

LIBERACIÓN DE NORADRENALINA POR RESERPINA. I. INTERACCIÓN CON ANFETAMINA Y CON BRETELIO EN BAZO DE GATO *

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

INTRODUCCIÓN. — Continuando con experiencias anteriores ya presentadas en esta Asociación (PLANAS y cols., 1977) sobre la interacción de la reserpina con distintos fármacos, hemos estudiado en esta ocasión las posibles modificaciones del efecto de la reserpina cuando previamente se perfunde el bazo de gato *in situ* con anfetamina o bretilio.

En este trabajo exponemos los resultados obtenidos al estudiar la interacción de la reserpina a una concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ g/ml. (LAPORTE i cols., 1968) con distintas concentraciones de anfetamina (10^{-7} , 10^{-5} y 10^{-4} g/ml.). También hemos procedido a la determinación de la concentración de noradrenalina liberada por la reserpina, cuando previamente se había administrado al animal 2 mg/kg. de anfetamina 1 hora antes de iniciar la perfusión con reserpina. Por otra parte, hemos introducido un nuevo fármaco en nuestro estudio de interacciones con la reserpina, el bretilio, administrado en perfusión en el bazo de gato a una dosis de 5×10^{-6} g/ml.

El bretilio es una sustancia bloqueante de la transmisión adrenérgica por acción presináptica, no bloqueando la liberación de catecolaminas por parte de la médula suprarrenal (BOURA y GREEN, 1965).

MATERIAL Y MÉTODOS. — La preparación utilizada ha sido el bazo de gato perfundido *in situ* según la técnica de Kirpekar y Mitsu (1967), que en esencia consiste en utilizar gatos de ambos sexos de aproximadamente 2,5 kilos de peso. Los animales son anestesiados primero con éter y a continuación con cloralosa (100 mg/kg.), administrada por vía endovenosa a través de la femoral. A continuación se canula la tráquea y se abre el abdomen por medio de una incisión en la línea media, elimi-

* Sessió del dia 31 de gener de 1979. La segona part del treball fou publicada en el número d'octubre de 1980, pàgina 887.

nado desde el duodeno hasta el colon; al extraer el intestino disecamos la vena mesentérica superior hasta su unión con la vena esplénica, dejando un muñón suficientemente largo para su posterior canulación. Después se ligan y se cortan las conexiones vasculares entre el bazo y el estómago y peritoneo, eliminando los dos últimos. Se extraen ambas suprarrenales con el fin de excluir la posibilidad de la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo. Se liga la arteria hepática, colocándose una cánula en la vena mesentérica superior y otra en la aorta para perfundir el bazo. Inmediatamente antes de iniciar la perfusión se ligan la aorta y vena porta y se llena la cavidad abdominal con parafina líquida. Después de iniciar la perfusión se sangra el animal hasta su muerte por medio de una cánula colocada en la carótida. Así pues, el líquido de perfusión penetra por la arteria celíaca, luego por la esplénica y aparece, después de atravesar el órgano, en el flujo de la vena mesentérica superior.

La perfusión se lleva a cabo con solución bicarbonatada de Krebs aireada con carbógeno a una temperatura de 35°C , impulsada por medio de una bomba de perfusión a una velocidad de 6 ml/min. En dicha solución se disuelven las sustancias a estudiar.

En el caso de la administración de la anfetamina (2 mg/kg.) por vía endovenosa, se inyecta esta sustancia por la vena femoral, dejando transcurrir una hora desde el momento de la inyección hasta que se liga la vena esplénica. La perfusión del bazo se inicia directamente con reserpina ($2,5 \times 10^{-5}$ g/ml.) disuelta en Krebs.

Se toman las muestras cada 2 min. durante un período de 12 min. para cada sustancia a estudiar.

El contenido en noradrenalina de las muestras venosas se determina por el método de Schelleberger y Gordon (1971). Las sustancias empleadas son: sulfato de DL-anfetamina (Miquel), Reserpina (Ciba-Geigy), Tosilato de bretilio (Gayoso-Welcome, S. A.).

RESULTADOS. — Interacción anfetamina-reserpina:

En una primera serie de experiencias se ha estudiado la liberación espontánea de noradrenalina por el bazo de gato durante su perfusión con líquido de Krebs. Esta liberación es del orden de $0,55 \pm 0,19 \text{ ng} / 2 \text{ min.}$, y es a la que denominaremos liberación basal o control. Seguidamente se ha añadido al líquido de perfusión reserpina a la concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ g/ml., tomándose muestras de perfusado cada 2 min. La liberación de noradrenalina producida por dicho alcaloide es del orden de $46 \pm 4,92 \text{ ng} / 2 \text{ min.}$

En otra serie de experiencias se ha perfundido el bazo de gato inicialmente con anfetamina, y 12 min. después de ella se inicia la perfusión con reserpina durante 12 min. más a la concentración arriba indicada.

Dado que en experiencias anteriores presentadas a esta Asociación (PLANAS y cols., 1977) se había estudiado la concentración de 10^{-6} g/ml. de anfetamina, en esta ocasión se han estudiado las concentraciones de 10^{-7} , 10^{-5} y 10^{-4} g/ml., para intentar establecer una relación dosis-respuesta.

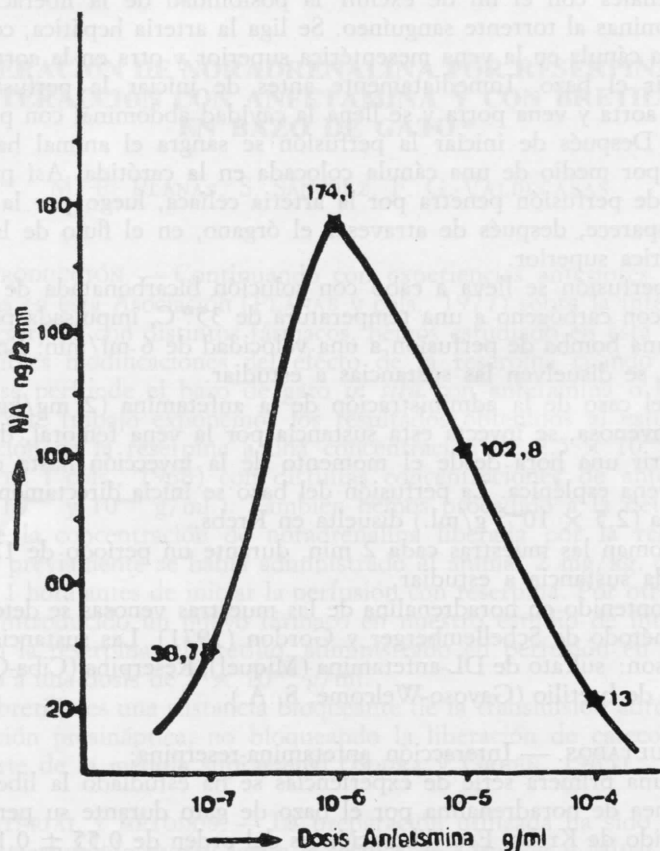


FIG. 1.— Representación gráfica de la interacción anfetamina-reserpina. La concentración de reserpina es constante ($2,5 \times 10^{-5}$ g/ml.).

En la figura 1 se expresan en ordenadas los ng de noradrenalina liberada por el bazo de gato en un intervalo de 2 min. cuando se inicia la perfusión con reserpina a la concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ g/ml., después de la perfusión con anfetamina a las concentraciones indicadas en abscisas. Se aprecia que la liberación máxima se obtiene con 10^{-6}

g/ml. de anfetamina, siendo menor la liberación de noradrenalina tanto en el caso en que previamente se perfunde con anfetamina a dosis menores (10^{-7} g/ml.) como cuando las dosis son superiores (10^{-5} y 10^{-4} g/ml.). Puede observarse que con la dosis de anfetamina de 10^{-4} g/ml. se obtiene únicamente una liberación de noradrenalina del orden de 13 ng/2 min. con una diferencia estadísticamente significativa respecto al valor obtenido administrando reserpina sola.

Por otra parte, se administró a una serie de gatos 2 mg/kg. de anfetamina por vía endovenosa 1 hora antes de iniciar la perfusión con reserpina. Como puede observarse en la figura 2, al iniciar la perfusión con reserpina en estas condiciones se produce en un primer momento una liberación de noradrenalina que alcanza un valor de $93,70 \pm 11,10$ ng/2 min. Dicha liberación disminuye rápidamente y a los 8 min. es ya inferior a la obtenida con reserpina sola.

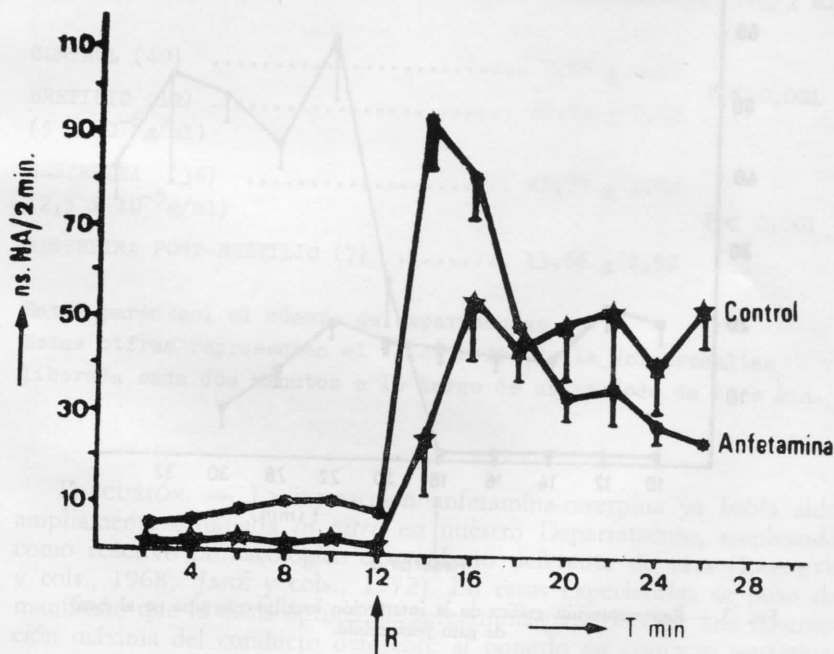


FIG. 2. — Representación gráfica de la interacción anfetamina-reserpina en el bazo de gato cuando la anfetamina se había inyectado (2 mg/kg. i. v.) 1 hora antes de iniciar la perfusión.

Interacción bretilio-reserpina:

Para efectuar las experiencias con esta sustancia, dado que ya conocíamos la liberación basal o control ($0,55 \pm 0,19$ ng/2 min.) y también

la obtenida al perfundir con reserpina sola a la concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ g/ml. ($46 \pm 4,92$ ng/2 min.), procedimos a perfundir directamente el bazo de gato con bretilio a la concentración de 5×10^{-6} g/ml., y transcurridos 18 min. iniciamos también la perfusión con reserpina durante 12 min. más a la concentración arriba indicada.

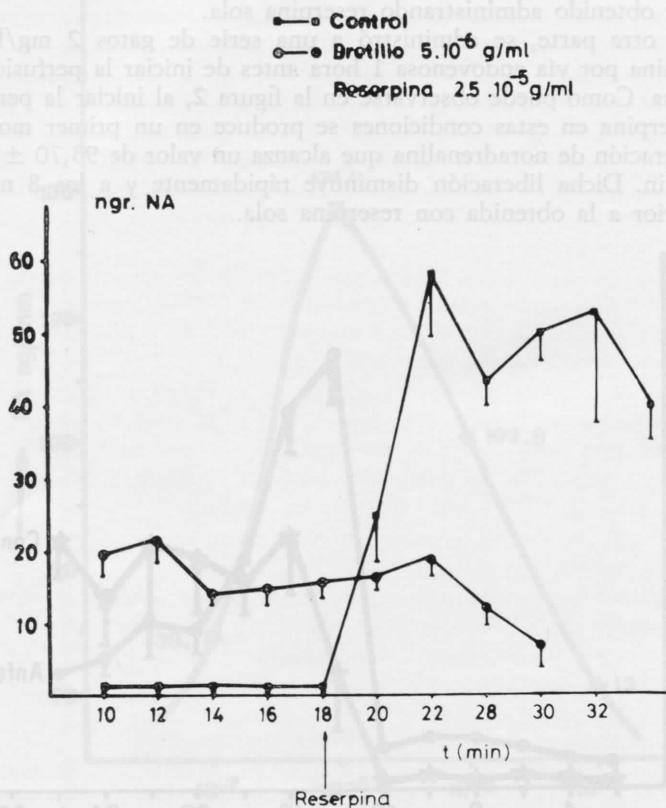


FIG. 3. — Representación gráfica de la interacción bretilio-reserpina en el bazo de gato perfundido.

Como podemos observar en la figura 3, mientras se perfunde bretilio solo a dicha concentración, se obtiene una liberación media de noradrenalina de $12,51$ ng/2 min. Al perfundir a continuación con reserpina, obtenemos, a diferencia de lo que ocurre con la anfetamina, una liberación de noradrenalina del orden de $13,66 \pm 2,52$ ng/2 min., claramente inferior a la que obtendríamos con el alcaloide solo.

Así pues observamos que el bretilio a esta concentración disminuye la liberación de noradrenalina producida por la reserpina.

En la tabla II se resume el valor en ng de noradrenalina liberada tras la perfusión con dichas sustancias.

TABLA 2

LIBERACION DE NORADRENALINA EN BAZO DE GATO PERFUNDIDO

"IN SITU". ACCION DE BRETELIO Y RESERPINA.

	NORADRENALINA (ng/2 min)	
CONTROL (40)	0,55 $\pm$ 0,17	P < 0,001
BRETELIO (12)	12,51 $\pm$ 2,02	
(5 x 10 ⁻⁶ g/ml)		
RESERPINA (36)	45,77 $\pm$ 4.92	P < 0,001
(2,5 x 10 ⁻⁵ g/ml)		
RESERPINA POST-BRETELIO (7)	13,66 $\pm$ 2,52	

Entre paréntesis el número de experiencias

Estas cifras representan el valor medio de la Noradrenalina

liberada cada dos minutos a lo largo de un período de doce min.

DISCUSIÓN. — La interacción anfetamina-reserpina ya había sido ampliamente estudiada *in vitro* en nuestro Departamento, empleando como reactivo farmacológico el conducto deferente de rata (LAPORTE y cols., 1968; JANÉ y cols., 1972). En estas experiencias se puso de manifiesto que la dosis óptima de anfetamina para obtener una contracción máxima del conducto deferente al ponerlo en contacto posteriormente con reserpina era el 1×10^{-6} g/ml, habiéndose estudiado paralelamente las de $2,5 \times 10^{-7}$ g/ml y 5×10^{-7} g/ml.

Por otra parte, las dosis de reserpina estudiadas posteriormente a la anfetamina oscilaron entre 1×10^{-6} g/ml. y 1×10^{-4} g/ml. De estas experiencias se concluyó que las dosis más adecuadas para la obtención del denominado «fenómeno reserpínico» *in vitro* era para la anfetamina 1×10^{-6} g/ml. y para la reserpina $2,5 \times 10^{-5}$ g/ml.

Estas dosis fueron las primeras estudiadas por nosotros en el bazo de gato perfundido *in situ*. La elección de este preparado se ha debido a que se trata de un órgano muy rico en catecolaminas en el que se han llevado a cabo gran cantidad de experiencias relacionadas con el sistema adrenérgico.

De acuerdo con estos datos y con nuestras anteriores experiencias (PLANAS, 1977) hemos estudiado esta interacción manteniendo fija la concentración de reserpina ($2,5 \times 10^{-5}$ g/ml.) y modificando la de anfetamina (10^{-7} g/ml., 10^{-5} g/ml. y 10^{-4} g/ml.)

Mientras que la liberación de noradrenalina provocada por la anfetamina a las distintas dosis estudiadas varía poco, el efecto de la reserpina resulta muy variable según sea la concentración de anfetamina perfundida previamente.

La liberación de noradrenalina por parte de la reserpina alcanza un valor máximo tras la perfusión con 10^{-6} g/ml. de anfetamina. Esta liberación es también elevada cuando la concentración de anfetamina perfundida ha sido de 10^{-5} g/ml., mientras que concentraciones de anfetamina de 10^{-7} g/ml. y 10^{-4} g/ml. disminuyen, incluso, la cantidad de noradrenalina liberada por efecto de la reserpina sola.

En otra serie de experiencias, al inyectar al animal *in vivo* 2 mg/kg. i. v. de anfetamina 1 hora antes de iniciar la perfusión con reserpina se obtiene una liberación de noradrenalina muy elevada en un primer momento pero que rápidamente desciende hasta niveles incluso inferiores a los obtenidos con reserpina sola.

De estos dos tipos de experiencias parece deducirse que en presencia de anfetamina se facilita la salida de noradrenalina de la terminación adrenérgica por parte de la reserpina.

En condiciones normales la reserpina libera metabolitos inactivos, pero en presencia de anfetamina, posiblemente por un fenómeno de alteración de la permeabilidad de la membrana presináptica, se facilitaría la salida de las catecolaminas sin llegar a metabolizarse.

De las experiencias descritas parece deducirse que si se aumenta mucho la cantidad de anfetamina perfundida no solamente no aumenta la cantidad de noradrenalina liberada por la reserpina sino que incluso ésta llega a disminuir por debajo de los niveles obtenidos únicamente con reserpina.

Los resultados obtenidos empleando el bretilio se comentan junto con los de la comunicación siguiente.

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

BIBLIOGRAFIA

- BOURA, A. L. A., GREEN, A. F.: Adrenergic neurona blocking agents. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 5, 183, 1965.
- JANÉ, F., PLANAS, M. E., VALDECASAS, F. G.: La inversión del efecto de la reserpina. I. Breve reconsideración. *Anales de Medicina*, vol. LIX, 1972.
- KIRPEKAR, S. M., MISU, Y.: Release of norepinephrine by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium. *J. Physiol. Lond.*, 188, 219, 1967.
- LAPORTE, J., JANÉ, F., CUENCA, E., RODRÍGUEZ, L., VALDECASAS, F. G.: Interactions between amphetamine and reserpine *in vitro*. *Experientia*, 24, 1.161, 1968.
- PLANAS, M. E., GASCÓN, P., VALDECASAS, F. G.: Interacció reserpina-simpaticomimètica en la melsa de gat *in situ*. *Annals de Medicina*, LXII, 9, 1977.
- SCHELLEMBERGER, M. K., GORDON, J. H.: A rapid simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas. *Analyt. Biochem.*, 39, 356, 1971.

*Departament de Farmacologia. Centre Coordinat del C.S.I.C.
Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.*