

LIBERACIÓN DE NORADRENALINA POR RESERPINA. II. INTERACCIÓN CON BRETILIO EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA *

S. SÁNCHEZ, M. E. PLANAS, F. G.-VALDECASAS

INTRODUCCIÓN. — Desde hace ya algunos años estudiamos en nuestro Departamento la interacción de la reserpina con distintas sustancias que actúan en la presinapsis adrenérgica (simpaticomiméticos indirectos, inhibidores de la MAO, etc.). El bretilio es un bloqueante de la conducción del impulso nervioso que actúa también a nivel presináptico. Tras su administración se ha descrito en un primer momento un efecto simpaticomimético atribuible a la liberación periférica de catecolaminas de las terminaciones adrenérgicas (BOURA y GREEN, 1965). Este efecto persiste tras la adrenalectomía y el bloqueo ganglionar y por el contrario desaparece tras la administración de bloqueantes adrenérgicos alfa y beta, y además la administración previa de una dosis de reserpina que produzca deplección de catecolaminas disminuye marcadamente la respuesta simpaticomimética en la rata. En un segundo tiempo se produce una inhibición de las respuestas al estímulo de nervios adrenérgicos.

En la comunicación anterior se ha demostrado este efecto simpaticomimético inicial en el bazo de gato perfundido *in situ* seguido de la inhibición del efecto de la reserpina. Dado el interés de estos resultados hemos iniciado el estudio de esta interacción empleando como reactivo farmacológico el conducto deferente de rata. El conducto deferente de rata posee una rica inervación adrenérgica, por lo que su contenido en noradrenalina es elevado. Se trata por tanto de un órgano muy adecuado para poder valorar modificaciones en el contenido de este neurotransmisor.

MATERIAL Y MÉTODOS. — Para determinar el contenido en noradrenalina del conducto deferente de rata, tras las previas administraciones a los distintos lotes de ratas, macho Sprague-Dawley de pesos compren-

* Sesió del dia 31 de gener de 1979.

dados entre 250 ± 10 gr. de las sustancias a ensayar, en este caso: reserpina, 2,5 mg/kg. por vía i. v. y bretilio 10 mg/kg. i. p. bien por separado, o bien juntas, seguimos la técnica que indicamos a continuación:

Transcurrido el tiempo correspondiente tras la administración a cada lote de ratas de la sustancia a ensayar, se sacrifica al animal mediante un golpe en la cabeza, procediendo a continuación a la disección del conducto deferente. Para ello se incide el saco escrotal dejando al descubierto los testículos, que se evierten hacia el exterior, con lo que se visualizan los conductos deferentes de ambos lados.

A continuación se secciona el conducto deferente por sus 2 extremos proximal y distal, con lo que presenta una longitud aproximada de 3-6 cm., y un peso seco de unos 60-90 mg.

Seguidamente, y manteniéndolo siempre en hielo, procedimos a la determinación del contenido en noradrenalina por el método de Chang (1964), que en líneas generales consiste en la extracción de las catecolaminas de los tejidos por medio de butanol, una adsorción simple con alúmina para eliminar las sustancias fluorescentes, no catélicas, y la formación de fluoróforos por acción del yodo. Sin embargo, nosotros y con el propósito de poder comparar los resultados por nosotros obtenidos con los ya obtenidos en este mismo Departamento (PLANAS, Tesis Doctoral), en dicho método bioquímico introducimos también la modificación usada por los anteriores autores, debida a GIACALONE, y que sustituye la alúmina por cloroformo, lo que simplifica el método sin perder precisión, al eliminarse todos los procesos necesarios para ajustar el pH de la alúmina.

Las sustancias empleadas son: Serpasol (Ciba-Geigy) y Tosilato de Bretilio (Gayoso-Wellcome, S. A.). Las soluciones de bretilio se han preparado en suero fisiológico.

En la segunda parte de nuestras experiencias con conducto deferente, hemos utilizado también ratas macho Sprague-Dawley comprendidas entre iguales límites de peso, a las que hemos administrado por vía i. p. 10 mg/kg de bretilio 1 hora antes de ser sacrificadas, después de lo cual les extraímos un conducto deferente y lo colocamos en un baño de órganos, mantenido a una temperatura constante de 31°C y sumergido en líquido nutritivo de Krebs y oxigenado con carbógeno.

RESULTADOS. — En una primera serie de experiencias se ha determinado el contenido en noradrenalina del deferente de rata, expresado en microgramos/gr. de tejido sin administración previa de sustancia alguna, siendo en este caso de 10,78 microgramos/gr., denominándolo valor control.

Seguidamente, y en otra serie de experiencias, se ha procedido a inyectar bretilio, a una concentración de 10 mg/kg., por vía i. p., a

unos lotes de 4 ratas cada uno, sacrificando los animales de los distintos lotes a distintos tiempos: 30 min., 1 hora, 2 horas, 4 horas y 8 horas, determinándose seguidamente el contenido en noradrenalina. Los resultados obtenidos, expresados gráficamente en la figura 1, se recogen en la tabla I.

Conducto deferente de rata

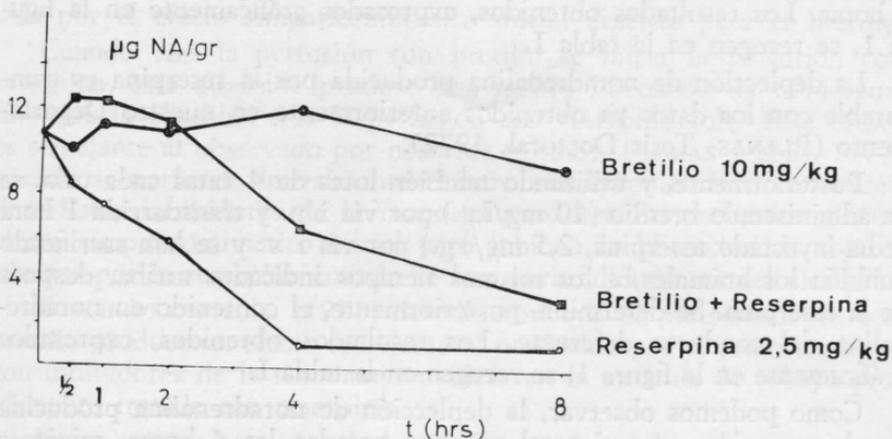


Fig. 1. — Representación gráfica del efecto de bretilio (10 mg/kg), la reserpina (2,5 mg/kg) y la asociación de ambas sustancias en el conducto deferente de rata.

CONDUCTO DEFERENTE DE RATA: Contenido en noradrenalina (µg/g de tejido)

Control 10,78 ± 0,64

<u>Tiempo</u>	<u>Bretilio</u>	<u>Reserpina</u>	<u>Bretilio + Reserpina</u>
	10 mg/kg i.p.	2,5 mg/kg i.v.	
30 min.	10,07 ± 0,60	8,45 ± 0,60	12,3 ± 0,69
1 hora	11,29 ± 0,71	7,48 ± 0,51	12,2 ± 0,20
2 "	10,80 ± 1,09	5,77 ± 0,31	11,38 ± 0,54
4 "	12,11 ± 1,01	1,15 ± 0,13	6,51 ± 0,33
8 "	9,39 ± 1,22	1,06 ± 0,12	3,26 ± 0,54

Cada uno de estos valores representa la media de un mínimo de 5 experiencias.

Entre los valores obtenidos con reserpina, y los obtenidos con bretilio + reserpina, en los distintos tiempos, existe una diferencia estadísticamente muy significativa (0,005 < P < 0,001)

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

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

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

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

El deferente de rata pretratada con bretilio (10 mg/kg. i. p. 1 hora antes del sacrificio del animal) colocado en un baño de órgano aislado, muestra movimientos espontáneos intensos y que perduran durante unas 4 horas aproximadamente.

La aparición de estos movimientos podría atribuirse a la liberación de pequeñas cantidades de noradrenalina inducida por efecto del bretilio.

DISCUSIÓN. — Desde hace ya mucho tiempo (BOURA y GREEN, 1959), se sabe que el bretilio produce una marcada disminución de las respuestas nerviosas inducidas por estimulación eléctrica. Este efecto de bloqueo de las neuronas adrenérgicas va precedido por unos ligeros y poco duraderos efectos simpaticomiméticos indirectos (FURCHGOTT, 1960; KIRPEKAR y FURCHGOTT, 1969; ABBS, 1966).

El sistema parasimpático, por el contrario, no se afecta por las concentraciones de bretilio que son suficientes para bloquear la transmisión adrenérgica.

La acción del bretilio sobre las neuronas adrenérgicas se debe posiblemente a que se acumula activamente en la terminación nerviosa sim-

pática, accediendo a ella por un mecanismo de transporte activo en la membrana (ROSS y GOSZTONYI, 1975; ROSS y KELDER, 1976).

En nuestras experiencias en bazo de gato perfundido *in situ* con bretilio (5×10^{-6} g/ml) (comunicación anterior) se observa que tras la administración de esta sustancia se produce, aun sin estimulación eléctrica del nervio esplénico, una cierta liberación de noradrenalina que aparece en el perfusado. Posiblemente esta liberación sea producida por el efecto simpaticomimético inicial descrito para el bretilio.

Cuando tras la perfusión con bretilio se inicia la perfusión con reserpina, este alcaloide produce una menor liberación de noradrenalina que la obtenida tras la perfusión con reserpina sola. Este efecto es semejante al observado por nosotros mismos (PLANAS y cols., 1977) cuando se perfunde inicialmente el bazo con iproniácida o con pargilina. Estos inhibidores de la monoaminoxidasa no presentan ningún efecto simpaticomimético inicial pero inhiben la liberación de catecolaminas por la reserpina cuando se han perfundido antes del alcaloide.

FURCHGOTT y cols. (1971) describieron que el pretratamiento con bretilio produce un efecto semejante al producido por el pretratamiento con inhibidores de la monoaminoxidasa en la aurícula de cobayo previamente tratada con reserpina.

Estos autores proponen la hipótesis que el bretilio, al ser transportado de forma activa al interior de las terminaciones nerviosas adrenérgicas, alcanza una concentración capaz de inhibir competitivamente a la monoaminoxidasa.

Por otra parte, cuando administramos bretilio (10 mg/kg. i. p.) a unos lotes de ratas y luego las sacrificamos a distintos tiempos no se observa modificación en el contenido en noradrenalina del conducto deferente respecto a los animales control. A pesar de que aparentemente no existe paralelismo entre la liberación de noradrenalina por el bazo de gato perfundido con bretilio y el hecho que el bretilio no produzca modificación en la concentración de noradrenalina en el conducto deferente quizá sea debido a que el método empleado para determinar el contenido en noradrenalina del conducto deferente (CHANG, 1964) no es capaz de detectar las pequeñas cantidades que libera el bazo de gato y que determinamos con el método de Schelleberger y Gordon (1971).

No obstante, cuando a otros lotes de ratas las pretratamos con bretilio (10 mg/kg. i. p.) y una hora después les administramos reserpina (2,5 mg/kg. i. v.) observamos que el bretilio inhibe también parcialmente la acción depletores de noradrenalina provocada por la reserpina sola.

Esta interacción del bretilio con la reserpina en el conducto deferente de rata, concuerda exactamente con la obtenida en el bazo de gato perfundido *in situ*. Se trata de dos órganos ricos en catecolaminas

y en los que, a pesar de tener distinta estructura anatomofisiológica, se obtienen resultados concordantes.

Nuestra hipótesis para explicar la interacción bretilio-reserpina se basaría en el hecho de que el bretilio es recaptado al interior de la terminación nerviosa adrenérgica por un sistema de transporte activo coincidente con el de la noradrenalina (ROSS y GOSZTONYI, 1975; ROSS y KELDER, 1976). Al administrar posteriormente reserpina este alcaloide penetra en la terminación adrenérgica, posiblemente por difusión pasiva, y produce la conocida deplección de noradrenalina de las vesículas de almacenamiento.

La noradrenalina por efecto de la reserpina pasa de los gránulos de almacenamiento a quedar libre en el interior de la terminación adrenérgica. En determinadas circunstancias (p. ej. por el pretratamiento con anfetamina), la noradrenalina pasa rápidamente al espacio sináptico, pero en el caso de pretratamiento con bretilio se halla bloqueado el mecanismo transportador, por lo que la noradrenalina encuentra dificultado el paso al espacio sináptico. Esto explicaría el efecto inhibitor del bretilio sobre la acción de la reserpina que hemos observado tanto en el bazo de gato perfundido *in situ* como en el conducto deferente de rata.

Los autores agradecen la colaboración de los señores Andrés Calvet, Alfonso Tristán y Antonia Casellas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBS, E. T.: Catecholamine release by xylocholine, bretylium and guanethidine. Br. J. Pharmac. Chemother., 25, 285.
- BOURA, A. L. A., GREEN, A. F.: The actions of bretylium: adrenergic neurone blocking and other effects. BBr. J. Pharmacol., 14, 536, 1959.
- BOURA, A. L. A., GREEN, A. F.: Adrenergic neurone blocking agents. Annu. Rev. Pharmacol., 5, 183, 1965.
- CHANG, C. C.: A sensitive method for spectrophotofluorimetric assay of catecholamines. Int. J. Neuropharmac., 3, 643, 1964.
- FURCHGOTT, R. F.: In Adrenergic mechanisms. Ed by J. R. Vane p. 197, 1960.
- FURCHGOTT, R. F., SÁNCHEZ, P., WAKADE, A. R., CERVONI, P.: Interactions of bretylium and other drugs on guinea-pig atria: evidence for inhibition of neuronal monoamine oxidase by bretylium. J. Phar. End. Exp. Ther., 179, 171, 1971.
- KIRPEKAR, S. M., FURCHGOTT, R. F.: Interaction of tyramine and guanethidine in the spleen of the cat. J. Phar. Expt. Ther., 26, 1972.
- PLANAS, M. E., GASCÓN, P., VALDECASAS, F. G.: Interacció reserpina-simpaticomimètics en la melsa de gat *in situ*. Annals de Medicina, LXII, 9, 1977.
- ROSS, S. B., GOSZTONYI, T.: On the mechanism of the uptake of ^3H -bretylium in peripheral sympathetic nerves. Arch. Pharmacol., 288, 283, 1975.
- ROSS, S. B., KELDER, D.: Active transport of ^3H -bretylium in the rat vas deferens *in vitro*. Acta physiol. scand., 97, 209, 1976.
- SHELLEMBERGER, M. K., GORDON, J. H.: A rapid simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-hidroxytryptamine from discrete brain areas. Analyt. Biochem., 39, 356, 1971.

Departamento de Farmacología. Centro Coordinado del C.S.I.C.
Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.