos de NA se depletan la efectividad de la fenoxibenzamina en aumentar la liberación de NA<sup>3</sup> durante la estimulación nerviosa está reducida (Enero y Langer, 1973). Resultados semejantes obtuvieron Cubeddu y

Weiner (1975), quienes midieron la liberación de DBH. El pretratamiento con reserpina depleta completamente los depósitos endógenos de NA sin afectar los niveles de DBH en el bazo de gato (Cubeddu y Weiner, 1975). Mientras la fenoxibenzamina aumenta 4 veces la liberación de DBH producida por estimulación nerviosa en el bazo normal (cuando se libera también NA), la droga no aumenta la liberación de DBH provocada por estimulación cuando los depósitos han sido deplecionados de NA por reserpina. En consecuencia, el aumento de la liberación de NA por estímulo nervioso provocado por los antagonistas  $\alpha$  adrenérgicos depende de que se libere transmisor desde los nervios y estimule los receptores inhibitorios presinápticos  $\alpha$  adrenérgicos.

Del mecanismo de retroalimentación negativo se desprende el concepto de que los antagonistas  $\alpha$  adrenérgicos no tendrían efecto sobre la liberación de NA que resulta de un único pulso de estimulación, porque en estas condiciones no hay NA liberada antes, de la cual se pueda disponer para estimular los receptores presinápticos  $\alpha$ . En aurícula de cobayo, Rand y col. (1973), demostraron que la fenoxibenzamina no afecta la liberación de NA-<sup>3</sup>H en respuesta a un solo pulso pero aumenta con 2, 4, 8 y 16 pulsos a una frecuencia de 1 Hz. Kalsner (1979) informó que en conducto deferente de cobayo la exposición a 33  $\mu$ M de fenoxibenzamina aumentó la liberación de tritio a un pulso, y concluyó que el concepto de mecanismo por retroalimentación negativo tendría que ser reconsiderado; pero es posible que en estos experimentos los resultados hayan sido distorsionados ya que a tan alta concentración de fenoxibenzamina, aumenta el tritio liberado en condiciones basales.

La magnitud de la reducción de la liberación provocada por la estimulada

ción obtenida con agonistas  $\alpha$  adrenérgicos es más pronunciada cuanto más baja es la frecuencia de la estimulación nerviosa (Langer y col., 1975). Los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos no pueden reducir la liberación de NA producida por altas frecuencias de estimulación (Armstrong y Paura, 1973; Langer y col., 1975). Esta característica de la dependencia de la frecuencia de la regulación mediada por receptores adrenérgicos  $\alpha$  presinápticos (Fig. N° 10), contrasta con los efectos de los agentes bloqueantes neuronales como la guanetidina y el bretilio, los cuales disminuyen la liberación a bajas y altas frecuencias de estimulación nerviosa. La inhibición de la neurotransmisión noradrenérgica por agonistas con estructura de feniletilamina sólo puede ser demostrada cuando la captación neuronal de la NA está inhibida por cocaína y desipramina. Por otra parte, cuando la liberación del transmisor es reducida por agonistas  $\alpha$  adrenérgicos que son derivados imidazolínicos, no es necesario inhibir la captación neuronal. Por el contrario, la inhibición de la captación neuronal con cocaína o desipramina disminuye la efectividad de los derivados imidazolínicos como la oximetazolina o clonidina para inhibir la neurotransmisión adrenérgica (Dubocovich y Langer, 1981).

La regulación de la liberación de NA mediada por los receptores presinápticos  $\alpha$  adrenérgicos se pueden demostrar sólo para procesos de liberación del transmisor dependientes de calcio como la estimulación nerviosa y la despolarización por potasio o veratridina. La liberación de NA por tiramina no es modificada por agonistas ni antagonistas  $\alpha$  adrenérgicos.

Posiblemente los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos inhiben la liberación de NA provocada por la estimulación reduciendo la disponibilidad de calcio para el

acoplamiento estímulo-secretorio que participa en la liberación exocitótica del neurotransmisor. Otra posibilidad es que la activación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos inhibitorios presinápticos eviten la propagación de la despolarización a través de la red de varicosidades. De acuerdo con este punto de vista, la activación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos reduciría la neurotransmisión previniendo el reclutamiento de varicosidades para la liberación del neurotransmisor (Stjärne, 1978).

De todos los tejidos investigados hasta ahora, sólo en las arterias renales no hay modulación presináptica por fentolamina ni por clonidina (Kalsner y Chan, 1980).

En los últimos años han sido publicados trabajos donde trata de demostrarse que la regulación de la liberación del neurotransmisor durante la estimulación nerviosa por drogas que actúan sobre los receptores  $\alpha$  presinápticos, no sería tan dependiente de la frecuencia de estimulación como se ha sostenido hasta ahora. Así, Wakade y Wakade (1982), marcando con  $\text{NA-}^3\text{H}$  el corazón perfundido de cobayo, demuestran que el mecanismo de retroalimentación negativo implicado en el control de la neurotransmisión simpática opera sobre un amplio rango de frecuencias de actividad neuronal (0.125 a 10 Hz), aunque su efectividad puede declinar con el incremento de esta frecuencia (30 Hz).

Por su parte, Lew y Angus (1982), trabajando con aurículas de cobayo estimuladas en forma intramural durante el período refractario, sugieren que la clonidina reduce la cantidad de NA liberada por pulso independientemente de la frecuencia de estimulación; la dependencia con la frecuencia de estimulación observada anteriormente, podría ser debida a los efectos de los procesos de captación y remoción del neurotransmisor en la biofase.

Posible participación de nucleótidos cíclicos en la inhibición presináptica de la liberación de NA

En glándula pineal de rata se ha descrito un mecanismo presináptico dependiente de calcio para la generación de GMPc (guanosinmonofosfato cíclico). Este sistema generador de GMPc parece que está unido a un receptor  $\alpha$  adrenérgico ya que el incremento en el nucleótido cíclico obtenido por  $NA^+$  o por  $K^+$  se bloquea por drogas bloqueantes de estos receptores (O'Dea y Zatz, 1976). Este efecto de los agonistas  $\alpha$ , se pierde por desnervación.

Pelayo y col. (1978) han encontrado que la exposición a dibutiril GMPc reduce la liberación de  $NA-^3H$  provocada por  $K^+$  de la glándula pineal de rata, pero no modifica la liberación inducida por tiramina. Todos estos hechos sugieren que en la glándula pineal de rata el GMPc podría ser un eslabón en los eventos que siguen a la activación del receptor  $\alpha$  presináptico que conducen a una disminución en la liberación de NA. Esto no ha sido confirmado en otros tejidos. Más aún, en el bazo perfundido de gato y en el conducto deferente de rata los análogos del GMPc no reducen la liberación de  $NA-^3H$  durante la estimulación nerviosa.

Skolnick y col. (1978) hallaron que los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos de la serie de las imidazolininas reducen los niveles tisulares de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico) y Wikberg (1979), sugirió que la inhibición de la neurotransmisión podría estar unida a una disminución de los niveles de AMPc.

Posible participación de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasa de la membrana en la modulación de la liberación a través de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos presinápticos inhibitorios

Se produce liberación del transmisor en condiciones bajo las cuales la actividad de la enzima está inhibida, mientras que la activación de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasa conduce a la inhibición de la liberación del neurotransmisor. Es posible por lo tanto, que la inhibición de la liberación del neurotransmisor por las catecolaminas esté relacionado con la activación de esta enzima. En apoyo de esta teoría, Yoshimura (1973) encontró que las catecolaminas activan la enzima en homogenato y sinaptosomas de cerebro, y Gutman y Boonyaviroy (1977) que los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos activan la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasa preparada de la médula adrenal.

Si la modulación presináptica de la liberación de NA durante la estimulación nerviosa parece ser dependiente de la frecuencia y a altas frecuencias de estimulación se produce una gran concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular, y la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasa está activada, esto explicaría la baja efectividad de los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos para inhibir la liberación de NA a altas frecuencias de estimulación; esto estaría relacionado con el hecho de que la ATPasa de la membrana está ya en un estado estimulado.

El nivel molecular del mecanismo presináptico de control de la liberación del neurotransmisor no está aún claro. Por otra parte, se piensa (Stjärne, 1978), que la activación de los receptores  $\alpha$  presinápticos pueden producir una hiperpolarización local que evita la propagación de la conducción del impulso en los terminales nerviosos noradrenérgicos. Esto puede ser producido por un

aumento de la conductancia al potasio que lleva a la hiperpolarización y bloqueo de la conducción. Además, la inhibición presináptica por los receptores  $\alpha$  puede estar mediada a través de una depresión del acoplamiento electrosecretorio más bien que por una restricción de la entrada de los pulsos nerviosos en la parte más alejada de los terminales nerviosos (Stjärne, 1978).

2-

Receptores presinápticos facilitatorios  $\beta$  adrenérgicos en los terminales nerviosos noradrenérgicos periféricos

Langer y col. (1974) propusieron la facilitación de la liberación de NA por estímulo nervioso a través de los receptores presinápticos  $\beta$ . En forma inversa a los  $\alpha$  presinápticos, los  $\beta$  presinápticos serían activados por bajas concentraciones del neurotransmisor que por retroalimentación positiva llevaría a un aumento de la liberación de NA (Fig. N° 10). Posteriormente, se aportaron nuevos experimentos en apoyo de la teoría de la regulación de la liberación del neurotransmisor adrenérgico a través de este mecanismo de retroalimentación positiva. Así, el isoproterenol en bajas concentraciones facilita la liberación de NA durante la estimulación a bajas frecuencias de estimulación en diferentes tejidos: aurícula de cobayo, aorta torácica y bazo de gato, glándula pineal y vena porta de rata (Adler-Graschinsky y Langer, 1975; Celuch y col., 1978; Pelayo y col., 1978; Westfall y col., 1979; Dahlöf y col., 1980). In vivo, se ha encontrado un aumento por isoproterenol y una disminución por sotalol de la liberación de NA por estímulo nervioso del nervio cardioacelerador derecho en el perro anestesiado (Yamaguchi y col., 1977). Esto sucede a

frecuencias de estimulación entre 1 y 5 Hz. Además, Weinstock y col. (1978), demostraron que los receptores presinápticos  $\beta$  están presentes en las terminaciones nerviosas recién formadas cuando se cultiva el ganglio cervical superior de la rata. En esta preparación no hay estructuras postsinápticas.

El incremento en la liberación de NA obtenido por estimulación nerviosa en presencia de isoproterenol se antagoniza con propranolol  $10^{-7}$  M (Adler-Graschinsky y Langer, 1975; Celuch y col., 1978; Pelayo y col., 1978; Dahlöf y col., 1980). El propranolol reduce directamente la liberación de NA por estímulo nervioso en forma pequeña pero significativa en estas mismas preparaciones. En otras preparaciones como la glándula pineal de rata (Pelayo y col., 1978) y arteria y vena mesentérica humana (Stjärne y Brundin, 1975), el propranolol no reduce la liberación de NA-<sup>3</sup>H por estímulo nervioso.

Como se vio para los receptores  $\alpha$  presinápticos (Stjärne, 1974), los receptores  $\beta$  presinápticos son estereoespecíficos. El aumento en la NA liberada por estímulo nervioso se observa con (-)-isoproterenol, pero no con (+)-isoproterenol. Dahlöf y col. (1980), encontraron que el dl-propranolol pero no el d-propranolol reduce la liberación de NA-<sup>3</sup>H por estímulo nervioso de la vena porta de ratas espontáneamente hipertensas.

Según los resultados experimentales reunidos hasta el presente, los receptores  $\beta$  presinápticos facilitatorios de la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso serían del tipo  $\beta_2$ . Este punto de vista está basado en experimentos realizados en nervios constrictores humanos, donde se ha encontrado que la terbutalina y el salbutamol, agonistas adrenérgicos del tipo  $\beta_2$ , aumentan la liberación de NA-<sup>3</sup>H producida por estimulación nerviosa, mientras que el agonista  $\beta_1$ , H110/30, no tuvo efecto (Stjärne y Brundin, 1976).

Existe la posibilidad de que los receptores presinápticos  $\beta$  adrenérgicos facilitatorios sean activados principalmente por la A circulante para incrementar la neurotransmisión noradrenérgica. Cuando se marcan los terminales nerviosos con A, el propranolol se hace más efectivo para reducir la liberación del transmisor producida por la estimulación nerviosa simpática (Guimaraes y col., 1978; Rand y col., 1979). Por lo tanto, es posible que la A pueda participar en el mecanismo de retroalimentación positivo para la liberación de NA de los terminales nerviosos noradrenérgicos periféricos. Los antagonistas  $\beta$  adrenérgicos pueden así actuar en este sitio para causar una disminución en la salida del transmisor bloqueando el mecanismo de retroalimentación positivo mediado por los receptores  $\beta$  adrenérgicos presinápticos facilitatorios.

En contraste con la inhibición presináptica mediada a través de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  que estaría presente en los terminales nerviosos noradrenérgicos (Fig. N° 10), tanto periféricos como centrales, no hay todavía evidencias de la presencia de adrenoreceptores  $\beta$  presinápticos facilitatorios en áreas del sistema nervioso central que contenga terminales nerviosos noradrenérgicos.

#### Posible participación de nucleótidos cíclicos en la facilitación presináptica de la liberación de NA

La A y sus congéneres producen un grupo importante de efectos metabólicos cuya manifestación incluye hiperglucemia, hiperlactidemia, hiperlipemia,

aumento del consumo de oxígeno e hipercalemia. La sustancia clave involucrada en la mediación de estos efectos, como así también en los de un gran número de otras hormonas, es el AMPc, como ha sido demostrado en una serie de investigaciones iniciadas en la década del setenta: Robinson y col., 1971 y Rall, 1972. La A aumenta la acumulación de AMPc intracelular activando una enzima unida a la membrana plasmática, la adenilato ciclasa, a través de los receptores  $\beta$  postsinápticos, la cual cataliza la conversión de ATP a AMPc. El AMPc inicia entonces una serie de alteraciones intracelulares que producen los efectos metabólicos y farmacológicos característicos de las catecolaminas (ref. en Mayer, 1980).

A pesar de no haberse encontrado todavía evidencias de la presencia de adrenoreceptores  $\beta$  presinápticos facilitatorios en áreas del sistema nervioso central que contengan terminales nerviosos noradrenérgicos, es necesario destacar que el dibutiril AMPc produce un aumento dependiente de la concentración en la liberación de NA-<sup>3</sup>H producida por estimulación nerviosa en cortes de la corteza occipital de la rata (Pelayo y col., 1978).

## VIII- Objetivos

### A) Antecedentes

Ya hemos dicho que el aumento de actividad del sistema nervioso simpático está asociado con una síntesis acelerada de NA en órganos como el corazón, cerebro y glándula submaxilar de animales enteros, y que éste incremento en la síntesis del neurotransmisor noradrenérgico se ha demostrado también en preparaciones aisladas como glándula adrenal y nervio hipogástrico-conducto deferente. Hemos visto también que la síntesis acelerada del neurotransmisor es consecuencia del aumento en la velocidad de conversión de la L-tirosina a DOPA por un incremento en la actividad de la enzima TH que lleva a cabo esta conversión. Esta hidroxilación, es como sabemos, la primera etapa y además la limitante de la velocidad en la biosíntesis de la NA. Midiendo la actividad de esta enzima tenemos una medida de la velocidad de síntesis del neurotransmisor.

Cuando hablamos de regulación de la TH dijimos que puede hacerse en forma rápida y lenta, siendo esta última una inducción de la enzima.

En forma rápida la enzima es regulada por los niveles citoplasmáticos libres de NA, inhibiéndola por un aumento o activándola por una disminución de los mismos. El aumento de la NA libre en el citoplasma inhibe a la TH por antagonismo competitivo con el cofactor, la pteridina. Los efectos inhibitorios sobre la TH de las drogas que actúan en forma tal que aumentan los niveles de NA libre citoplasmática, como son los inhibidores de MAO, las aminas simpatomiméticas de acción indirecta y el bretilio, pueden ser antagonizados por adición al medio de exceso del cofactor, la pteridina. Dijimos también que la estimula

ción nerviosa produce en los terminales nerviosos simpáticos la liberación del neurotransmisor adrenérgico al espacio sináptico por un proceso de exocitosis. De este transmisor liberado, parte del mismo es recaptado por el terminal adrenérgico, parte se pierde al espacio sináptico y parte del mismo actúa sobre los receptores postsinápticos  $\alpha$  ó  $\beta$  localizados en la membrana de las células efectoras postsinápticas dando lugar a la respuesta típica del órgano efector, contracción o relajación de un músculo liso, efectos cronotrópicos o inotrópicos sobre el corazón o secreción de una glándula. Es por lo tanto probable que drogas que modifican la recaptación del neurotransmisor nos den también información sobre la regulación de la TH al modificar los niveles citoplasmáticos de NA.

Sin embargo, el aumento de la actividad de TH que se observa después de la estimulación eléctrica de la preparación nervio hipogástrico-conducto deferente no es antagonizado por la NA, mientras que el aumento observado durante la estimulación sólo es antagonizado parcialmente por el neurotransmisor pero no es revertido por la adición de exceso de cofactor, la pteridina reducida, al medio. Este incremento de actividad no inhibido competitivamente por NA se debería a una fosforilación de la enzima por una proteína kinasa dependiente del AMPc, que llevaría a la misma desde un estado inactivo de baja afinidad por el cofactor, a un estado activado de alta afinidad, o según otros investigadores, sin cambio en la afinidad se obtendría una enzima que por estar activada llevaría a una reacción de mayor velocidad máxima.

Hemos expuesto también la hipótesis desarrollada en los últimos años de que los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  estarían presentes en la superficie exter

rior del terminal nervioso adrenérgico y que por un mecanismo de retroalimentación negativo y positivo respectivamente modifican la cantidad de neurotransmisor liberado por estímulo nervioso.

Si el aumento en la actividad del sistema simpático está asociado a un aumento en la síntesis de NA, este aumento en la síntesis se producirá a fin de mantener siempre en el mismo nivel los depósitos endógenos del neurotransmisor que se pierde al espacio sináptico durante la estimulación nerviosa.

Si conseguimos variar la cantidad del neurotransmisor que se libera con cada estímulo nervioso que llega, esto se tendría que ver reflejado en una variación de la velocidad de síntesis de la NA y en última instancia en la variación de la velocidad de hidroxilación del sustrato, la tirosina.

Nuestro objetivo fue estudiar las variaciones en la actividad de la enzima TH en el período posterior a la estimulación nerviosa, en tejido intacto de órgano aislado que ha sido previamente sometido a la estimulación nerviosa adrenérgica en distintas condiciones de estimulación y en presencia de drogas que alteren ya sea los niveles del neurotransmisor en el tejido o el posterior destino del mismo, así como drogas que modifiquen la cantidad del neurotransmisor liberado por estímulo nervioso. De esta forma tratamos de determinar si existe una regulación de la enzima a través de los receptores presinápticos.

## B) Desarrollo

Todo el trabajo se realizó en la preparación muscular aislada: nervio infratroclear-membrana nictitante de gato, que es un órgano par. Ya se había

probado que en esta preparación, a semejanza de la preparación nervio hipogástrico-conducto deferente de cobayo, se produce una alteración en la actividad de la enzima TH en el tejido intacto en el período inmediato posterior a la estimulación eléctrica intermitente. Todos los experimentos se realizaron en forma pareada, es decir se estimuló una sola de las dos preparaciones, mientras que la otra montada en el baño de órgano aislado en la misma forma, permaneció sin estimular y fue el control. Previamente se determinó que si bien había dispersión de datos entre animales, no la había entre las dos preparaciones del mismo animal.

A- Como primer paso se establecieron los parámetros y programas de estimulación que provocaron el mayor incremento en la actividad de la enzima:

1. Intermitencia de la estimulación
2. Parámetros de la estimulación (voltaje, frecuencia, etc.)
3. Tiempo de estimulación
4. Número total de estímulos

B- Como segundo paso se estudiaron diversas variables relacionadas con la estimulación realizada en las condiciones precedentemente establecidas y la mejor forma de expresar los resultados:

1. Extinción del fenómeno de activación postestimulación
2. Actividad de la TH en el cuerpo neuronal (G.C.S.) en el período posterior a la estimulación nerviosa
3. NA endógena en el tejido después de la estimulación
4. Presencia de  $Ca^{++}$  en el medio durante la estimulación y en el período posterior a la misma, es decir, durante la medición de la actividad de TH.

5. Justificación de la expresión de los resultados en forma pareada.

C- Como tercer punto se estudió la acción que sobre la actividad de la enzima tiene la estimulación realizada en condiciones tales en que estén alterados los niveles citoplasmáticos de NA:

1. Deplecionados los depósitos endógenos del neurotransmisor por la administración al animal de reserpina
2. Impedida la recaptación del neurotransmisor por los terminales nerviosos adrenérgicos durante la estimulación por el agregado al medio de incubación de cocaína
3. Impedida la degradación metabólica del neurotransmisor y por lo tanto aumentados los niveles citoplasmáticos del mismo por incubación previa de las preparaciones con pargilina, un inhibidor de la MAO, principal enzima implicada en el metabolismo de la NA intraneuronal.

D- En cuarto lugar se estudió la acción que sobre la actividad de TH en el período de postestimulación tiene la estimulación nerviosa realizada en presencia de drogas que modifican la liberación de NA actuando a través de los receptores presinápticos:

1. Estimulación nerviosa en presencia de bloqueantes de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos: fentolamina y fenoxibenzamina.
2. Estimulación nerviosa en presencia de agonistas  $\alpha$  adrenérgicos durante la estimulación: clonidina.
3. Estimulación nerviosa en presencia de agonistas  $\beta$  adrenérgicos. Se usó isoproterenol.
4. Estimulación en presencia de bloqueantes  $\beta$  adrenérgicos: propranolol y metoprolol.

5. Estimulación en presencia de inhibidores de fosfodiesterasa, se usó papaverina.

E- El quinto paso fue medir la liberación por estímulo nervioso del neurotransmisor marcado con  $\text{NA-}^3\text{H}$ , en las mismas condiciones en que se estimuló la preparación previa a la medición de la actividad de TH.

Con los valores de liberación de  $\text{NA-}^3\text{H}$  se estudió la correlación que había entre ellos y la activación de la TH.

**IX- Métodos****A) Preparación aislada de nervio infratroclear-membrana nictitante de gato**

Los gatos de 1.8 a 4.0 kg de peso, de ambos sexos, se anestesian con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.) y se canula la tráquea. Se sacan los globos oculares y las membranas nictitantes con todo el tejido circundante; se colocan en una cápsula de Petri con solución de Krebs modificada burbujeada con 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>. La composición del Krebs es la siguiente (concentración milimolar): NaCl, 118,0; KCl, 4,7; CaCl<sub>2</sub>, 2,6; MgCl<sub>2</sub>, 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; glucosa, 11,1; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0.004 y ácido ascórbico, 0,11.

El músculo medial se disecciona junto con las fibras simpáticas postganglionares que parten del nervio infratroclear bajo un microscopio de disección binocular. Los tejidos se mantienen siempre en la solución de Krebs modificada y burbujeada. A continuación se montan las preparaciones en un baño de órgano aislado de 5 ml. Para ello, el cartílago sobre el cual están insertas las fibras del músculo medial se fijan al fondo del baño; el extremo superior del músculo se conecta a un transductor de fuerza (Grass FT 03) y la tensión desarrollada por el músculo se registra con un polígrafo Grass. El nervio infratroclear se pasa a través de un electrodo bipolar de platino en forma de espiral situado en el baño a nivel del nervio. El electrodo con el nervio en su interior se protege cubriendo con una capa de silicona para aislar el electrodo

del medio de incubación. La estimulación se realiza con pulsos cuadrados monofasicos de 0.5 milisegundos de duración por medio de un estimulador Grass S88. La tensión del músculo se ajusta a 2.5 g (tensión de reposo).

Una vez montadas las membranas, se hace primero una curva de voltaje para que la estimulación se realice a voltaje supramáximo. La curva se construye estimulando a 10 Hz durante 20 segundos desde 20 a 80 voltios. Generalmente, el voltaje supramáximo se encuentra entre 60 y 80 voltios.

Después que las membranas se han montado y se ha hecho la curva de voltaje se deja pasar un período de 60 minutos antes de comenzar la estimulación. Durante este tiempo la solución de Krebs del baño se renueva cada 10 minutos. El burbujeo con la mezcla  $O_2 + CO_2$  debe ser constante. Al mismo tiempo, durante este período la tensión de reposo de la preparación se ajusta repetidamente a 2.5 g, al cabo de 40 a 50 minutos alcanza las condiciones invariables. Esta tensión no se modifica a través del experimento. La temperatura se mantiene siempre a 37°C.

#### 1.a.) Preparación para medición de actividad de TH

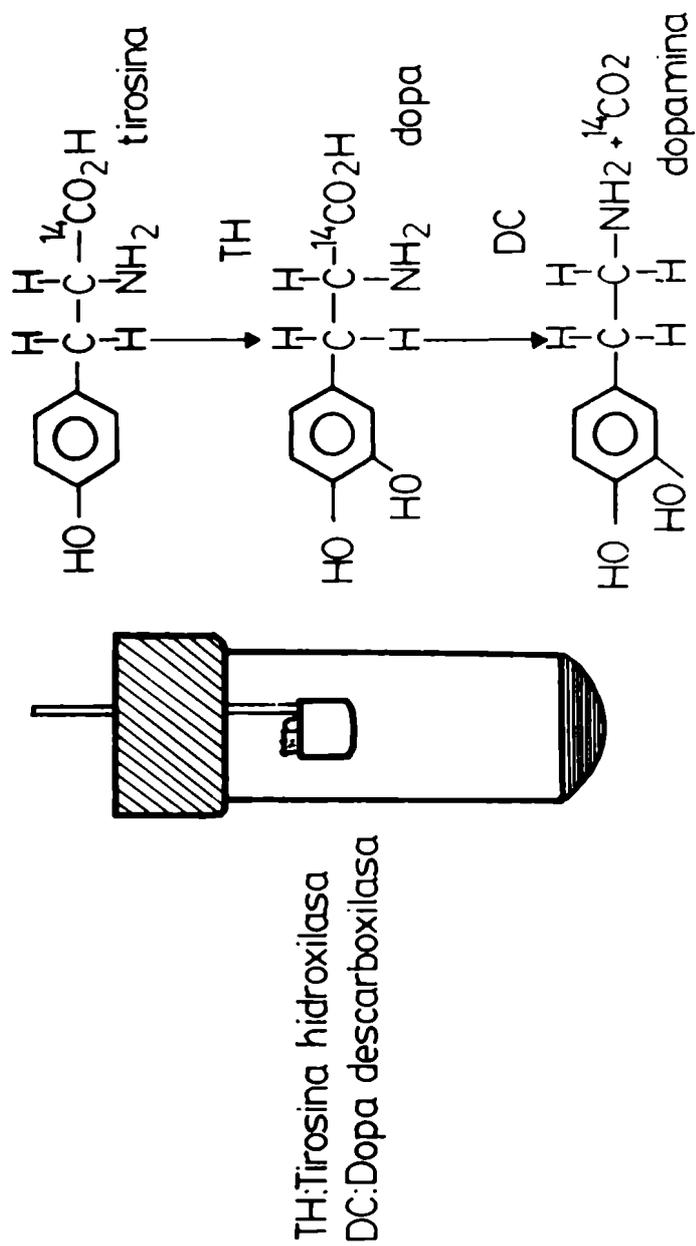
La preparación, si es destinada para la medición de actividad de TH en el período posterior a la estimulación nerviosa, se procede a estimularla durante 1 hora en forma intermitente 30 segundos de cada minuto una vez que ha alcanzado condiciones invariables que como dijimos necesita aproximadamente 60 min después de la curva de voltaje. La estimulación se realiza ya sea en condiciones control o en presencia de drogas. En el caso de estimular en presencia de dro-

gas, éstas se colocan en el baño antes de comenzar la estimulación a distintos tiempos según la misma. Siempre se estimula una sola preparación; la otra permanece sin estimular como control (sin estímulo) salvo en algunos casos, como por ejemplo cuando se quiere mostrar que la estimulación provoca la misma activación en las dos membranas del mismo animal. Una vez concluida la estimulación, se la desmonta rápidamente, se le corta el cartílago y el nervio y se la introduce en el tubo donde ya está el medio de incubación preparado para el dosaje de la actividad de TH.

#### 2.a. Medición de la actividad de TH en el tejido intacto.

Para medir la actividad de la enzima se usa el método de Waymire y col. (1971), que básicamente consiste en atrapar el  $\text{CO}_2$ , marcado con  $^{14}\text{C}$  que se desprende de la reacción, en un recipiente central de plástico con un pequeño papel de filtro plegado, impregnado con 0.2 ml de solubilizador NCS (Nuclear Chicago Corporation, U.S.A.) como se muestra en la Fig. N° 11.

El tejido se incuba en el tubo de ensayo corto que contiene 0.5 ml de solución de la siguiente composición: 0.4 ml de solución de Krebs con la misma composición con la que se realizó la estimulación y disección pero concentrada en un 20 % y sin ácido ascórbico; se completa a un volumen de 0.5 ml con 0.05 ml de agua, 0.025 ml de solución de ácido ascórbico  $1 \times 10^{-4}$  M y 0.025 ml de L-tirosina  $1\text{-}^{14}\text{C}$   $2 \times 10^{-3}$  M (52 uC/umol). De esta forma en el Krebs normal la concentración de L-tirosina es  $1 \times 10^{-5}$  M. El ácido ascórbico tiene una concentración  $5 \times 10^{-3}$  M, superior al Krebs normal para evitar la oxidación. El



**Fig. 11.** Esquema del método de medición de actividad de TH por el método de Waymire y col., 1971.

tapón con el recipiente central que contiene 0.2 ml de solubilizador NCS para atrapar el  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido, se coloca inmediatamente después de introducido el tejido. El tubo se incuba durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. El tubo con el medio de incubación ha sido llevado previamente a  $37^\circ\text{C}$  por una incubación previa de 5 min.

La reacción se detiene a los 20 minutos inyectando 0.2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, que se introduce a través del tapón de goma. Los blancos son blancos químicos, es decir del mismo medio sin tejido.

La incubación con agitación, continúa durante 2 horas más a  $37^\circ\text{C}$  para facilitar la total liberación del  $^{14}\text{CO}_2$  y luego el recipiente con el solubilizador que tiene además el papel plegado, se coloca en un vial con 10 ml de líquido centelleador para muestras orgánicas de la siguiente composición: 0.6 g de POPOP (1,4-bis-2-(5-feniloxazol) benzeno); 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol) y 5 ml de etanol por litro de tolueno y se cuenta en contador de centelleo líquido.

En algunos casos en que se quiere conocer la acción de una droga o de un ión durante la postestimulación, éste se agrega al medio de incubación del tubo, donde se va a medir la TH, antes que el tejido.

Tanto la actividad basal como la actividad en el período posterior a la estimulación nerviosa de la membrana nictitante, difiere mucho en valor absoluto de un animal a otro pero son muy similares los valores de las dos membranas del mismo animal. Por esta razón la expresión de los resultados la realizamos como relación entre los nCi de  $^{14}\text{CO}_2$  liberados por la membrana estimulada en 20 min, y la no estimulada, y su valor es un número que expresa las veces que

se incrementa la actividad de la enzima por estímulo nervioso con respecto a su valor basal, sin estimular.

Los nCi se obtienen a partir de las c.p.m. obtenidas en el contador para cada membrana de la siguiente forma:

$$nCi = \frac{cpm_m \times 100}{ef \times 2200} - \frac{cpm_{bl} \times 100}{ef \times 2200}$$

donde:  $cpm_m$ , son las cuentas por minuto leídas para la membrana

$cpm_{bl}$ , son las cuentas por minuto leídas para el blanco

$ef$ , es la eficiencia de la lectura del contador (aproximadamente 83 %)

$$\frac{cpm \times 100}{ef} = dpm \text{ (desintegraciones por minuto)}$$

2200 son las desintegraciones por minuto equivalentes a 1 nCi

luego:  $\frac{nCi_{me}}{nCi_{m \text{ s.e.}}} = R$

$nCi_{me}$  = nCi membrana estimulada

$nCi_{m \text{ s.e.}}$  = nCi membrana sin estimular

$R$  = relación entre ambas membranas

3.a. Preparación para la medición de liberación de  $NA-^3H$  por estímulo nervioso

La  $\text{NA-}^3\text{H}$  se empleó como trazador radiactivo del neurotransmisor respectivo (Langer y Vogt, 1971).

Las membranas nictitantes se montan en el baño de órgano aislado en la misma forma que para estimular durante 1 hora. Treinta minutos después de la curva de voltaje, se incuba durante 30 minutos con  $25 \mu\text{Ci}$  ( $5 \text{ uCi/ml}$ ) de  $(+)-\text{NA } 7\text{-}^3\text{H}$  (actividad específica 5-7 Ci/mmol). La  $\text{NA-}^3\text{H}$  se diluyó en 10 ml de solución de Krebs ajustado a pH 7.4 (5 ml para cada membrana). Al final de este período de incubación, el tejido se lava ocho veces durante 1 minuto con solución de Krebs. Seguidamente la solución de Krebs se reemplaza cada 10 minutos durante 2 horas. Estos lavados repetidos aseguran la eliminación de  $\text{NA-}^3\text{H}$  no neuronal.

El flujo de productos radiactivos del tejido al baño de incubación se determina contando muestras de 0.5 ml, es decir se toma la muestra antes de cada reemplazo del Krebs. Luego de 120 minutos del final de la incubación con la  $\text{NA-}^3\text{H}$ , el flujo espontáneo radiactivo se nivela, alcanza un equilibrio y se comienza a tomar muestras de 2 ml al final de cada período de 5 minutos, antes de renovar la solución de Krebs del baño de incubación, que ahora se realiza en este tiempo más corto.

Los nervios se estimulan a la frecuencia indicada en cada grupo experimental (4,10 ó 20 Hz) durante 5 minutos, con pulsos cuadrados de 0.5 milisegundos de duración y voltaje supramáximo como para la estimulación intermitente. A cada membrana se le aplican dos períodos de estimulación. El primer período de estimulación se lleva a cabo a los 138 minutos después del final de la incubación con  $\text{NA-}^3\text{H}$ . El segundo período se aplica 60 minutos después del primero.

El primer período se toma como control del segundo, pudiendo éste realizarse también en condiciones control o llevarse a cabo en presencia de drogas. En este último caso estas drogas se agregan a distintos tiempos antes de esta segunda estimulación y se agregan al baño cada vez que se reemplaza el Krebs hasta el final del experimento.

Al final del experimento se desmontan las membranas nictitantes, se les corta el cartílago y el nervio y se homogenizan en 5 ml de ácido perclórico 0.4 N y se deja extrayendo 24 horas. Se centrifuga y una alícuota del sobrenadante se coloca en el vial para medir la radiactividad remanente en el tejido que es necesario conocer para calcular la liberación fraccional tanto espontánea como inducida por estimulación nerviosa.

El líquido centelleador usado en este caso, así como en las muestras que se toman durante todo el experimento, es centelleador para muestras acuosas y tiene la siguiente composición: tolueno, 600 ml; Tritón X-100, 300 ml; PPO, 5.0 g; POPOP, 0.1 g y HCl 1 N, 20 ml. La eficiencia se corrige con soluciones patrones de tritio.

La liberación de NA y sus metabolitos tritiados por estímulo nervioso se expresa como liberación fraccional/estímulo, entendiéndose por liberación fraccional la relación entre el  $^3\text{H}$  liberado por la estimulación y el total existente en el tejido en el momento de iniciarse la estimulación. La liberación inducida por estímulo nervioso se calcula restando a la liberación por estímulo el flujo espontáneo (sin estímulo) que se acepta tuvo lugar en todas las muestras durante y después de la estimulación nerviosa. El valor del flujo espontáneo restado de las muestras del período de estimulación y de las de postesti

mulación es la liberación basal de reposo, el que se obtiene promediando el valor de las tres últimas muestras de los períodos inmediatos anteriores al de estimulación. La liberación total es la suma de todos los incrementos por arriba de los niveles espontáneos inducidos durante el período de estimulación. Este valor se divide por el número total de estímulos del período de estimulación y se obtiene el  $^3\text{H}$  liberado por estímulo, luego dividido por el  $^3\text{H}$  total presente en el tejido en el momento de comenzar la estimulación, representa la liberación fraccional por estímulo (a). La radiactividad total presente en el tejido en el momento de comenzar la estimulación se determina en cada experimento sumando a la radiactividad presente en el tejido al final del experimento, la radiactividad recogida en todas las muestras desde ese período de estimulación hasta el final de la colección de muestras.

La liberación fraccional por estímulo (a) se calcula en la siguiente forma:

$$\text{liberación fracc/} \quad \Sigma \left[ \frac{\text{nCi liberado/muestra} - \text{nCi liberados espont./muestra}}{\text{nCi}_{\text{tej}} \text{ antes del estímulo}} \right]$$

$$\text{estímulo} \quad = \quad \frac{\quad}{\text{N}^\circ \text{ de estímulos}}$$

en donde: la  $\Sigma$  indica todas las muestras que tienen mayor número de cuentas que el promedio de las tres muestras inmediatas anteriores a la del estímulo. Los nCi liberados/muestra son los nCi totales de cada muestra.

B) Preparación aislada de nervio preganglionar-ganglio cervical superior del gato

Una vez anestesiados los animales, se les extrae ambos ganglios junto con 5 cm de nervio simpático cervical (pregangliónico) y alrededor de 0.5 cm de nervio carotídeo (postgangliónico). Los ganglios con sus nervios se colocan en una cápsula de Petri con solución de Krebs de la composición ya mencionada burbujeada con la mezcla de  $O_2$  y  $CO_2$  y se los diseca de tejidos adheridos.

Cada ganglio, junto con un cm de nervio pregangliónico, se coloca en un baño de órgano aislado de 5 ml. El nervio postgangliónico se corta cerca del cuerpo del ganglio. El nervio pregangliónico simpático se pasa a través de electrodos bipolares de platino para la estimulación con pulsos de onda cuadrada de 2 milisegundos de duración. La temperatura del baño se mantiene a  $37^\circ C$  siempre burbujeado.

Las estimulaciones pregangliónicas se realizaron a una frecuencia de 20 Hz y a un voltaje supramáximo de 80 V estimulando, como para la membrana nictitante, 30 segundos de cada minuto durante 1 hora. Ambos ganglios se montan en la misma forma, uno se estimula y el otro no.

Terminada la estimulación se desmonta rápidamente la preparación, se corta el nervio, y el ganglio se introduce en el tubo de incubación para determinar actividad de TH.

La medición de la actividad de TH y el cálculo posterior se realiza en igual forma que para la membrana nictitante.

C) Determinación de la NA endógena de las membranas estimuladas y no estimu-  
ladas

Para la determinación de la NA endógena, se desmontan las membranas, es

timuladas y no estimuladas en igual forma que para la medición de TH, se secan sobre papel de filtro, se pesan y homogenizan en 5 ml de ácido perclórico 0.4 N que contiene 1 mg/ml de EDTA Na<sub>2</sub> y 1,25 mg/ml de sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). El homogenato se deja extrayendo 24 horas y luego se centrifuga a 3000 x g durante 10 min. El sobrenadante se lleva a pH 8.2 mediante el agregado de solución buffer de Tris 0.5 M (pH 10) y una alícuota de 3 ml se pasa a través de una columna que contiene 200 mg de alúmina activada (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ajustada a pH 8.2 con la solución buffer de Tris 0.5 M, pH 8.2. Luego de pasada la muestra, la columna de alúmina se lava primero 3 veces con 1 ml de agua destilada y luego se eluye la NA mediante el pasaje de 3 ml de ácido acético 0.2 N. Simultáneamente se preparan patrones internos y externos con cantidades conocidas de NA. Los primeros se pasan por columna de alúmina en iguales condiciones que el tejido, y los segundos se preparan igual que el eluido, es decir en 3 ml de ácido acético 0.2 N.

La determinación de NA endógena se realiza por el método del trihidroxiindol descrito por Laverty y Taylor (1968) sobre 1 ml de la fracción de ácido acético 0.2 N y se basa en la propiedad de emitir fluorescencia que tienen los compuestos trihidroxiindólicos derivados de las catecolaminas.

Las muestras se llevan a pH final de 6.2 - 6.6 mediante el agregado de 200 ul de una solución de fosfato trisódico (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0.5 M, pH 12.8.

La oxidación de la NA se realiza mediante el agregado de 50 ul de una solución que contiene 5 mg/ml de I<sub>2</sub> y 55 mg/ml de NaI. El tiempo de oxidación es de 3 minutos.

La tautomerización de los productos formados se realiza mediante el agre

gado de 500 ul de una solución de 2.4 N de NaOH que contiene 12.5 mg/ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y 10 mg/ml de  $\text{EDTA Na}_2$ , inmediatamente de cumplidos los 3 minutos de oxidación.

Cinco minutos después de la alcalinización se acidifican las muestras con 200 ul de ácido acético glacial con lo que se obtiene un incremento y estabilización del fluoróforo formado.

Las lecturas se realizan en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman a 380 nm de excitación - 480 nm de emisión, entre los 20 y 40 minutos posteriores a la oxidación.

Los blancos correspondientes a las muestras y los blancos de reactivos se hacen invirtiendo el orden de agregado de los reactivos, es decir, la solución iodo-iodurada se agrega después del ácido acético glacial.

De la relación entre las soluciones patrones internas y externas, se calcula la recuperación para cada una de las determinaciones realizadas, siendo ésta superior al 80 %.

El contenido de NA de las muestras se calcula en base a la curva obtenida con los patrones internos. El método permite calcular con precisión cantidades de NA de hasta 1.5 ng/ml. Para expresar los resultados, las lecturas de fluorescencia de la NA de las muestras (F) se multiplican por un factor (f) cuyo cálculo considera la alícuota de muestra y la relación (r) entre unidades fluorométricas y ng de NA determinada por medio de las muestras patrón. Finalmente se divide por el peso del tejido. El contenido de NA tisular queda así expresado en ug de NA por g de tejido.

$$\text{NA (ug/g)} = \frac{F \cdot f}{P_{\text{tej}}}$$

$$\text{donde: } f = r \text{ (ng)} \frac{5 \text{ ml}}{3 \text{ ml}} \text{ y } P_{\text{tej}} = \text{peso del tej (mg)}$$

### Reserpinización de los animales

Cuando se estimulan tejidos reserpinizados, estos provienen de animales a los cuales se les inyectó una dosis de 0.3 mg/kg s.c. de reserpina solubilizada en ácido ascórbico (200 mg/ml), 24 horas antes. Esta dosis depleciona completamente los depósitos de NA.

### Cálculos estadísticos

A los datos de actividad de TH en el período posterior a la estimulación nerviosa se les aplicó el test de t para datos pareados. La comparación de actividad de TH y liberación fraccional/estímulo se realizó por análisis de regresión (Snedecor y Cochran, 1967).

### Drogas utilizadas

Fueron utilizadas las siguientes drogas: fenoxibenzamina (Smith Kline and French Labs., Philadelphia); clorhidrato de papaverina (Sigma); clorhidrato de fentolamina y reserpina (Ciba Lab.); clorhidrato de clonidina (Boehringer Sohn); clorhidrato de pargilina (Abbott U.S.A.); clorhidrato de cocaína (Lab. Verardo y Cia.); clorhidrato de (+) propranolol (Imperial Chem. Ind. Lim.);

clorhidrato de (-)-isoproterenol (Sterling-Winthrop Research Institute); tartrato de metoprolol (Hässle, Goteborg); Ro 4-1284 (Hoffman La Roche Lab.); dl-noradrenalina-7-<sup>3</sup>H (6,9 Ci/mmol); L-tirosina-1-<sup>14</sup>C (52 uCi/umol) y solubilizador NCS (Nuclear Chicago Corporation, U.S.A.).

X- Resultados

A- Dependencia de la activación de la TH en el período de postestimulación, parámetros y programas de estimulación

1. Intermittencia de la estimulación:

Ya hemos dicho que se observó en otras preparaciones (conducto deferente-nervio hipogástrico, tanto de rata como de cobayo) que la estimulación con tinua no puede realizarse por tiempos prolongados sin que el músculo comience rápidamente a declinar sus respuestas y en algunos casos ésta desaparece por variados períodos durante la estimulación. Se sabe además que, si la estimulación es ininterrumpida, no se observa activación de la TH durante el período de postestimulación. Por lo tanto, esta estimulación prolongada puede lle v arse a cabo siempre que se realice en forma intermitente, es decir, con períodos de estimulación y períodos de reposo alternadamente. Así fue como determinamos, en experimentos previos, que en nuestra preparación las mayores respuestas musculares, es decir más sostenidas en el curso del tiempo, las ob ten í amos cuando estimulábamos 30 segundos de cada minuto, dejando descansar la preparación durante los siguientes 30 segundos. Obtuvimos también con este programa de estimulación, los mayores valores de activación de la TH y además, más importante, los valores más reproducibles. Los parámetros de estimulación para estas pruebas fueron los corrientes en nuestro laboratorio para esta pre pa ra ción (70-80 V; 0.5 milisegundos de duración, 10 Hz).

Weiner y Rabadjija (1968 b) ya habían demostrado en la preparación conducto deferente-nervio hipogástrico de cobayo, que tanto los parámetros de estimulación como el programa de la misma eran críticos. Ellos medían actividad de TH durante el período de estimulación con un programa de estímulos de 5 segundos por minuto. Cuando la duración del período de estimulación la incrementaron de 5 a 30 segundos por min, observaron un incremento significativo en la velocidad de síntesis de NA. Pero paralelamente a éste hubo una rápida disminución de las respuestas contráctiles del tejido. Estimulando continuamente durante la hora, la velocidad de síntesis fue menor que con 30 seg/min y aproximadamente igual a la de 5 seg/min y luego de la contracción inicial, las respuestas contráctiles del tejido fueron infrecuentes y débiles.

Estos autores realizaron también algunas determinaciones de actividad de TH en el período posterior a la estimulación de 1 hora para examinar si la síntesis acelerada de NA persistía en este período. En sus condiciones de estimulación de 5 seg/min, la velocidad de síntesis no aumentaba en el período de postestimulación, pero sí lo observaron estimulando 30 seg/min. Estimulando continuamente durante toda la hora, no pudieron demostrar ningún incremento.

De estos resultados y de nuestras observaciones podemos concluir que aunque los tejidos son diferentes, ambos responden en forma máxima con el mismo plan de estimulaciones intermitentes, al menos en el período inmediato posterior a la estimulación que es el único estudiado por nosotros.

## 2. Parámetros de la estimulación:

a) Voltaje: en nuestra preparación, como ya dijimos, las estimulacio-

nes se llevaron a cabo siempre a voltaje supramáximo, es decir una intensidad de voltaje en la que un período de estímulos de 10 Hz de frecuencia durante 10 segundos provoca la mayor respuesta del músculo. Este voltaje está siempre entre 70-80 V.

En la preparación de Weiner y Rabadjija (1968 b) (conducto deferente-ner<sub>v</sub>io hipogástrico de cobayo), la intensidad en sus condiciones de estimulación fue inicialmente 5 V, cuando aumentaron cinco veces esta intensidad, observaron un pequeño incremento con respecto a 5 V que no fue estadísticamente significativo. Posteriormente, trabajaron a voltaje supramáximo, 8-10 V (Weiner y col. 1978).

Nosotros no investigamos las posibles variaciones en la actividad de la enzima por variación del voltaje aplicado a la misma durante la estimulación; todos los estudios realizados en nuestro laboratorio con la membrana nictitante de gato, coinciden en que los mejores resultados y más reproducibles se obtienen a voltaje supramáximo.

b) <sup>^</sup> Duración del impulso: Los experimentos los realizamos con duración de cada pulso de 0.5 milisegundos ya que doblando la duración de cada uno, no se obtuvieron incrementos significativos en la velocidad de síntesis de NA.

c) Frecuencia: Una vez determinado que la intermitencia de estimulación debía ser de 30 segundos, el voltaje supramáximo y la duración de cada estímulo de 0.5 milisegundos, era necesario saber a qué frecuencia de estimulación se obtendría la mayor activación de la enzima y con valores reproducibles. Para ello determinamos la actividad de TH estimulando a distintas frecuencias

desde 0.25 estímulos/segundo (0.25 Hz) hasta 40 Hz durante 1 hora. Los otros parámetros y el programa de estimulación fueron los ya fijados. Con los datos obtenidos construimos el gráfico de la Fig. N° 12. Allí representamos en

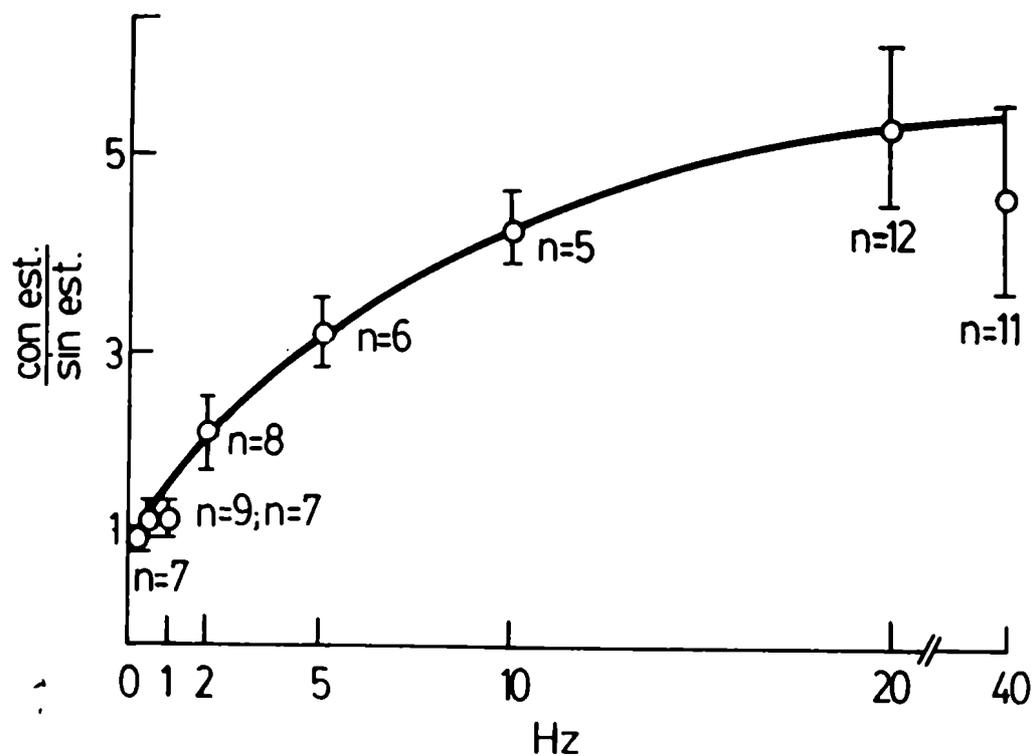


Fig. 12. Activación de la TH en el período posterior a la estimulación nerviosa en función de la frecuencia de estimulación.

abscisas, la frecuencia de estimulación y en ordenadas, la relación entre la

actividad de TH en membranas estimuladas y membranas sin estimular (con est/sin est). Como hemos dicho, cada punto representa la media  $\pm$  el error standard de los datos pareados. En el gráfico se observa que la activación de la enzima aumenta con la frecuencia de estimulación hasta llegar a un máximo a los 20 Hz aproximadamente. A la frecuencia superior que se probó de 40 Hz, la actividad no aumenta sino que disminuye aunque no significativamente. No se probaron frecuencias intermedias entre 20 y 40 Hz. Adoptamos la frecuencia de 20 Hz para todos los experimentos generales.

Para este parámetro, Weiner y Rabadjija (1968 b), observaron un aumento en la formación de NA cuando doblaban la frecuencia de estimulación, de 25 a 50 Hz pero la variabilidad de las respuestas fue más grande que las observadas a frecuencias menores y la diferencia que observaron no fueron estadísticamente significativas.

### 3. Tiempo de estimulación:

Si bien todos los experimentos que realizamos para encontrar los mejores parámetros y la mejor intermitencia de la estimulación, los realizamos estimulando la preparación durante 1 hora porque este período fue el elegido inicialmente por los investigadores que estudiaron este fenómeno, quisimos saber si en nuestra preparación y en el período de postestimulación los mejores resultados se obtenían estimulando 1 hora. Para ello estimulamos las preparaciones en las mismas condiciones (0.5 msec., 70-80 V, 20 Hz, 30 seg/min) durante períodos de tiempo diferentes, 6, 15, 30 y 60 minutos. En la Fig. N° 13, se representan los resultados obtenidos. A los 6 minutos de la estimulación in-

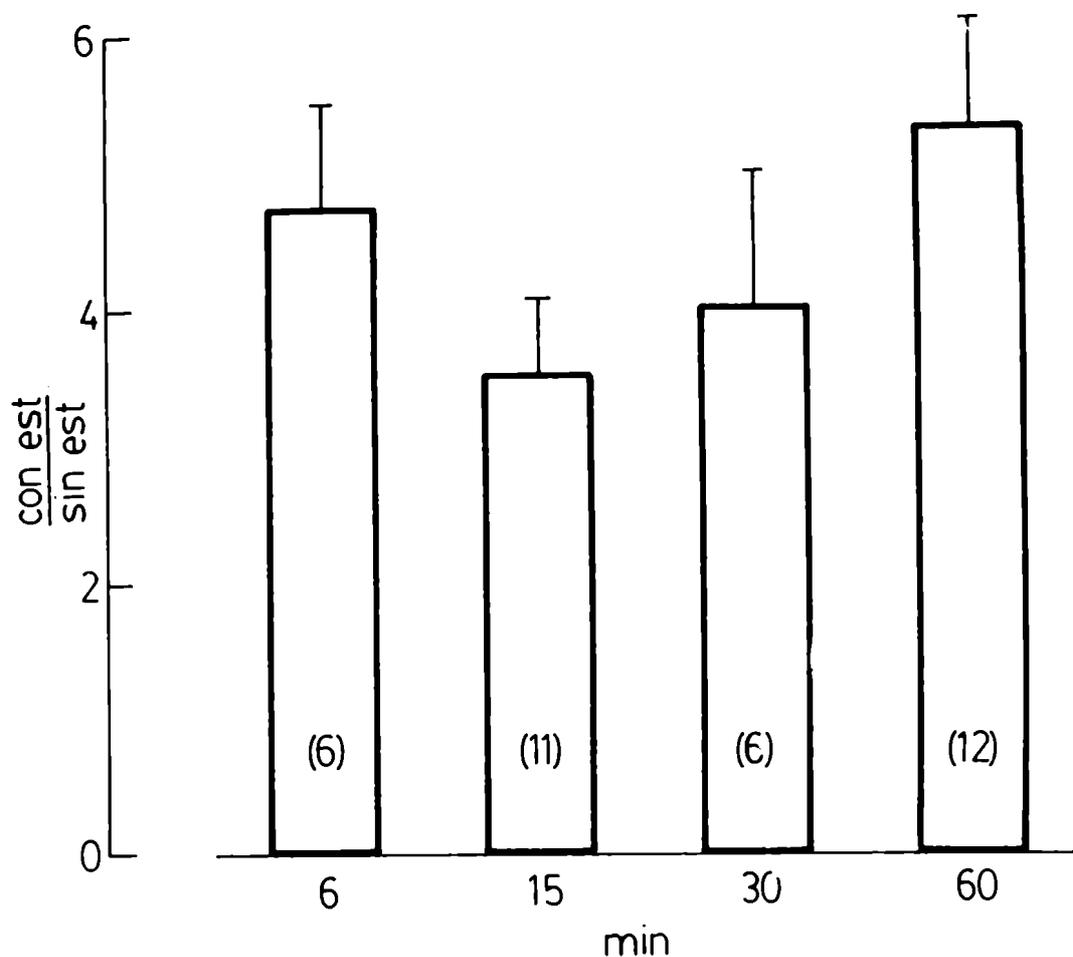


Fig. 13. Activación de la TH en el período posterior a la estimulación nerviosa realizada a 20 Hz, durante distintos tiempos.

termite la activación de la enzima en el período de postestimulación no muestra diferencia significativa con los tejidos estimulados durante 15, 30 ó 60 minutos, aunque a partir de los 15 minutos de estimulación parecería que

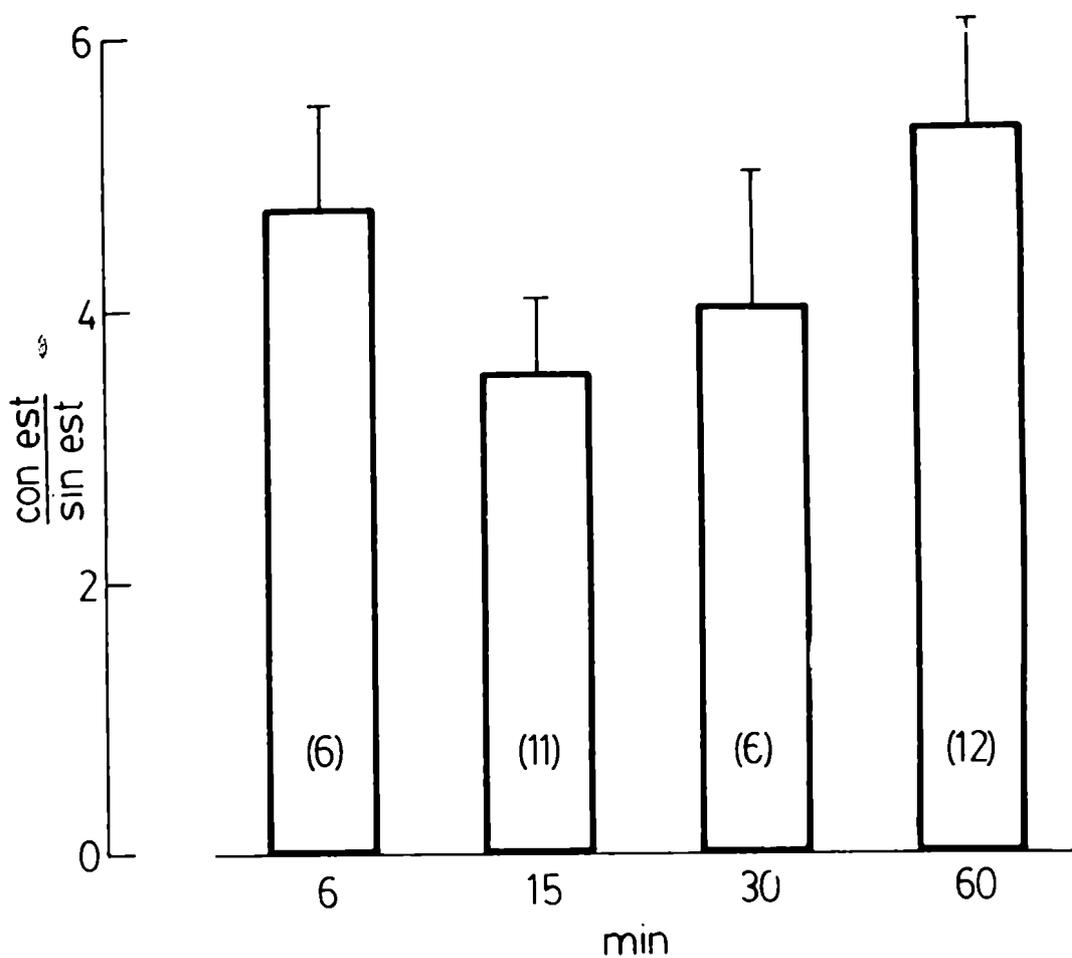


Fig. 13. Activación de la TH en el período posterior a la estimulación nerviosa realizada a 20 Hz, durante distintos tiempos.

termite la activación de la enzima en el período de postestimulación no muestra diferencia significativa con los tejidos estimulados durante 15, 30 ó 60 minutos, aunque a partir de los 15 minutos de estimulación parecería que

hay un pequeño y sostenido incremento. Por esta tendencia hacia un mayor incremento con el tiempo de estimulación, es que elegimos estimular durante 1 hora todas las preparaciones.

En la Fig. N° 14, se observa un trazado tipo de la respuesta contráctil del músculo liso obtenido durante la hora de estimulación intermitente. Cada trazo creciente refleja la contracción de la membrana, que es rápida y se mantiene en el punto máximo hasta que cesan los 30 segundos de estimulación. Cuando esto ocurre se relaja rápidamente, trazo decreciente. La estimulación en condiciones control, sin el agregado de drogas y sin tratamiento previo del animal, no deteriora la preparación durante toda la hora de estimulación.

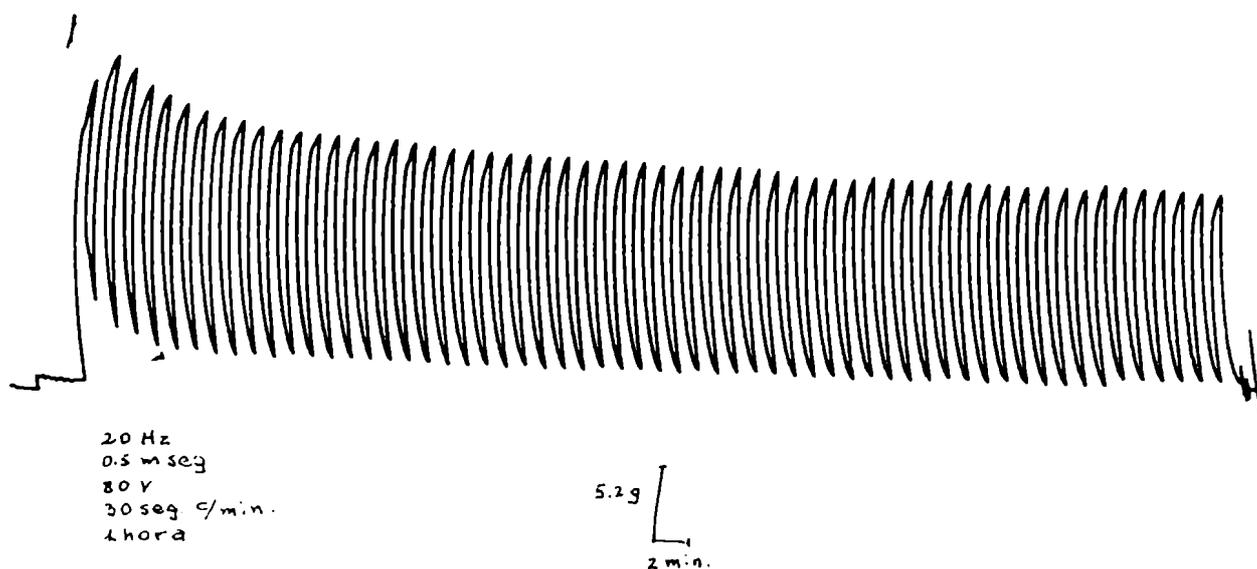


Fig. 14. Trazado del polígrafo durante la hora de estimulación intermitente de una membrana nictitante normal.

## 4. Número total de estímulos:

En el punto 2 c, dijimos que el aumento de la velocidad de síntesis del neurotransmisor es dependiente de la frecuencia de estimulación, llegando a un máximo alrededor de los 20 Hz. En estos experimentos el número total de estí-

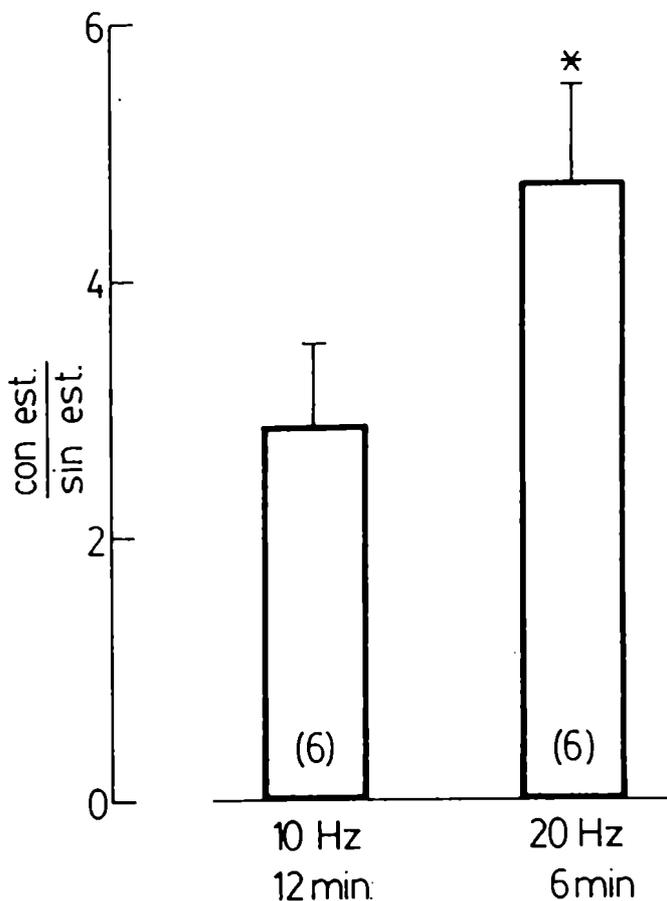


Fig. 15. Activación de la TH en el período posterior a la estimulación nerviosa por el mismo número de estímulos a dos frecuencias diferentes.

mulos fue diferente, ya que el tiempo de estimulación fue el mismo (1 hora). Por lo tanto, quisimos comprobar que era la frecuencia de estimulación y no el número total de estímulos el que determinaba el valor del incremento de la activación. Para ello estimulamos a diferente frecuencia durante distintos períodos de tiempo, de manera de aplicar un número igual de pulsos en distintas preparaciones. Que el aumento depende de la frecuencia y no del número total de impulsos, lo vemos en la Fig. N° 15. El aumento de síntesis es casi el doble a 20 Hz que a 10 Hz para un total de 3600 impulsos (debemos recordar que estimulamos 30 segundos de cada minuto).

B- VARIABLES RELACIONADAS CON LA ESTIMULACIÓN REALIZADA EN LAS CONDICIONES ESTABLECIDAS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Extinción del fenómeno de activación:

Dijimos en un párrafo anterior, que el fenómeno de incremento de actividad de la TH en el período posterior a la estimulación eléctrica intermitente, es un fenómeno de rápida instalación; bastan 6 minutos de estimulación para observar un incremento de casi 5 veces el basal midiendo la actividad inmediatamente. Quisimos saber en qué forma desaparecía o se extinguía el fenómeno, midiendo para ello la actividad a distintos tiempos después de terminada la estimulación. Los resultados los vemos en la Fig. N° 16. Observamos que es un fenómeno que se extingue en forma lenta en función del tiempo, 1 hora después de concluida la estimulación todavía es posible medir diferencias en la actividad de la enzima entre el tejido estimulado y el no estimulado.

2. Cuerpo neuronal - Terminales nerviosos

Habiendo encontrado una gran diferencia en la activación de la TH en el período de postestimulación en nuestra preparación (5 veces el valor del control no estimulado), con respecto a la activación encontrada por Weiner y Rabdjija (1968 b) en su preparación de conducto deferente-nervio hipogástrico, también en el período de postestimulación (1.6 veces el control), quisimos sa-

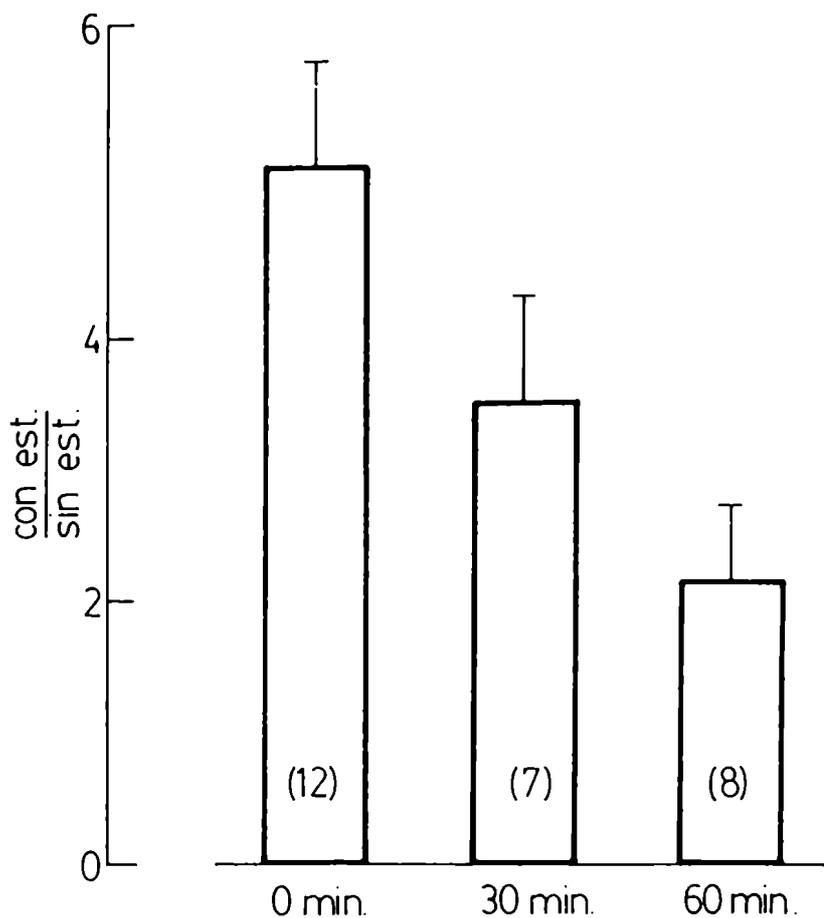


Fig. 16. Extinción del fenómeno de activación de la TH.

ber si esa gran diferencia podría provenir sólo de las diferencias entre tejidos o especies o si se debía a diferentes formas de dosaje o estimulación.

Si analizamos las condiciones de estimulación del conducto deferente (5 milisegundos, 5 voltios, 25 Hz, 30 segundos/min, 60 minutos), las diferencias no son muy marcadas con nuestros parámetros, y no justifican la gran diferencia con nuestros resultados.

En cuanto a la forma de determinar la NA formada, sí hay diferencia de métodos; ellos determinan NA-<sup>3</sup>H formada a partir de tirosina 3,5-<sup>3</sup>H en el tejido y en el baño de incubación que se formó durante 1 hora, en el período postestímulo. En la membrana nictitante medimos <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> formado a partir de tirosina-<sup>14</sup>C durante 20 minutos en el período posterior a la estimulación.

Si bien no hemos tratado de reproducir los resultados variando los parámetros de estimulación, no pensamos que sea esto el motivo que justifique la gran diferencia. Hemos pensado más bien, que ésta se deba a diferencias anatómicas de la preparación o a la forma de dosaje de actividad de la enzima.

Los terminales nerviosos que inervan el conducto deferente provienen de fibras postganglionares muy cortas, de forma tal que los ganglios (cuerpos neuronales) están situados casi sobre el conducto deferente. Esta disposición determina que al medir la TH en la preparación, se esté midiendo la actividad de los terminales juntamente con la actividad en el cuerpo neuronal y que cuando se estimula se estimulen también los ganglios.

En nuestra preparación, los terminales nerviosos que inervan la membrana nictitante están lejos de su cuerpo celular (ganglio cervical superior, GCS), de manera que cuando medimos la actividad de la enzima lo hacemos sólo en los terminales; la estimulación ya dijimos, es postganglionar.

Para poder discriminar entre esta posibilidad y la posibilidad de que las diferencias se debieran a la medición de la actividad, estudiamos qué ocurría con la actividad de la TH del GCS cuando se sometía al mismo plan de estimulación de las membranas. La relación tejido estimulado/sin estimular (con est/sin est), para ambas preparaciones, figura en la Tabla N° 1.

	G.C.S.	n	Memb. nictitante	n
Actividad basal (nC/org. x 20 min)	1.10 $\pm$ 0.14	4	0.10 $\pm$ 0.09	12
Act. postestímulo (nC/org. x 20 min)	0.94 $\pm$ 0.12	4	0.48 $\pm$ 0.09	12
Relación con est/sin est	0.86 $\pm$ 0.05	4	5.30 $\pm$ 0.83	12

Tabla 1. Actividad basal y postestímulo del ganglio cervical superior y membrana nictitante (20 Hz, 1 hora) y la relación con est/sin est con datos pareados.

Como se deduce de los datos, el aumento en la actividad de TH por estímulo nervioso no se observa en estas condiciones experimentales a nivel del cuerpo neuronal, observándose una ligera disminución con respecto al control, fenómeno éste que no fue estudiado.

Sin embargo, esta gran diferencia de respuesta ante el estímulo eléctrico entre terminales nerviosos y cuerpo neuronal, no son comparables con los valores absolutos de actividad de la enzima, que son 10 veces más altos en el cuerpo celular que en los terminales en condiciones basales como observamos en la misma Tabla N° 1. Esto es lógico porque refleja la mayor cantidad de enzima existente en el cuerpo neuronal con respecto a los terminales.

### 3. NA endógena después de la estimulación:

Como en los experimentos en condiciones normales, la estimulación la realizamos a 20 Hz, frecuencia que no es fisiológica; quisimos saber si se producía depleción en los niveles endógenos de NA. Para ello realizamos la estimulación en las mismas condiciones control, es decir una membrana se estimula y la otra queda sin estimular para conocer los valores basales. Al final de la estimulación las membranas se desmontan en la misma forma que para dosar TH, se pesan y se homogenizan en ácido perclórico 0.4 M para dosar NA por el método de Laverty y Taylor (1968). Los promedios de los pesos de las membranas y de la NA endógena para tejidos control y estimulados están en la Tabla N° 2. No existen diferencias significativas entre ambos grupos, es decir que la síntesis acelerada es suficiente para mantener los niveles en los valores basales normales.

	Sin estimular	n	Con est.(20 Hz 1 h)	n
Peso (mg)	39.4 ± 2.0	8	39.4 ± 3.1	8
NA endógena (ug/g)	7.0 ± 1.0	8	7.2 ± 0.9	8

Tabla 2. Promedios individuales de peso y contenido de NA endógena de las membranas sin estimular y membranas estimuladas durante 1 hora a 20 Hz.

4. Presencia de Ca<sup>++</sup> en el medio:

Estudiamos a continuación el requerimiento de Ca<sup>++</sup> en el medio de incubación

ción tanto durante la estimulación como durante la medición de la actividad de TH en el período de postestimulación. Para ello diseñamos dos grupos experimentales: uno donde la estimulación se realizó en  $\text{Ca}^{++}$  normal y el dosaje en bajo  $\text{Ca}^{++}$ , y el otro donde la estimulación y el dosaje se llevaron a cabo en bajo  $\text{Ca}^{++}$ . Llamamos bajo  $\text{Ca}^{++}$  a una concentración 0.26 mM, es decir la décima parte del Krebs Ringer normal que es 2,6 mM.

Los resultados los vemos en la Fig. N° 17, donde hemos representado también el valor control, es decir la relación (con est/sin est) para membranas estimuladas (70-80 V, 0.5 msec., 20 Hz, 30 seg/min, 1 hora) en  $\text{Ca}^{++}$  normal y hecho el dosaje también en  $\text{Ca}^{++}$  normal.

Los valores muestran que la enzima estimulada y dosada en bajo  $\text{Ca}^{++}$  da aparentemente un incremento menor en la activación que la enzima estimulada en bajo  $\text{Ca}^{++}$  y dosada en  $\text{Ca}^{++}$  normal. Decimos aparentemente menor porque el análisis estadístico de los resultados nos indica que si bien la diferencia es significativa con respecto a la enzima solo dosada en  $\text{Ca}^{++}$  normal (comparar B con C), no es significativa con respecto al valor control, membranas estimuladas y dosada la enzima en  $\text{Ca}^{++}$  normal (comparar B con A).

##### 5. Justificación de la expresión de los resultados en forma pareada:

Hemos dicho en la parte experimental que todos los resultados son expresados como el promedio de las relaciones entre ambas membranas de un mismo animal (datos pareados), en las que en general se estimula una de ellas y la otra actúa como control sin estimular. Aún en resultados donde no se estimula ninguna

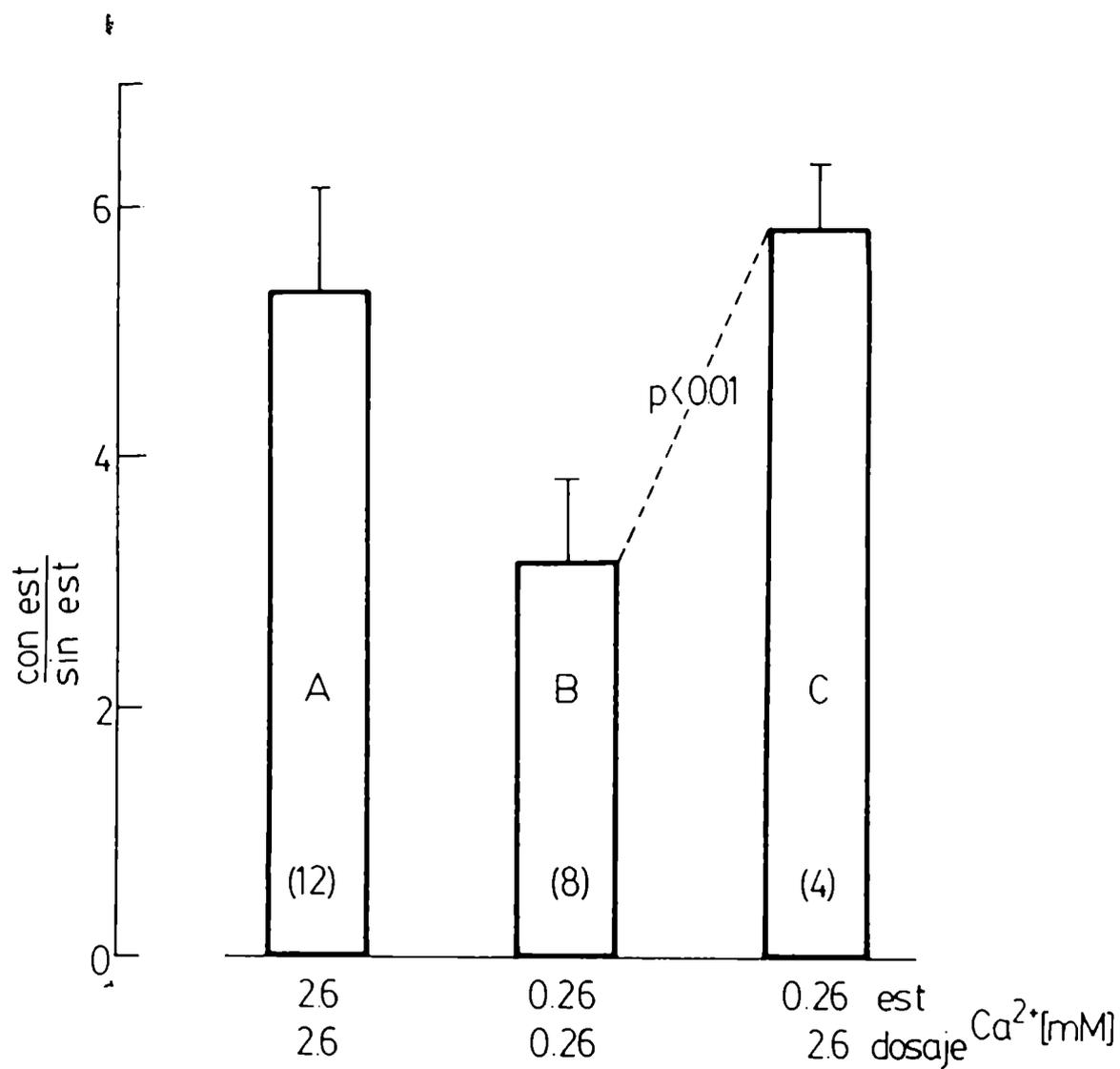


Fig. 17. Activación de la TH en el período posterior a la estimulación nerviosa en concentración de Ca<sup>++</sup> normal y bajo, durante la estimulación y el dosaje.

de las dos membranas o se estimulan ambas pero una de ellas en presencia de una droga, también los resultados se expresan como promedio de los datos pareados.

Esta expresión de los resultados se justifica por la gran diferencia que hay tanto en la actividad basal de la enzima como en la activación de la misma producida por el estímulo nervioso, entre animales. En la Tabla N° 3, se muestran resultados de actividad absoluta de cada par de membranas de estos grupos experimentales para poder apreciar las diferencias entre animales. Debido a esta dispersión tan grande de los datos, se hacen pequeñas las diferencias entre membranas estimuladas y no estimuladas para un mismo grupo experimental si los datos no son pareados.

Condición Experimental	Relación $\frac{m_2}{m_1}$	Valores individuales de $m_1$ y $m_2$ (nCi/org. 20 min)		
Basal	0.98 $\pm$ 0.25 (n = 5)	0.050	0.032	0.145
		0.062	0.037	0.093
Est. a 2-Hz	1.21 $\pm$ 0.28 (n = 8)	0.480	0.185	0.287
		0.462	0.189	0.256
Est. a 5 Hz	1.16 $\pm$ 0.20 (n = 4)	0.954	0.182	0.254
		0.823	0.200	0.300

Tabla 3. Valores absolutos y relación de la actividad de TH en pares de membranas sometidas ambas a las mismas condiciones de estimulación o de reposo durante 1 hora.  $m_1$ , órgano montado a la izquierda del experimentador,  $m_2$ , el contralateral.

Pero esta dispersión entre animales, no existe entre ambas membranas de un mismo animal. Tanto en condiciones de no estimulación como después de la estimulación de ambas membranas, la relación es prácticamente 1. En la misma Tabla N° 3, se muestran los valores promedio de las relaciones entre ambas membranas de un mismo animal sujetas a distintas condiciones de estimulación o en reposo. Como vemos, el promedio de las relaciones es siempre cercano a 1.

‡

§

C.- Modulación del incremento de actividad de la TH posterior al estímulo nervioso, por los niveles citoplasmáticos de noradrenalina. Acción de drogas que modifican estos niveles

Ya hemos dicho que las catecolaminas y otros catecoles son capaces de inhibir la actividad de la TH y que esta inhibición es competitiva entre la catecolamina y la pteridina por la forma oxidada de la enzima. El hallazgo, que la síntesis podía ser inhibida por el producto final, fue de suma importancia para el estudio de la regulación de la síntesis de NA. Weiner y Rabadjija (1968 a) observaron que el efecto de la estimulación sobre la síntesis de NA podía ser reducido o bloqueado adicionando catecolaminas al medio; de este hecho concluyeron que el aumento de síntesis por estímulo nervioso se debía a la reducción de la inhibición por producto final y propusieron que una pequeña cantidad o depósito de NA en solución en el axoplasma de la neurona adrenérgica, regularía la actividad de la TH. Durante la estimulación esta pequeña cantidad disminuiría reduciendo la inhibición y aumentando la síntesis.

A continuación, los experimentos llevados a cabo para conocer cómo influyen los niveles de NA sobre la actividad basal y la activación postestímulo nervioso de la enzima.

l.c. Depleción de los depósitos de NA. Acción de la reserpina

Para deplecionar los depósitos endógenos de NA se les administró a los

animales 0,3 mg/kg de reserpina, subcutánea, 24 horas antes. En esta serie de experimentos se midió la actividad de la enzima después de la estimulación en condiciones normales durante 1 hora (70-80 V, 0.5 mseg, 20 Hz, 30 seg/min). Se muestra en la Fig. N° 18, el trazado del polígrafo obtenido durante la hora

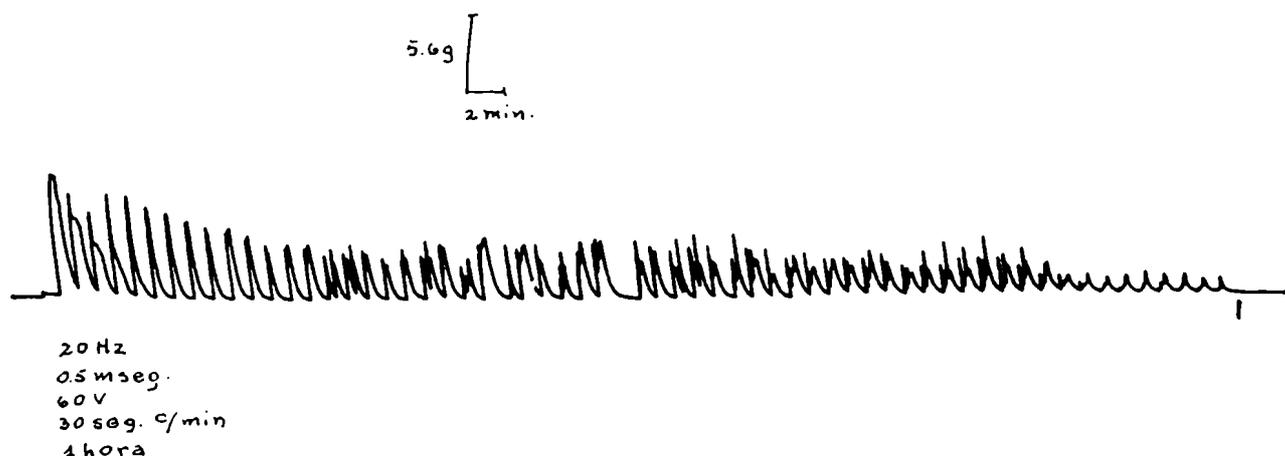


Fig. 18. Trazado del polígrafo durante la hora de estimulación intermitente de una membrana de animal reserpinizado.

de estimulación intermitente de una membrana nictitante proveniente de un animal reserpinizado. Como se puede observar, la respuesta contráctil es pobre y va declinando marcadamente. En la Fig. N° 19, se muestra que la reserpini-zación impide que se obtenga el aumento de actividad por estimulación, el incremento es casi nulo, ya que la relación es cercana a 1, valor que corresponde a pares de membranas en iguales condiciones experimentales. Para comparar

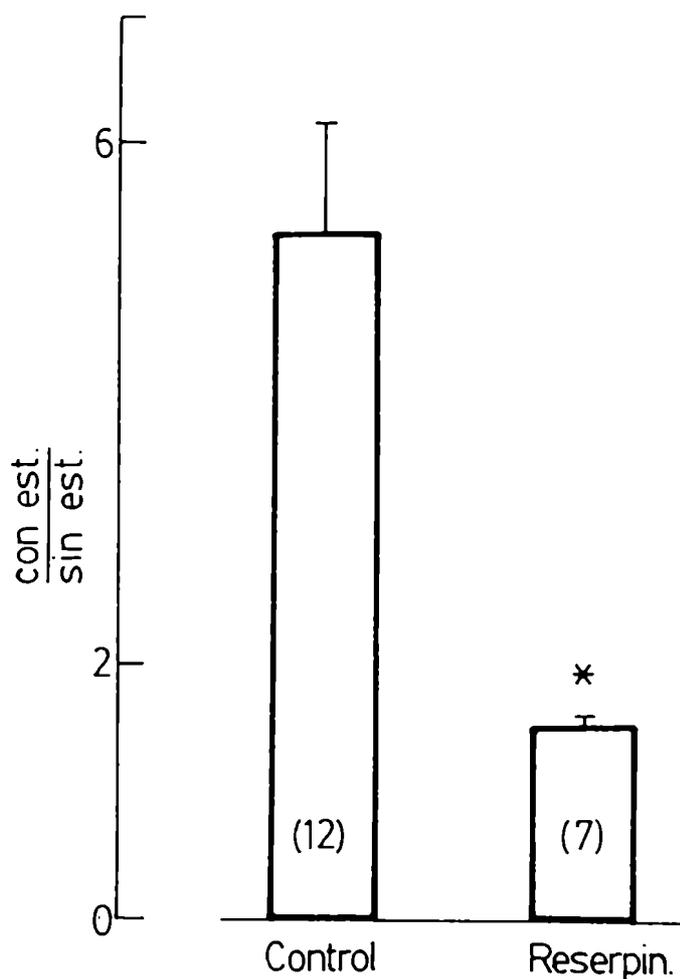


Fig. 19. Ausencia de activación de la TH por estímulo nervioso en membranas de animales reserpinizados (20 Hz, 1 hora).

se indica el valor ya visto de membranas normales en las mismas condiciones de estimulación.

Si bien no obtuvimos aumento de actividad de la enzima después de la estimulación nerviosa, debemos destacar que los valores basales de la actividad de la misma, se encuentran muy por arriba de los hallados en las mismas

condiciones en membranas normales. Como en estos experimentos (animales reserpinizados) no se pueden comparar datos pareados, hemos calculado por un lado, el promedio de la actividad basal de todas las membranas normales sin agregado de drogas, y por el otro, el de las membranas reserpinizadas en las mismas condiciones. Los valores obtenidos son los siguientes:

Membranas normales	Membranas reserpinizadas
$0.060 \pm 0.004$ nCi/memb.20 min	$0.241 \pm 0.024$ nCi/memb.20 min
n = 80	n = 20

$p < 0.001$

lo cual indica que las membranas provenientes de animales reserpinizados, ya tienen un valor basal de actividad de la enzima alrededor de 4 veces superior a las provenientes de animales normales.

#### 2.c. Acción del Ro 4-1284

Esta es una droga de tipo reserpínico que provoca la salida del neurotransmisor de los terminales nerviosos. La NA que sale de los gránulos de almacenamiento, pasa por el citoplasma antes de dejar el terminal; esto hace que aumente el nivel citoplasmático de la misma o de alguno de sus metabolitos, y por lo tanto, se inhiba la TH. En la Fig. N° 20, se han representado los valores de actividad de TH obtenidos en condiciones de no estimulación en pares de membranas incubadas durante 1 hora (en presencia y en ausencia de Ro 4-1284)<sup>§</sup>, lavadas durante 5 minutos con Krebs normal y determinada la acti-

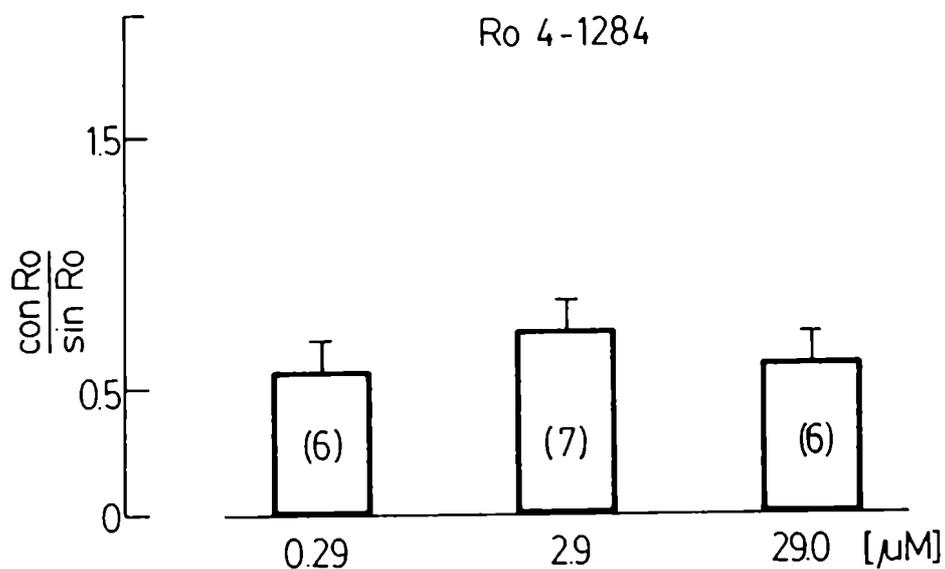


Fig. 20. Inhibición de la TH por incubación en presencia de Ro 4-1284.

vidad de la enzima inmediatamente. Se han utilizado tres concentraciones del agente: 0.29, 2.9 y 29  $\times 10^{-6}$  M. La actividad basal de la enzima disminuye aproximadamente a la mitad si el tejido es previamente incubado "in vitro" con la droga. El Ro 4-1284 en concentración de  $0.29 \times 10^{-6}$  M en el baño ya produce el efecto máximo, porque no hay diferencia significativa con mayores concentraciones.

Como era de esperar, esta inhibición por Ro 4-1284 desaparece si los tejidos provienen de animales previamente reserpinizados. En la Fig. N° 21, se ve la falta de efecto de la droga. La relación de la actividad de membra-

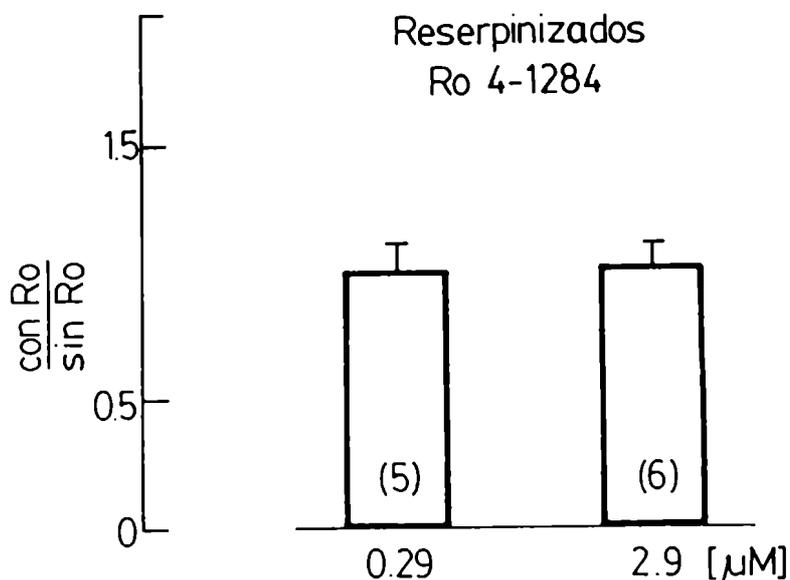


Fig. 21. Ausencia de inhibición de TH por Ro 4-1284 en membranas provenientes de animales reserpinizados.

nas incubadas con Ro 4-1284, sobre membranas incubadas en Krebs Ringer normal tienen el valor aproximado de 1. Las membranas nictitantes provenientes de gatos reserpinizados 24 horas antes con 0,3 mg/kg de reserpina, no tienen NA detectable por el método de dosaje que hemos empleado (Lavery y Taylor, 1968). Debemos destacar que los valores absolutos de actividad basal de la enzima entre las membranas incubadas con Ro 4-1284 y las incubadas sin la droga son altos, ya que provienen de tejidos reserpinizados. En la Tabla N° 4, consignamos los valores absolutos promedio de actividad correspondientes a la Fig. N° 21.

Sin Ro 4-1284 nCi/memb.20 min	Con Ro 4-1284 nCi/memb.20 min		n
0.259 ± 0.032	[0.29 x 10 <sup>-6</sup> M]	0.260 ± 0.037	5
0.316 ± 0.054	[2.9 x 10 <sup>-6</sup> M]	0.348 ± 0.055	6

Tabla 4. Actividad absoluta basal promedio de TH de membranas reserpinizadas incubadas en Krebs Ringer normal y en presencia de Ro 4-1284.

3.c.Efecto de un inhibidor de la captación neuronal de NA sobre la actividad de TH

Dentro de las drogas que inhiben la captación neuronal de la NA, elegimos la cocaína, droga que a una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M inhibe el 90 % de la captación neuronal del transmisor adrenérgico. Quisimos saber qué acción tendría sobre el incremento de actividad de TH por estimulación nerviosa el hecho de llevar a cabo ésta, en condiciones que no permiten la recaptación de la NA liberada por estímulo. En la Fig. N° 22, se muestra el valor obtenido en presencia de cocaína. Esta fue agregada al baño de órgano aislado 30 minutos antes de comenzar la estimulación, la que fue realizada a 20 Hz. Se observa que el valor es inferior a la mitad del alcanzado en condiciones control ( $1.94 \pm 0.38$  y  $5.30 \pm 0.83$ , respectivamente), es decir el hecho de no permitir la recaptación de NA hace que la actividad de la enzima no alcance los niveles que alcanza estimulando el tejido a 20 Hz en condiciones normales de me-

dio de incubación.

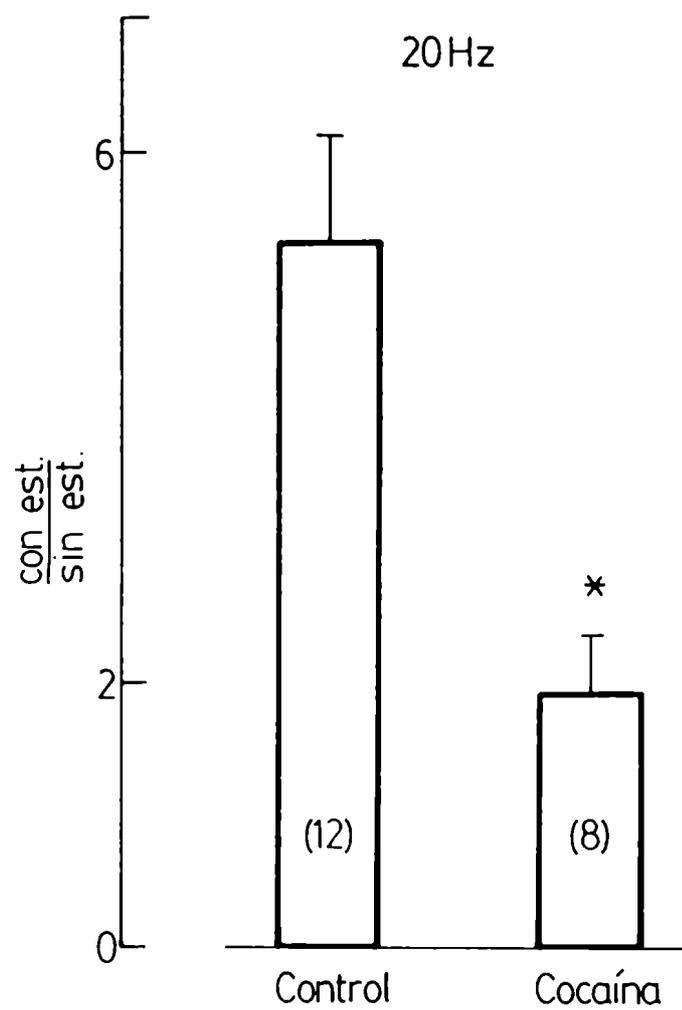


Fig. 22. Incremento de la actividad de TH por estímulo nervioso en presencia del bloqueante de la captación neuronal, cocaína.

4.c. Acción de la pargilina sobre la actividad basal

La pargilina es una droga que aumenta los niveles citoplasmáticos de NA porque inhibe a la monoaminoxidasa (MAO), enzima que metaboliza el neurotransmisor adrenérgico al glicol desaminado DOPEG. En la Tabla N° 5, se presentan los valores de actividad de la TH en condiciones de no estimulación de terminada inmediatamente después de incubadas las membranas durante 75 minutos con pargilina ( $0.5 \times 10^{-3}$  M) y lavadas durante 5 minutos con Krebs Ringer normal. Para comparar, se ha colocado el valor basal de la enzima en condiciones control, es decir incubadas sólo en Krebs Ringer. Los datos en este caso no son pareados, sino que representan el promedio  $\pm$  el error standard de los controles (sin estímulo) en ambos grupos experimentales.

Medio de incubación	n	Actividad de TH (nCi/memb.20 min)
Krebs Ringer	80	$0.060 \pm 0.004$
Krebs Ringer (Pargilina 0.5 mM)	8	$0.047 \pm 0.008$

Tabla 5. Actividad basal absoluta promedio de TH de membranas normales incubadas en Krebs Ringer normal y en presencia de pargilina  $0.5 \times 10^{-3}$  M.

Si bien los valores no son diferentes estadísticamente, ya sea por el

bajo número de determinaciones en presencia de pargilina o porque los datos no son pareados, hay una tendencia hacia valores menores en las membranas incubadas con el inhibidor de aproximadamente el 20 %.

5.c. Acción de la pargilina sobre la actividad postestimulación

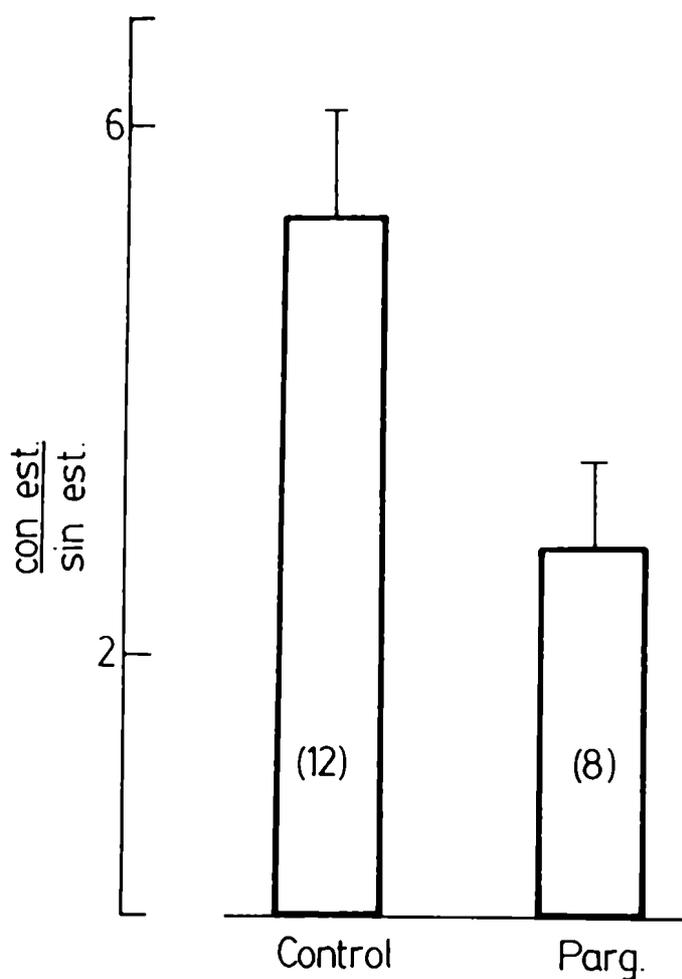


Fig. 23. Disminución de la activación de la TH por estímulo nervioso en presencia de pargilina.

Cuando la estimulación se realiza en presencia de pargilina en el medio de incubación, la relación (con est/sin est) de la TH en el período de postestimulación disminuye aproximadamente a la mitad cuando se la compara con la relación en las membranas control. Los resultados en la Fig. N° 23.

La presencia de pargilina durante la estimulación, impidió que la enzima se activara totalmente.

D- Acción de drogas que modifican la liberación de NA por estímulo nervioso

Dijimos que los agentes adrenérgicos ( $\alpha$  ó  $\beta$ ), que actúan sobre receptores postsinápticos, participan también modulando la neurotransmisión, a través de la activación de mecanismos presinápticos inhibitorios y facilitatorios durante la estimulación nerviosa. El bloqueo de los receptores adrenérgicos  $\alpha$  presinápticos y la activación de los  $\beta$  aumenta la liberación de NA. Por el contrario, la activación de los  $\alpha$  y el bloqueo de los  $\beta$  por agonistas y bloqueantes respectivamente, reduce la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso.

Vamos a ver a continuación, en nuestras condiciones experimentales, la acción que sobre la activación de la TH en el período de postestimulación, tienen los agonistas y bloqueantes tanto  $\alpha$  como  $\beta$  adrenérgicos que modifican la liberación del neurotransmisor adrenérgico cuando la estimulación de nuestra preparación se llevó a cabo en presencia de los mismos.

1.d. Acción de bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos

El bloqueo del mecanismo inhibitorio presináptico aumenta la liberación de la NA por estímulo nervioso; este aumento en la liberación del neurotransmisor debería afectar la actividad de la TH si es que ésta depende de la liberación del neurotransmisor.

Se estimuló en presencia de dos bloqueantes adrenérgicos distintos: fentolamina y fenoxibenzamina, colocados en el baño de órgano aislado 20 minu

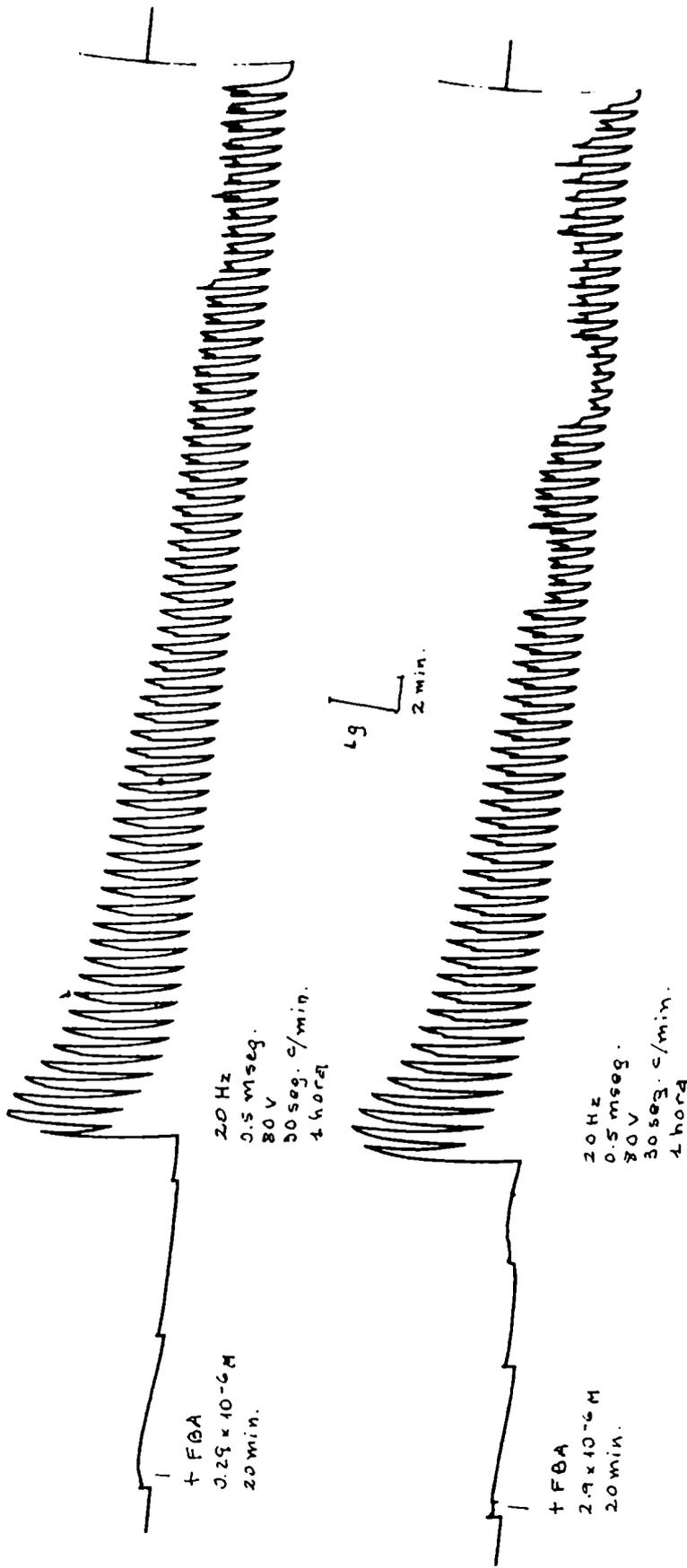
tos antes de comenzar la estimulación, tanto en el baño del tejido que se va a estimular como en el que va a servir de basal, sin estímulo. Se experimentó asimismo con dos concentraciones de fenoxibenzamina,  $0.29$  y  $2.9 \times 10^{-6}$  M. Para la fentolamina se usó  $2.9 \times 10^{-6}$  M.

Como la membrana nictitante tiene receptores postsinápticos de tipo  $\alpha$  casi exclusivamente, la respuesta muscular en presencia de los bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos se ve muy disminuída y en algunos casos se hace casi nula. Para mostrar este efecto reproducimos en la Fig. N° 24, un trazado del polígrafo obtenido durante la estimulación intermitente de la membrana nictitante en presencia de fenoxibenzamina en una concentración de  $0.29$  y  $2.9 \times 10^{-6}$  M. Si bien la liberación de NA en la presinapsis es mayor, el bloqueo postsináptico redujo marcadamente la contracción del músculo liso.

Los resultados de la actividad de TH postestimulación a 20 Hz de frecuencia los vemos en la Fig. N° 25; ellos indican que ninguno de los dos bloqueantes utilizados afectan la activación de la TH por arriba de la producida por la estimulación nerviosa en condiciones control, (si bien parece observarse un ligero incremento cuando pasamos de  $0.29$  a  $2.9 \times 10^{-6}$  M de fenoxibenzamina, ninguno de los dos valores es significativamente diferente del valor control, como tampoco lo es el de la fentolamina).

Como los mecanismos moduladores presinápticos juegan un papel importante a bajas frecuencias y no a altas frecuencias de estimulación, en nuestro diseño una alta frecuencia de estimulación (20 Hz) explicaría el resultado negativo.

Por esta razón efectuamos el mismo experimento a menor frecuencia (1 Hz) y comparamos las respuestas con tejidos controles estimulados a esa



**Fig. 24.** Trazado del polígrafo durante la hora de estimulación intermitente de membranas nicotínicas en presencia de dos concentraciones de fenoxibenzamina.

misma frecuencia.

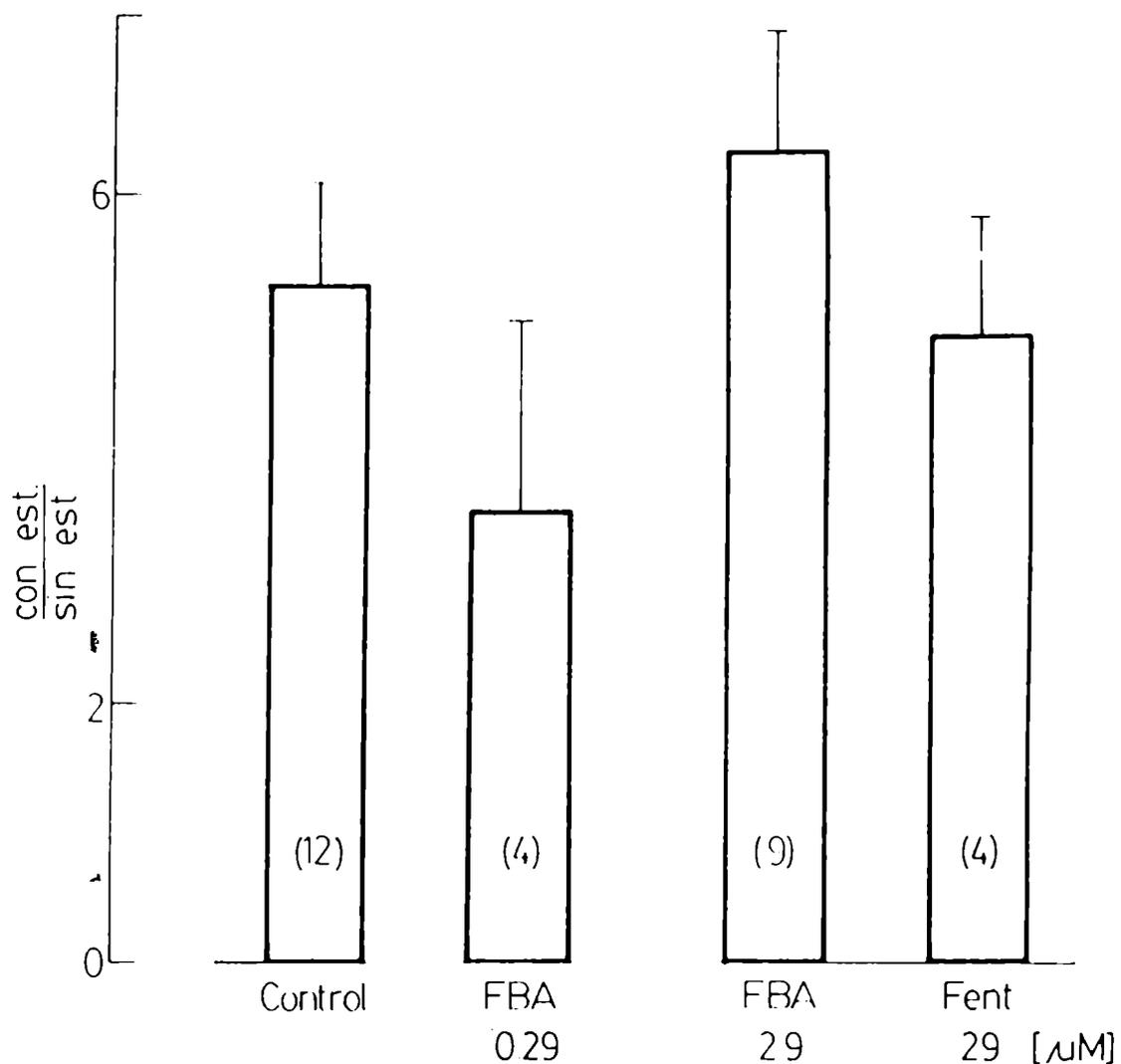


Fig. 25. Incremento de actividad de la TH por estímulo nervioso en presencia de los bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos fenoxibenzamina (FBA) y fentolamina (Fent.).

En la Fig. N° 26, se observa que a una frecuencia de estimulación me-

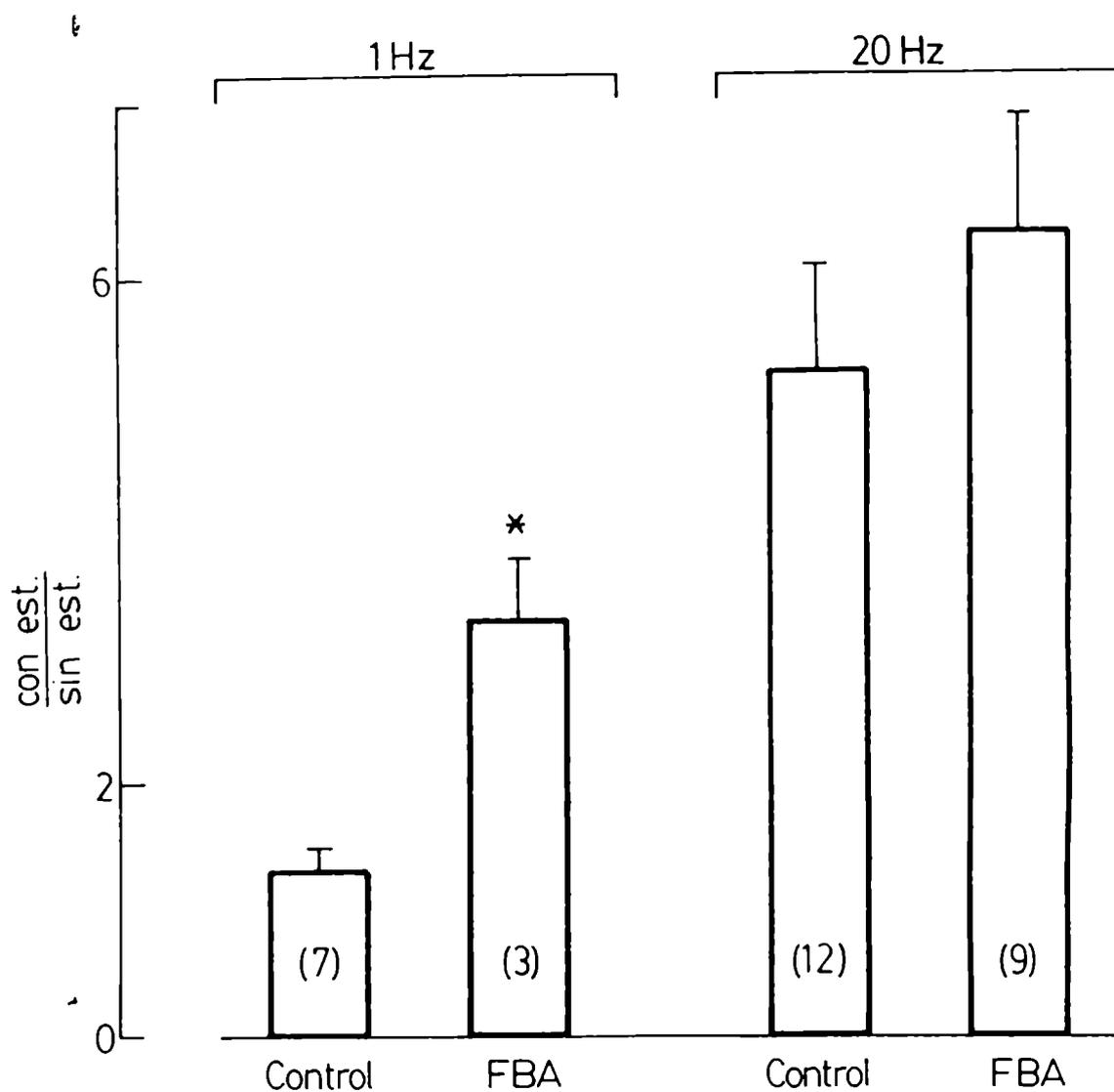


Fig. 26. Incremento de actividad de la TH por estímulo nervioso a diferentes frecuencias de estimulación en presencia del bloqueante  $\alpha$  adrenérgico fenoxibenzamina.

nor, la actividad de la enzima del tejido incubado y estimulado en presencia del bloqueante  $\alpha$  adrenérgico, fenoxibenzamina, aumenta casi 3 veces más que

la activación alcanzada por el tejido control estimulado en condiciones normales, es decir en ausencia del bloqueante. Para comparar se grafican los datos obtenidos estimulando a 20 Hz (con fenoxibenzamina en la misma concentración y sin ella).

2.d. Efecto de la fenoxibenzamina sobre tejidos deplecionados de NA por reserpina

Si como hemos observado hasta ahora, los incrementos de actividad de TH por estímulo nervioso pareciera que dependen de la cantidad del neurotransmisor liberado, nos pareció importante examinar qué pasa con la actividad de la enzima cuando se estimula en presencia de fenoxibenzamina pero en tejido que ha sido deplecionado previamente por la administración de reserpina, 24 horas antes.

En la Fig. N° 27, se representan los valores obtenidos de actividad de TH después de estimular en presencia de fenoxibenzamina  $2.9 \times 10^{-6}$  M, un tejido previamente reserpinizado. Para comparar, representamos de nuevo los valores obtenidos anteriormente del efecto de la fenoxibenzamina sobre un tejido normal. La estimulación se realizó a 20 Hz.

La figura muestra que aparentemente es necesaria la presencia de NA en los terminales nerviosos adrenérgicos para medir un aumento significativo en la velocidad de síntesis del mismo por estímulo nervioso. Esto se desprende del hecho de que en tejidos deplecionados por reserpina la estimulación nerviosa no produce aumento en la velocidad de síntesis del neurotransmisor en presencia ni en ausencia de fenoxibenzamina. Sin embargo, hay que destacar que,

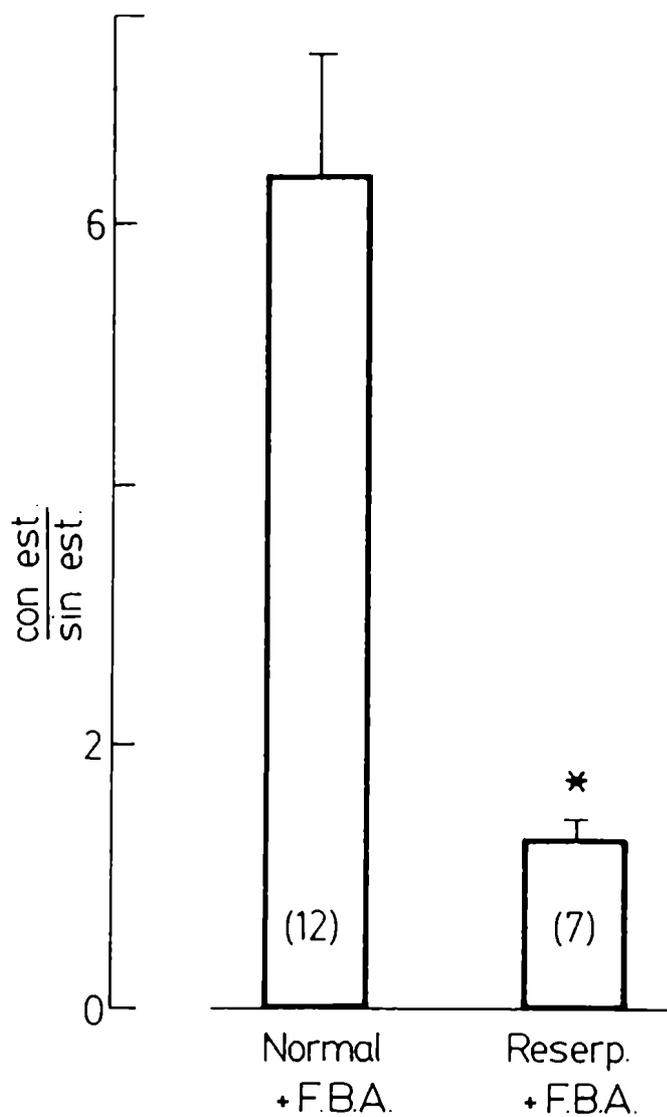


Fig. 27. Incremento de actividad de la TH por estímulo nervioso en presencia del bloqueante  $\alpha$  adrenérgico fenoxibenzamina  $2.9 \times 10^{-6}$  M en tejido normal y deplecionado por reserpina. 20 Hz, 1 hora.

lo mismo que en el grupo experimental sólo reserpinizado, los valores basales

de la enzima (membranas no estimuladas) ya son muy altos y no difieren por lo tanto del de las estimuladas. Sus valores son:

Sin estímulo	n = 7	Con estímulo	n = 7
0.304	$\pm$ 0.028 nCi/memb.20 min	0.376	$\pm$ 0.037 nCi/memb.20 min

### 3.d. Acción de agonistas $\alpha$ adrenérgicos

Como agonista  $\alpha$  adrenérgico utilizamos la clonidina, agonista parcial que al activar los receptores  $\alpha$  adrenérgicos presinápticos disminuye la liberación de NA por estímulo nervioso por un fenómeno de retroalimentación negativa. Esta acción moduladora la realiza la clonidina sólo a frecuencias bajas de estimulación, es por este motivo que la estimulación intermitente la realizamos para este grupo experimental a 5 Hz, todos los otros parámetros y el programa de estimulación, son los mismos. La clonidina la agregamos al baño 20 minutos antes de comenzar la estimulación en una concentración de  $1.12 \times 10^{-7}$  M. El resultado lo vemos en la Fig. 28, comparando el aumento de actividad de la enzima que se alcanza en un tejido control (Ringer normal) estimulando con una frecuencia de 5 Hz y el alcanzado en presencia de clonidina, vemos que es aproximadamente la mitad.

Los experimentos de los puntos 1, 2 y 3 nos estarían indicando que el aumento en la actividad de la enzima por estímulo nervioso sería proporcional a la cantidad de neurotransmisor liberado y que si éste está en muy baja cantidad en el tejido (tejidos reserpinizados), el incremento de actividad no se produce.

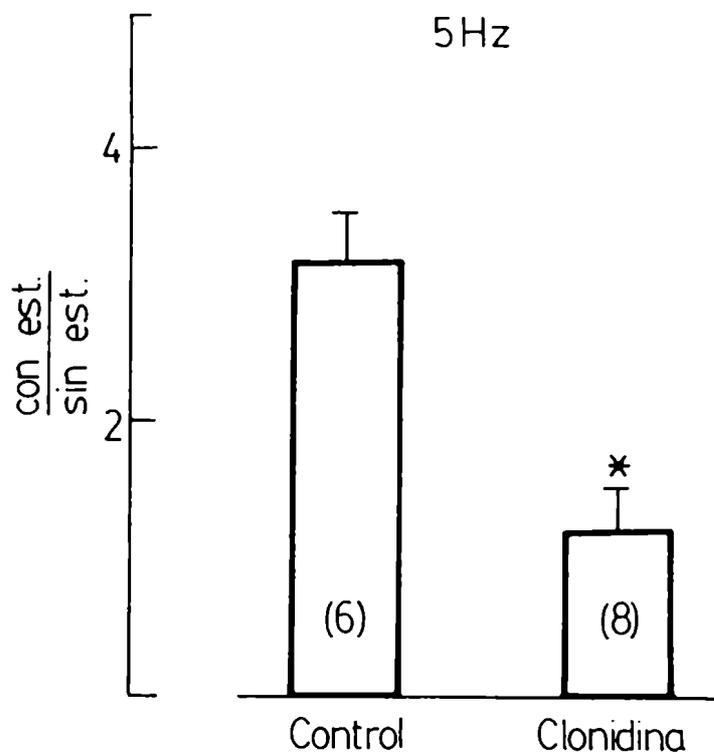


Fig. 28. Incremento de actividad de la TH por estímulo nervioso a 5 Hz en presencia del agonista parcial  $\alpha$  adrenérgico clonidina.

#### 4.d. Acción de agonistas $\beta$ adrenérgicos

Ya sabemos que un agonista  $\beta$  adrenérgico actuando sobre receptores pre sinápticos  $\beta$ , los activa facilitando la liberación por estímulo nervioso del neurotransmisor adrenérgico. Ya hemos dicho además que estas drogas actúan

modificando la liberación a bajas frecuencias de estimulación y que estas modificaciones producidas en la liberación por estos agentes  $\beta$  adrenérgicos, no son tan marcadas como las observadas con los agentes  $\alpha$  adrenérgicos, ya sean agonistas o antagonistas.

En nuestros experimentos usamos como agonista  $\beta$  adrenérgico, isoproterenol en una concentración de  $12 \times 10^{-9}$  M, concentración a la cual ya se activan los receptores  $\beta$ . El isoproterenol se colocó en el baño 30 minutos antes de comenzar la estimulación. Esta se realizó a 1 Hz durante 1 hora, ya que a baja frecuencia de estimulación se ha encontrado regulación de la liberación de NA durante el estímulo nervioso, por estos receptores presinápticos.

En la Fig. N° 29, se representa el valor obtenido, el cual se compara

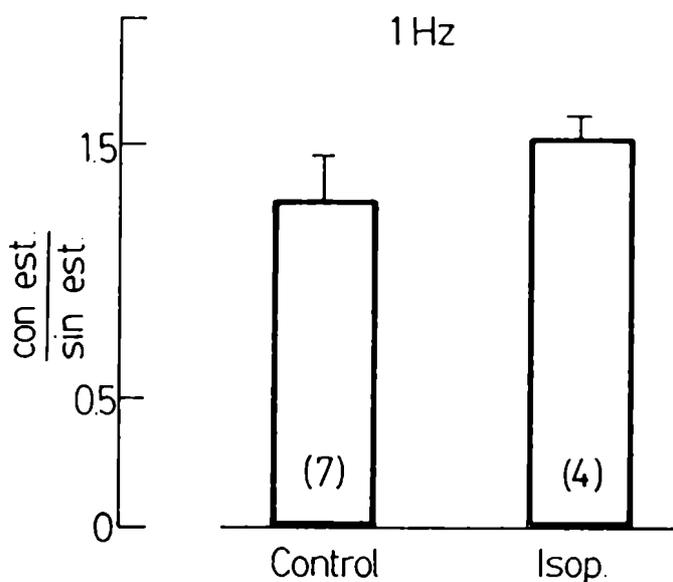


Fig. 29. Incremento de actividad de la TH por estímulo nervioso.  
Isop.: isoproterenol.

con el correspondiente a esa frecuencia de estimulación en condiciones de Krebs Ringer normal. De la comparación estadística de ambos, hemos obtenido que la pequeña diferencia que se observa no es significativa. Esta falta de efecto del agonista  $\beta$  adrenérgico no nos sorprendió ya que el efecto de los agonistas  $\beta$ , en especial el isoproterenol, que ha sido el más usado en los estudios sobre receptores  $\beta$  adrenérgicos presinápticos, varía mucho en su capacidad de activar el mecanismo modulador positivo con el tejido y la especie.

#### 5.d. Efecto de los antagonistas $\beta$ adrenérgicos

El antagonista  $\beta$  adrenérgico utilizado fue el metoprolol en concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M. El metoprolol es un antagonista  $\beta$  adrenérgico tan potente como el propranolol. Se colocó en el baño 30 minutos antes de comenzar la estimulación. Esta se realizó a una frecuencia de 5 Hz y los otros parámetros de estimulación en las condiciones habituales. A esta frecuencia de estimulación, los antagonistas  $\beta$  adrenérgicos muestran su acción moduladora en otros tejidos. En la Fig. N° 30, hemos representado como siempre la relación de membranas incubadas con metoprolol estimuladas y no estimuladas. La relación  $3.00 \pm 0.85$ , es ligeramente inferior a la relación control, pero no difiere significativamente de ella. El metoprolol no ha producido variación en el incremento de actividad de la TH por estímulo nervioso.

#### 6.d. Acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa

Hemos dicho que la activación de la TH por estímulo nervioso se logra-

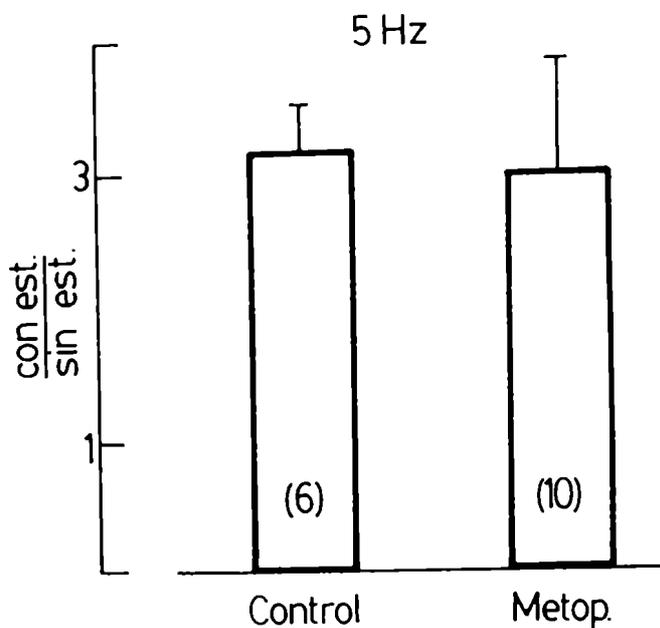


Fig. 30. Incremento de la actividad de la TH por estímulo nervioso. Metop.: metoprolol  $10^{-6}$  M.

ría según la hipótesis más aceptada, por fosforilación de la misma, por la proteína kinasa dependiente de AMPc. Es por este motivo que investigamos los efectos que sobre la activación de la enzima por estímulo nervioso tendría el inhibir la fosfodiesterasa responsable de la destrucción del AMPc. Los experimentos los realizamos a dos frecuencias de estimulación: 1 y 20 Hz; los otros parámetros de estimulación fueron los habituales; la papaverina, inhibidor de la fosfodiesterasa, fue agregada al baño 30 minutos antes de comenzar la estimulación en concentración  $2.66 \times 10^{-5}$  M. En la Fig. N° 31, hemos

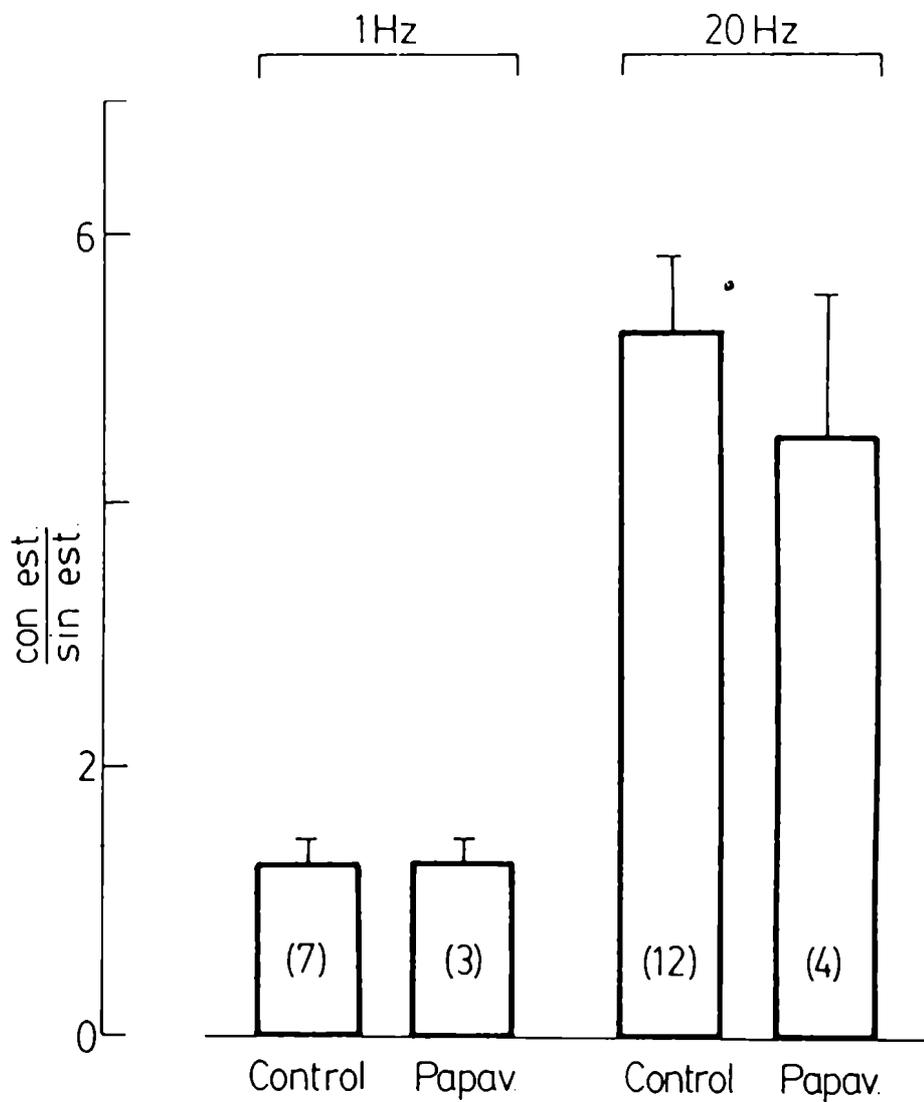


Fig. 31. Incremento de la actividad de la TH por estímulo nervioso en presencia de pargilina  $2.66 \times 10^{-5}$  M.

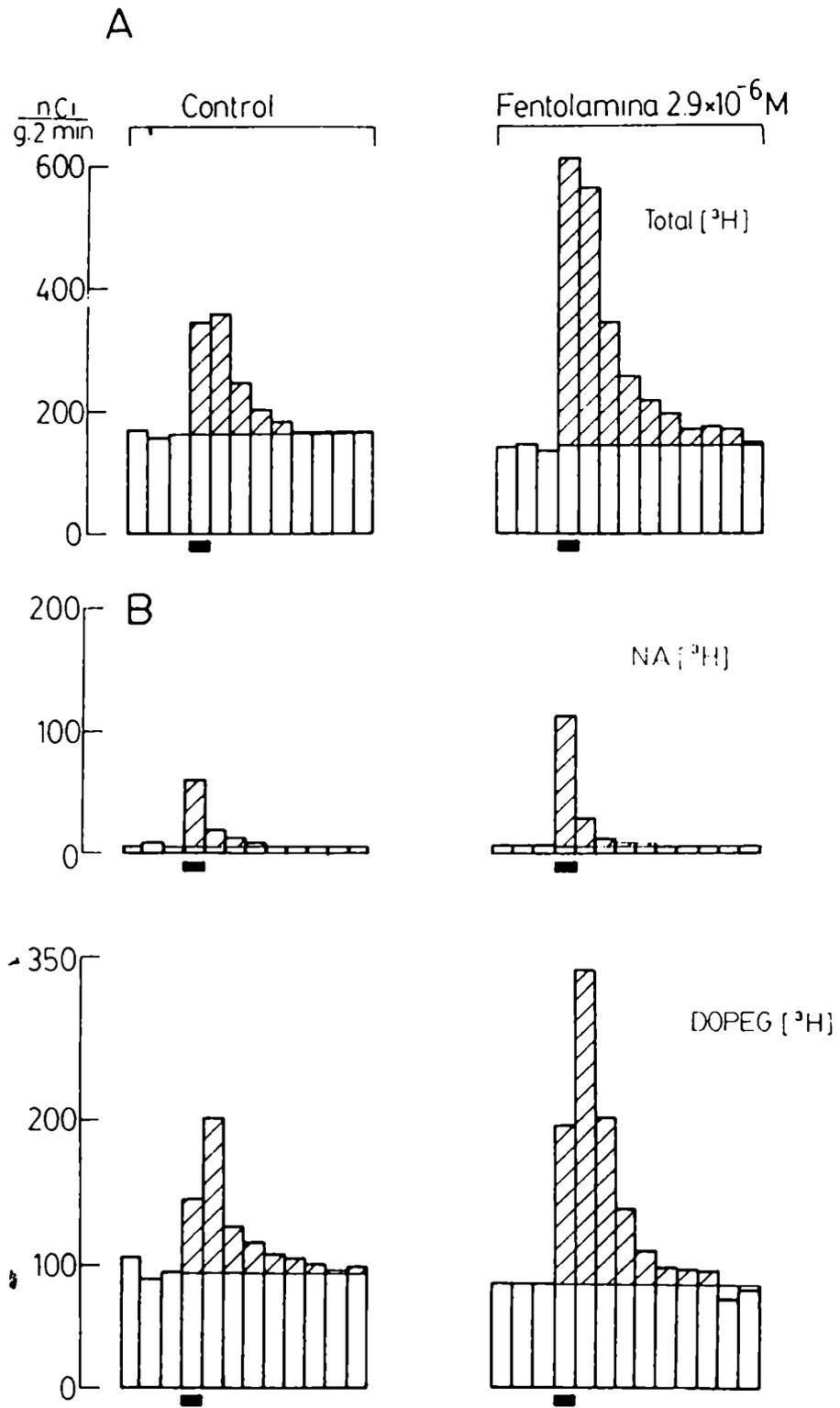
representado los valores obtenidos, con los valores control para comparar.

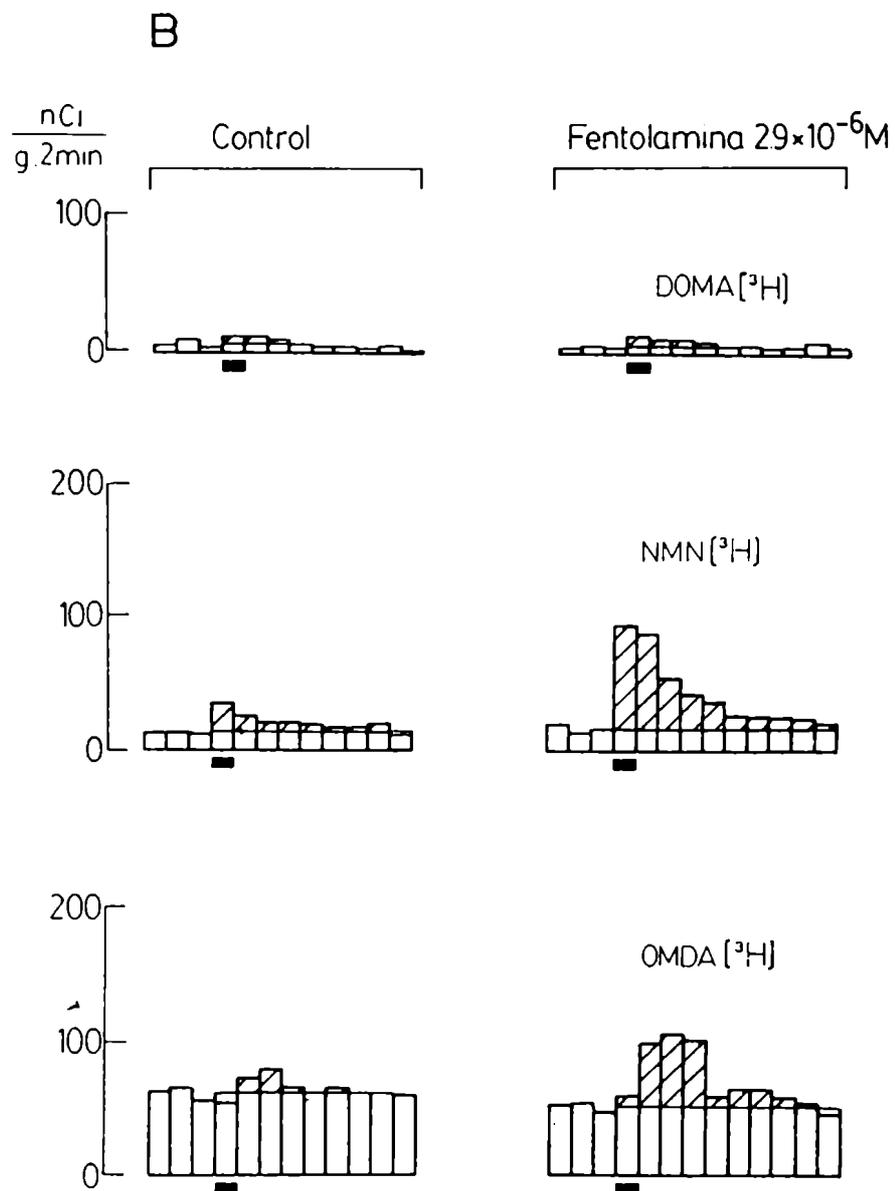
Se puede observar que no hay diferencias significativas entre ellos. Es decir que el hecho de inhibir la fosfodiesterasa y con ello supuestamente aumentar los niveles de AMPc, no ha resultado en un aumento de actividad de la enzima como se esperaría, por lo menos a 1 Hz, ya que a 20 Hz, como hemos visto, aparentemente se alcanza el máximo de estimulación y no es sobrepasado ni por bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos que aumentan la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso.

### E- Relación entre liberación de noradrenalina-<sup>3</sup>H y actividad de TH

A fin de determinar en forma directa la relación existente entre la NA liberada por estímulo nervioso y la activación alcanzada por la TH en el período posterior a la misma, medimos la NA-<sup>3</sup>H que se libera al baño de órgano aislado al estimular el tejido marcado previamente sus depósitos endógenos de NA con el neurotransmisor radiactivo. Las estimulaciones se realizaron en las mismas condiciones y en presencia de las mismas drogas que la medición de TH.

El material radiactivo que se libera al baño de órgano aislado tanto en condiciones basales como de estimulación, no es sólo NA-<sup>3</sup>H, sino que ésta está acompañada de todos sus metabolitos, los que se liberan en mayor o menor cantidad, conjuntamente con ella. Para dar una idea de esta liberación, en la Fig. N° 32, hemos representado un experimento tipo de liberación. En la parte A está representada la liberación total de radiactividad en nCi por g de tejido que se libera tanto en condiciones basales, barras blancas, como la liberación por encima de la basal, barras rayadas, que se produce por estimulación nerviosa en muestras consecutivas de 2 minutos. La pequeña barra rectangular negra debajo de la abcisa indica los períodos de dos minutos de estimulación nerviosa; cada uno se realizó a 10 Hz, el primero en condiciones control y el segundo en presencia de fentolamina  $2.9 \times 10^{-6}$  M. Como se puede observar, la liberación producida por estímulo nervioso no se limita al período de estimulación, sino que se prolonga por varios minutos luego de finalizada la misma. Esto se debe a la difusión de lo liberado a través del tejido





**Fig. 32 A y B.** Liberación basal (barras blancas) y por estímulo nervioso (barras rayadas) de radiactividad. Izquierda, estimulación control; derecha, en presencia de FBA  $2.9 \times 10^{-6} \text{M}$ .

hasta quedar libre en el baño. Las barras blancas anteriores a la estimulación se toman como liberación basal. En la parte B hemos representado el mismo experimento, mostrando cómo se distribuye esta radiactividad entre la NA y sus distintos metabolitos. Igualmente como en A, las barras blancas muestran liberación basal, las barras rayadas liberación por estímulo nervioso.

El cuadro metabólico para el  $^3\text{H}$  tanto en la liberación espontánea como la producida por estímulo nervioso de la membrana nictitante se muestra en las Tablas N° 6 y 7. La fracción de los metabolitos O-metilados desaminados (OMDA), que comprende el MOPEG y el VMA, junto con el glicol desaminado DOPEG representan las principales fracciones en la liberación espontánea, mientras que la NA da cuenta de menos del 10 % del total de radiactividad (Tabla N° 6).

Condición Experimental	Flujo Espontáneo (nC/g x 2 min)	Porcentaje de la radiactividad total				
		NA	DOPEG	DOMA	NMN	OMDA
Control	165	7.5	59.3	5.4	7.6	20.1
Fentolamina $2.9 \times 10^{-6}$ M	142	7.0	58.2	5.6	9.3	19.8

Tabla 6. Contribución de la NA y sus metabolitos al flujo basal control. Los datos corresponden al experimento tipo de la Fig. 32 y son el promedio de las 3 últimas muestras antes del estímulo.

Durante la liberación por estimulación nerviosa (Tabla N° 7), el cuadro metabólico se altera. El DOPEG es la principal fracción en el incremento

Condición Experimental	Liberación total (nC/g)	Porcentaje de la radiactividad total				
		NA	DOPEG	DOMA	NMN	OMDA
Control <sup>‡</sup>	555	23.7	50	2.4	14.5	9.3
Fentolamina 2.9 x 10 <sup>-6</sup> M	743	21.4	45.9	0.5	22.3	9.8

Tabla 7. Contribución de la NA y sus metabolitos a la liberación por estímulo nervioso (10 Hz, 2 min). Los datos corresponden al experimento tipo de la Fig. 32.

total de la radiactividad obtenida. El glicol desaminado dio cuenta del 50 % del incremento total de radiactividad, mientras que la NMN es el 15 % (Fig. N° 32 y Tabla N° 7). La fracción de los O-metilados desaminados (MOPEG y VMA) y el ácido desaminado DOMA, contribuyen mínimamente en la liberación de radiactividad producida por estimulación. Aquí, la NA-<sup>3</sup>H no metabolizada, representa el 24 % del total de lo liberado por estimulación, es decir que de menos del 10 % en condiciones basales pasó casi al 25 % en condiciones de liberación por estímulo nervioso.

En este cuadro metabólico pueden observarse variaciones durante la liberación en presencia de algunas de las drogas que hemos utilizado (clonidina, fenoxibenzamina, fentolamina) para incrementar o disminuir la liberación del neurotransmisor por estimulación nerviosa. Estas drogas no producen cam-

bios en el total liberado ni en la distribución metabólica en condiciones basales.

Las condiciones experimentales en las cuales se midió liberación y en experimentos paralelos actividad de TH, fueron los indicados en la Fig. N° 33. En ésta, la abcisa representa la liberación fraccional por pulso mientras la ordenada expresa el número de veces que se incrementa la actividad de TH como consecuencia de la estimulación intermitente durante 1 hora en presencia de las distintas drogas como indican los símbolos.

En "Métodos" se explicó que la liberación fraccional es la relación entre la suma de todo lo liberado por la estimulación nerviosa por arriba del basal (suma de todas las barras rayadas en la Fig. N° 32) y el tritio existente en el tejido en el momento de comenzar la estimulación. Este valor dividido por el total de estímulos (1200 en el caso del ejemplo graficado en la Fig. N° 32, porque se estimuló a 10 Hz, durante 2 minutos), nos da la liberación fraccional por pulso, valor de nuestra abcisa.

En la Fig. N° 33, hemos representado los valores obtenidos en las distintas condiciones experimentales. El análisis de regresión da para esta recta trazada con 8 puntos ( $n = 8$ ), los siguientes valores:

$$\bar{x} = 1.33$$

$$\bar{y} = 3.95$$

$$b = 2.14 \pm 0.42$$

$$a = 1.10 \pm 0.62$$

$$r = 0.877$$

$$p < 0.01$$

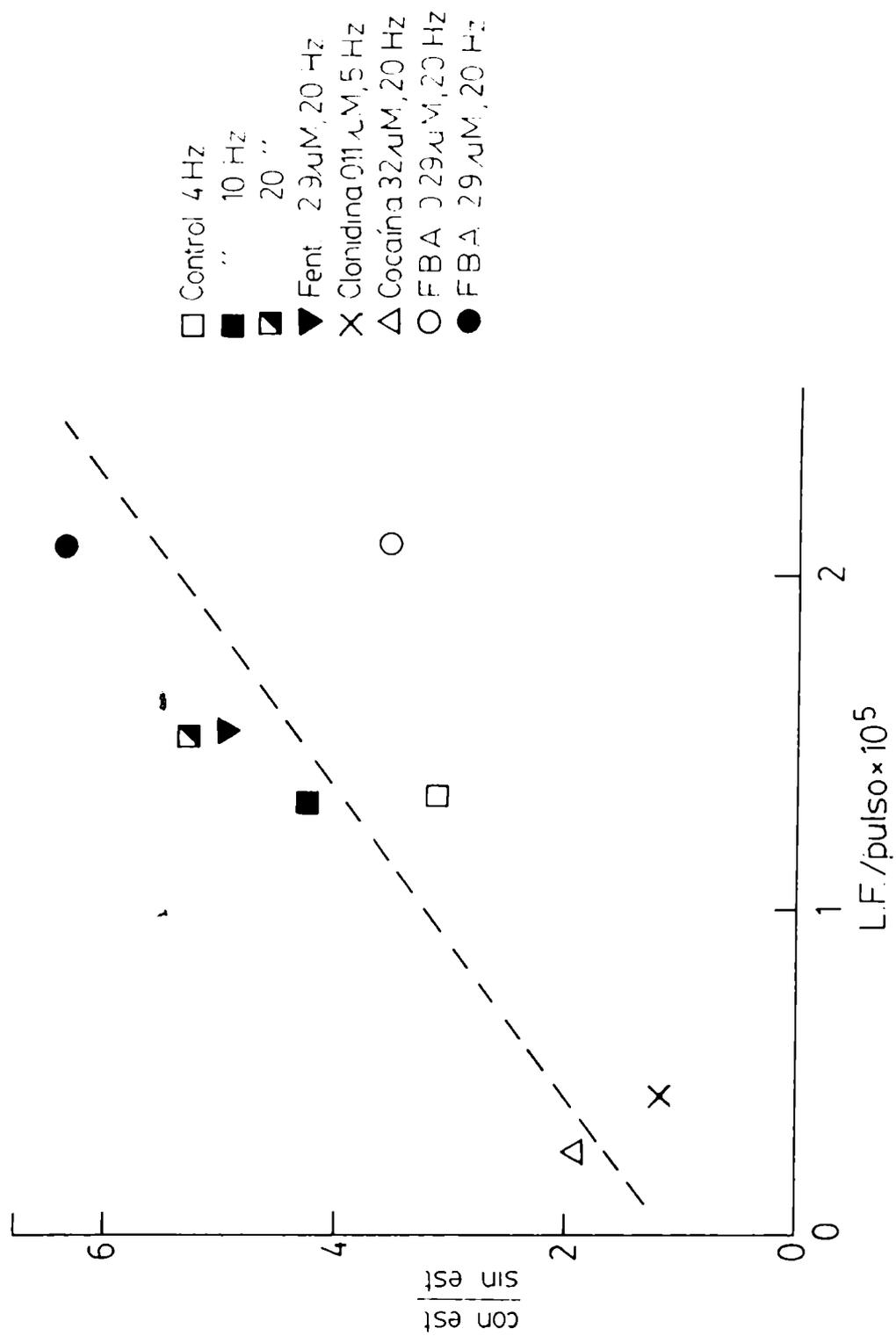


Fig. 33. Relación entre la liberación fraccional por pulso de  $\text{NA-}^3\text{H}$  y la activación de la TH.

El valor de  $r$  nos indica una correlación significativa entre la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso, expresada como liberación fraccional por pulso y el incremento de la actividad de TH expresada como número de veces que aumenta la actividad basal de la misma por efecto del estímulo.

XI- DiscusiónA- Activación de la TH en el período de postestimulación, parámetros y programas de estimulación

Los resultados de otros autores (Alousi y Weiner, 1966; Weiner y Rabadjija, 1968 a,b; Weiner y col., 1978) y los nuestros indican que la estimulación nerviosa está asociada con un aumento en la velocidad de síntesis del neurotransmisor adrenérgico, y este incremento que se observa tanto durante la estimulación como en el período posterior a la misma, se debe a una activación de la enzima TH.

Esta activación de la TH es la que conduce al aumento de síntesis de NA, ya que cuando se mide el paso siguiente en la biosíntesis usando como precursor radiactivo la DOPA, la diferencia entre el tejido estimulado y el control es muy pequeño en comparación con la diferencia medida cuando se usa tirosina radiactiva. Si bien no se miden diferencias apreciables entre tejido estimulado y control usando DOPA como precursor, la velocidad de síntesis, como era de esperar, fue considerablemente mayor ya que la actividad de DOPA descarboxilasa es muy superior a la de TH en los tejidos (Weiner y Rabadjija, 1968 a).

Aunque la velocidad de síntesis de la NA está aumentada significativamente por la estimulación nerviosa, ésta está sujeta a limitaciones para producir el máximo aumento. Estas limitaciones están dadas por la intermitencia, los parámetros y los programas de estimulación. La intermitencia de 30 seg

de estimulación y 30 seg de reposo, que para nuestra preparación es la más apropiada, sería necesaria a fin de no "agotar" la fibra nerviosa con una estimulación continua ya que en estas condiciones se observa una rápida caída y desaparición de la contracción muscular. O quizás sea necesario este intervalo de reposo para recaptar parte del neurotransmisor que se libera durante la estimulación.

Al no recaptarse, la pérdida de NA durante el estímulo sería muy elevada y no podría recuperarse por síntesis en la cantidad requerida.

Nosotros hemos hecho determinación de NA endógena de tejidos inmediatamente después que han sido estimulados durante 1 hora en las condiciones habituales por nosotros aplicadas, y no hemos encontrado diferencias entre las membranas estimuladas y las que permanecen en reposo, al menos con el método que hemos empleado (Laverly y Taylor, 1968). Esto demostraría que la biosíntesis durante la estimulación sería suficiente para mantener los depósitos endógenos de NA en su nivel normal y la biosíntesis que se realiza en el período postestimulación cubriría un pequeño depósito no detectable por el método de dosaje de la NA.

En cuanto a los parámetros de estimulación, voltaje y duración del impulso, podemos decir que el voltaje supramáximo y la duración de 0.5 milisegundos son los más adecuados ya que desarrollan la máxima respuesta y la más reproducible para cada frecuencia de estimulación y no producen deterioro del tejido.

El tercer parámetro, la frecuencia de estimulación, hemos comprobado que en las condiciones establecidas para los otros parámetros, ella es la que determina la magnitud del fenómeno, ya que la activación de la enzima aumenta

con la frecuencia, hasta alcanzar un máximo alrededor de los 20 Hz. Este valor máximo de actividad de la enzima que se obtiene en condiciones control, pareciera ser el máximo a que puede llegar la enzima ya que el mismo, como hemos visto, no puede ser sobrepasado ni aún en las condiciones de máxima liberación por estímulo como el que se obtiene realizando la estimulación en presencia de bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos ni aumentando la frecuencia. La estimulación a 40 Hz que dio un valor promedio ligeramente inferior con respecto a la estimulación a 20 Hz, podemos considerarlo similar al valor obtenido estimulando a 20 Hz ya que el error aumentó considerablemente debido a la mayor dispersión de los datos y sólo en pequeño grado podríamos atribuirlo al deterioro de la preparación ya que la respuesta muscular se mantuvo a través de la hora de estimulación.

Con respecto al tiempo durante el cual se prolonga la estimulación, si bien elegimos estimular la preparación durante 1 hora para medir la actividad durante los 20 min inmediatos al cese de la misma, porque obtuvimos los valores más elevados y menos dispersos y porque así trabajaron otros investigadores sobre el mismo tema; en nuestro caso, con sólo 6 min de estimulación obtuvimos casi el máximo de actividad de la enzima, pero con 15 y 30 min., se obtuvieron valores ligeramente menores pero que no difirieron significativamente con el obtenido estimulando durante 1 hora. Esto significa que este fenómeno es de muy rápida instalación, bastan unos pocos minutos de estimulación para ya observarlo. Nosotros no probamos tiempos menores de 6 minutos.

Weiner y col. (1978), estimulando durante diferentes períodos de tiempo, observaron que la estimulación por períodos tan cortos como 1 min, estaba asociada con la conversión de casi toda la enzima a la forma activa ya que ex

hibieron similar cinética con respecto al cofactor, la pteridina, las TH preparadas de conductos deferentes de cobayo estimulados por períodos desde 1 a 30 minutos. Asimismo observaron que la actividad de la TH soluble preparada a partir del conducto deferente no estimulado disminuye gradualmente con el tiempo de permanencia en el baño de incubación hasta alcanzar un valor de 47 % con respecto a la TH preparada a partir de conductos deferentes que permanecieron en el baño durante sólo 1 min, luego de extraídos del animal. Esto hizo que la diferencia entre los conductos estimulados y no estimulados amentara 3 veces cuando la estimulación intermitente se prolongó durante 1 hora, mientras que con sólo 1 min. de estimulación la diferencia fue sólo del doble, a pesar de que los parámetros cinéticos de la enzima proveniente del tejido estimulado no varió apreciablemente durante distintos tiempos de estimulación.

La estimulación casi máxima de la enzima obtenida en 6 min se produjo estimulando a 20 Hz, lo cual representa un total de 3600 impulsos. Cuando aplicamos este mismo número de impulsos pero en un lapso de tiempo mayor, 12 minutos, de manera que disminuimos la frecuencia a 10 Hz, ya no obtuvimos el mismo auménto de actividad sino que éste fue mucho menor. Esto lo podemos interpretar en la siguiente forma: en condiciones "in vitro" la preparación no estimulada tiene la enzima en su más bajo nivel de actividad, cuando es estimulada, si los impulsos son espaciados, la pérdida de NA por unidad de tiempo es menor que si se estimula a mayor frecuencia y la enzima tiene que sintetizar a menor velocidad para mantener la concentración de NA siempre en el mismo nivel. De allí que para el mismo número de impulsos se active más cuando son aplicados en forma más frecuente.

B- Extinción del fenómeno de activación; Noradrenalina endógena

Hemos comprobado que con 1 hora de estimulación intermitente, el fenómeno de la activación de la TH en el período de postestimulación es de lenta desaparición y que a los 60 min de finalizada la misma, todavía se observan diferencias entre la membrana control y la estimulada, midiendo la actividad durante los 20 minutos siguientes. Esta activación de la enzima de tan larga duración, nos estaría indicando que habría que reponer NA perdida durante la hora de estimulación. Es decir que la síntesis que se lleva a cabo durante la estimulación no alcanzaría para llevar al neurotransmisor a los niveles normales de concentración. Esto a su vez estaría en contra de las determinaciones que hemos realizado de NA endógena al término de la estimulación, nosotros no hemos encontrado diferencias entre las membranas estimuladas y las no estimuladas, ni en la NA endógena, ni en su peso. Como ya dijimos, quizás sea ese pequeño compartimiento o depósito de neurotransmisor que según se cree (Weiner y Rabadjija, 1968 a), actúa inhibiendo a la TH, que al disminuir durante la estimulación libera a la enzima de la inhibición que le provoca y ésta lo sintetiza activamente para reponerlo. Diferencias debidas a este pequeño depósito de NA no podrían ser halladas por el método que empleamos comúnmente en el laboratorio.

No hemos estudiado el comportamiento de la enzima a distintos tiempos de finalizada la estimulación, cuando ésta se llevó a cabo durante breves períodos de tiempo, 5-6 min, para saber si hay correlación entre tiempo de estimulación y tiempo de extinción del fenómeno. De hallar una correlación positiva podríamos quizás saber algo más sobre estos compartimientos o depósitos

neuronales de NA que se cree actúan regulando la enzima a tiempos cortos, puesto que es evidente que el contenido total de NA no es crítico con respecto a la regulación de la síntesis de NA en estas condiciones.

En apoyo de esta hipótesis están los resultados de Bhatnagar y Moore (1972), que si bien trabajaron en distintas condiciones que las nuestras, animal entero y estimulación preganglionar, sus resultados pueden servir como comparación. Ellos midieron, en gatos, el contenido de NA en los cuerpos celulares (ganglio cervical superior) y terminales (glándulas salivales submaxilares) de las neuronas simpáticas postganglionares, durante, inmediatamente después, y dos y seis horas después que cesó la estimulación eléctrica, preganglionar, intermitente, de tres horas de duración. En el ganglio, ni el contenido de NA ni la velocidad de formación de NA-<sup>14</sup>C a partir de tirosina-<sup>14</sup>C se alteran durante o dentro de las seis horas posteriores a tres horas de estimulación preganglionar. En las glándulas salivales, la estimulación durante una a tres horas reduce el contenido de NA. Durante el período de postestimulación el contenido de NA se recobra parcialmente por síntesis y no por captación específica de NA, y en el mismo, la síntesis de NA a partir de tirosina-<sup>14</sup>C se realiza en forma acelerada pero retorna a los valores controles de velocidad antes de que los depósitos de NA se restablezcan. Esto sugiere que si la síntesis de NA es regulada por un control de retroalimentación, sólo una parte de los depósitos participan en esta regulación.

#### Cuerpo Neuronal - Terminales nerviosos

De los valores obtenidos por Weiner y Rabadjija (1968 a) en su prepara

ción de conducto deferente-nervio hipogástrico y de los nuestros en las preparaciones de nervio preganglionar-ganglio cervical superior y nervio infratroclear-membrana nictitante, dijimos que la gran diferencia encontrada entre los mismos podría surgir de la diferencia anatómica entre las dos preparaciones o bien del diferente método de dosaje de la enzima.

Al no encontrar nosotros incremento en la actividad de la TH en el ganglio y sí en los terminales, podemos sugerir que el menor incremento encontrado en el conducto deferente se explicaría por un enmascaramiento debido a la presencia de células ganglionares en este tejido, cuya actividad enzimática no cambia por el estímulo.

De esta hipótesis podemos deducir: primero, que la diferencia en la activación de la TH por estímulo nervioso entre las preparaciones conducto deferente-nervio hipogástrico de cobayo y membrana nictitante-nervio infratroclear de gato, puede deberse, por lo menos en parte, a la diferente disposición anatómica de terminales nerviosos y cuerpos neuronales, sin descartar que pueda haber diferencia por el solo hecho de ser diferentes tejidos de distintos animales. Los resultados de Bhatnagar y Moore (1972), si bien fueron hechos en animal entero, están de acuerdo con los nuestros en que no hay aceleración de la síntesis de NA a partir de tirosina-<sup>14</sup>C en el ganglio cervical superior de gato por estimulación intermitente hasta de tres horas de estimulación. Segundo, que nuestra preparación sería más adecuada para medir este fenómeno de activación de la enzima en los terminales nerviosos adrenérgicos por estimulación eléctrica ya que no intervienen los cuerpos neuronales que enmascaran los resultados por su alto contenido de enzima que no se activa por estímulo nervioso.

Sin embargo, pensamos también que gran parte de la diferencia, si no toda, pueda deberse al método utilizado para el dosaje de la enzima. El método utilizado inicialmente por Weiner y col. (1968 a) y con el único que midieron actividad de la enzima en el período posterior a la estimulación, también les dio valores bajos para la actividad de la enzima durante la estimulación (63 % de aumento con respecto al control). Posteriormente (Weiner y col., 1978), usando el mismo método que hemos utilizado nosotros (Waymire y col., 1971), encontraron durante la estimulación una actividad 3 veces superior con respecto al tejido no estimulado, lo que nos hace suponer que en estas condiciones de dosaje, sería posible medir una mayor activación también en el período de postestimulación en el conducto deferente de cobayo.

#### Presencia de $\text{Ca}^{++}$ en el medio

La aparente menor activación de la TH que se produce cuando se estimula la preparación y se mide la actividad de la enzima en bajo  $\text{Ca}^{++}$  ( $2.6 \times 10^{-4}$  M). mostraría que el  $\text{Ca}^{++}$  juega un rol importante en este fenómeno. Este hecho estaría de acuerdo con los resultados del grupo de Roth. Estos autores encontraron que el agregado de  $\text{CaCl}_2$  a una preparación de TH soluble ya sea de sistema periférico, conducto deferente (Morgenroth y col., 1974) como de sistema central, protuberancia y corteza cerebral de rata (Morgenroth y col., 1975 a), produce una marcada activación de la enzima cuando se ensaya en concentraciones subsaturantes de tirosina ( $1 \times 10^{-5}$  M) y del cofactor, la pteridina ( $1 \times 10^{-4}$  M). La máxima activación la obtuvieron con  $\text{Ca}^{++}$   $5 \times 10^{-5}$  M y no cambia hasta una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M. El EDTA, que por sí no tie-

ne acción sobre la enzima, antagoniza la activación producida por el  $\text{Ca}^{++}$ .

Esta activación de la TH, se refleja en el cambio de las propiedades cinéticas de la enzima, una disminución del Km para la tirosina y el cofactor la pteridina de aproximadamente cinco veces y un aumento del Ki para la NA de casi 20 veces en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . De esta forma la NA es un inhibidor mucho menos efectivo para la enzima activada por  $\text{Ca}^{++}$ .

Los autores sugieren que la disminución de la inhibición de la TH por su producto final, la NA, el cual se cree ocurre durante la estimulación nerviosa, puede llevarse a cabo por un mecanismo enteramente diferente al que supone la existencia de un pequeño depósito de NA soluble, al cual tendría acceso la TH y rápidamente reducible en tamaño por la liberación del transmisor. Según Roth y col., cuando los impulsos nerviosos despolarizan el terminal noradrenérgico, el  $\text{Ca}^{++}$  que según se cree, entra al terminal a través de su membrana, e inicia la liberación del transmisor, puede también producir una activación de la TH en el terminal nervioso similar a la que ven cuando el  $\text{Ca}^{++}$  lo agregan a la enzima aislada. De esta forma, durante la estimulación nerviosa, el incremento en la formación de NA en el terminal nervioso intacto puede deberse a la alteración de la afinidad de la enzima por su inhibidor, el producto final, la NA, el sustrato, la tirosina y el cofactor la pteridina.

Sin embargo, los resultados experimentales que dieron lugar a esta teoría que parece muy atrayente, no han podido ser reproducidos por otros investigadores (Lerner y col., 1977; Weiner y col., 1977).

Queda en duda por lo tanto, si el bajo  $\text{Ca}^{++}$  usado por nosotros ( $2.6 \times 10^{-4}$  M), suficiente para iniciar la liberación del neurotransmisor puesto que la respuesta muscular durante la hora de estimulación fue normal, sería

en realidad responsable de la menor activación de la enzima encontrada en es  
tas condiciones.

C- Modulación del incremento de actividad de la TH posterior al estímulo nervioso, por los niveles citoplasmáticos de noradrenalina. Acción de drogas que modifican los mismos

1. Depleción de los depósitos de noradrenalina

Acción de la reserpina

La reserpinización de los animales hizo que desapareciera la activación de la TH por estímulo nervioso que se produce en el período posterior al mismo, en la membrana nictitante de animales normales con respecto a los controles sin estimular, observándose al mismo tiempo un incremento de aproximadamente 4 veces en el valor basal de la actividad de la enzima. Este incremento en el valor basal de la enzima en las membranas provenientes de animales reserpinizados es un fenómeno que ha sido ya descrito para los terminales nerviosos adrenérgicos. Mueller y col.(1969a) y Thoenen y col. (1969 b), demostraron que la TH puede ser inducida tanto en la médula adrenal como en el ganglio simpático de diversas especies (ratón, rata, cobayo, conejo) por drogas que causan un aumento reflejo en la actividad del sistema nervioso simpático. Este aumento que es máximo a los 3 días en las adrenales de ratas con una única dosis de reserpina de 2.5 mg/kg, se debe a una inducción de la enzima, síntesis de nuevas moléculas de TH, el que se previene con inhibidores de la síntesis proteica como la cicloheximida. Ya a las 24 horas pudieron medir un incremento del 65 % en la actividad de la enzima, en homogenato de tejido. En nuestra preparación, el incremento de 4 veces la actividad ba-

sal de la enzima de animales reserpinizados con respecto al valor de animales normales, se midió en tejido intacto. Nosotros no hemos medido la actividad de la enzima en homogenato de tejido proveniente de animales reserpinizados, en condiciones saturantes de sustrato y cofactor para ver si había un incremento en la actividad total de TH (inducción).

Por otra parte Pfeffer y col. (1975), estudiaron los efectos de la reserpina sobre la TH en glándulas adrenales y conducto deferente de rata y de ratón, tanto en tejido intacto como en homogenato de los mismos. Ellos encontraron que durante las primeras horas (1-4 hs) después de la administración de reserpina (2 ó 5 mg/kg), la actividad de TH en cortes de adrenal de rata y conductos deferentes intactos de rata y ratón, se reduce profundamente, aunque no encuentran efecto sobre la actividad de la enzima en homogenatos de estos tejidos. El efecto, observado sólo en preparaciones intactas, se antagonizó competitivamente por la adición al medio del cofactor, la pteridina ( $DMPH_4$ ). El análisis cinético, indicó que el efecto del tratamiento agudo con reserpina en estos tejidos aislados intactos era un aumento del  $K_m$  para el cofactor, la pteridina pero sin alteración de la  $V_{max}$ . Estos resultados indican que la reserpina produce inhibición de TH porque evita el almacenamiento de las catecolaminas y causa niveles elevados de la NA libre intraneuronal. La catecolamina inhibe la enzima en una forma competitiva con el cofactor, la pteridina. En conducto deferente de ratón intacto, tejido donde muestran el efecto de la reserpina a las 12 y 24 horas después de la inyección (2 mg/kg) de reserpina, se ve que los valores bajos de actividad de TH persistieron hasta las 12 horas, pero a las 24 horas ya han vuelto a los valores normales. A los 3 días de tratamiento con reserpina (1 inyección diaria), encuentran aumento en los

niveles de TH en las glándulas adrenales de rata pero no en los conductos deferentes de rata o de ratón. Es decir, encuentran inducción de la enzima sólo en adrenales y no encuentran aumento de actividad de TH en los conductos deferentes a las 24 horas de reserpina.

Esta diferencia con nuestros resultados indicaría un distinto comportamiento por diferencia de especie o de órgano, no a una diferente forma de medición de actividad de la enzima, ya que nosotros usamos el mismo método por estos autores empleados (Waymire y col., 1971).

Nuestros resultados pueden ser interpretados con las observaciones que trabajando con ganglio cervical superior y membrana nictitante de gato obtuvieron Chatzkel (1974) y Rubio (1977). Rubio (1977), mostró que incubando tanto el ganglio cervical superior como la membrana nictitante de gato con dibutiril AMP cíclico (db AMPc) durante 1 ó 2 horas, se produce un aumento de la actividad de TH medida en el tejido intacto. En ganglio, a la hora de incubación, el aumento es pequeño y más marcado a las 2 horas (80 % aproximadamente) mientras que el incremento en la membrana nictitante ya se produce a los 30 minutos siendo a las 2 horas de 4 veces el control (sin db AMPc). Esta activación no desaparece si la incubación con db AMPc se realiza conjuntamente con cicloheximida, en concentraciones que inhiben la velocidad de incorporación de la tirosina-<sup>14</sup>C a las proteínas. Este incremento en la hidroxilación de la tirosina no se debe por lo tanto a síntesis de nuevas moléculas de la enzima, no es una inducción. Esta activación de la enzima no se produce si se incuba la enzima soluble aislada del ganglio con el db AMPc directamente.

Con esto demuestra que el db AMPc es capaz de aumentar la hidroxilación de la tirosina en los cuerpos celulares y terminales nerviosos de la neuu

rona sin aumentar la actividad total de la TH en el homogenato de los tejidos.

Por su parte, Chatzkel y col. (1974), en su trabajo sobre modulación de la síntesis de AMPc en el ganglio superior de gato por estimulación presináptica de corta duración, encontraron que los niveles de AMPc se incrementan por esta estimulación.

En nuestra preparación podría suceder que una droga que causa un aumento reflejo en la actividad del sistema nervioso simpático como la reserpina, estuviera aumentando los niveles endógenos de AMPc, quizás a través de la adenilatociclasa, y que fuera este AMPc el que produce la activación de TH. Es decir que el valor basal de la actividad de TH en membranas reserpinizadas ya está elevado por un mecanismo similar al que produce el estímulo nervioso y la incubación con db AMPc. En apoyo de esta hipótesis están los resultados de Rubio y los nuestros: por incubación durante 2 horas con el db AMPc, la membrana nictitante incrementa 4 veces su actividad como las membranas de animal reserpinizado 24 horas antes, y por estímulo nervioso aproximadamente 5 veces a una frecuencia de 20 Hz.

En estas condiciones experimentales, tejidos provenientes de animales reserpinizados, en que la enzima tiene ya casi el máximo de la actividad que adquiere cuando se estimula eléctricamente el tejido, no podría sobrepasarla si se la somete al estímulo nervioso, de allí que no hayamos podido ver diferencias entre tejido estimulado y sin estímulo provenientes de animales reserpinizados. Estarían todas las moléculas en estado activado según la teoría de Weiner (Weiner y col., 1978). Esta activación podría ser causada también por la total desinhibición debido a la falta de NA, que es casi completa a las 24 horas de la inyección de la reserpina.

Acción del Ro 4-1284

El agente reserpínico Ro 4-1284 aumenta la liberación de  $NA-^3H$  de la aurícula aislada de cobayo (Adler-Graschinsky y col., 1972). En estas condiciones experimentales más del 70 % de la  $NA-^3H$ , liberada por el Ro 4-1284, se metaboliza presinápticamente al glicol desaminado DOPEG. Este metabolito se forma preferentemente dentro de los terminales nerviosos no sólo en las aurículas de cobayo sino en otros tejidos inervados adrenérgicamente como el conducto deferente de rata (Graefe y col., 1973), en el bazo de gato (Dubocovich y Langer, 1973) y en la membrana nictitante de gato (Luchelli-Fortis y Langer, 1974).

Rubio (1976), en su trabajo de la acción de los metabolitos de la NA sobre la regulación de la actividad de TH, encontró que el Ro 4-1284 no inhibe la TH en homogenato de aurícula de cobayo hasta una concentración de  $2.9 \times 10^{-5}$  M si la concentración del cofactor  $DMPH_4$ , era  $0.1$  ó  $2 \times 10^{-3}$  M. Cuando los experimentos los realizó en tejido intacto, en presencia de una concentración de Ro 4-1284, que incrementa considerablemente la liberación de  $DOPEG-^3H$  ( $8.7 \times 10^{-6}$  M), la actividad de la TH se inhibió más del 50 % en una concentración de  $DMPH_4$  en el medio de incubación de  $0.1 \times 10^{-5}$  M. Sin embargo, cuando hizo similares experimentos en presencia de  $2 \times 10^{-3}$  M de  $DMPH_4$ , no se observó inhibición de la TH. Cuando la concentración de Ro 4-1284 la incrementó a  $2.9 \times 10^{-5}$  M, la droga inhibió la TH a concentraciones de  $DMPH_4$   $0.1$  ó  $2 \times 10^{-3}$  M. Por otra parte, el DOPEG agregado al homogenato de tejido inhibió a la TH con una  $IC_{50}$  de  $3.2 \times 10^{-5}$  M en presencia de  $DMPH_4$   $0.1 \times 10^{-3}$  M y de  $4.0 \times 10^{-4}$  M para  $2 \times 10^{-3}$  M de  $DMPH_4$ . Esta potencia es similar a la de

la NA. De esto concluyó que la inhibición por DOPEG es competitiva con respecto al cofactor, el  $\text{DMPH}_4$ , lo mismo que la inhibición por Ro 4-1284. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de TH en el tejido intacto por la exposición al Ro 4-1284, sería el resultado de un aumento en la concentración citoplasmática del glicol desaminado DOPEG.

En nuestra preparación, inervada adrenérgicamente, la exposición al Ro 4-1284 que inhibió la actividad de TH (basal) aproximadamente a la mitad, lo estaría haciendo a través del metabolito desaminado DOPEG formado en alta concentración en el citoplasma a partir de la NA liberada desde los gránulos por el agente reserpínico. Nosotros tenemos una inhibición mayor a más bajas concentraciones de Ro 4-1284, que la encontrada por Rubio, eso puede deberse al mayor tiempo de incubación o a que no suplementamos el medio de incubación con  $\text{DMPH}_4$ .

En cuanto a la acción del Ro 4-1284 sobre tejido reserpinizado, podemos decir que era de esperar una falta de acción, ya que a las 24 horas no tiene NA sobre la cual actuar, la actividad basal de la enzima no difiere de la de los tejidos solamente reserpinizados. Esto apoyaría nuestra interpretación en tejidos controles.

## 2. Efecto de un inhibidor de la captación neuronal de noradrenalina sobre la actividad de TH.

La inactivación de la NA liberada por estimulación nerviosa se lleva a cabo en su mayor parte por la captación neuronal del transmisor a través de la membrana del terminal nervioso (Iversen, 1967 b). Este mecanismo activo

de transporte de NA reduce efectivamente la concentración del transmisor liberado en el espacio sináptico. Esta captación puede así, regular la cantidad de transmisor liberado por estimulación que puede realmente activar los receptores  $\alpha$  presinápticos. Cuando se inhibe la captación neuronal por cocaína se dispone de una cantidad mayor de neurotransmisor liberado por estímulo nervioso sin metabolizar (Langer y Enero, 1974) para activar los receptores  $\alpha$  presinápticos inhibitorios. Como consecuencia de ésto, la inhibición de la captación conduce a un incremento de la inhibición de la liberación por aumento del neurotransmisor en las vecindades de los terminales nerviosos (Langer, 1980).

Esto explicaría el hecho de que la inhibición de la transmisión noradrenérgica por agonistas  $\alpha$  adrenérgicos con estructura de feniletilaminas se puede demostrar sólo cuando la captación neuronal de la NA está inhibida por cocaína o desipramina. Por otra parte, cuando la liberación del neurotransmisor se reduce por un agonista  $\alpha$  adrenérgico derivado de las imidazolininas, como la clonidina, no es necesario inhibir la captación neuronal. Más aún, la inhibición de la captación neuronal, en este caso, disminuye la eficiencia de los derivados de la imidazolina para inhibir la neurotransmisión adrenérgica tanto periférica como en el sistema nervioso central (Langer, 1980).

En nuestro grupo experimental, la estimulación en presencia del bloqueante de la captación neuronal de NA, cocaína, la activación de la TH por estimulación nerviosa a 20 Hz no alcanzó los niveles de la estimulación control, es decir tejido normal en ausencia de drogas. Esta limitación de la activación de la enzima coincidiría con el efecto inhibitorio de la NA actuando sobre los receptores  $\alpha$  presinápticos que, como dijimos, sólo se ponen de

manifiesto cuando se inhibe la captación neuronal por inhibidores de la misma, como la cocaína y desipramina.

### 3. Acción de la pargilina sobre la actividad basal

Al inhibir la MAO, se incrementa la NA citoplasmática por estar bloqueado el principal paso que lleva a la degradación intraneuronal del neurotransmisor, es decir la formación del DOPEG y de allí el MOPEG. Esta elevación de la NA intraneuronal tiene poco efecto sobre la actividad basal de la enzima, aparentemente un 20 % lo cual estaría justificado si tenemos en cuenta que el DOPEG que se forma en ausencia de inhibidores de MAO, tiene una potencia inhibitoria semejante a la del neurotransmisor (Rubio, 1976).

### Acción de la pargilina sobre la actividad postestimulación

La liberación de  $NA-^3H$  por estimulación nerviosa en órgano perfundido (bazo), no varía si se perfunde 1 hora antes de la estimulación con pargilina en una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M. Es decir, la inhibición de la monoaminooxidasa (MAO) por pargilina no modifica los valores absolutos de liberación por estímulo producida por la estimulación nerviosa (Langer y Dubocovich 1981).

En animal entero perfundido (conejo) con  $NA-^3H$ , una dosis de pargilina de 40 mg/kg i.v., produce una pequeña reducción en la velocidad de liberación de la  $NA-^3H$  (Majewski y col., 1982).

Aunque nuestra preparación es órgano aislado, condición diferente a

las mencionadas, es similar en cuanto a liberación con el órgano perfundido y, por lo tanto, suponemos que la liberación de NA por estímulo nervioso en presencia de pargilina  $5 \times 10^{-2}$  M, no difiere de la liberación en condiciones control. En consecuencia, la mayor acumulación de NA en el terminal por la inhibición de la MAO, no produciría una mayor salida del neurotransmisor por estímulo nervioso, si bien lo produce por aminas que liberan NA (Luchelli-Fortis y Langer, 1974). Pero si bien no habría cambio en la salida del neurotransmisor, al ser éste recaptado, no va a pasar al metabolito desaminado DOPEG, sino que va a quedar como NA inhibiendo a la TH. Si bien dijimos que no son muy diferentes las potencias inhibitorias de la NA y el DOPEG sobre la TH, por lo cual no importaría que la NA recaptada quedara como tal o pasara a DOPEG debemos tener en cuenta que éste metabolito se pierde mucho más fácilmente hacia el espacio sináptico, es decir deja la neurona con una constante de velocidad aparente para el eflujo mayor que el neurotransmisor. Esta velocidad diferente de eflujo se atribuye a la mayor lipofilicidad del metabolito (Trendelenburg y col., 1980). De esta forma, en nuestra preparación la inhibición que ha sufrido la TH con respecto al valor control en el período posterior a la estimulación nerviosa en presencia de pargilina, sería debida a la mayor acumulación citoplasmática de NA y no a una menor liberación del neurotransmisor como hemos visto en el caso de los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos (clonidina), que al actuar sobre los receptores presinápticos  $\alpha$ , disminuyen la liberación de NA por estímulo nervioso.

D- Acción de drogas que modifican la liberación de NA por estímulo nervioso

1. Acción de bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos

Los resultados de activación de la TH obtenidos en presencia de fenoxibenzamina  $0.29$  y  $2.9 \times 10^{-6}$  M, lo mismo que con fentolamina  $2.9 \times 10^{-6}$  M a 20 Hz, indicarían que ninguno de los dos bloqueantes utilizados estarían afectando la activación de la TH más allá de la que se obtiene estimulando en condiciones de Krebs Ringer normal. Si es cierta nuestra hipótesis que a mayor liberación por estímulo mayor actividad de TH, tendríamos que haber obtenido mayor actividad en presencia de fenoxibenzamina en ambas concentraciones como así también en presencia de fentolamina con respecto a la actividad obtenida por estimulación en condiciones normales, ya que se trata de bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos que aumentan la liberación por estímulo nervioso. Este resultado puede ser sólo aparentemente contradictorio. El hecho de no observar una diferencia significativa puede tener origen en 2 motivos: primero, que ya estamos en el límite que puede alcanzar la activación de la TH (20 Hz) y por lo tanto los bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos no pueden modificarla o, segundo, que a esta alta frecuencia de estimulación los receptores presinápticos  $\alpha$  no funcionan como moduladores de la liberación por estímulo nervioso, como sugieren algunos investigadores.

La primera hipótesis estaría avalada por la curva de actividad de la TH en función de la frecuencia de estimulación; vimos que a 20 Hz en condiciones control de estimulación, sin agregado de drogas, se llega a un máximo que no se sobrepasa estimulando a mayor frecuencia.

En cuanto a la segunda, Langer y col. (1975), en su trabajo con bazo perfundido de gato, sostienen que los receptores presinápticos  $\alpha$  actuarían regulando la disponibilidad de los iones calcio necesarios para el acople estímulo-secretorio, y que a altas frecuencias de estimulación los receptores presinápticos  $\alpha$  perderían la propiedad regulatoria por la entrada tan augmentada de iones calcio.

Similarmente, Wakade y Wakade (1982), trabajando con corazón de cobayo perfundido, encuentran que el mecanismo de retroalimentación negativo que controla la neurotransmisión simpática, opera sobre un ancho rango de actividad neuronal, pero sin embargo, la efectividad puede declinar con el aumento de la frecuencia de estimulación.

En apoyo de estas dos hipótesis, están nuestros resultados de estimulación a baja frecuencia en presencia de fenoxibenzamina. A una frecuencia de estimulación en que no se obtiene el máximo de activación de TH (control), la presencia del bloqueante en concentración  $2.9 \times 10^{-6}$  M, produce un aumento significativo de la actividad de la enzima.

#### Efecto de la fenoxibenzamina sobre tejidos deplecionados de noradrenalina con reserpina

Cuando estimulamos a 20 Hz en presencia de fenoxibenzamina  $2.9 \times 10^{-6}$  M, tejidos que previamente habían sido deplecionados del neurotransmisor por reserpina, no se vio la activación de la enzima con respecto a las membranas no estimuladas. En este caso, como en el grupo experimental de las membranas solamente reserpinizadas, el valor basal de la actividad de la enzima ya era muy

alto. Este resultado lo interpretamos en la misma forma que el obtenido con tejidos reserpinizados, ya que la fenoxibenzamina no afectó el valor basal de la enzima en condiciones de reserpinización.

Por otra parte, se sabe que la operatividad del mecanismo de retroalimentación negativo para la liberación de la NA requiere un umbral de concentración del transmisor liberado por los impulsos nerviosos al espacio sináptico (Langer, 1974). Cuando la NA endógena de los depósitos se depleta, la efectividad de la fenoxibenzamina para aumentar la liberación de NA-<sup>3</sup>H durante la estimulación nerviosa, se reduce considerablemente (Enero y Langer, 1973). Similares resultados obtuvieron Cubeddu y Weiner (1975) en bazo perfundido de gato, quienes midieron la liberación de DβH producida por estimulación nerviosa. El pretratamiento con reserpina depleta completamente los depósitos de NA endógena sin afectar los niveles de DβH en el bazo de gato. Mientras la fenoxibenzamina aumenta 4 veces la liberación de DβH producida por estimulación nerviosa en el bazo no tratado (cuando se libera NA), la droga falla en aumentar la liberación provocada por estímulo de DβH, cuando los depósitos de NA están depletados por tratamiento con reserpina. Por lo tanto, la habilidad de un antagonista α adrenérgico de aumentar la liberación de NA provocada por estímulo nervioso depende de la posibilidad de que el neurotransmisor que se libera desde los terminales nerviosos, active los receptores α adrenérgicos inhibitorios.

## 2. Acción de agonistas α adrenérgicos

La magnitud de la reducción de la liberación de NA provocada por estímulo

mulo nervioso con agonistas  $\alpha$  adrenérgicos es más pronunciada a frecuencias bajas de estimulación. Ya ha sido demostrado que los agonistas  $\alpha$  adrenérgicos fallan en reducir la salida de NA producida por altas frecuencias de estimulación. Armstrong y Boura (1973), trabajando con ratas demostraron que la taquicardia producida por estimulación nerviosa cardíaca preganglionar, era disminuída por clonidina hasta 10 ug/kg y que esta reducción era inversamente proporcional a la frecuencia de estimulación. Hasta ahora en todos los tejidos periféricos explorados, están presentes los receptores presinápticos  $\alpha$  adrenérgicos inhibitorios, salvo en las arterias renales de vaca que no han podido ser demostrados (Kalsner y Chan, 1980).

Como hemos dicho para la acción de los bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos sobre los receptores presinápticos  $\alpha$ , la falta de acción de los primeros cuando se estimula a altas frecuencias se debería a una pérdida de la facultad regulatoria de los receptores  $\alpha$  presinápticos provocada por la gran disponibilidad de calcio. En presencia de concentraciones bajas de calcio externo ( $2.6 \times 10^{-4}$  M), tanto el bloqueo como la activación de los receptores  $\alpha$  presinápticos, se vuelven nuevamente efectivos para aumentar o disminuir la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso (Langer y col., 1975).

En nuestro grupo experimental, la presencia de clonidina en el medio donde se realizó la estimulación a 5 Hz de frecuencia, produjo una activación de la TH de aproximadamente la tercera parte de la que produjo la misma frecuencia en los tejidos sin clonidina. Esta relación de 1 a 3 se produjo también en la liberación del neurotransmisor en las mismas condiciones experimentales.

Por lo tanto, en nuestra preparación tanto los agonistas como los anta

gonistas  $\alpha$  adrenérgicos actuarían regulando la actividad de la TH a través de los receptores presinápticos  $\alpha$ , al menos a bajas frecuencias de estimulación, que son las fisiológicas.

### 3. Acción de agonistas y antagonistas $\beta$ adrenérgicos

Mientras el mecanismo de retroalimentación negativo mediado por los receptores presinápticos  $\alpha$  se realizaría a través de la disponibilidad de calcio, los receptores presinápticos  $\beta$  que median la retroalimentación positiva, parecen estar ligados a la activación de una adenilatociclasa neuronal (Langer y col., 1975).

Estos receptores  $\beta$ , cuya activación produce un incremento en la liberación del neurotransmisor, trabajan sólo a bajas frecuencias de estimulación y han podido ser demostrados en numerosos tejidos periféricos: aurículas de cobayo, aorta torácica y bazo perfundido de gato, glándula pineal y vena porta de rata, pero aún no han podido ser demostrados en áreas del sistema nervioso central, que contienen terminales noradrenérgicos (Langer, 1980).

En nuestra preparación no hemos podido detectar una variación en la activación de la TH por estímulo nervioso en presencia de un agonista ni de un bloqueante  $\beta$  adrenérgico, lo cual según nuestra hipótesis, se debe a que no se produjo variación en la liberación de NA cuando se estimuló en presencia de agentes  $\beta$  adrenérgicos con respecto a la liberación en condiciones normales.

En nuestra preparación, la membrana nictitante de gato, no se ha podido demostrar una acción presináptica de antagonistas  $\beta$  adrenérgicos (Dra. Enero,

comunicación personal).

Esta falta de mecanismo presináptico no es extraña ya que no ha sido posible demostrarlo en todos los tejidos periféricos. Por otra parte, en la membrana nictitante, los receptores  $\beta$  que producen relajación (Trendelenburg, 1974), son escasos y por lo tanto, podría carecer del mecanismo presináptico facilitatorio así como se ha demostrado que las arterias renales de vacuno carecen de receptores regulatorios  $\alpha$  presinápticos (Kalsner y Chang, 1980).

Por otro lado, es posible que los receptores  $\beta$  presinápticos facilitatorios puedan ser activados por concentraciones muy bajas de A circulante, para estimular la liberación de NA (Stjärne y Brundin, 1975; Guimarães y col., 1978; Dahlof y col., 1978; Rand y col., 1979).

#### 4. Acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa

Además de proponerse el AMPc como responsable de la inducción de la TH producida por stress (Guidotti y col., 1973), es probable que también participe en la regulación de la misma a tiempos cortos, tanto en el sistema nervioso periférico (Keen y McLean, 1974) como en el sistema nervioso central (Roth y col., 1975). Como ya dijimos, Rubio (1977), demostró que tanto el ganglio cervical superior como la membrana nictitante de gato, incubados durante 2 horas con db AMPc, aumentaban la hidroxilación de la tirosina en el órgano intacto. Por otra parte, la actividad total de la TH en el homogenato de los tejidos en presencia de concentraciones saturantes de sustrato y cofactor, no fue modificada. Además, esta hidroxilación no fue bloqueada por inhibidores de la síntesis proteica, con lo cual demostró que era una activación y no una

inducción de la enzima.

Es por estos motivos que, en nuestra preparación, tratamos de incrementar los niveles de AMPc neuronales inhibiendo la fosfodiesterasa que provoca su destrucción. Al no encontrar nosotros activación de la TH más allá de la provocada por la sola estimulación, condiciones control, ni aún cuando estimulamos a baja frecuencia, 1 Hz, podemos suponer o bien que los niveles alcanzados por el AMPc al bloquear su destrucción no son suficientes para alterar la actividad de la enzima durante el tiempo que se incubó, o que es condición necesaria incubar directamente con el nucleótido cíclico.

E- Relación entre liberación de noradrenalina-<sup>3</sup>H y actividad de TH

La marcación de los depósitos endógenos de NA de los terminales nerviosos adrenérgicos con NA radiactiva, ha sido demostrada que es homogénea si se deja transcurrir suficiente tiempo para su distribución interna y con un prolongado lavado que asegura la eliminación de la misma de los sitios extraneuronales. Como ya dijimos, Langer y Vogt (1971), demostraron que la actividad específica de la NA del tejido y de la NA liberada estimulando la membrana nictitante de gato, no eran significativamente diferentes. Con estos experimentos demostraron que el período prolongado de incubación y lavado que emplearon (30 min de incubación con 10 uCi/ml y 90 min de lavado), produjeron una casi homogénea marcación dentro de los nervios simpáticos.

Esta demostración descartó la suposición que se tenía de que la marcación era preferentemente de las vesículas ubicadas en los sitios más cercanos a la membrana citoplasmática a través de la cual se realiza la captación por un proceso activo (Chidsen y Harrison, 1963; Fischer y Iversen, 1966, ref. en Iversen, 1967 a).

La marcación radiactiva de los depósitos de NA es la herramienta utilizada por todos los investigadores a fin de medir la liberación del neurotransmisor adrenérgico, ya sea espontánea o inducida por drogas o estímulo eléctrico ante la imposibilidad de medir tan pequeñas cantidades de NA endógena que se liberan al medio de incubación por un órgano aislado.

En nuestro caso, los experimentos de liberación con NA-<sup>3</sup>H fueron hechos previa marcación de los depósitos en condiciones exactamente iguales para todos los grupos experimentales (30 min de incubación y 120 min de lavado) de

manera que el  $^3\text{H}$  liberado representa proporcionalmente a toda la NA endógena liberada y esta proporción es aproximadamente la misma en todos los experimentos. Por lo tanto, los resultados se expresan como liberación fraccional por estímulo, que es la parte de  $^3\text{H}$  liberado por pulso con respecto al total que posee el tejido en ese momento, el que es comparable en todos los experimentos llevados a cabo en las mismas condiciones.

Por otra parte, lo que llamamos liberación fraccional por estímulo, es el total de  $^3\text{H}$  que, como vimos en los gráficos, no está formado sólo por NA- $^3\text{H}$  sino que contribuyen todos los metabolitos en mayor o menor cantidad. Esta es por lo tanto una aproximación ya que cuando decimos que la activación de la TH sería proporcional a la liberación por estímulo nervioso, nos estamos refiriendo a la liberación del neurotransmisor, ya que éste es el que se libera por exocitosis, los metabolitos provienen de la NA- $^3\text{H}$  recaptada que es metabolizada y sale espontáneamente por difusión.

No obstante esta limitación, en los grupos experimentales en que hemos medido ambos parámetros, liberación de  $^3\text{H}$  por estímulo nervioso y en las mismas condiciones experimentales activación de la TH, la representación gráfica de las relaciones entre los mismos nos dio una recta con un valor de regresión significativa. Este resultado apoyaría nuestra hipótesis de que la activación de la TH es proporcional a la liberación por estímulo nervioso y como ésta es modulada por los receptores presinápticos  $\alpha$  adrenérgicos, éstos receptores modularían también la actividad de la TH.

### XII- Conclusiones

La estimulación nerviosa postganglionar intermitente de la membrana nictitante de gato produce aumento de la actividad de la enzima TH durante el período posterior a la estimulación. Este aumento de actividad que persiste por lo menos hasta 1 hora después de terminada la estimulación, depende en su magnitud, en condiciones normales, de los parámetros y programas de estimulación.

En las condiciones óptimas de voltaje y duración de cada pulso (70-80 V, 0.5 mseg), la activación de la enzima es función de la frecuencia de estimulación y no del número total de pulsos, aumentando con el incremento de frecuencia hasta alcanzar un máximo alrededor de 20 Hz (20 pulsos/seg).

Con una intermitencia en la estimulación de 30 seg. por minuto, y los parámetros de estimulación mencionados, la activación que se obtiene es la máxima ya a los 6 min. de estimulación, midiendo la actividad de la enzima inmediatamente después de terminada la misma, ya que no difiere significativamente de la alcanzada estimulando durante 1 hora. Lo que no se sabe es si la persistencia del fenómeno, que se prolonga más allá de 1 hora después de finalizada la estimulación cuando ésta se lleva a cabo durante 1 hora, persiste en la misma forma e intensidad cuando la estimulación se lleva a cabo por períodos tan cortos como 6 min.

Esta activación de la TH por estímulo nervioso, medida después de la estimulación es un fenómeno que se observa sólo en los terminales nerviosos de las neuronas postganglionares que inervan a la membrana nictitante, ya

que la enzima que se encuentra en los cuerpos neuronales de las mismas (ganglio cervical superior) no sufre modificación por estimulación.

Esta estimulación intermitente tan prolongada no produce al final de la misma, depleción detectable de la NA endógena del tejido. Posiblemente la activación de la TH durante el período de postestimulación se produzca para restablecer el nivel del neurotransmisor de algún pequeño compartimiento no detectable pero importante en la regulación de la enzima.

Los iones  $Ca^{++}$ , necesarios para que se produzca la liberación del neurotransmisor por estímulo nervioso, parecen necesarios en concentraciones normales para observar el máximo de activación de la enzima en el período de postestimulación durante el cual se mide la actividad, ya que la medición de la actividad de la enzima en una concentración diez veces menor a la normal produce valores significativamente menores a los medidos en un tejido estimulado en bajo  $Ca^{++}$  y medida la actividad en  $Ca^{++}$  normal.

La administración de reserpina a los animales en una cantidad que depleta completamente los depósitos endógenos del neurotransmisor a las 24 hs, provoca la desaparición del fenómeno de activación de la enzima en el período posterior a la estimulación nerviosa. Esta falta de acción del estímulo nervioso se debe a que la enzima ya está, en condiciones basales (sin estímulo nervioso), activada en forma máxima. Esta activación de la enzima podría haber sido provocada por una pérdida de la inhibición que le causa la NA citoplasmática o más probablemente por un aumento reflejo de la actividad del sistema nervioso simpático por la reserpina, el cual lleva a un aumento de los niveles endógenos de AMPc y éste fuera luego el que produce la activación de la TH.

La exposición del tejido al agente reserpínico Ro 4-1284, inhibe la actividad basal de la enzima a la mitad, esta inhibición es provocada tanto por la NA como por el principal metabolito de la NA producido por el Ro 4-1284, el DOPEG. Tanto el DOPEG como la NA actúan compitiendo con el cofactor el  $\text{DMPH}_4$ , por la enzima. La acción del Ro 4-1284 sobre tejido reserpinizado desaparece ya que no hay neurotransmisor para liberar desde los gránulos al citoplasma para inhibir la enzima, que además ya se encuentra activada al máximo por ser el tejido reserpínizado.

Cuando se inhibe la captación neuronal con cocaína la activación de la TH durante la postestimulación es menor con respecto a los controles (sin cocaína) estimulados a la misma frecuencia. Esta menor activación se debería a que hay más neurotransmisor en la biofase sin metabolizar actuando sobre los receptores presinápticos  $\alpha$ , estos son entonces estimulados y disminuyen la liberación por estímulo nervioso. Esta interpretación está apoyada por los resultados de la liberación fraccional por pulso en presencia de cocaína.

Las drogss que actúan aumentando los niveles citoplasmáticos de neurotransmisor también actúan a nivel de la actividad basal de la enzima y de la actividad en el período de postestimulación. La pargilina que eleva los niveles citoplasmáticos de NA porque inhibe a la MAO, responsable de su metabolismo en la neurona, produce un efecto inhibitorio reducido sobre la actividad basal, del 20 %. El efecto sobre la actividad en el período posterior a la estimulación, disminución de la activación con respecto a los controles no se debería a una menor salida de NA por estímulo nervioso sino a una inhibición parcial de la enzima por la NA recaptada que se acu-

mula en el citoplasma y no se metaboliza por estar inhibida la MAO. Podemos por lo tanto resumir diciendo que: la depleción total del neurotransmisor causa un aumento máximo de la actividad basal de la TH y provoca la desaparición del incremento de actividad por estímulo.

Las drogas que aumentan los niveles citoplasmáticos de neurotransmisor producen ligera inhibición de la actividad basal y una marcada inhibición de la activación que por estímulo nervioso se mide en el período de postestimulación en condiciones control.

En cuanto a la regulación de la TH a través de los receptores presinápticos inhibitorios ( $\alpha$ ) y facilitatorios ( $\beta$ ), sólo hemos podido observar regulación a través de los  $\alpha$  presinápticos y en frecuencias fisiológicas de estimulación.

La activación de los receptores presinápticos  $\alpha$  por clonidina reduce la activación de la TH a 5 Hz, con respecto a los controles, como así también reduce la liberación de neurotransmisor  $^3\text{H}$ . El bloqueo de los mismos receptores por fenoxibenzamina no permite ver mayor activación de la enzima con respecto a los controles estimulando a altas frecuencias, posiblemente porque la enzima ya no puede sobrepasar el nivel de actividad pero sí se observa diferencia significativa a frecuencias fisiológicas.

La activación y bloqueo de los receptores  $\beta$  adrenérgicos no provocaron en nuestra preparación cambios en la actividad de la enzima en el período posterior a la estimulación, como no vimos tampoco acción sobre la misma cuando estimulamos en presencia de un inhibidor de fosfodiesterasa que aumenta los niveles de AMPc.

Estos resultados, apoyados por la recta de regresión que representa

actividad de TH en función de la liberación fraccional de  $^3\text{H}$  por pulso, ind  
carían que en la membrana nictitante de gato la enzima TH se activa por es-  
tímulo nervioso en forma proporcional a la salida de neurotransmisor y como  
esta salida de neurotransmisor es regulada por el mecanismo presináptico in  
hibitorio  $\alpha$ , la enzima puede ser regulada a través de estos receptores, al  
menos en el período posterior a la estimulación nerviosa.

W. A. J.

W. A. J.

XIII- Referencias Bibliográficas

- ADLER-GRASCHINSKY E. and LANGER S.Z., Brit. J. Pharmacol. 53: 43-50, 1975.
- ADLER-GRASCHINSKY E., LANGER S.Z. and RUBIO M.C., J. Pharmacol. Exp. Ther. 180: 286-301, 1972.
- ALBURQUERQUE E.X., SEYAMA I. and NARAHASHI T., J. Pharmacol. Exp. Ther. 184: 308-314, 1973.
- ALOUSI A. and WEINER N., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 56: 1491-1496, 1966.
- AMES M.M., LERNER P. and LOVENBERG W., J. Biol. Chem. 253: 27-31, 1978.
- ARMSTRONG C.M., Q. Rev. Biophys. 7: 179-209, 1974.
- ARMSTRONG C.M. and BOURA A.L.A., Brit. J. Pharmacol. 47: 840-852, 1973.
- AXELROD J., J. Biol. Chem. 237: 1657-1660, 1962.
- AXELROD J. and VESELL E.S., Mol. Pharmacol. 6: 78-84, 1970.
- AXELROD J., WEIL-MALHERBE H. and TOMCHICK R., J. Pharmacol. Exp. Ther. 127: 251-256, 1959.
- BANKS P., Biochem. J. 101: 18C-20C, 1966.
- BANKS P., MAYOR D. and TOMLINSON D.R., J. Physiol. (London) 219: 755-761, 1971.
- BEREMBEIM D.M., WONG D.L., MASOVER S.J. and CIARANELLO R.D., Mol. Pharmacol. 16: 482-490, 1979.

- BERTLER A., FALCK B., OWMAN Ch. and ROSENGRENN E., Pharmacol. Rev. 18, N° 1, Pat. 1: 369-385, 1966.
- BHATNAGAR R.K. and MOORE K.E., J. Pharmacol. Exp. Ther. 180: 265-276, 1972.
- BLASCHKO H., J. Physiol. (London) 96: 50-51 P, 1939.
- BLASCHKO H., HAGEN P. and WELCH A.D., J. Physiol. (London) 129: 27-49, 1956.
- BLOOM F.E., J. Histochem. Cytochem. 27: 333-348, 1973.
- BOURA A.L.A. and GREEN A.F., Brit. J. Pharmacol. 14: 536-548, 1959.
- BRIMIJOIN S., J. Neurobiol. 6: 379-394, 1975.
- BRIMIJOIN S. and MOLINOFF P.B., J. Pharmacol. Exp. Ther. 178: 417-425, 1971.
- BRIMIJOIN S. and WIERMMA M.J., Brain Res. 120: 77-96, 1977.
- BULLOCK T.H. and HAGIWARA S., J. Gen. Physiol. 40: 565-577, 1957.
- BUTCHER L.L., Life Sci. 21: 1207-1226, 1977.
- CANNON W.B. and URIDIL J.E., Am. J. Physiol. 58: 353-354, 1921.
- CARLSSON A., HILLARP N.Å. and WALDECK B., Acta Physiol. Scand. 59: Suppl. 215, 1963.
- CAVERO I., DENNIS T., LEFEVRE-BORG F., PERROT P., ROACH A.G. and SCATTON B. Brit. J. Pharmacol. 67: 283-292, 1979.
- CELUCH S.M., DUBOCOVICH M.L. and LANGER S.Z., Brit. J. Pharmacol. 63: 97-108, 1978.

- CIARANELLO R.D., WOOTEN G.F. and AXELROD J., J. Biol. Chem. 250: 3204-3211, 1975.
- CLOUTIER G. and WEINER N., J. Pharmacol. Exp. Ther. 186: 75-85, 1973.
- COYLE J.T. and AXELROD J., J. Neurochem. 19: 449-459, 1972.
- CRAINE J.E., DANIELS G.H. and KAUFMAN S., J. Biol. Chem. 248: 7838-7844, 1973.
- CROUT J.R., MUSKUS A.J. and TRENDELENBURG U., Brit. J. Pharmac. Chemother. 18: 600-611, 1962.
- CUBEDDU L.X., BARNES E.M., LANGER S.Z. and WEINER N., J. Pharmacol. Exp. Ther. 190: 431-450, 1974.
- CUBEDDU L.X. and WEINER N., J. Pharmacol. Exp. Ther. 192: 1-14, 1975.
- CUENOD M. and SCHONBACH J., J. Neurochem. 18: 809-816, 1971.
- CHATZKEL S., ZIMMERMAN J. and BERG A., Brain Res. 80: 523-526, 1974.
- DAHLÖF C., LJUNG B. and ÅBLAD B., Eur. J. Pharmacol. 50: 75-78, 1978.
- DAHLÖF C., LJUNG B. and ÅBLAD B., Acta Physiol. Scand. 108: 39-47, 1980.
- DAHLSTRÖM A., In: New aspects of storage and release mechanisms of catecholamines, ed. by Schumann and Kroneberg, pp 20-36, Springer-Verlag, Berlin, 1970.
- DAHLSTRÖM A. and HAGGENDAL J., Acta Physiol. Scand. 67: 278-288, 1966.

- DAIRMAN W. and UDENFRIEND S., *Mol. Pharmacol.* 6: 350-356, 1970.
- DE LORENZO R.J. and FREEDMAN S.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1036-1043, 1977.
- DEMIS D.J., BLASCHKO H. and WELCH A.D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 113: 14-15, 1955.
- DE POTTER W.P., CHUBB I.W., PUT A. and DE SCHIAEPDRYVER A.F., *Arch. int. Pharmacodyn. Théor.* 193: 191-197, 1971.
- DE ROBERTIS E., *Prog. Brain Res.* 8: 118-136, 1964.
- DE ROBERTIS E. and FRANCHI C.M., *J. Exp. Med.* 98: 269-276, 1953.
- DE ROBERTIS E. and PELLEGRINO DE IRALDI A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10: 361-372, 1961.
- DRAIN D.J., HARLINGTON M., LAZARE R. and POULTER G.A., *Life Sci.* 1: 93-97, 1962.
- DRAPEAU P. and BLAUSTEIN M.P., In *Trend in Autonomic Pharmacology*, Vol. 2, pag. 117-130, 1982.
- DROZ B., KOENIG H.L. and DI GIAMBERARDINO L., *Brain Res.* 60: 93-127, 1973.
- DUBOCOVICH M.L. and LANGER S.Z., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 278: 179-194, 1973.
- DUBOCOVICH M.L. and LANGER S.Z., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198: 83-101, 1976.

DUBOCOVICH M.L. and LANGER S.Z., J. Pharmacol. Exp. Ther. 216: 162-171, 1981.

DUCH D.S., VIVEROS O.H. and KIRSHNER N., Biochem. Pharmacol. 17: 255-264, 1968.

ECCLES J.C., The physiology of synapses. Springer-Verlag, Berlin, Academic Press, Inc., New York, 1964.

ECCLES J.C., The understanding of the brain. Mc Graw-Hill Co., New York, 1973.

ELLIOTT T.R., J. Physiol. (London) 32: 401-467, 1905.

ENERO M.A. and LANGER S.Z., Brit. J. Pharmacol. 49: 214-225, 1973.

ENERO M.A., LANGER S.Z., ROTHLIN R.P. and STEFANO F.J.E., Brit. J. Pharmacol. 44: 672-688, 1972.

VON EULER U.S., Acta Physiol. Scand. 12: 73-97, 1946.

VON EULER U.S., Ergebn. Physiol. 46: 261-307, 1950.

VON EULER U.S., In Catecholamines (Blaschko H. and Muscholl E. eds.). Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. 33, Springer-Verlag, Berlin, pp. 186-230, 1972.

VON EULER U.S. and LISHAJKO F., Acta Physiol. Scand. 74: 501-506, 1968.

FALCK B., Acta Physiol. Scand. 56: Suppl. 197, 1962.

FARAH M.B. and LANGER S.Z., Brit. J. Pharmacol. 52: 549-557, 1974.

FELLMAN J.H., *Enzimología* 20: 366-375, 1959.

FOLKOW B., HÄGGENDAL J. and LISANDER B., *Acta Physiol. Scand.* 72, Suppl. 307: 6-38, 1967.

GEFFEN L.B., LIVETT B.G. and RUSH R.A., *J. Physiol. (London)* 204: 593-605, 1969.

GEFFEN L.B. and RUSH R.A., *J. Neurochem.* 15: 925-930, 1968.

GEWIRTZ G.P. and KOPIN I.J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175: 514-520, 1970.

GLOWINSKI J., KOPIN I.J. and AXELROD J., *J. Neurochem.* 12: 25-30, 1965.

GOLDSTEIN M., ANAGNOSTE B., LAUBER E., Mc KERECHAN M.R., *Life Sci.* 3: 763-767, 1964.

GOLDSTEIN M., EPSTEIN B., BRONAUGH R.L. and ROBERGE C., In *Chemical Tools in catecholamine research*, eds. Almgren O., Carlsson A. and Engel J. (North Holland, Amsterdam, Netherlands) Vol. 2, pp 257-269, 1975.

GOLDSTEIN M. and WEISS Z., *Life Sci.* 4: 261-264, 1965.

GOODALL Mc C. and KIRSHNER N., *Circulation* 17: 366-371, 1958.

GORDON R., SPECTOR S., SJOERDSMA A. and UDENFRIEND S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 153: 440-447, 1966.

GRAEFE K.H., STEFANO F.J.E. and LANGER S.Z., *Biochem. Pharmacol.* 22: 1147-1160, 1973.

GRUNDFEST H., *Physiol. Rev.* 37: 337-361, 1957.

GRUNDFEST H., In: The nervous system, Vol. I (Tower D.B., ed.) Raven Press, New York, pp 153-164, 1975.

GUIDOTTI A., ZIVKOVIC B., PFEIFFER R. and COSTA E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278: 195-206, 1973.

GUIMARAES S., BRANDAO F. and PAIVA M.Q., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 305: 185-188, 1978.

GULDBERG H.C. and MARSDEN C.A., Pharmacol. Rev. 27: 135-206, 1975.

GUTMAN Y. and BOONYAVIROF J.P., J. Neural Transm. 40: 245-252, 1977.

HAGIWARA S. and TASAKI I., J. Physiol. (London) 143: 114-137, 1958.

HAMBERGER B., MALMFORS T., NORBERG K.A. and SACHS C., Biochem. Pharmacol. 13: 841-844, 1964.

HARRIS J.E., BALDESSARINI R.J., MORGENROTH V.H., III and ROTH R.H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 789-793, 1975.

HARTMAN B.K., MOLINOFF P.B. and UDENFRIEND S., Pharmacologist 12: 470, 1970.

HERTTING G. and AXELROD J., Nature, Lond. 192: 172-173, 1961.

HERTTING G., POTTER L.T. and AXELROD J., J. Pharmacol. Exp. Ther. 136: 289-292, 1962.

HILLARP N.A., Acta Physiol. Scand. 42: 321-332, 1958.

HODGKIN A.L. and HUXLEY A.F., J. Physiol. (London) 117: 500-544, 1952.

HOFFMAN A.R., CIARANELLO R.D. and AXELROD J., *Biochem. Pharmacol.* 24: 544-546, 1975.

HOLTZ P., *Pharmacol. Rev.* 11: 317-329, 1959.

HOWELL J.I. and LUCY J.A., *FEBS Lett.* 4: 147-150, 1969.

IKEDA M., FAHIEN L.A. and UDENFRIEND S., *J. Biol. Chem.* 241: 4452-4456, 1966.

IKEDA M., LEVITT M. and UDENFRIEND S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18: 482-488, 1965.

IVERSEN L.L., In "The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves", Cambridge University Press, Cap. 7, pag. 108-146, 1967 a.

IVERSEN L.L., In "The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves", University Press, Cambridge, Cap. 8, pag. 147-198, 1967 b.

IVERSEN L.L., GLOWINSKY J. and AXELROD J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 151: 273-284, 1966.

JAIM-ETCHEVERRY G.I. and ZIEHER L.M., In *Advances in Cytopharmacology*, Vol. 1, F. Clementi and B. Ceccarelli, eds. pag. 343-361, Raven Press, New York, 1971.

JOH T.H. and GOLDSTEIN M., *Mol. Pharmacol.* 9: 117-129, 1973.

JOH T.H., PARK D.H. and REIS D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 4744-4748, 1978.

- JOHNSON R.G., CARLSON N.J. and SCARPA A., J. Biol. Chem. 253: 1512-1521, 1978.
- KALSNER S., Brit. J. Pharmacol. 66: 343-349, 1979.
- KALSNER S. and CHAN C.C., Can. J. Physiol. Pharmacol. 58: 504-512, 1980.
- KAO C.Y., Pharmacol. Rev. 18: 997-1049, 1966.
- KAUFMAN S. and FRIEDMAN S., Pharmacol. Rev. 17: 71-100, 1965.
- KEEN P., Mc LEAN W.G., J. Neurochem. 22: 5-10, 1974.
- KINDWALL E.P. and WEINER N., J. Neurochem. 13: 1523-1531, 1966.
- KIRPEKAR S.M., FURCHGOTT R.F., WAKADE A.R. and PRAT J.C., J. Pharmacol. Exp. Ther. 187: 529-538, 1973.
- KIRSHNER N., J. Biol. Chem. 226: 821-825, 1957.
- KNOLL J., In "Enzyme inhibitors as drugs" (Ed. M. Sandler). The Macmillan Press Ltd., pp 151-175, 1980.
- KUCZENSKI R., J. Biol. Chem. 248: 2261-2265, 1973.
- KUCZENSKI R.T. and MANDELL A.J., J. Biol. Chem. 247: 3114-3122, 1972.
- KVETNASKY R., WEISE V.K. and KOPIN I.J., Endocrinology 87: 744-749, 1970.
- LAGERGRANTZ M., FRIED G. and DAHLIN I., Acta Physiol. Scand. 94: 136-138, 1975.
- LANGER S.Z., Biochem. Pharmacol. 23: 1793-1800, 1974.

LANGER S.Z., Brit. J. Pharmacol. 60: 481-497, 1977.

LANGER S.Z., Pharmacol. Rev. 32: 337-362, 1980.

LANGER S.Z., ADLER-GRASCHINSKY E. and ENERO M.A., Abstr. Jerusalem Satellite Symposia. XXVI<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences, p. 81, Israel Physiological and Pharmacological Society, Jerusalem, 1974.

LANGER S.Z., ADLER-GRASCHINSKY E., ENERO M.A. and STEFANO F.J.F., Proceedings of the XXV<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences, Munich, p. 335, The German Physiological Society, Munich, 1971.

LANGER S.Z., ADLER-GRASCHINSKY E. and GIORGI O., Nature (London) 265: 648-650, 1977.

LANGER S.Z. and DUBOCOVICH M.L., J. Pharmacol. Exp. Ther. 216: 162-171, 1981.

LANGER S.Z., DUBOCOVICH M.L. and CELUCH S.M., In "Chemical tools in catecholamine research", Vol. II pag. 183-190, 1975. Eds. O. Almgren, A. Carlsson and J. Engel, North-Holland Publishing Company.

LANGER S.Z. and ENERO M.A., J. Pharmacol. Exp. Ther. 191: 431-443, 1974.

LANGER S.Z. and VOGT M., J. Physiol. 214: 159-171, 1971.

LAVERTY R. and TAYLOR K.M., Analyt. Biochem. 22: 269-279, 1968.

LERNER P., AMES M.M. and LOVENBERG W., Mol. Pharmacol. 13: 44-49, 1977.

LEVI-MONTALCINI R. and ANGELETTI P.V., Physiol. Rev. 48: 534-569, 1968.

LEVIN E.Y. and KAUFMAN S., J. Biol. Chem. 236: 2043-2049, 1961.

- LEVITT M., SPECTOR S., SJOERDSMA A. and UDENFRIEND S., J. Pharmacol. Exp. Ther. 148: 1-8, 1965.
- LEW M.J. and ANGUS J.A., J. Pharmacol. Exp. Ther. 223: 540-546, 1982.
- LOEWI O., Pflügers Arch. ges. Physiol. 189: 239-242, 1921.
- LOKHANDWALA M.F. and BUCKLEY J.P., Eur. J. Pharmacol. 40: 183-186, 1976.
- LOVENBERG W., BRUCKWICK E.A. and HANBAUER I., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 2955-2958, 1975.
- LOVENBERG W., WEISSBACH H. and UDENFRIEND S., J. Biol. Chem. 237: 89-93, 1962.
- LUCY J.A., In Lysosomes in Biology and Pathology, pp. 313-341. Ed. Dingle J.T. and Fell H., Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1969.
- LUCHELLI-FORTIS M.A. and LANGER S.Z., J. Pharmacol. Exp. Ther. 188: 640-653, 1974.
- LLOYD T. and KAUFMAN S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 907-913, 1975.
- LLOYD T. and WEINER N., Mol. Pharmacol. 7: 569-580, 1971.
- MAJEWSKI H., HEDLER L. and STARKE K., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321: 20-27, 1982.
- MAYER S.E., In: Goodman and Gillman's: "The pharmacological basis of therapeutics", 6<sup>th</sup> edition. Cap. IV, pag. 76, 1980.
- Mc GEER P.L., BAGCHI S.P. and Mc GEER E.G., Life Sci. 4: 1859-1867, 1965.

- Mc GEER P.L. and Mc GEER E.G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17: 502-507, 1964.
- MOLINOFF P.B. and AXELROD J., *Ann. Rev. Biochem.* 40: 465-500, 1971.
- MOLINOFF P.B., BRIMIJOIN W.S., WEINSHILBOUM R.M. and AXELROD J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66: 453-458, 1970.
- MORGENROTH V.H., III, BOADLE-BIBER M. and ROTH R.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4283-4287, 1974.
- MORGENROTH V.H., III, BOADLE-BIBER M.C. and ROTH R.H., *Mol. Pharmacol.* 11: 427-435, 1975 a.
- MORGENROTH V.H., III, HEGSTRAND L.R., ROTH R.H. and GREENGARD P., *J. Biol. Chem.* 250: 1946-1948, 1975 b.
- MORRE M. and WURTMAN R.J., *Life Sci.* 28: 65-75, 1981.
- MUELLER R.A., THOENEN H. and AXELROD J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 169: 74-79, 1969 a.
- MUELLER R.A., THOENEN H. and AXELROD J., *Science* 163: 468-469, 1969 b.
- MUELLER R.A., THOENEN H. and AXELROD J., *Endocrinology* 86: 751-755, 1970 a.
- MUELLER R.A., THOENEN H. and AXELROD J., *Eur. J. Pharmacol.* 10: 51-56, 1970 b.
- MUSACCHIO J.M., *Biochim. Biophys. Acta* 191: 485-487, 1969.
- MUSACCHIO J.M. and WURZBURGER R.J., *Fed. Proc.* 28: 287, 1969.

- RAAB W. and HUMPREYS R.J., J. Pharmacol. Exp. Ther. 89: 64-76, 1947.
- RAND M.J., MAJEWSKI H., McCULLOCH M.W. and STORY D.F., In "Presynaptic receptors", ed. by S.Z. Langer, K. Starke and M.L. Dubocovich, pp. 263-269, Pergamon Press, Oxford, 1979.
- RAND M.J., STORY D.F., ALLEN G.S., GLOVER A.B. and McCULLOCH M.W., In "Frontiers in Catecholamine Research", ed. by E. Usdin and S.H. Snyder, pp. 579-581, Pergamon Press, New York, 1973.
- RANG H.P., Q. Rev. Biophys. 7: 283-397, 1975.
- RENAUD L.P., In "Psychopharmacology: A generation of progress", Raven Press, New York, pag. 423-424, 1978.
- ROSS S.B., WEINSHILBOUM R., MOLINOFF P.B., VESELL E.S. and AXELROD J., Mol. Pharmacol. 8: 50-58, 1972.
- ROTH R.H., MORGENROTH V.H., III, and SALZMAN P.M., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 289: 327-343, 1975.
- ROTH R.H., SALZMAN P.M. and MORGENROTH V.H., III, Biochem. Pharmacol. 23: 2779-2784, 1974.
- ROTH R.H., STJÄRNE L. and VON EULER U.S., J. Pharmacol. Exp. Ther. 158: 373-377, 1967.
- RUBIO M.C., Gen. Pharmacol. 7: 153-157, 1976.
- RUBIO M.C., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 299: 69-75, 1977.
- RUBIO M.C. and LANGER S.Z., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 280: 315-330, 1973.

- MUSACCHIO J.M., WURZBURGER R.J. and D'ANGELO G.L., *Mol. Pharmacol.* 7: 136-146, 1971.
- NAGATSU T., LEVITT M. and UDENFRIEND S., *J. Biol. Chem.* 239: 2910-2917, 1964.
- NELSON D.L. and MOLINOFF P.B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196: 346-359, 1976.
- NORN S. and SHORE P.A., *Biochem. Pharmacol.* 20: 2133-2135, 1971.
- O'DEA R.F. and ZATZ M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 3398-3402, 1976.
- OESCH F., OTTEN U. and THOENEN H., *J. Neurochem.* 20: 1691-1706, 1973.
- OTTEN U., PARAVICINI U., OESCH F. and THOENEN H., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 280: 117-127, 1973.
- PATRICK R.L. and KIRSHNER N., *Mol. Pharmacol.* 7: 87-96, 1970.
- PELAYO F., DUBOCOVICH M.L. and LANGER S.Z., *Nature (London)* 274: 76-78, 1978.
- PETRACK B., SHEPPY F. and FETZER V., *J. Biol. Chem.* 243: 743-748, 1968.
- PFEFFER R.I., MOSIMANN W. and WEINER N., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193: 533-548, 1975.
- PFENNINGER K.H., *Prog. Histochem. Cytochem.* 5: 1-83, 1973.
- POTTER L.T. and AXELROD J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 142: 299-305, 1963.
- POTTER L.T., COOPER T., WILLMAN V.S. and WOLFE D.E., *Circ. Res.* 16: 468-481, 1965.

SCHMITT F.O., DEV P. and SMITH B.H., *Science* 193: 114-120, 1976.

SCHWAB M.E. and THOENEN H., *Brain Res.* 105: 213-227, 1976.

SHANES A.M., *Pharmacol. Rev.* 10: 59-164, 1958.

SHIMAN R., AKINO M. and KAUFMAN S., *J. Biol. Chem.* 246: 1330-1340, 1971.

SKOLNICK P., STALVEN L.P., DALY J.W., HOYLER E. and DAVIS J.N., *Eur. J. Pharmacol.* 47: 201-210, 1978.

SMITH A.D. and WINKLER H., In "Catecholamines" (Blaschko H. and Muscholl E. eds.). *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, Vol. 33, Springer-Verlag, Berlin, pp. 538-617, 1972.

SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G., *Statistical Methods*, 6<sup>th</sup> ed. Ames: The Iowa State University Press, 1967.

SOURKES T.L., *Pharmacol. Rev.* 18: 53-60, 1966.

SPECTOR S., SJOERDSMA A. and UDENFRIEND S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 147: 86-95, 1965.

STARKE K., *Naturwissenschaften* 58: 420, 1971.

STARKE K., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 274: 18-45, 1972.

STARKE K., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* Vol. 77: pag. 1-124, 1977  
(by Springer-Verlag).

STARKE K., MONTEL H. and SCHUMANN H.J., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 270: 210-214, 1971.

STJÄRNE L., Acta Physiol. Scand. 62: Suppl. 228, 1964.

STJÄRNE L., Pharmacol. Rev. 18: 425-432, 1966.

STJÄRNE L., In "Catecholamines" (Blaschko H. and Muscholl E. eds.).  
Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. 33, Springer-Verlag,  
Berlin, pp. 231-269, 1972.

STJÄRNE L., Acta Physiol. Scand. 90: 286-288, 1974.

STJÄRNE L., Neuroscience 3: 1147-1155, 1978.

STJÄRNE L. and BRUNDIN J., Acta Physiol. Scand. 94: 139-141, 1975.

STJÄRNE L. and BRUNDIN J., Acta Physiol. Scand. 97: 88-93, 1976.

STJÄRNE L., HEDQVIST P. and LAGERCRANTZ H., Biochem. Pharmacol. 19:  
1147-1158, 1970.

STJÄRNE L. and LISHAJKO F., Biochem. Pharmacol. 16: 1719-1728, 1967.

THOA N.B., WOOTEN G.F., AXELROD J. and KOPIN I.J., Mol. Pharmacol. 11:  
10-18, 1975.

THOENEN H., Nature (London) 228: 861-862, 1970.

THOENEN H., In "Catecholamines" (Blaschko H. and Muscholl E. eds.).  
Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. 33, Springer-Verlag,  
Berlin, pag. 813-344, 1972.

THOENEN H., MUELLER R.A. and AXELROD J., Nature (London) 221: 1264, 1969 a.

THOENEN H., MUELLER R.A. and AXELROD J., J. Pharmacol. Exp. Ther. 169: 249-  
254, 1969 b.

THURESON-KLEIN A., KLEIN R.L. and STJÄRNE L.L., In "Catecholamines: Basic and Clinical frontiers", Vol. I, pag. 262-264. Edited by Usdin, Kopin and Barchas. Pergamon Press, 1979.

TIPTON K.F., In "Enzymatic basis of detoxication", Vol. I chapter 17, pp. 355-370, 1980.

TRENDELENBURG U., Pharmacol. Rev. 15: 225-276, 1963.

TRENDELENBURG U., In "Catecholamines" (Blaschko H. and Muscholl E. eds), Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. 33, Springer-Verlag, Berlin, pag. 336-362, 1972.

TRENDELENBURG U., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285: 375-393, 1974.

TRENDELENBURG U., Trends in Pharmacol. Sci. Vol. 1: 4-6, 1979.

TRENDELENBURG U., BÖNISCH H., GRAEFE K.H. and HENSELING M., Pharmacol. Rev. 31: 179-203, 1980.

UDENFRIEND S., Pharmacol. Rev. 18: 425-432, 1966.

UDENFRIEND S., ZALTZMAN-NIRENBERG P. and NAGATSU T., Biochem. Pharmacol. 14: 837-845, 1965.

VAN ORDEN III L.S., BURKE J.P., REDICK J.A., RYBARCZYK K.E., VAN ORDEN D.E., BAKER H.A. and HARTMAN B.K., Neuropharmacology 16: 129-133, 1977.

VULLIET P.R., LANGAN T.A. and WEINER N., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 92-96, 1980.

WAKADE A.R. and WAKADE T.D., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321: 77-79, 1982.

WALLACE E.R., KRANTZ M.J. and LOVENBERG W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2253-2255, 1973.

WAYMIRE J.C., BJUR R. and WEINER N., Analyt. Biochem. 43: 588-600, 1971.

WEINER N., In Goodman and Gilman's "The pharmacological basis of therapeutics" (Macmillan Publishing Co., Inc., New York), Cap. 8, pag. 138-175, 1980 a.

WEINER N., In Goodman and Gilman's "The pharmacological basis of therapeutics", 6<sup>th</sup> edition. Macmillan Publishing Co., Inc., New York, pag. 198-201, 1980 b.

WEINER N. and BJUR R., In Monoamine oxidases: New vistas . E. Costa and M. Sandler, Eds., Vol. 5 "Advances in Biochemical Psychopharmacology", Raven Press, New York, pp. 409-419, 1972.

WEINER N., CLOUTIER G., BJUR R. and PFEFFER R.I., Pharmacol. Rev. 24: 203-221, 1972.

WEINER N., LEE F.L., BARNES E. and DREYER E., In "Structure and function of monoamine enzymes", pp. 109-148, Marcel Dekker, Inc., New York, 1977.

WEINER N., LEE F.L., DREYER E. and BARNES E., Life Sci. 22: 1197-1216, 1978.

WEINER N. and RABADJIJA M., J. Pharmacol. Exp. Ther. 160: 61-71, 1968 a.

WEINER N. and RABADJIJA M., J. Pharmacol. Exp. Ther. 164: 103-114, 1968 b.

WEINER N., WAYMIRE J.C. and SCHNEIDER F.H., *Acta Cient. Venez.* 22:  
Suppl. 2, 179-183, 1971.

WEINSHILBOUM R.M. and AXELROD J., *Circ. Res.* 28: 307-315, 1971.

WEINSHILBOUM R.M., THOA N.B., JOHNSON D.G., KOPIN I.J. and AXELROD J.,  
*Science* 174: 1349-1351, 1971.

WEINSTOCK M., THOA N.B. and KOPIN I.J., *Eur. J. Pharmacol.* 47: 297-302,  
1978.

WEISS P., In: *Regional chemistry*, ed. by S.S. Kety and J. Elkes, pp. 240-  
242, Pergamon Press, New York, 1961.

WEISS P., In: *The neurosciences: Second Study Program*, ed. by F.O. Schmitt,  
pp. 840-850, Rockefeller University Press, New York, 1970.

WESTFALL T.C., PEACH M.J. and TITERMARY V., *Eur. J. Pharmacol.* 58: 67-  
74, 1979.

WIKBERG J.E.S., *Acta Physiol. Scand.* suppl. 468, pp. 1-99, 1979.

WOLFE D.E., POTTER L.T., RICHARDSON K.C. and AXELROD J., *Science* 138:  
440, 1962.

WOOTEN G.F. and COYLE J.T., *J. Neurochem.* 20: 1361-1371, 1973.

WURZBURGER R.J. and MUSACCHIO J.M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177: 155-  
168, 1971.

YAMAGUCHI N., DE CHAMPLAIN J. and NADEAU R.A., *Circ. Res.* 41: 108-117, 1977.

YOSHIMURA K., J. Biochem. 74: 389-391, 1973.

ZIVKOVIC B., GUIDOTTI A. and COSTA E., Mol. Pharmacol. 10: 727-735,  
1974.