

VCH-FC  
DOC-B  
B292

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE RESERPINA Y GUANETIDINA EN  
EL DESARROLLO DEL SISTEMA ADRENERGICO

Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con Mención en Biología  
Programa de Bioquímica

Facultad de Ciencias

por  
Jorge Bartolomé Valls  
Diciembre, 1978

Patrocinante: Profesor Theodore A. Slotkin

EFFECTS OF RESERPINE AND GUANETHIDINE ADMINISTRATION ON  
THE DEVELOPMENT OF THE ADRENERGIC SYSTEM

AN ABSTRACT

of a dissertation submitted to the Faculty of Sciences  
of the University of Chile  
in partial fulfillment of the requirements for the degree of  
Doctor en Ciencias con Mención en Biología  
Programa de Bioquímica

by  
Jorge Bartolomé Valls  
Diciembre, 1978

Dissertation supervisor: Professor Theodore A. Slotkin

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que  
la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

JORGE BARTOLOME VALLS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito  
de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología  
en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 de Enero de 1979.

Dr. Theodore Slotkin  
Patrocinante de Tesis  
*pp. Jorge Baruel*

Dr. Fernando Orrego  
Comité Informante de Tesis

Dr. Juan Fernandez  
Comité Informante de Tesis

Dr. Carlos Muñoz  
Comité Informante de Tesis

Dr. Lionel Gil  
Comité Informante de Tesis

Dr. Jorge Belmar  
Comité Informante de Tesis

*F. Orrego*

*Juan Fernandez*

*Carlos Muñoz*

*Lionel Gil*

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuroquímica del Departamento de Farmacología, Centro Médico de Duke, Universidad de Duke, Carolina del Norte, U.S.A., bajo la dirección del Dr. Theodore A. Slotkin.

Quiero expresar mis más sinceros reconocimientos a las siguientes personas, cuyos aportes fueron muy valiosos durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Theodore A. Slotkin, por su ágil enseñanza de las técnicas de investigación neurobioquímica, por su gran aporte de ideas, activa y valiosa participación en la discusión de los resultados experimentales, y muy especialmente, por haberme inculcado un enfoque dinámico y práctico de la investigación científica.

A los Dres. Fernando Orrego, Humberto Viveros y Norman Kirshner por haberme introducido al apasionante mundo de la neurobioquímica.

A los señores Christopher Lau y Frederic Seidler por su colaboración en el desarrollo experimental del trabajo.

Al Dr. Ricardo Bull, por la revisión crítica del manuscrito.

A la señora Ildina Cerda, por su paciencia y gran eficiencia en la transcripción del manuscrito.

A todas las personas del Laboratorio, que de un modo u otro, ayudaron a la materialización de esta tesis.

Jorge Bartolomé Valls  
Santiago de Chile, 1978

*A mi esposa, a mis hijos y a mis padres*

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
ABREVIATURAS .....	xiv
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xix
INTRODUCCION .....	1
METODOS Y MATERIALES .....	8
I. METODOS	
A. Procedimientos experimentales a que fueron so- metidas las ratas .....	8
1. Administración postnatal de reserpina ...	8
2. Administración postnatal de guanetidina ..	8
3. Administración prenatal de reserpina ....	9
B. Preparación de los tejidos .....	10
1. Estudios en adrenales .....	10
2. Estudios en cerebro .....	11
3. Estudios en corazón y cerebro .....	12
C. Determinación de catecolaminas .....	12
D. Tirosina hidroxilasa .....	14
1. Determinación de la actividad en médula a- drenal .....	16
2. Determinación de la actividad en cerebro .	17
E. Dihidroxifenilalanina decarboxilasa (Dopa de- carboxilasa) .....	17
1. Preparación a partir de riñones de cerdo .	18
2. Determinación de la actividad .....	18

	Pág.
F. Dopamina $\beta$ -hidroxilasa .....	19
G. Ornitina decarboxilasa .....	21
H. Captación de catecolaminas por las vesículas de almacenamiento de aminas .....	22
I. Captación sinaptosomal de tiramina- <sup>3</sup> H .....	24
J. Determinación de la presión arterial sistólica en la rata adulta .....	25
 II. MATERIALES	
A. Generales .....	28
B. Isótopos .....	28
 RESULTADOS	
A. Efectos de la administración postnatal de reserpina en el desarrollo simpático-adrenal .....	29
1. Efectos de la administración de reserpina (2,5 ó 5 mg/kg) a ratas recién nacidas .....	29
2. Efectos de la administración de reserpina (2,5 mg/kg) a ratas de diferentes edades .....	36
3. Efectos del pretratamiento con clorisondamina sobre la depleción aguda de catecolaminas producida por la reserpina .....	36
4. Efectos de la reserpina "in vitro" sobre la captación de adrenalina- <sup>3</sup> H .....	39
5. Efectos de la DL- $\alpha$ -metil-p-tirosina ( $\alpha$ MPT) en el contenido de catecolaminas adrenales .....	39
6. Efectos de la nicotina en el contenido de catecolaminas adrenales y en la actividad de la tirosina hidroxilasa .....	42

	Pág.
7- Efectos de la administración de reserpi na a ratas adultas .....	42
B. Efectos de la administración postnatal de reserpina en el desarrollo del corazón y cerebro .....	45
1. Estimulantes y bloqueadores adrenérgi - cos .....	48
2. Ratas adultas .....	50
3. Ratas en desarrollo .....	53
C. Efectos de la administración postnatal de guanetidina en desarrollo de la médula a- drenal y cerebro .....	58
1. Efectos de la guanetidina sobre la mé- dula adrenal .....	58
2. Efectos de la guanetidina sobre el ce- rebro .....	63
D. Efectos de la administración prenatal de reserpina en el desarrollo de la médula adrenal y del cerebro .....	67
1. Administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento: efec- tos sobre la médula adrenal .....	67
2. Administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento: efec- tos sobre la presión arterial .....	71
3. Administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento: efec- tos sobre el cerebro .....	75
4. Administración de reserpina los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento: efec- tos sobre la médula adrenal y el ce- rebro .....	75

	Pág.
5. Administración de reserpina los días 4, 3 y 2 antes del nacimiento: efectos sobre la médula adrenal .....	78
DISCUSION	
A. Administración postnatal de reserpina .....	82
1. Efectos sobre las adrenales .....	82
2. Efectos sobre el corazón y el cerebro ...	86
B. Administración postnatal de guanetidina ...	90
1. Efectos sobre las adrenales .....	90
2. Efectos sobre el cerebro .....	91
C. Administración prenatal de reserpina .....	92
1. Efectos sobre las adrenales .....	92
2. Efectos sobre el cerebro .....	95
CONCLUSIONES .....	96
BIBLIOGRAFIA .....	98

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Efectos de reserpina y clorisondamina sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas recién nacidas y adultas .....	38
Tabla 2.	Efectos de la reserpina "in vitro" sobre la captación de adrenalina- <sup>3</sup> H en vesículas de almacenamiento de adrenales de ratas en desarrollo .....	40
Tabla 3.	Efectos del éster metílico de la DL- $\alpha$ -metil-p-tirosina ( $\alpha$ MPT) sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas recién nacidas y adultas .....	41
Tabla 4.	Efectos de la nicotina sobre el contenido de catecolaminas y la actividad de la tirosina hidroxilasa en médula adrenal .....	43
Tabla 5.	Efectos de isoproterenol y nicotina sobre la actividad de la ornitina de carboxilasa en corazón de rata adulta .....	49
Tabla 6.	Efectos de reserpina y nicotina sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas adultas .....	55
Tabla 7.	Efectos de reserpina y nicotina sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas en desarrollo .....	59
Tabla 8.	Contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas controles en desarrollo .....	61
Tabla 9.	Efectos de la clorisondamina sobre los aumentos en la actividad de la tirosina hidroxilasa inducidos por la guañetidina en médula adrenal de ratas de 2 días de edad .....	64

	Pág.
Tabla 10. Peso del cerebro y actividad de ornitina decarboxilasa y tirosina hidroxilasa en ratas controles en desarrollo .....	65
Tabla 11. Efectos postnatales de la nicotina sobre las catecolaminas adrenales de ratas expuestas a la reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento .....	73
Tabla 12. Efectos de la DL-p-clorofenilalanina (PCPA) sobre la presión arterial sistólica de ratas adultas normales y de ratas adultas cuyas madres fueron tratadas con reserpina los días 9, 8 y 7 antes del parto .....	74
Tabla 13. Administración de reserpina los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento; efectos sobre la médula adrenal .....	79
Tabla 14. Administración de reserpina los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento; efectos sobre el cerebro .....	80
Tabla 15. Administración de reserpina los días 4, 3 y 2 antes del nacimiento; efectos sobre la médula adrenal .....	81

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Esquema del autoanizador de catecolaminas ..	13
Fig. 2. a) Esquema del equipo utilizado para medir la presión arterial en la cola de la ra- ta.	
b) Registro normal de la presión arterial ....	26
Fig. 3. Peso corporal de ratas en desarrollo des - pués de la administración de una dosis úni ca de reserpina al nacer .....	30
Fig. 4. Contenido de catecolaminas en adrenales de ratas en desarrollo después de la adminis- tración de una dosis única de reserpina al nacer .....	31
Fig. 5. Actividad de tirosina hidroxilasa y dopami na $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas en desarrollo después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer .....	32
Fig. 6. Captación de adrenalina- $^3\text{H}$ en vesículas de almacenamiento aisladas de adrenales de ra tas en desarrollo (expresada por glándula), después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer .....	34
Fig. 7. Captación de adrenalina- $^3\text{H}$ en vesículas de almacenamiento aisladas de adrenales de ra tas en desarrollo (expresada por 100 $\mu\text{g}$ de catecolaminas endógenas), después de la ad ministración de una dosis única de reserpī na al nacer .....	35
Fig. 8. Efectos de la administración de reserpina a ratas de diferentes edades sobre el con- tenido de catecolaminas y actividad de ti- rosina hidroxilasa y dopamina $\beta$ -hidroxila- sa en las adrenales .....	37

Fig. 9.	Efectos de la reserpina sobre el contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas adultas (50 días de edad). ....	44
Fig. 10.	Efectos de la reserpina sobre la captación de adrenaline- <sup>3</sup> H en vesículas de almacén aisladas de adrenales de ratas adultas (50 días de edad), expresada por glándula y por 100 $\mu$ g de catecolaminas endógenas .....	46
Fig. 11.	Peso corporal, del corazón y cerebro de ratas adultas después de la administración de una dosis única de reserpina .....	51
Fig. 12.	Efectos de la administración de una dosis única de reserpina a ratas adultas sobre la actividad de la ODC de corazón y sobre las respuestas cardíacas de la ODC a la estimulación con nicotina inyectada a diferentes tiempos después de la reserpina .....	52
Fig. 13.	Efectos de la administración de una dosis única de reserpina a ratas adultas sobre las respuestas cardíacas de la ODC a la estimulación con isoproterenol inyectado a diferentes tiempos después de la reserpina .....	54
Fig. 14.	Peso corporal, del corazón y cerebro de ratas en desarrollo después de una dosis única de reserpina administrada a la edad de 1 día .....	56
Fig. 15.	Efectos de una dosis única de reserpina administrada a la edad de 1 día, en el desarrollo de la actividad de ODC de corazón y en las respuestas cardíacas de la ODC a la estimulación con nicotina inyectada a diferentes tiempos después de la reserpina ...	57
Fig. 16.	Efectos de una dosis única de reserpina, administrada a la edad de 1 día, en el desarrollo de la actividad de la ODC en cerebro .....	60

Fig. 17. Contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas en desarrollo tratadas con guanetidina .....	62
Fig. 18. Peso del cerebro y actividad de ornitina decarboxilasa y tirosina hidroxilasa en cerebro de ratas en desarrollo tratadas con guanetidina .....	66
Fig. 19. Peso corporal, contenido de catecolaminas, actividad de tirosina hidroxilada y dopamina $\beta$ -hidroxilasa y captación de adrenalina por glándula y por 100 $\mu$ g de catecolaminas endógenas, en ratas con controles en desarrollo .....	68
Fig. 20. Peso corporal y del cerebro de ratas en desarrollo cuyas madres fueron inyectadas con reserpina los días 9, 8 y 7 antes del parto .....	69
Fig. 21. Contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas cuyas madres fueron inyectadas con reserpina los días 9, 8 y 7 antes del parto .....	70
Fig. 22. Captación de adrenalina en vesículas de almacenamiento aisladas de adrenales de ratas en desarrollo (expresadas por glándula y por 100 $\mu$ g de catecolaminas endógenas), cuyas madres fueron inyectadas con reserpina los días 9, 8 y 7 antes del parto .....	72
Fig. 23. Peso del cerebro, actividad de la tirosina hidroxilasa y captación sinaptosomal de tiramina y síntesis de octopamina en ratas controles en desarrollo .....	76
Fig. 24. Actividad de la tirosina hidroxilasa y captación sinaptosomal de tiramina y síntesis de octopamina en ratas en desarrollo cuyas madres fueron inyectadas con reserpina los días 9, 8 y 7 antes del parto .....	77

## ABREVIATURAS

ATP	:	adenosín 5'-trifosfato
CA	:	catecolaminas
DBH	:	dopamina $\beta$ -hidroxilasa
DDC	:	dopa decarboxilasa
DMPH <sub>4</sub>	:	2-amino-4-hidroxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidro-pteridina
DTT	:	ditiotreitól
$\alpha$ MPT	:	éster metílico de DL- $\alpha$ -metil-p-tirosina
ODC	:	ornitina decarboxilasa
PCA	:	ácido perclórico
PCPA	:	p-clorofenilalanina
PMB	:	p-hidroximercuribenzoato
POPOP	:	1,4-bis-(2-(5-feniloxazolil)-benceno)
PPO	:	2,5-difeniloxazol
TCA	:	ácido tricloroacético
TCP	:	clorhidrato de trans-2-fenilcipropil-amina (tranilcipromina)
TH	:	tirosina hidroxilasa
Tris	:	tri - (hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

El objetivo principal de esta Tesis consistió en estudiar los efectos de la administración de dos drogas que producen depleción de catecolaminas (CA), reserpina y guanetidina, en el desarrollo del sistema adrenérgico en las adrenales, corazón y cerebro y además, en establecer las diferencias en la actividad de dichas drogas en los organismos inmaduros con respecto a los adultos.

En la médula adrenal, cuatro horas después de la administración de reserpina (2,5 ó 5 mg/kg, s.c.) a ratas recién nacidas se observó una depleción aguda de CA y a las 24 horas el contenido de CA era un 10 a 20% del valor control; la recuperación de los niveles normales demoró 2 semanas. La depleción aguda (4 horas) de CA no fue inhibida al pretratar las ratas con un agente bloqueador de los receptores colinérgicos nicotínicos (clorisondamina; 10 mg/kg, s.c.). Una dosis igual de clorisondamina, contrarrestó la disminución de CA obtenida en las ratas adultas, lo que indica que la depleción aguda obtenida en las ratas recién nacidas no es de origen neurogénico reflejo vía nervio esplácnico. La reserpina no alteró el desarrollo de la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) y aumentó sólo ligeramente el de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH). En contraste, la reserpina produjo grandes aumentos de la actividad de TH y DBH y una disminución del contenido de CA menos acentuado y de menor duración en las ratas adultas. Al administrar reserpina a ratas de diferentes edades, la respuesta de tipo adulta (inducción de TH) se obtuvo solamente a partir de los 8 días de edad. Por otro lado, cuando se administró un agonista colinérgico (nicotina; 10 mg/kg, s.c.) a ratas recién nacidas, hubo inducción de TH, lo que prueba que la médula adrenal de las ratas recién nacidas está capacitada para inducir enzimas cuando

se la estimula directamente; la falta de respuesta enzimática a la estimulación refleja producida por la reserpina indica que la médula adrenal no está funcionalmente inervada en ratas menores de 8 días.

La capacidad de la ornitina decarboxilasa (ODC) (enzima que se cree tendría una participación muy importante en el desarrollo de los distintos órganos) para responder a drogas simpaticomiméticas, fue utilizada como índice para valorar la participación de las aferencias adrenérgicas en el desarrollo del corazón. En el corazón adulto con función simpática intacta, la administración de nicotina produjo un marcado aumento en la actividad de la ODC a las 3 horas; el pretratamiento con clorisondamina o con propranolol (bloqueador de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos), inhibió completamente este efecto, indicando que dicha estimulación se realiza a través de la vía simpática, probablemente estimulando las células ganglionares. En contraste, la nicotina administrada a ratas en desarrollo fue incapaz de estimular la ODC cardíaca durante los 5 primeros días de edad, no así el isoproterenol (un agonista  $\beta$ -adrenérgico), el cual sí produjo grandes aumentos en la actividad de la ODC tanto en el corazón adulto como en el recién nacido. Estos resultados demuestran que las conexiones funcionales entre el sistema nervioso y las células cardíacas estarían ausentes en las ratas recién nacidas y que ellas se establecerían entre los 5 y 8 días de edad. La administración de reserpina a ratas adultas o a ratas de un día de edad, disminuyó la intensidad de la respuesta en el corazón adulto y retardó el tiempo durante el desarrollo en que aparecen las respuestas de tipo adulto. Estos resultados demuestran que la administración de reserpina a ratas recién nacidas, demora el establecimiento de las conexiones funcionales entre los nervios simpáticos y las células cardíacas y por lo tanto, retarda el desarrollo del corazón.

La administración de guanetidina (50 mg/kg, s.c.) durante los primeros días de edad aumentó entre un 40 y 80% el contenido de CA y la actividad de TH y DBH en las adrenales, con recuperación de los valores normales a las 2 ó 3 semanas de edad. El pretratamiento de las ratas recién nacidas con clorisondamina (10 mg/kg, s.c.) inhibió completamente dichos aumentos, lo que indica que la guanetidina produce una estimulación de los receptores colinérgicos nicotínicos localizados en la membrana de las células adrenomedulares. En contraste, la administración de guanetidina a ratas adultas no alteró prácticamente los valores de las CA, TH y DBH en las adrenales. Por lo tanto, la administración de guanetidina a ratas durante los primeros días de edad acelera el desarrollo normal de las adrenales, aparentemente a través de un efecto estimulante directo. Estos resultados sugieren además que durante el desarrollo habría un cambio en las características del receptor colinérgico de las células adrenales, de modo que éste ya no sería sensible a guanetidina en el adulto o que tal vez, la presencia de la inervación funcional impediría el efecto estimulante directo de la droga.

Finalmente, se administró reserpina (1mg/kg, s.c.) a ratas embarazadas en distintos períodos de embarazo. En las ratas nacidas de madres tratadas con reserpina los días 6, 5 y 4 ó 4, 3 y 2 antes del parto, se observó una depleción de CA en las adrenales, la cual puede ser atribuída a efectos directos de la droga; sin embargo, en ningún momento se observó inducción de TH o DBH. La administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento no alteró los niveles de CA en las adrenales postnatales, pero produjo elevaciones permanentes en la actividad de las enzimas y en la captación de aminos por las vesículas de almacenamiento a partir de los 10 días de edad, es decir, después que las adrenales se encuentran funcionalmente inervadas. Cuando se estimularon las

adrenales directamente con nicotina, antes o después de la i nervación funcional, se obtuvo el mismo grado de depleción de CA en las ratas expuestas a la reserpina y en las controles. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tono nervioso simpático sobre la médula adrenal se encontraría permanentemente aumentado en las ratas expuestas a la reserpina in útero durante los días 9, 8 y 7 antes del parto. En el cerebro, la administración de reserpina los días 9, 8 y 7 ó 6, 5 y 4 produjo un déficit en la actividad de TH, lo que indica que la administración prenatal de reserpina altera también al sistema adrenérgico central.

## ABSTRACT

The principal goal of this Thesis was to investigate the effects of two catecholamine depleting drugs, reserpine and guanethidine on the development of the adrenergic system in the adrenals, heart and brain, and to establish whether their actions are similar in adult and immature animals.

Four hours after reserpine administration (2.5 or 5 mg/kg, s.c.) to neonatal rats, an acute depletion of catecholamines (CA) was observed in the adrenals, and by 24 hours CA fell to 10 - 20% of controls; recovery required 2 weeks. Pretreatment of neonates with chlorisondamine (10 mg/kg, s.c.), a nicotinic cholinergic blocking agent, did not prevent acute (4 hours) CA depletion, but did block the decline observed in adult rats, indicating that the acute depletion in neonates is not due to neurogenic stimulation via the splanchnic nerve. At no time after the administration of reserpine to neonates was a change in tyrosine hydroxylase (TH) observed, and only a small increment in dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) activity was obtained. In contrast, adult rats given reserpine showed marked increases in both TH and DBH, and depletion of CA was less marked and of shorter duration. Administration of reserpine to rats of different ages demonstrated that an adult pattern of response (TH induction) was obtained only after 8 days of age. On the other hand, nicotine (10 mg/kg, s.c.), a cholinergic agonist, given to neonates did evoke TH induction, indicating that at birth the adrenal is capable of induction if stimulated directly: the lack of response to reflex effects of reserpine until 8 days of age, indicates that in the rat, the adrenal medulla is not functionally innervated at birth.

The ability of ornithine decarboxylase (ODC) (an enzyme which is thought to play a key role in organ development) to

respond to sympathomimetic agents, was utilized as an index of the role of the sympathetic system in the development of the rat heart. In the adult heart with intact sympathetic function, nicotine administration resulted in marked increases in ODC activity within 3 hours; pretreatment with chlorisondamine, or with propranolol, a  $\beta$ -adrenergic receptor blocker, completely abolished the nicotine-induced increase, indicating that stimulation occurred via the sympathetic system, probably through ganglionic cell stimulation. In contrast, nicotine given to developing rats was unable to stimulate heart ODC during the first 5 days of postnatal age, although administration of isoproterenol, a  $\beta$ -adrenergic agonist, did evoke a large increase in both neonatal and adult heart ODC. These results demonstrate that functional connections between the sympathetic nervous system and cardiac cells are not present at birth, but are established at some time between 5 and 8 days of age. Administration of reserpine to adult rats or to one day old pups, decreased the ODC response to nicotine in the adults and retarded the onset of a mature response in developing animals. Thus, neonatal reserpine administration can delay the time at which functional connections are established between sympathetic nerves and cardiac cells and therefore heart development.

Guanethidine administration (50 mg/kg, s.c.) during the first days of age produced a 40 to 80% increase in the adrenal CA, TH and DBH values, with return to normal values by 3 - 4 weeks of age. Pretreatment of neonates with chlorisondamine (10 mg/kg, s.c.) prevented the stimulatory effects of guanethidine indicating that in neonates, this drug produces a direct stimulation of nicotinic cholinergic receptors localized on the membrane of the adrenomedullary cells. In contrast, administration of guanethidine to adult rats had little or no effect on adrenal CA, TH or DBH. Thus, guanethidine administration during the first days of age accelerates the normal development of rat

adrenals, apparently through a direct stimulatory effect. These data suggest that either the specificity of adreno - medullary cholinergic receptors changes with development, so that they become insensitive to guanethidine in the adult, or that in later stages the presence of functional innervation prevents the access of the drug to the receptors.

Finally, reserpine (1 mg/kg, s.c.) was administered to pregnant rats during different periods of pregnancy. Rats born to mothers who received reserpine on days 6, 5 and 4 or 4, 3 and 2 before delivery showed early postnatal adrenal CA depletion, an effect which can be attributed to a direct action of the drug; however, at no time was induction of TH or DBH observed. Administration of reserpine on days 9, 8 and 7 before delivery did not alter postnatal CA levels in the offspring but produced permanent elevations in enzyme activities and vesicular amine uptake beginning at 10 days of age. Studies utilizing direct stimulation with nicotine indicated that inherent responsiveness of the adrenal medulla itself was the same in control and reserpine-exposed pups. Therefore, these data suggest that sympathoadrenal tone has been permanently increased in the offspring of rats which have been exposed to reserpine on days 9, 8 and 7 before delivery. In the brain, administration of reserpine on days 9, 8 and 7 or 6, 5 and 4 before delivery produced subnormal TH activities, indicating that prenatal reserpine administration also alters CA disposition in the central nervous system.

## INTRODUCCION

Durante el desarrollo pre y postnatal, el sistema adrenérgico periférico experimenta una serie de cambios muy acentuados en los niveles de catecolaminas (CA), en la actividad de las enzimas que participan en su biosíntesis y en la capacidad de captación de aminas exógenas (1-7). En el pollo, la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de CA (8), es ya detectable en el embrión de un día; las CA y el resto de las enzimas están todas presentes alrededor del sexto día (1). En la rata, a pesar de que las enzimas aparecen tempranamente durante el período de gestación, las CA adrenales no son detectables hasta tres días antes del nacimiento (2). Además, de estudios realizados mediante microscopía electrónica se sabe que las vesículas de almacenamiento de aminas aparecen cuatro días antes del nacimiento (9). Estos resultados sugieren que dichos organelos constituyen el factor limitante en el aumento de las CA adrenales durante el desarrollo.

En cerebro de ratas inmaduras, Karki y col. (10) observaron que al inhibir la monoamino oxidasa, los niveles de CA alcanzados no eran comparables a los valores obtenidos en el animal adulto, y concluyeron que ello se debería, principalmente, al desarrollo incompleto de los sistemas de almacenamiento de aminas. Por otro lado, Mirkin (5), encontró que durante el período postnatal los depósitos de CA y las proteínas vesiculares solubles aumentan en forma paralela. Estos resultados indicarían que las vesículas de almacenamiento también podrían tener un papel importante en el desarrollo funcional de las neuronas adrenérgicas centrales.

Debido a que las vesículas de almacenamiento de la médula adrenal de rata aparecen relativamente tarde durante la gestación, los cambios más acentuados en el contenido de CA se producen durante las primeras semanas de desarrollo postnatal (11). Durante ese período de tiempo, la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de CA y las vesículas de almacenamiento experimentan una serie de cambios, los cuales dependen en parte, del nivel de actividad de las aferencias nerviosas. Es así como ha sido demostrado que la esplacnectomía disminuye los aumentos de los depósitos de CA y los incrementos de TH y DBH dependientes de la edad en las adrenales de rata (6). Por otro lado, un aumento en la actividad esplácnica, acelera la velocidad de recuperación de los depósitos de CA en adrenales adultas que han sido depletadas de aminos mediante reserpina (12, 13). En el ganglio simpático, la administración crónica de agentes bloqueadores ganglionares específicos retarda también el perfil de desarrollo normal de las enzimas de la biosíntesis de CA (14). Esta dependencia de la actividad neural de los depósitos de CA durante el desarrollo postnatal, se observa también en las respuestas al stress. Por ejemplo, Comline y Silver (15) observaron que, en fetos de vacunos, la secreción de CA en respuesta a la asfixia, es independiente de estímulos neurogénicos; en cambio, el mismo tipo de stress aplicado dos semanas después del nacimiento, produce una aguda depleción de aminos adrenales la cual depende principalmente de la participación neuronal. Estos resultados indican que, conjuntamente con el desarrollo postnatal de los sistemas de almacenamiento de CA, se producirían cambios importantes en los mecanismos de movilización de aminos.

Durante estos últimos años, se ha realizado una serie de estudios que demuestran que los efectos producidos por drogas que actúan sobre el sistema adrenérgico, dependen también en gran medida de la edad del animal. Se sabe, por ejemplo,

que la administración de guanetidina a ratas o ratones durante las dos primeras semanas de edad, produce una irreversible y prácticamente completa simpatectomía periférica (16-19). En los adultos, la guanetidina debe ser inyectada durante períodos de tiempo mucho más largos para ocasionar daño al tejido adrenérgico (20-22). El animal en desarrollo, es más sensible también a los efectos depletadores de CA de otras drogas tales como reserpina y tetrabenazina. Por ejemplo, cuando se inyectan ratas de 11 días de edad con cualquiera de las dos drogas antes mencionadas, se produce una disminución en el contenido de CA en cerebro, la cual es más intensa y de mayor duración que la obtenida en el animal adulto (23). Por otro lado, ha sido demostrado que la administración de otras drogas que actúan sobre el sistema adrenérgico, tales como clorpromazina, metil-anfetamina o fenciclidina, a ratas durante el período de gestación, provoca una alteración en los niveles de CA en el cerebro de la rata adulta (24-26). En pollos, la inyección de reserpina a huevos fertilizados antes del período de incubación disminuye los niveles de CA en cerebro durante el desarrollo embrionario; sin embargo, a las 4 semanas de edad postnatal hay un aumento en los niveles de CA y de TH (27), y una alteración en la conducta del animal (28,29). Estos últimos resultados sugieren que la modificación del contenido de aminos tempranamente durante el desarrollo, podría ocasionar una alteración prolongada en los mecanismos de regulación de la biosíntesis de CA.

Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados acerca de los efectos de drogas sobre el desarrollo del sistema adrenérgico se midió exclusivamente el contenido de CA y solamente, en algunos casos, se determinó además la actividad de alguna de las enzimas de la biosíntesis de CA. Por e j e m p l o, Nair (26) observó que al administrar clorpromazina a ratas recién nacidas, se obtiene un aumento de los niveles

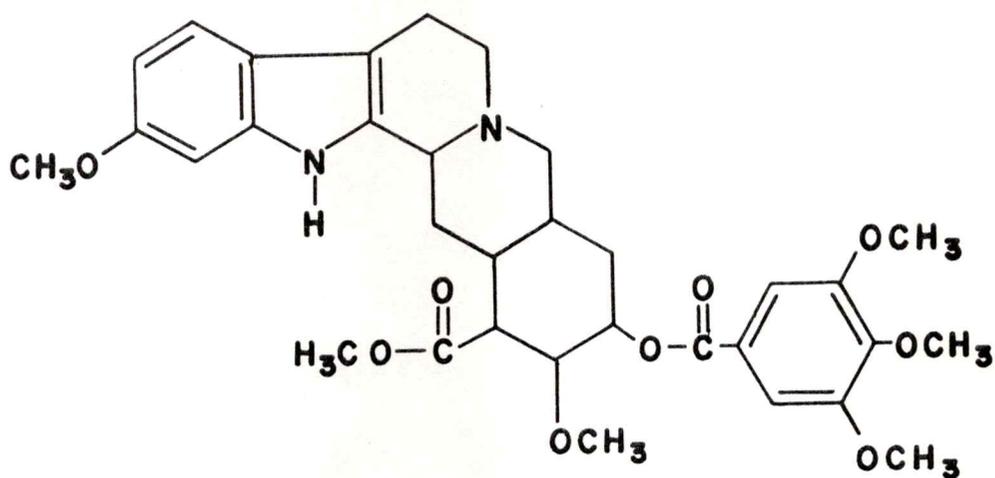
de CA en el cerebro de la rata adulta; dichos aumentos podrían deberse a un incremento de la síntesis, a una mayor capacidad de almacenamiento o a una menor liberación de neurotransmisores. Por otro lado, Liuzzi y col. (30) y Nomura y col. (31) observaron que la administración de guanetidina a ratones recién nacidos provoca una disminución prolongada en el contenido de CA en el cerebro y en el corazón; al igual que en el ejemplo anterior, no se determinó el mecanismo de esta alteración del desarrollo. Obviamente, el conocimiento de los efectos de drogas sobre el desarrollo del sistema adrenérgico, además de la determinación de los niveles de CA, requiere de un estudio más detallado de las enzimas y de la capacidad de almacenamiento de las vesículas.

El objetivo principal de esta Tesis consiste en identificar las lesiones bioquímicas o funcionales específicas inducidas en el sistema adrenérgico como consecuencia de la administración de dos drogas que depletan CA, reserpina y guanetidina durante el desarrollo de la rata. En todos los casos que serán estudiados, se compararán los efectos producidos por dichas drogas en la rata adulta con los observados en el animal en desarrollo. Ello permitirá determinar en qué forma los cambios experimentados por la médula adrenal, el corazón y el cerebro, durante el desarrollo, influyen sobre los efectos producidos por ambas drogas. Simultáneamente, y considerando que el desarrollo de la médula adrenal es a su vez dependiente tanto del grado de inervación funcional como de mecanismos de retroalimentación (32-34), se determinará en qué forma la administración pre o postnatal de tales drogas, altera a su vez el desarrollo normal de dicho tejido. La elección de la médula adrenal como sistema modelo de neurona adrenérgica, está basada en estudios que demuestran que la embriología, histología, bioquímica y farmacología de este tejido es similar a la de las neuronas adrenérgicas, y además, a que ha sido estudiada

preferentemente por un gran número de investigadores debido al mayor número de técnicas disponibles.

Las drogas simpaticopléjicas utilizadas en este estudio se escogieron debido a que, como ya se mencionó anteriormente, son capaces de alterar la función adrenérgica en los organismos inmaduros. Se seleccionaron además por las siguientes razones específicas:

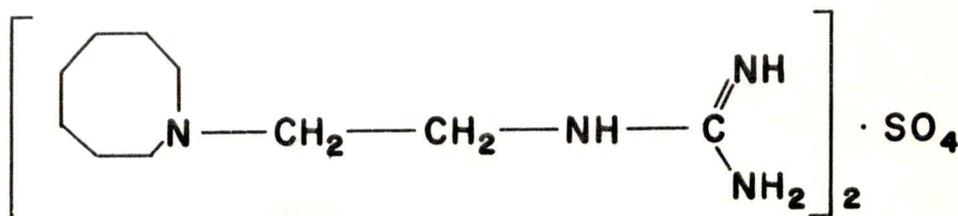
- a) Reserpina. Es una de las drogas utilizadas en el tratamiento de la hipertensión arterial. Se la suele emplear también para combatir ciertos trastornos cardiovasculares durante el desarrollo, y es además, una de las drogas empleadas en la toxemia del embarazo. La reserpina inhibe el mecanismo de captación de aminas dependiente de  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  localizado en las membranas de las vesículas de almacenamiento (35-38), provocando una depleción de aminas tanto a nivel central



**Reserpina**

como periférico. La reserpina incrementa además la actividad refleja del sistema simpático periférico, aumentando así la secreción de CA (39), realzando de esta manera el efecto depletor de la droga. La reserpina atraviesa la barrera placentaria y disminuye los niveles de CA en el animal recién nacido (40).

b) Guanetidina. Es otra de las drogas utilizadas en el tratamiento de la hipertensión. La guanetidina tiene un interés especial por el hecho de carecer de un efecto directo sobre la médula adrenal y el cerebro de ratas adultas (41-43). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la administración de guanetidina a ratas y ratones recién nacidos, provoca una disminución prolongada en los niveles de CA en el SNC (30, 31). Ello se debería, probablemente, a que en los roedores la barrera hematoencefálica no estaría completamente desarrollada a tan temprana edad permitiendo, por lo tanto, el acceso de la droga al cerebro. Esto último, sugiere que los efectos de la guanetidina pueden ser completamente diferentes en el animal inmaduro. Al igual que la reserpina, la guanetidina produce una depleción de CA en las



**Sulfato de guanetidina**

terminaciones adrenérgicas, provocando de esta manera un bloqueo de dichas neuronas (43-46). Su mecanismo de acción es muy complejo y no está del todo aclarado. Al inyectarla por vía intravenosa se observa, inicialmente, un aumento transitorio en la presión arterial similar al que se obtiene al administrar tiramina (47). Posteriormente, hay una inhibición en la conducción de los impulsos nerviosos en las fibras adrenérgicas y por lo tanto, una disminución de la liberación de CA; este efecto es similar al mecanismo de acción del bretilio. (48, 49). Finalmente, se produce una depleción de CA en la neurona adrenérgica, parecida a la obtenida con la reserpina (43, 44). Para complicar las cosas un poco más, hay estudios que indican que la guanetidina inhibe además la captación neuronal de CA a través de un mecanismo similar al de la cocaína (50).

Los resultados que se esperan obtener en esta Tesis, pueden ser de considerable importancia para valorar las consecuencias de la administración de este tipo de drogas durante la vida fetal o postnatal, en el desarrollo del sistema adrenérgico; pueden indicar además la necesidad de terapias diferentes durante el embarazo y en las distintas etapas del desarrollo.

## METODOS Y MATERIALES

### I. METODOS

#### A. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES A QUE FUERON SOMETIDAS LAS RATAS

Se emplearon ratas Sprague-Dawley obtenidas de los Laboratorios Zivic-Miller, Allison Park, Pennsylvania, U.S.A. Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación.

##### 1. Administración postnatal de reserpina

Las ratas fueron inyectadas con una dosis única de reserpina (2,5 ó 5 mg/kg, s.c.) al nacer y se sacrificaron a varios intervalos de tiempo entre 4 hr y 29 días después de haber administrado la droga. A los controles se les administró solución salina.

En otro tipo de experimentos, las ratas fueron inyectadas con reserpina o solución salina al nacer, pero además éstas se inyectaron posteriormente (a intervalos de varios días) con nicotina (10 mg/kg, s.c.), isoproterenol (0,17 mg/kg, s.c.) o con solución salina, siendo sacrificadas 3 hr después de la segunda inyección. Las dosis de nicotina y de isoproterenol elegidas son aquellas que producen la máxima estimulación de la enzima ornitina decarboxilasa en corazón (nicotina e isoproterenol) y la máxima depleción de catecolaminas adrenales (nicotina).

##### 2. Administración postnatal de guanetidina

Las ratas fueron inyectadas con guanetidina (50 mg/kg, s.c.) diariamente a partir de los 2 días de edad, durante 5 días, mientras que los controles recibieron solución vehículo (NaCl 0,9% - ácido ascórbico 0,1% - pH 7,4) recién preparada. Los animales fueron sacrificados a varios intervalos de tiempo entre

los 3 y 49 días de edad. En otros experimentos, las ratas fueron pretratadas con clorisondamina (10 mg/kg, s.c.) 30 minutos antes de la administración de guanetidina y sacrificadas 24 hr después de la segunda inyección.

### 3. Administración prenatal de reserpina

Las ratas embarazadas (todas con igual tiempo de embarazo) fueron distribuidas en jaulas especiales para crianza (una por jaula), con libre acceso al agua y a la comida. Las ratas fueron inyectadas con reserpina (1 mg/kg, s.c.) una vez al día durante 3 días consecutivos, en diferentes períodos de gestación (un sólo período por cada grupo experimental); mientras que a las ratas controles se les administró solución salina. El tamaño de las camadas varió entre 8 y 12 ratas, tanto en las controles como en las inyectadas con reserpina. Los animales fueron sacrificados entre 1 y 45 días de edad postnatal. Se utilizaron ratas de ambos sexos y sólo cuando éstos fueron fácilmente distinguibles (entre los 36 y 45 días de edad) se repartieron animales, en igual proporción de sexos, entre los grupos experimentales y los controles. En ningún caso se observó alguna diferencia atribuible al sexo en los resultados experimentales obtenidos. Para cada determinación se escogieron al azar ratas provenientes de camadas diferentes.

En otro tipo de experimentos se escogieron ratas de 3 y 14 días de edad, nacidas de ratas controles y de ratas que habían sido tratadas con reserpina durante los días 9, 8 y 7 antes del parto, y se les administró nicotina (5 ó 10 mg/kg, s.c.) o solución salina, siendo sacrificadas 4 hr después de la inyección.

## B. PREPARACION DE LOS TEJIDOS

### 1. Estudios en adrenales

Determinación de catecolaminas, actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y captación de adrenalina- $^3\text{H}$  por las vesículas de almacenamiento

Se extrajeron las adrenales de las ratas y después de eliminarles el tejido adiposo y conectivo se homogeneizaron en 2,5 ml de una solución de sacarosa 0,3 M; Tris-HCl 0,025 M (pH 7,4); iproniazida  $10^{-5}$  M (sacarosa-Tris-iproniazida) a 4°C, utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem cónico (vidrio - vidrio). En los experimentos realizados con ratas de muy corta edad se juntaron las glándulas de varios animales para así disponer de suficiente material. Se tomó una alícuota de 0,1 ml del homogeneizado recibéndola en 1,9 ml de ácido perclórico (PCA) al 3,5% y después de centrifugar a 26.000 g durante 10 min se determinó el contenido de catecolaminas (CA) en el sobrenadante. Otra alícuota de 0,5 ml del homogeneizado se diluyó con un volumen equivalente de agua destilada que contenía 2.000 unidades de catalasa de vacuno por mililitro, y se determinó la actividad de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH). Un mililitro del homogeneizado se centrifugó a 800 g durante 10 min y en el sobrenadante se determinó la captación de adrenalina- $^3\text{H}$  por las vesículas de almacenamiento de aminos.

El resto del homogeneizado se centrifugó a 26.000 g durante 10 min y se determinó la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) en el sobrenadante.

En aquellos experimentos en que no se determinó la captación vesicular de aminos, se separaron las alícuotas necesarias para la determinación de CA y DBH y el resto del homogeneizado se centrifugó directamente a 26.000 g para la

determinación de la TH.

En los experimentos en que a las adrenales sólo se les determinó el contenido de CA, las glándulas fueron homogeneizadas directamente en 2,5 ml de PCA al 3,5% y después de centrifugar a 26.000 g durante 10 min se cuantificaron las CA en el sobrenadante.

## 2. Estudios en cerebro

- a) Determinación de la actividad de tirosina hidroxilasa y ornitina decarboxilasa. Los cerebros se pesaron y homogeneizaron en 9 volúmenes de Tris-HCl 0,01 M (pH 7,2) y se separaron alícuotas de 0,1 ml para la determinación de la actividad de la TH. El resto de los homogeneizados se diluyó con un volumen equivalente de Tris-HCl 0,01 M (pH 7,2) y después de centrifugar a 26.000 g durante 10 min se determinó la actividad de la ornitina decarboxilasa en el sobrenadante.
- b) Determinación de la actividad de tirosina hidroxilasa y captación sinaptosomal de tiramina-<sup>3</sup>H. Los cerebros se pesaron y homogeneizaron en 9 volúmenes de sacarosa-Tris-iproniazida y se separaron alícuotas de 0,1 ml para la determinación de la actividad en la TH. El resto del homogeneizado se centrifugó a 1.000 g durante 10 min y el sobrenadante se centrifugó a 11.000 g durante 20 min. El pellet sinaptosomal crudo se resuspendió en Krebs-Henseleit (volumen original) que contenía además iproniazida 1,25 µM y ascorbato 2 µM y se recentrifugó a 11.000 g. El pellet lavado se resuspendió cuidadosamente en Krebs-Henseleit-iproniazida-ascorbato (la mitad de su volumen original), utilizando un Potter - Elvehjem (teflón-vidrio), y se determinó la captación sinaptosomal de tiramina-<sup>3</sup>H.

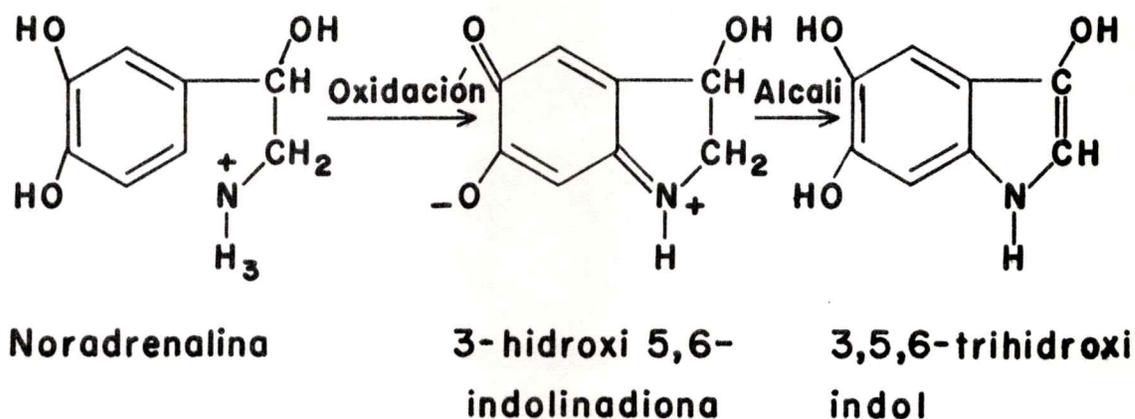
### 3. Estudios en corazón y cerebro

Determinación de la actividad de la ornitina decarboxilasa

Los tejidos se pesaron y homogeneizaron en 20 volúmenes de Tris-HCl 0,01 (pH 7,2), utilizando un Politrón. El homogeneizado se centrifugó a 26.000 g durante 10 min y se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante.

#### C. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS

Se siguió la técnica del trihidroxiindol (51) utilizando un autoanizador (52). El método se basa en la oxidación y ciclación de las catecolaminas, cuya ecuación general es la siguiente:



En la Fig. 1 aparece un esquema del autoanizador, cuyo funcionamiento básico es el siguiente. La muestra es succionada desde uno de los vasitos portamuestras y oxidada con un volumen equivalente de una solución de ferricianuro de

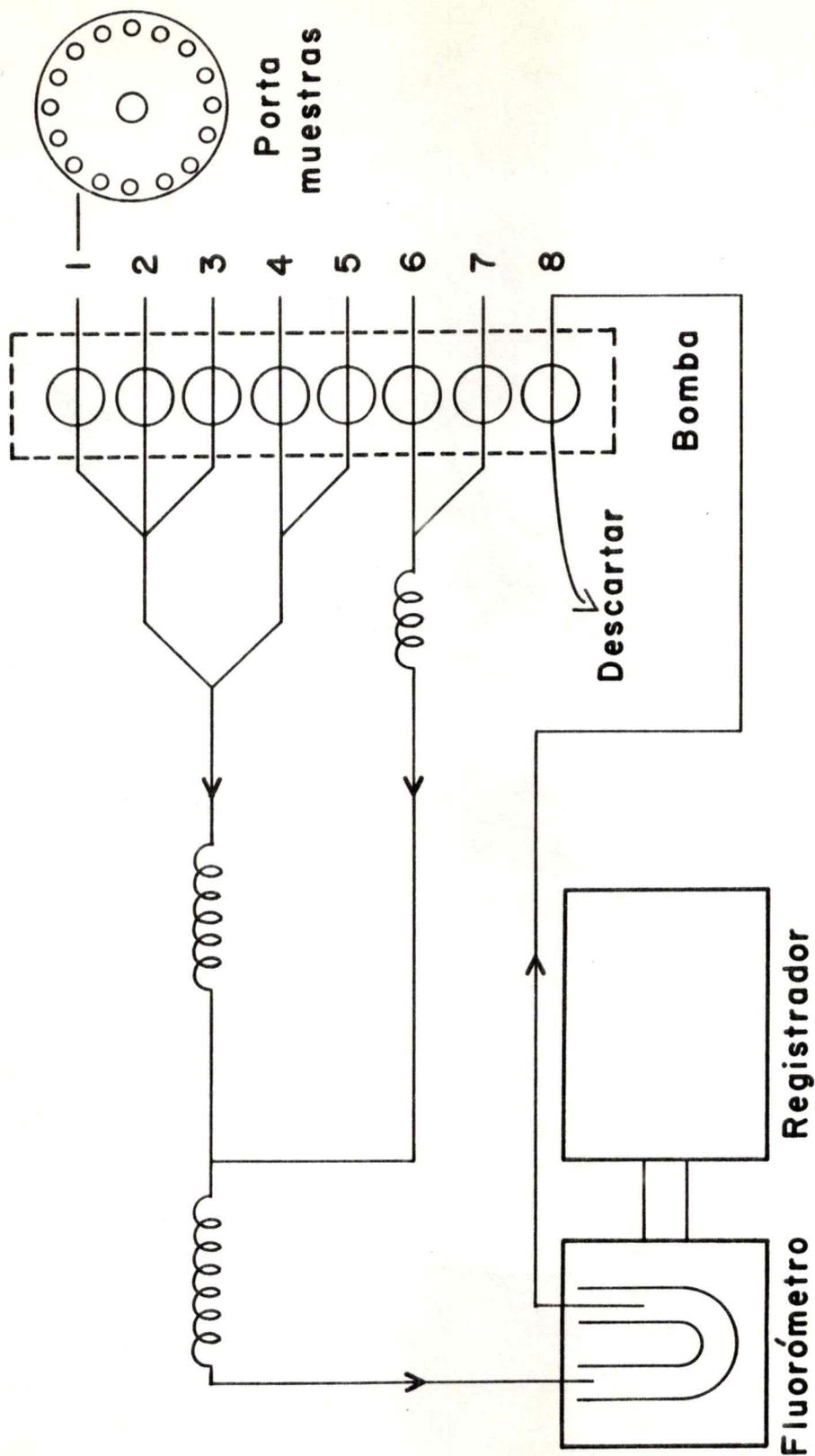


Fig. 1. Esquema del autoanalizador de catecolaminas. Los reactivos y las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 1 muestra; 2 aire; 3 agua; 4 ferricianuro de potasio 0,01% en tampón Tris-Acetato 0,15 M-Brij 0,03%, pH 6,0; 5 aire; 6 NaOH 2,5 N; 7 ácido ascórbico 0,3% en tampón Tris-Acetato-Brij.

potasio. Los productos de oxidación de las aminos (cromógenos) se mezclan a continuación con una solución de hidróxido de sodio, la cual los convierte en compuestos fluorescentes (trihidroxi-indoles). Al álcali se le agrega un agente estabilizador para evitar la descomposición oxidativa de estos últimos compuestos; cuando se emplea ácido ascórbico, la fluorescencia que se obtiene a partir de mezclas de adrenalina y noradrenalina es aditiva.

Antes de cada determinación se hizo una curva de calibración para adrenalina, con concentraciones entre 0,005 y 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , a partir de una solución madre que contenía 100  $\mu\text{g}$  de base libre/ml (18,2 mg de bitartrato de L-adrenalina en 100 ml de HCl 0,01 N).

Una de las ventajas principales de este método es la de poder manejar un gran número de muestras en un tiempo relativamente corto (40 determinaciones por hora), y con escasa participación personal. El equipo elimina además dificultades tales como: contaminación del material de vidrio, polvo, variaciones en el control de los tiempos de adición de los reactivos, inestabilidad de la solución de ácido ascórbico en hidróxido de sodio, etc., problemas que, en general, tienden a aumentar la fluorescencia de las muestras. La sensibilidad de este método es de 0,02  $\mu\text{g}$  de aminos totales por muestra.

#### D. TIROSINA HIDROXILASA

La tirosina hidroxilasa (TH; L-tirosina, tetrahidropteridina: oxígeno oxidoreductasa; E.C. 1.14.3.a) es la enzima que cataliza la oxidación de tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), utilizando oxígeno molecular y una tetrahidropteridina como cofactor:



La enzima es altamente específica para la L-tirosina, requiere  $Fe^{2+}$  para su actividad máxima y es inhibida por una gran variedad de aminoácidos y por catecoles; estos últimos mediante inhibición competitiva con el cofactor pterídínico (53, 54). Las evidencias disponibles indican que la TH es la enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas (8), y que su actividad está regulada por mecanismos de retroalimentación (42, 53, 55). La mayoría de los resultados experimentales sugieren que la enzima estaría presente en la fracción soluble de los homogeneizados (56-58), aunque hay ciertas evidencias que indican lo contrario (53, 59, 60). En el cerebro, la enzima se encuentra principalmente en la fracción sinaptosomal (61). La TH ha sido parcialmente purificada a partir de adrenales de bovino (62); posee un peso molecular de 34.000 y contiene  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  como grupo prostético.

## 1. Determinación de la actividad en médula adrenal

Se utilizó la técnica de Waymire y col. (63), la cual consiste en la decarboxilación enzimática de la L-dihidroxi - fenilalanina-1- $^{14}\text{C}$  (L-DOPA) que se genera a partir de L-tirosina-1- $^{14}\text{C}$  por acción de la TH. El método se basa en la mayor afinidad de la DOPA decarboxilasa por L-DOPA que por L-tirosina. Para ello se agrega un exceso de decarboxilasa al medio de incubación y el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado (casi exclusivamente a partir de la L-DOPA) es captado y cuantificado.

El medio de incubación contenía (en un volumen final de 0,55 ml): 0,1 ml del sobrenadante 26.000 g (ver: Preparación de los tejidos); 100  $\mu\text{moles}$  de tampón acetato de sodio, pH 6,1; 0,5  $\mu\text{moles}$  de sulfato ferroso; 1  $\mu\text{mol}$  de 2-amino-4-hidroxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahydropteridina-HCl ( $\text{DMPH}_4$ ); 20  $\mu\text{moles}$  de 2-mercaptoetanol; 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato de sodio mono básico 0,18 nmoles de L-tirosina-1- $^{14}\text{C}$  (50 mCi/mmol); 0,03  $\mu\text{moles}$  de L-tirosina; 5 nmoles de piridoxal fosfato y 7,5 unidades de DOPA decarboxilasa. La mezcla de reacción se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hr en recipientes de vidrio de 2,5 x 6,0 cm provistos de un tapón de goma que sostiene un pequeño capacho de plástico (Kontes Glass Co., Vineland, N.J., USA) situado aproximadamente a 1 cm de la superficie del medio de incubación y conteniendo un trozo de papel filtro de unos 4  $\text{cm}^2$  de superficie aproximadamente. La reacción se detuvo con 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% inyectados a través del tapón de goma. De la misma manera se agregaron 0,2 ml de hidróxido de hiamina en el interior del capacho (para atrapar el  $^{14}\text{CO}_2$ ) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por otros 30 min. A continuación se cortó el vástago que sujeta el capacho mediante una tijera y después de secar la parte exterior del capacho mediante papel filtro se recibió en 10 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad

enzimática está expresada en unidades (una unidad equivale a 1 nmol de  $^{14}\text{CO}_2$  producido por hora y por glándula).

## 2. Determinación de la actividad en cerebro

Los cerebros se homogeneizaron en 9 volúmenes de saca-rosa-Tris-iproniazida y se determinó la actividad de la TH directamente en el homogeneizado (0,1 ml) en la forma descrita para las adrenales, pero agregando además al medio de incubación Tritón (0,1%) y  $\text{CaCl}_2$  (0,7 mM) (concentraciones finales) con el objeto de optimizar la actividad. La actividad enzimática está expresada en unidades (una unidad equivale a 1 nmol de  $^{14}\text{CO}_2$  producido por hora y por cerebro).

### E. DIHIDROXIFENILALANINA DECARBOXILASA (DOPA DECARBOXILASA)

La DOPA decarboxilasa (DDC; L-3,4-dihidroxifenilalanina carboxi-liasa; E.C. 4.1.1.26) es la enzima que cataliza la conversión de DOPA a dopamina (64), pero es activa además con todos los L-aminoácidos aromáticos naturales, y es por eso que se le conoce más bien como decarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (65). Está distribuída en cantidades apreciables en la mayoría de los tejidos de los mamíferos incluyendo hígado, estómago, cerebro y riñón; razón por la cual se piensa que su función en el metabolismo no estaría limitada a la biosíntesis de CA. Se encuentra en la fracción soluble de los homogeneizados celulares, habiéndose detectado además una pequeña cantidad (2-10%) en la fracción correspondiente a las vesículas de almacenamiento de la médula adrenal (57). La enzima ha sido purificada a partir de riñón de cerdo; posee un peso molecular de 109.000 y contiene piridoxal fosfato como grupo prostético (66).

## 1. Preparación a partir de riñones de cerdo

Se siguió el método de Waymire y col. (63). Los riñones obtenidos de cerdos recién sacrificados fueron recibidos en hielo y trasladados rápidamente al laboratorio. Después de eliminarles la grasa y el tejido conjuntivo, se disecaron las cortezas, y una vez pesadas se homogeneizaron en 4 volúmenes de sacarosa 0,32 M utilizando una juguera a  $3/4$  de su velocidad máxima, durante 1 min, dos veces. El homogeneizado se centrifugó a 6.000 g durante 15 min. El sobrenadante se recentrifugó a 27.000 g durante 1 hr y al sobrenadante se le agregó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado (pH 8,0) lentamente hasta lograr un 37% de saturación. Se agitó 30 min y el precipitado fue eliminado mediante centrifugación a 27.000 g durante 30 min. El sobrenadante se llevó ahora hasta un 55% de saturación y se agitó nuevamente por otros 30 min, se centrifugó a 27.000 g durante 30 min y las proteínas precipitadas se resuspendieron en glicerol al 20% (70 ml por riñón aproximadamente). Todas las operaciones fueron realizadas a 4°C.

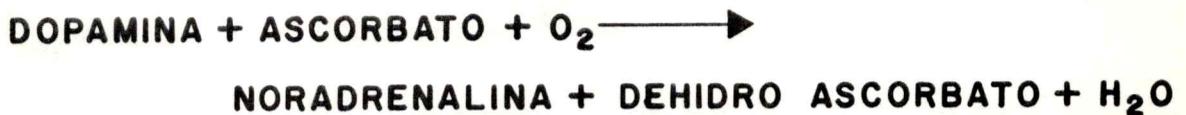
## 2. Determinación de la actividad

Se utilizó el método de Waymire y col. (63) que consiste en medir la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  producida por la enzima a partir de DL-DOPA-1- $^{14}\text{C}$ , en un medio de incubación similar al empleado en la determinación de la actividad de la tirosina hidroxilasa, puesto que la enzima debe funcionar bajo dichas condiciones. Se utilizó una concentración de DL-DOPA-1- $^{14}\text{C}$  de 15 nmoles (2,5 mCi/mmol), siendo éste el valor estimado equivalente a la máxima cantidad de L-DOPA que se cree se produce en el medio de incubación en que se determina la actividad de la tirosina hidroxilasa. Después de incubar la mezcla de reacción a 37°C durante 15 min, la reacción se detuvo con TCA al 10% y el  $^{14}\text{CO}_2$  producido se captó y cuantificó en la forma descrita

anteriormente. Una unidad de decarboxilasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la decarboxilación de 1 nmol de L-DOPA en 30 min.

#### F. DOPAMINA $\beta$ -HIDROXILASA

La dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH; 3,4-dihidroxifeniletilamina, ascorbato: oxígeno oxidoreductasa; E.C. 1.14.2.1) es la enzima que cataliza la oxidación de dopamina a noradrenalina:



La enzima es relativamente inespecífica pues es capaz de oxidar una gran variedad de feniletilaminas a sus correspondientes derivados  $\beta$ -hidroxilados (67, 68). La DBH parece estar localizada casi exclusivamente en las vesículas de almacenamiento de catecolaminas (57, 69-71), en donde se la encuentra tanto en la fracción soluble como en la particulada de las vesículas (57, 71-73). La proporción entre ambas formas de la enzima es variable en las distintas especies estudiadas, sin embargo ella es relativamente constante para una especie determinada en condiciones de reposo (72). La médula adrenal, el cerebro de rata, el conducto deferente y el corazón de bovino contienen potentes inhibidores endógenos de la DBH cuya participación fisiológica en la regulación de la actividad de la enzima y por lo tanto de la síntesis de noradrenalina, es aún desconocida (72, 74-76). Estos inhibidores endógenos pueden ser inactivados mediante compuestos tales como:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,

$\text{Ag}^+$ , p-hidroximercuribenzoato (PMB), N-etilmaleimida (NEM) y tranilcipromina (TCP) (72, 74). La enzima ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de adrenales de bovino (77) y más recientemente de feocromocitoma, suero humano (78, 79) y de adrenales de rata (80); posee un peso molecular de 290.000 y contiene  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  como grupo prostético.

#### Determinación de la actividad en médula adrenal

Se siguió el método de Friedman y Kaufman (77) el cual utiliza tiramina- $^3\text{H}$  uniformemente marcada como sustrato. Se tomaron alícuotas de 0,4 ml (en duplicado) del homogeneizado diluído con agua más catalasa\* (ver: Preparación de los tejidos) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hr en un medio que contenía: buffer fosfato de potasio (pH 5,8), 100  $\mu\text{moles}$ ; fumarato de sodio\* (pH 5,8), 60  $\mu\text{moles}$ ; ascorbato de sodio\*, 1  $\mu\text{mol}$ ; ATP, 5  $\mu\text{moles}$ ; TCP, 0,5  $\mu\text{moles}$ ; catalasa, 700 unidades; PMB, 5  $\mu\text{moles}$ ; tiramina fría, 0,01  $\mu\text{mol}$  y tiramina- $^3\text{H}$ , 1  $\mu\text{Ci}$ , en un volumen final de 1 ml. La reacción se detuvo con 1 ml de PCA al 7% y el precipitado se descartó mediante centrifugación. Se transfirió 1 ml del sobrenadante a un recipiente de vidrio de 2,5 x 6,0 cm y se alcalinizó con 0,3 ml de hidróxido de amonio 15 N.

---

\* Para obtener el máximo de actividad "in vitro" es necesario agregar catalasa y un ácido dicarboxílico (fumarato, por ej.,). La catalasa protege a la enzima al descomponer el agua oxigenada que se forma durante la reacción, mientras que el fumarato aumenta la velocidad de reacción de la enzima reducida con el oxígeno. El ascorbato reduce a la enzima, pero hasta este momento, se desconoce si es el verdadero cofactor fisiológico.

Después de oxidar los derivados  $\beta$ -hidroxilados mediante 0,25 ml de metaperyodato de sodio al 2%, se detuvo la reacción con 0,25 ml de glicerol al 10%, se acidificó con 1 ml de HCl 5 N, se agregaron 7 ml de tolueno y se agitó la mezcla vigorosamente durante 10 min. Se dejó decantar la solución y se transfirieron 5 ml de la capa de tolueno (conteniendo el aldehído radiactivo formado) a un frasco de conteo. Se agregaron 10 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad enzimática está expresada en unidades (una unidad equivale a 1 nmol de octopamina-<sup>3</sup>H producido por hora y por glándula).

#### G. ORNITINA DECARBOXILASA

La ornitina decarboxilasa (ODC; L-ornitina carboxiliasa; E.C. 4.1.1.17) es la enzima que cataliza la decarboxilación de ornitina a putrescina, siendo esta la primera etapa en la biosíntesis de poliaminas (81, 82).

Una de las características principales de la enzima es que su actividad y por lo tanto los niveles de poliaminas, varía rápidamente de acuerdo al estado metabólico celular. Es así como se ha demostrado que en todos los tejidos con una elevada proliferación y diferenciación celular, uno de los primeros cambios bioquímicos demostrables lo constituye la elevación en la actividad de la ODC (83-85). La enzima es de tipo soluble y, como la mayoría de las decarboxilasas, requiere del cofactor piridoxal fosfato para su actividad máxima (86); es específica para la L-ornitina y su vida media es una de las más cortas descritas para enzimas de mamíferos (10 a 20 min en hígado de rata) (86, 87). La ODC ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de hígado de rata y posee un peso molecular de 70.000 (88).

### Determinación de la actividad

Se siguió el método descrito por Russell y Snyder (82), ligeramente modificado. Se incubaron alícuotas de 0,9 ml del sobrenadante a 26.000 g (ver: Preparación de los tejidos) a 37°C durante 30 min en un medio (volumen final 1 ml) que contenía: ditiotreitól, 0,5  $\mu$ moles; piridoxal fosfato, 0,5  $\mu$ moles y ornitina- $^{14}\text{C}$ , 12 nmoles como sustrato. El  $^{14}\text{CO}_2$  se atrapó y cuantificó de la misma forma descrita para la determinación de la actividad de la TH. La actividad enzimática está expresada en unidades (una unidad equivale a 1 nmol de  $^{14}\text{CO}_2$  producido por hora y por gramo de tejido).

### H. CAPTACION DE CATECOLAMINAS POR LAS VESICULAS DE ALMACENAMIENTO DE AMINAS

Las vesículas de almacenamiento son estructuras subcelulares altamente especializadas para captar, sintetizar, almacenar y secretar catecolaminas (89).

La captación vesicular de aminas cumple principalmente dos funciones muy importantes: 1) captar dopamina, el precursor inmediato de la noradrenalina; de no existir este mecanismo, la velocidad de síntesis de noradrenalina estaría determinada por la difusión pasiva de dopamina hacia el interior de la vesícula de almacenamiento, y 2) recaptar las catecolaminas que han difundido al citoplasma.

Las vesículas son capaces de incorporar aminas exógenas a 30°C, pero no a 0°C. Esta captación es estimulada por ATP-Mg $^{2+}$  e inhibida por reserpina y por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrúlicos tales como N-etilmaleimida (NEM). Las evidencias actuales indican que la captación de aminas se realizaría a través de un transporte activo (90, 91).

Determinación de la captación de adrenalina-<sup>3</sup>H por las vesículas adrenales aisladas

Se utilizó el método de Slotkin y Kirshner (92). Para ello, se separaron alícuotas de 0,5 ml de la preparación vesicular (ver: Preparación de los tejidos) recibéndolas en tubos de centrífuga que contenían: 0,1 ml de ATP-Mg<sup>2+</sup>, 50 mM; 5 µCi de adrenalina-<sup>3</sup>H; 0,1 ml de adrenalina 1 mM (para contrarrestar cualquier diferencia en la concentración extravascular de adrenalina entre las muestras), y 0,3 ml de sacarosa 300 mM-Tris-HCl 25 mM (pH 7,4). Las muestras se incubaron a 30°C durante 30 min (con agitación) y los blancos se mantuvieron en hielo. La captación de adrenalina-<sup>3</sup>H se detuvo con 2 ml de sacarosa-Tris a 4°C y las vesículas fueron sedimentadas mediante centrifugación a 26.000 g durante 10 min. El sobrenadante se recibió en un volumen equivalente de PCA al 7%, se recentrifugó a 26.000 g y en el sobrenadante se determinó el contenido de catecolaminas y la radiactividad; esto último permite conocer la actividad específica del medio de marcación. El pellet vesicular se resuspendió en sacarosa-Tris y se recentrifugó dos veces. El pellet final fue resuspendido en 3 ml de PCA al 3,5% y después de centrifugar a 26.000 g durante 10 min se determinó el contenido de catecolaminas y la radiactividad en el sobrenadante. Aunque esta preparación está contaminada con otras partículas, la captación de aminas bajo las condiciones anteriores sólo se efectúa en las vesículas de almacenamiento (92).

La captación de adrenalina-<sup>3</sup>H en cada una de las muestras se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{captación}}{\text{glándula}} = \frac{\text{cuentas por min en las vesículas}}{\text{actividad específica del medio de marcación}} \times \frac{\text{contenido de CA por glándula}}{\text{contenido de CA en las vesículas de la muestra}}$$

$$\frac{\text{captación}}{100 \mu\text{g CA}} = \frac{\text{captación por glándula} \times 100}{\text{microgramos de CA por glándula}}$$

La captación vesicular dependiente de la temperatura se obtiene restándole la captación a 0°C al valor obtenido a 30°C. La captación por glándula refleja tanto la cantidad de vesículas funcionales por glándula, como la capacidad de captación de cada una de ellas para incorporar adrenalina-<sup>3</sup>H. La captación por 100 μg CA es una medida de la capacidad individual de las vesículas en relación a su contenido endógeno de CA, y es independiente del número de vesículas presentes (93).

#### I. CAPTACION SINAPTOSOMAL DE TIRAMINA -<sup>3</sup>H

Se tomaron alícuotas de 0,5 ml de la preparación sinaptosomal (ver: Preparación de los tejidos), y se recibieron en un volumen equivalente de Krebs-Henseleit conteniendo 5 μCi de tiramina-<sup>3</sup>H (0,75 nmoles) y se incubaron a 37°C durante 5 min, mientras que los blancos se mantuvieron en hielo. La captación de tiramina-<sup>3</sup>H se detuvo con 2 ml de Krebs-Henseleit a 4°C, y los sinaptosomas marcados se centrifugaron a 10.000 g. El pellet sinaptosomal se resuspendió y centrifugó dos veces más, y finalmente los sinaptosomas fueron resuspendidos en 3 ml de agua. Se midió la radiactividad y se cuantificó la octopamina-<sup>3</sup>H formada mediante oxidación con metaperyodato, tal como se describió para la dopamina β-hidroxilasa. La tiramina-<sup>3</sup>H tiene la ventaja de que permite medir el comportamiento de las vesículas de almacenamiento de CA en el interior de la terminación nerviosa (94-96). Debido a que la dopamina β-hidroxilasa se encuentra localizada casi exclusivamente en las vesículas de almacenamiento, su actividad depende en gran medida de la

capacidad vesicular para captar aminas. Por consiguiente, la conversión de tiramina-<sup>3</sup>H a octopamina-<sup>3</sup>H, constituye una medida de la función vesicular.

En otros experimentos, los sinaptosomas marcados fueron resuspendidos en sacarosa isotónica en vez de agua y centrifugados en gradientes de sacarosa de acuerdo a Bosmann y Hems - worth (97); los resultados de estos experimentos (no mostrados) indican que la captación de tiramina-<sup>3</sup>H se realiza principalmente en los sinaptosomas.

#### J. DETERMINACION DE LA PRESION ARTERIAL SISTOLICA EN LA RATA ADULTA

Se midió en la cola de la rata mediante el método ple - tismográfico de impedancia (98, 99). En la Fig. 2a, aparece un esquema del equipo utilizado. La rata se ubica en una jaula de restricción y se le coloca un brazalete inflable en la base de la cola, el cual está conectado a un electroesfigmoma - nómetro programable. Este instrumento permite inflar y desin - flar el brazalete automáticamente a ciertos intervalos de tiempo y con una velocidad constante. Luego se colocan dos elec - trodos de superficie en la mitad de la cola (separados unos 2 cm entre sí) y se conectan a un pletismógrafo. Este instrumento permite medir cambios de resistencia eléctrica extremadamente pequeños, tales como los generados, en este caso, por las variaciones en el volumen sanguíneo del segmento de tejido que separa a ambos electrodos. Esto se traduce en un cambio de voltaje en el pletismógrafo, el cual puede ser registrado me - diante un polígrafo.

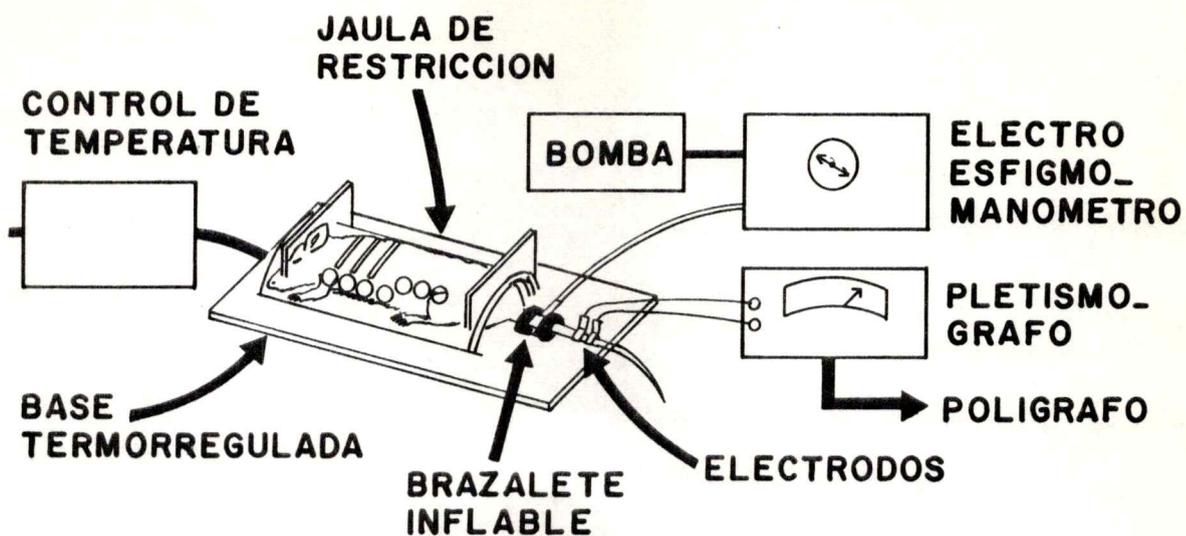


Fig. 2. a) Esquema del equipo utilizado para medir la presión arterial en la cola de la rata.

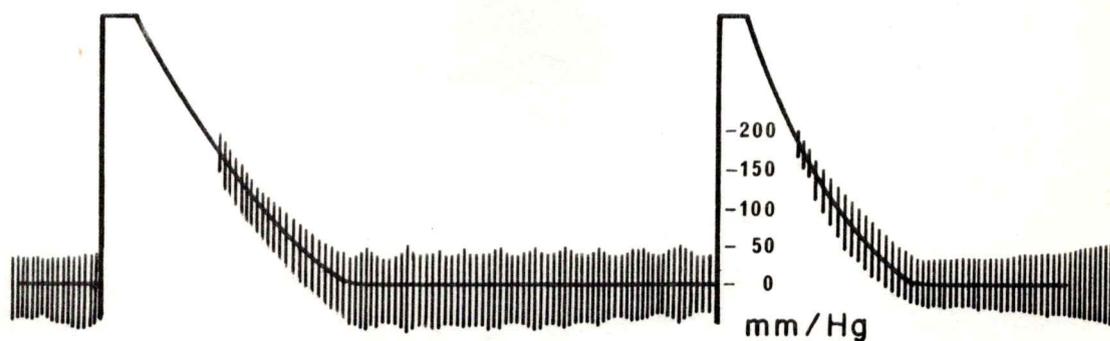


Fig. 2. b) Registro normal de la presión arterial.

La medición misma consiste en generar una presión en el brazalete ligeramente superior a la presión arterial sistólica de la rata (habiendo logrado obtener previamente un registro normal de la onda del pulso), dejando luego que ésta disminuya gradualmente. El punto en el registro en donde reaparece por primera vez la onda del pulso, corresponde a la presión arterial sistólica. En la Fig. 2b, aparece un registro normal de la presión arterial obtenida en la cola de la rata mediante este método.

### Estadística

Los resultados están expresados como los valores promedios  $\pm$  los errores tipos de las medias. Los niveles de significación se calcularon de acuerdo a la distribución t de "Student".

## II. MATERIALES

### A. GENERALES

Se obtuvieron de Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo. USA: clorhidrato de tiramina, fosfato de iproniazida, nicotina, sulfato de DL-isoproterenol, piridoxal-5'-fosfato, parahidroximercuribenzoato (PMB), catalasa de hígado de vacuno, clorhidrato del éster metílico de DL- $\alpha$ -metil-p-tirosina ( $\alpha$ MPT), adenosín 5'-trifosfato (ATP), L-tirosina, 2-mercaptoetanol, clorhidrato de trans-2-fenilcipropilamina (tranilcipromina; TCP), ascorbato de sodio, ditiotreitól (DTT) y p-clorofenilalanina (PCPA). De Ciba Pharmaceutical Co., Summit, N.J. USA: fosfato de reserpina (Serpasil), cloruro de clorisondamina (Ecolid) y sulfato de guanetidina (Isme-lin). De Winthrop Laboratories, Inc., New York, N.Y. USA: bitartrato de adrenalina. De Ayerst Laboratories, New York, N.Y. USA: clorhidrato de propranolol. De Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis. USA: 2-amino-4-hidroxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropteridina (DMPH<sub>4</sub>). De New England Nuclear Corp., Boston, Mass. USA: hidróxido de hiamina, 2,5-difeniloxazol (PPO) y 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil) benceno (POPOP). Los demás reactivos empleados fueron todos de grado analítico.

### B. ISOTOPOS

Se obtuvieron de New England Nuclear Corp., Boston, Mass. USA: tiramina-G-<sup>3</sup>H (10 Ci/mmol), dl-adrenalina-7-<sup>3</sup>H (10 Ci/mmol), L-tirosina-1-<sup>14</sup>C (10 mCi/mmol) y DL-ornitina-1-<sup>14</sup>C (50 mCi/mmol).

## RESULTADOS

### A. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION POSTNATAL DE RESERPINA EN EL DESARROLLO SIMPATICO-ADRENAL

#### 1. Efectos de la administración de reserpina (2,5 ó 5 mg/kg) a ratas recién nacidas

El peso de las ratas controles aumentó de 7 a 83 g desde el nacimiento hasta los 29 días de edad. Las ratas tratadas con 2,5 mg/kg de reserpina al nacer, tuvieron un peso entre 10 y 15% por debajo de los valores controles durante las 2 primeras semanas (Fig. 3). Las ratas inyectadas con 5 mg/kg de reserpina mostraron una deficiencia en peso mayor durante la primera semana, sin embargo su peso fue prácticamente normal a partir de la segunda semana de edad.

Durante el mismo período de tiempo, las catecolaminas (CA) adrenales de las ratas controles aumentaron de 0,2  $\mu\text{g/g}$  glándula al nacer a 5  $\mu\text{g/g}$  glándula a los 29 días de edad (Fig. 4). Cuatro horas después de haber administrado la dosis menor de reserpina, se observó una disminución significativa en el contenido de CA adrenales. Un día después, los niveles de CA habían descendido a un 20% del control. Con la dosis mayor, la depleción fue prácticamente completa a las 24 hr. Con cualquiera de las dos dosis empleadas, la depleción de CA observada 24 hr después de la administración de la droga fue seguida de una rápida recuperación, llegando a un 80% del valor normal 4 días después de haber recibido la droga. A partir de ese momento, la recuperación fue más lenta alcanzando los valores controles alrededor de las 2 semanas de edad.

En la Fig. 5 se observan los efectos de la administración neonatal de reserpina sobre la actividad de las enzimas

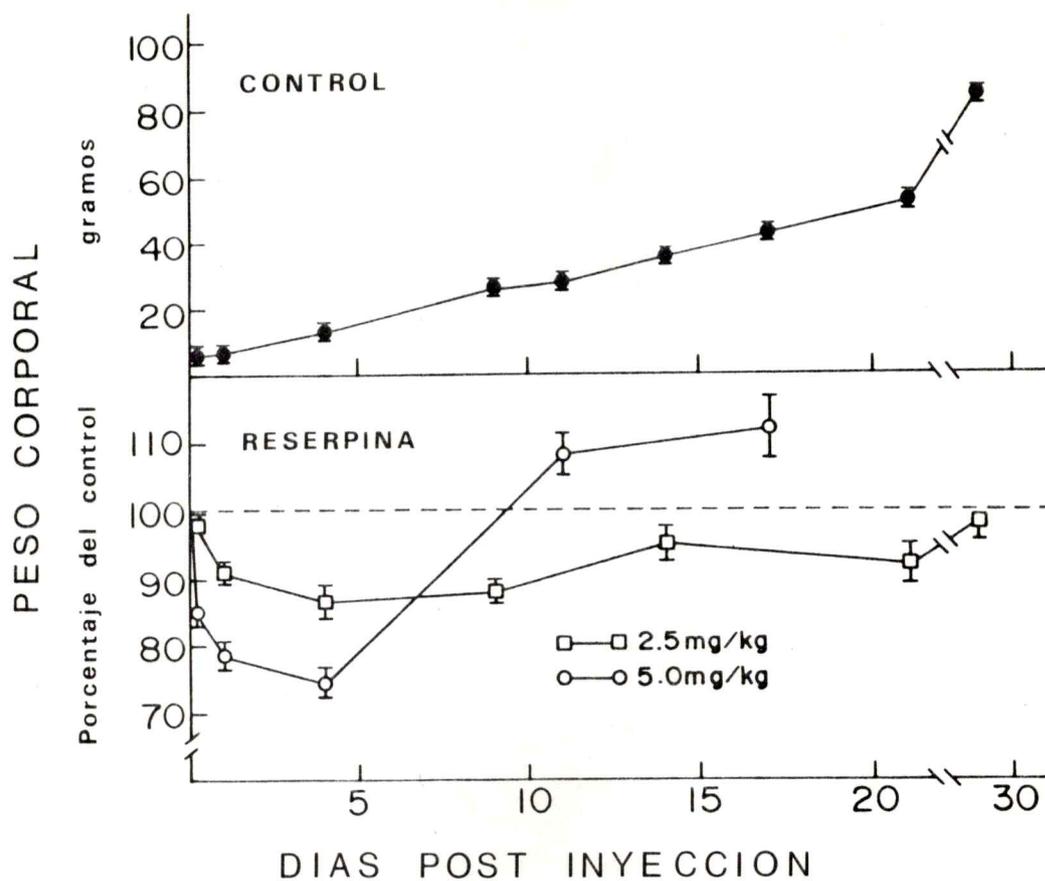


Fig. 3. Peso corporal de ratas en desarrollo después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de seis determinaciones.

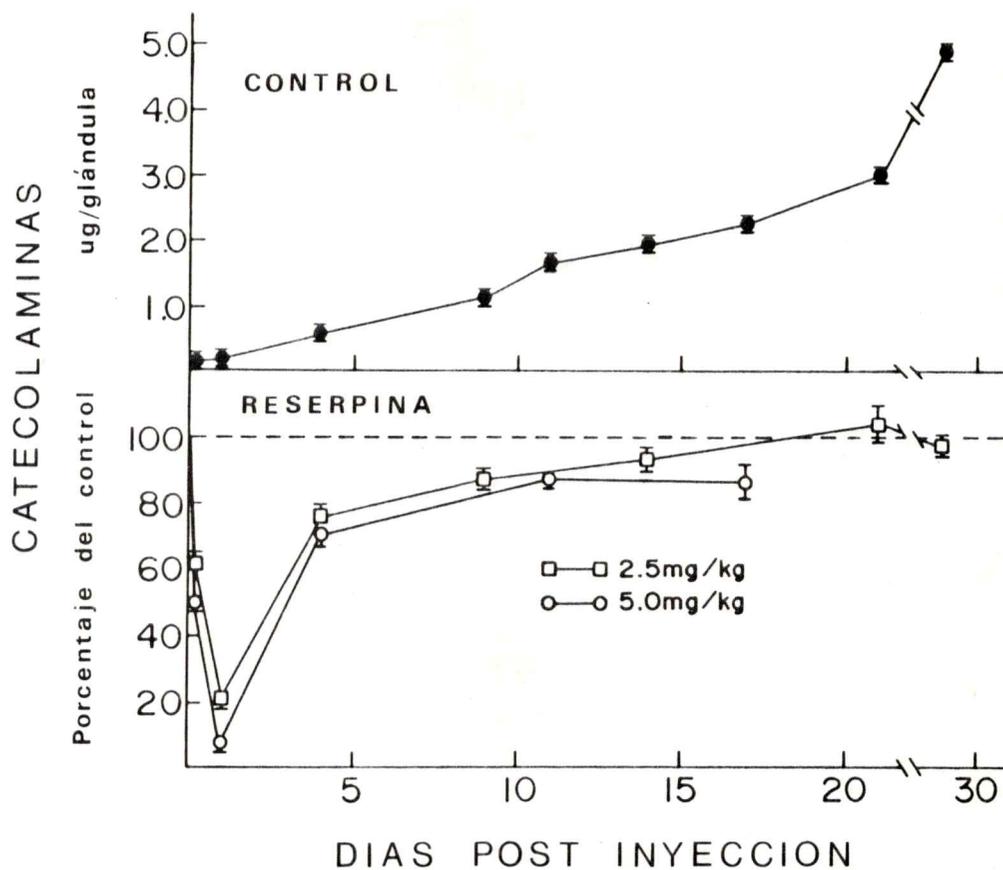


Fig. 4. Contenido de catecolaminas en adrenales de ratas en desarrollo después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de seis determinaciones.

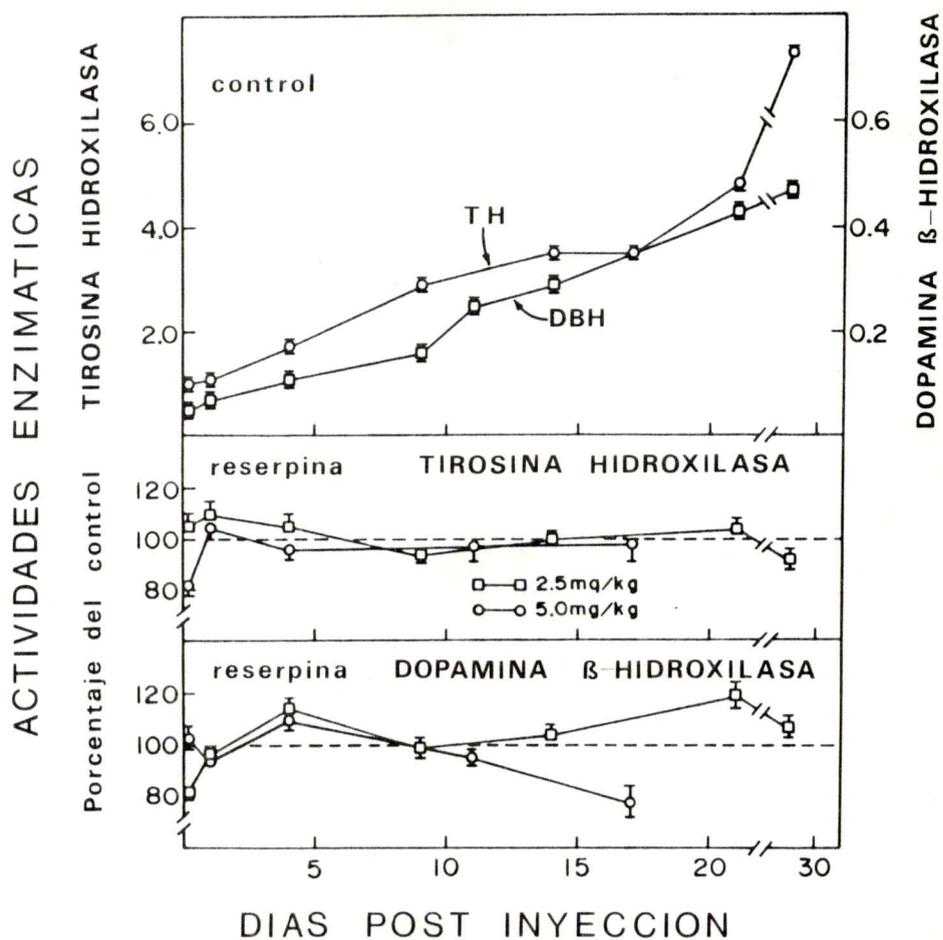


Fig. 5. Actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas en desarrollo después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de seis determinaciones.

tirosina hidroxilasa (TH) y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH) en la médula adrenal en desarrollo. Las actividades controles aumentaron de 1,2 nmoles/hr/glándula al nacer a 7,4 unidades a los 29 días para la TH y de 0,04 nmoles/hr/glándula a 0,47 unidades para la DBH en igual período de tiempo. La reserpina no produjo alteración alguna en el perfil de actividad de la TH en ningún momento del desarrollo. Del mismo modo, la DBH sólo mostró variaciones pequeñas, con un leve aumento de actividad a los 4 y 21 días después de la dosis menor y un aumento a los 4 días seguido de una disminución de actividad 17 días después de haber recibido la dosis mayor.

La capacidad de las vesículas de almacenamiento de las ratas controles para incorporar adrenalina- $^3\text{H}$  por glándula, aumentó aproximadamente 10 veces durante las 3 primeras semanas del desarrollo (Fig. 6). La captación por unidad de CA varió de 45 nmoles/100  $\mu\text{g}$  CA al nacer a 25 nmoles/100  $\mu\text{g}$  CA a las 3 semanas de edad (Fig. 7). Estos resultados indican que durante el desarrollo normal se produce un aumento en el número de vesículas funcionales, y una disminución en las capacidades de captación de las vesículas en relación al contenido de CA (11, 100).

Cuatro horas después de la administración de cualquiera de las dos dosis de reserpina utilizadas, se produjo una inhibición casi completa de la captación de adrenalina- $^3\text{H}$  expresada tanto por glándula como por unidad de CA (Fig. 6 y 7). La captación por glándula fue prácticamente normal a los 4 días de edad (Fig. 6). La captación por unidad de CA mostró un perfil diferente; el tratamiento con 2,5 mg/kg de reserpina produjo una inhibición completa a las 24 hr seguido de valores superiores a los controles ( $P < 0.02$ ) a los 4 días de edad y con una captación normal a los 9 días (Fig. 7). Con la dosis mayor la respuesta supranormal se produjo antes, fue más pronunciada y de mayor duración. De estudios anteriores se

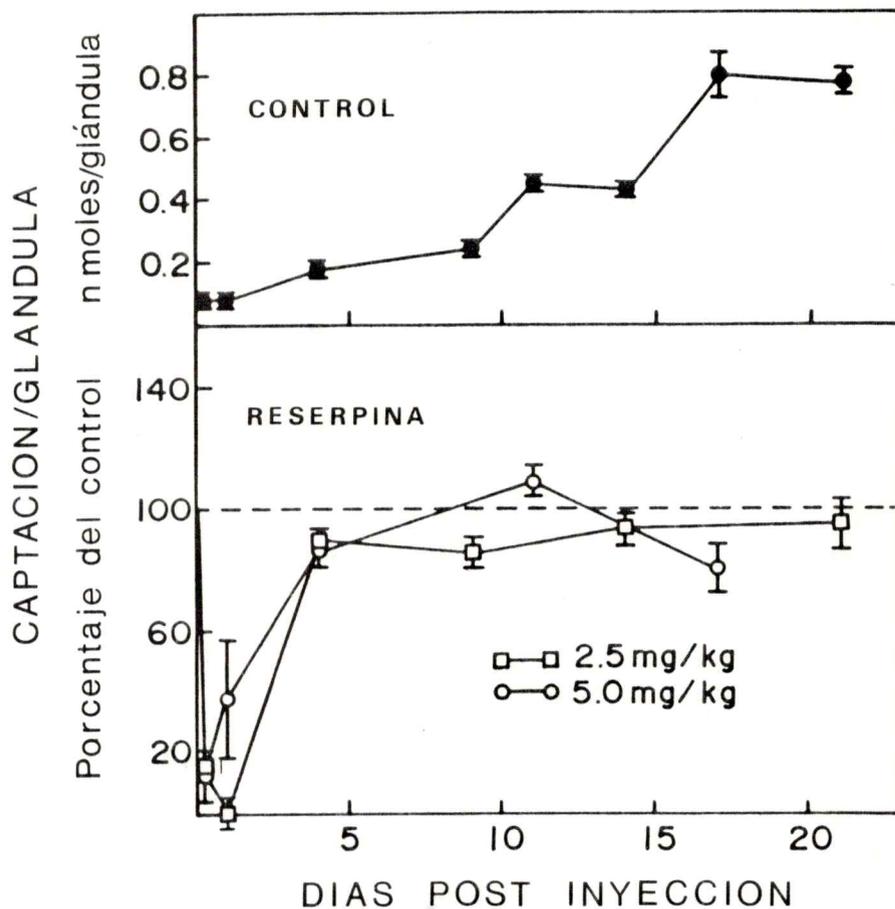


Fig. 6. Captación de adrenalina-<sup>3</sup>H en vesículas de almacenamiento aisladas de adrenales de ratas en desarrollo (expresada por glándula), después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de seis determinaciones.

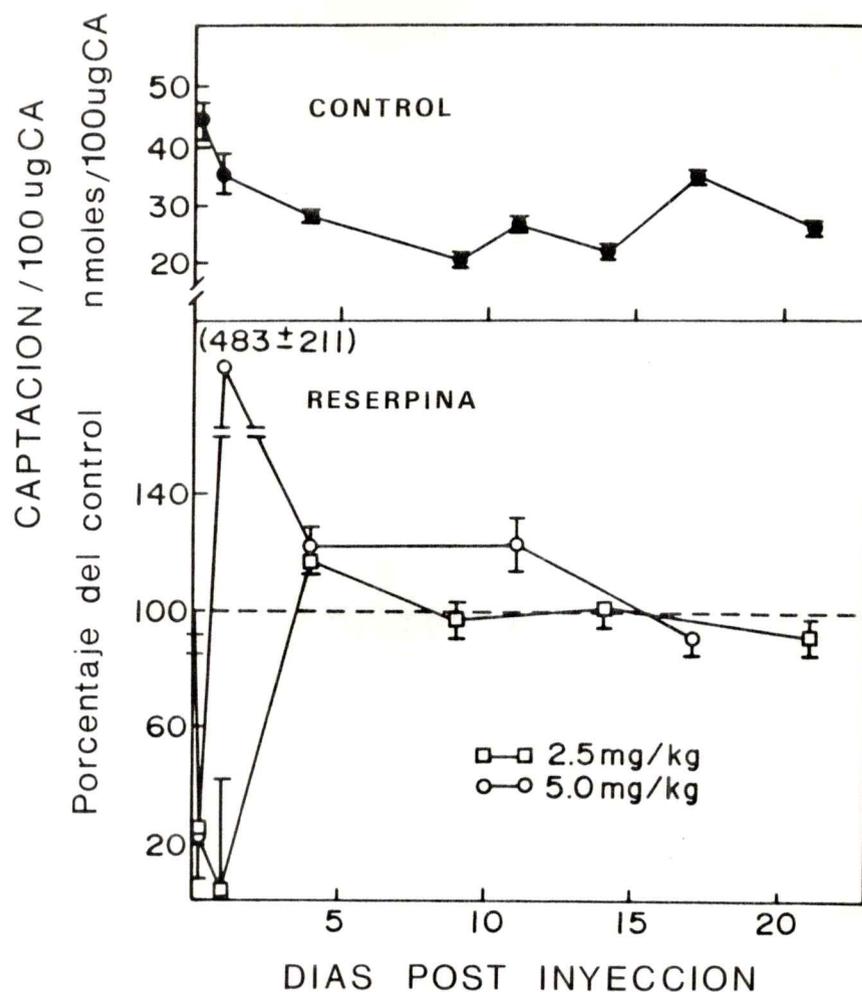


Fig. 7. Captación de adrenalina-<sup>3</sup>H en vesículas de almacenamiento aisladas de adrenales de ratas en desarrollo (expresada por 100  $\mu$ g de catecolaminas endógenas), después de la administración de una dosis única de reserpina al nacer. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de seis determinaciones.

sabe que las elevaciones por unidad indican que las vesículas intactas remanentes después de la respuesta secretora inicial, están parcialmente depletadas de CA endógenas y que simultáneamente se ha reiniciado la síntesis de nuevas vesículas, las cuales poseen un bajo contenido inicial de CA (93).

## 2. Efectos de la administración de reserpina (2,5 mg/kg) a ratas de diferentes edades

Tres días después de haber administrado la droga, la depleción de CA fue evidente en todas las edades estudiadas con excepción de una (Fig. 8). La actividad de TH no mostró cambios significativos en ratas recién nacidas ni con 4 días de edad. Sin embargo, la administración de la droga a ratas de 8, 11 y 14 días de edad produjo un aumento de 30 a 100% sobre los valores controles. En los distintos grupos ensayados, la actividad de DBH fue siempre de un 15 a 20% superior a los controles ( $P < 0.05$ ).

## 3. Efectos del pretratamiento con clorisondamina sobre la depleción aguda de catecolaminas producida por la reserpina

Con el objeto de determinar la posible participación de estímulos espláncnicos en la depleción neonatal de catecolaminas inducida por reserpina, se administró clorisondamina (bloqueador ganglionar de larga duración) 30 minutos antes de la inyección de reserpina. Como se observa en la Tabla 1, la administración de reserpina sola (2.5 ó 5 mg/kg) a ratas recién nacidas produjo una depleción aguda de CA a las 4 hr. Esta depleción no se observó en ratas adultas inyectadas con 2.5 mg/kg de reserpina; sin embargo, la dosis mayor redujo el contenido de CA adrenales a un 57% del control. La clorisondamina no previno la depleción aguda de CA en las ratas recién nacidas. Sin embargo, la misma dosis de la droga bloqueó

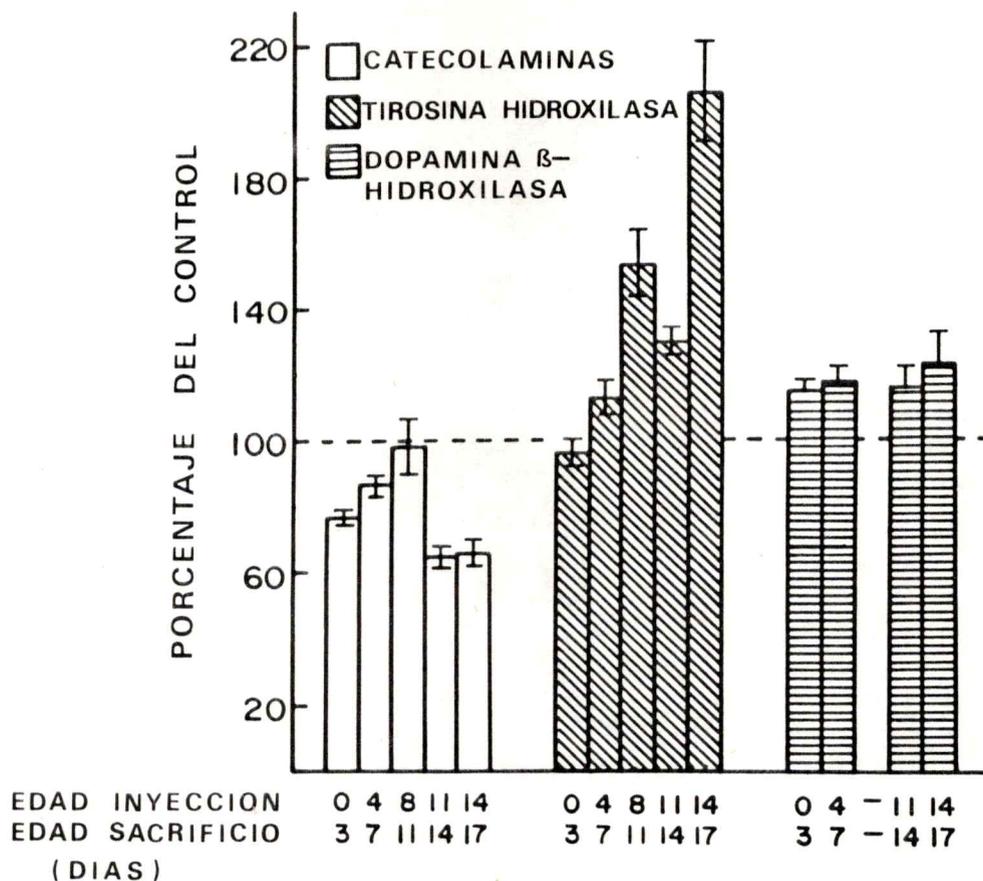


Fig. 8. Efectos de la administración de reserpina a ratas de diferentes edades sobre el contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en las adrenales. Las ratas fueron inyectadas con una dosis única de reserpina (2,5 mg/kg, s.c.) a las edades indicadas y fueron sacrificadas tres días después. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 4 a 6 determinaciones.

TABLA 1

Efectos de reserpina y clorisondamina sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas recién nacidas y adultas\*

Tratamiento		Catecolaminas	
Primera inyección	Segunda inyección (30 min después) (mg/kg)	(4 hr después de la segunda inyección) (Porcentaje del control) Recién nacidas	Adultas
Sol. Salina	Sol. Salina	100 ± 6 (27)	100 ± 5 (27)
Clorisondamina	Sol. Salina	103 ± 13 (9)	110 ± 8 (6)
Sol. Salina	Reserpina (2,5)	76 ± 3 †(11)	96 ± 6 (6)
Clorisondamina	Reserpina (2,5)	77 ± 4 †(10)	105 ± 3 (6)
Sol. Salina	Reserpina (5)	71 ± 3 §(6)	57 ± 5 §(6)
Clorisondamina	Reserpina (5)	73 ± 5 †(6)	
Sol. Salina	Reserpina (10)		65 ± 3 §(6)
Clorisondamina	Reserpina (10)		90 ± 9 (6)

\*Los valores controles fueron 0,224 ± 0,014 (26) y 16,8 ± 0,9 (27) µg/glándula, para las ratas recién nacidas (1 día de edad) y adultas (50 días de edad) respectivamente. Todas las drogas fueron administradas por vía subcutánea; la dosis de clorisondamina fue 10 mg/kg. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.). Las cifras en paréntesis indican el número de determinaciones.

†P<0,005, †P<0,002, §P<0,001 comparado con sol. salina - sol. salina

completamente la pérdida de CA en la rata adulta. La administración de clorisondamina sola no alteró los niveles de CA en las ratas recién nacidas ni en las adultas.

#### 4. Efectos de la reserpina "in vitro" sobre la captación de adrenalina-<sup>3</sup>H

Para averiguar si la depleción aguda de CA provocada por la reserpina en las ratas recién nacidas se debía a un mayor efecto de la reserpina sobre el mecanismo vesicular de captación de aminas, se agregó la droga directamente a preparaciones que contenían vesículas provenientes de animales de edades diferentes. Como se observa en la Tabla 2, la reserpina a una concentración  $10^{-7}$  M inhibió la captación entre un 75 y 85% en preparaciones de vesículas de ratas de 15, 30 y 50 días de edad. La inhibición obtenida en vesículas de ratas recién nacidas fue significativamente inferior, indicando que las acciones de la reserpina sobre la captación de aminas no serían responsables de la depleción aguda observada en neonatos.

#### 5. Efectos de la DL- $\alpha$ -metil-p-tirosina ( $\alpha$ MPT) en el contenido de catecolaminas adrenales

Para determinar si la depleción aguda de CA observada en las ratas recién nacidas pudiera deberse a una mayor velocidad de recambio, se bloqueó la síntesis de CA con  $\alpha$ MPT y se midieron los niveles de CA 4 hr después de haber administrado la droga. Como se observa en la Tabla 3, la  $\alpha$ MPT no alteró los valores de CA obtenidos en neonatos controles; la misma dosis de la droga produjo una pequeña pero significativa disminución en las CA de glándulas adultas. Estos resultados indicarían que la depleción aguda de CA inducida por reserpina en neonatos no podría explicarse solamente en base a una alteración en la velocidad de síntesis y/o degradación de CA.

TABLA 2

Efectos de la reserpina "in vitro" sobre la captación de adrenalina-<sup>3</sup>H en vesículas de almacenamiento de adrenales de ratas en desarrollo\*

Edad (días)	Captación de adrenalina (nmoles/100 µg de catecolaminas)		Porcentaje de inhibición
	Control	Reserpina (10 <sup>-7</sup> M)	
1	27,9 ± 2,5	13,9 ± 1,6	50 ± 6 †
15	22,8 ± 0,3	4,7 ± 0,4	79 ± 2
30	21,7 ± 0,5	5,6 ± 0,3	74 ± 1
50	19,3 ± 0,4	5,1 ± 0,2	74 ± 1

\* La reserpina se agregó directamente al medio de incubación. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.) de cuatro determinaciones.  
 † P < 0,001 comparado con el adulto (50 días).

TABLA 3

Efectos del éster metílico de la DL- $\alpha$ -metil-p-tirosina ( $\alpha$ MPT) sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas recién nacidas y adultas\*

Tratamiento	Recién nacidas	Catecolaminas ( $\mu$ g/glándula)	Adultas
Control	0,218 $\pm$ 0,005 (5)		15,2 $\pm$ 0,4 (6)
$\alpha$ MPT	0,228 $\pm$ 0,008 (7)		13,4 $\pm$ 0,4 †(6)

\*Las ratas fueron sacrificadas 4 hr después de la administración de 300 mg/kg de  $\alpha$ MPT, por vía intraperitoneal. Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.). Las cifras en paréntesis indican el número de determinaciones.

† P<0,02 comparado con el control.

## 6. Efectos de la nicotina en el contenido de catecolaminas adrenales y en la actividad de la tirosina hidroxilasa

Para averiguar si la ausencia de inducción de la TH en las ratas recién nacidas tratadas con reserpina se debía a una incapacidad de las adrenales para aumentar los niveles enzimáticos, se estimularon las adrenales directamente con nicotina (10 mg/kg). Un día después de haber administrado la droga a ratas de 4 y 35 días de edad, se obtuvo un aumento significativo de la TH en ambos grupos, con niveles normales de CA (Tabla 4).

## 7. Efectos de la administración de reserpina a ratas adultas

Para comparar los efectos de la reserpina obtenidos en las adrenales inmaduras con los efectos de la droga en las adrenales maduras, se inyectaron ratas adultas con 2,5 ó 5 mg/kg de reserpina y se midió el contenido de CA y la actividad de la TH y DBH en la médula adrenal. Cuatro horas después de haber administrado la droga, el contenido de CA adrenales era normal en las ratas inyectadas con 2.5 mg/kg y significativamente inferior a los controles en aquellas inyectadas con 5 mg/kg (Fig. 9). A las 24 hr, la depleción de CA era acentuada en ambos grupos de ratas; sin embargo, ésta no fue tan pronunciada como la obtenida en las ratas recién nacidas (Fig. 4). Los niveles de CA recuperaron los valores normales entre 3 y 6 días.

Un día después de administrada la dosis menor de reserpina, la TH aumentó su actividad alcanzando a los 3 días valores hasta de un 60% sobre el control (Fig. 9). Con la dosis mayor, la actividad máxima se produjo a las 24 hr (80% sobre el control), manteniéndose aún elevada a los 7 días. Con la dosis mayor, la DBH aumentó al primer día y con la menor al tercero, alcanzando valores de 65 y 25% sobre los controles respectivamente.

TABLA 4

Efectos de la nicotina sobre el contenido de catecolaminas y la actividad de la tirosina hidroxilasa en médula adrenal\*

	Catecolaminas ( $\mu\text{g/g}$ glándula)		Tirosina hidroxilasa (nmoles/glándula/hr)	
Tratamiento	(4 días de edad)	(35 días de edad)	(4 días de edad)	(35 días de edad)
Control	0,541 $\pm$ 0,000 (4)	8,31 $\pm$ 0,45 (6)	1,20 $\pm$ 0,04 (4)	10,5 $\pm$ 1,0 (6)
Nicotina	0,561 $\pm$ 0,028 (5)	8,27 $\pm$ 1,03 (6)	1,79 $\pm$ 0,08 †(5)	19,7 $\pm$ 3,0 <sup>†</sup> (6)

\*Las ratas fueron sacrificadas 24 hr después de la administración de 10 mg/kg de nicotina, por vía subcutánea. Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.). Las cifras en paréntesis indican el número de determinaciones.

† P < 0,001, + P < 0,02 comparado con el control.

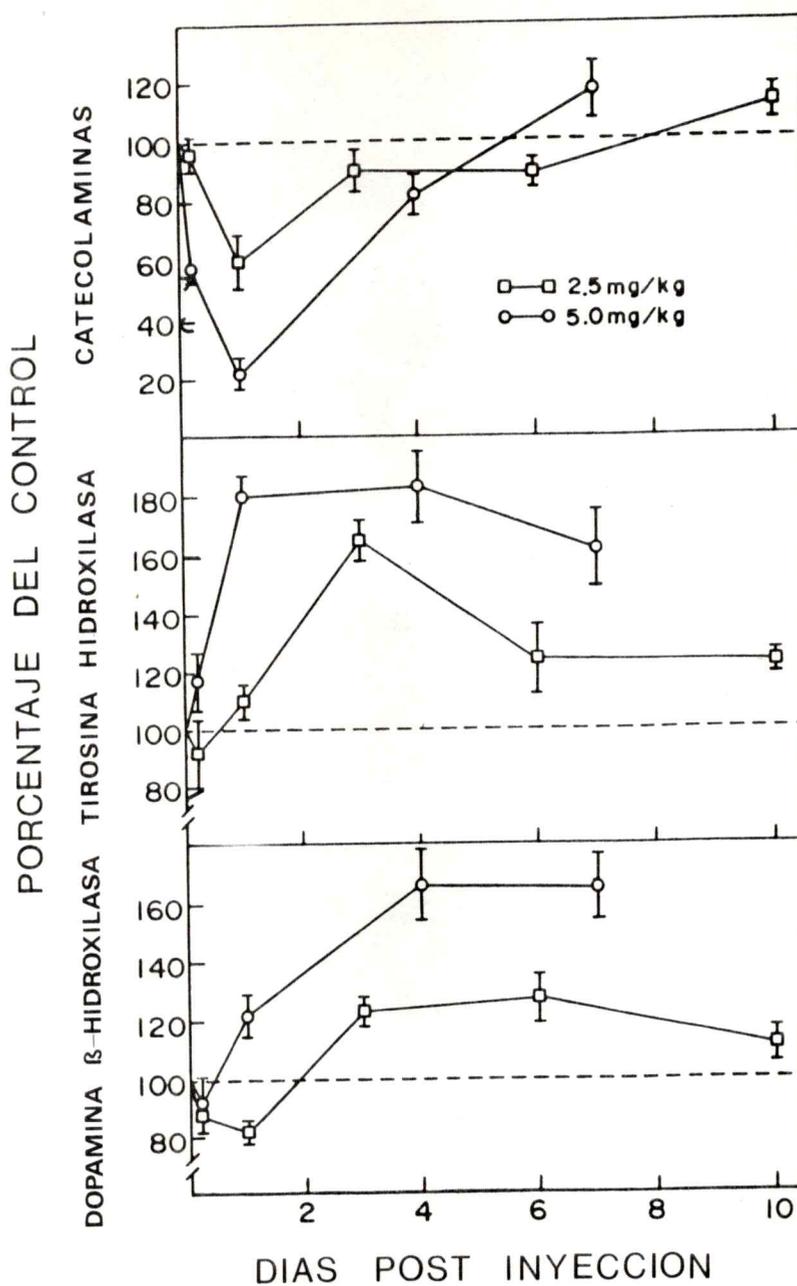


Fig. 9. Efectos de la reserpina sobre el contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas adultas (50 días de edad). Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de cinco o seis determinaciones.

Los efectos de la reserpina sobre la captación de adrenalina-<sup>3</sup>H por parte de las vesículas de adrenales adultas (Fig. 10) fueron similares a los observados en los neonatos tratados con reserpina. La captación por glándula estaba inhibida casi completamente 4 hr después de haber dado cualquiera de las dos dosis, recuperándose entre los 3 y 7 días. Expresada por unidad de CA, se observó una inhibición de la captación 4 hr después de la reserpina, seguida de valores supra normales a las 24 hr (con la dosis mayor) y a los 3 días (con la dosis menor).

#### B. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION POSTNATAL DE RESERPINA EN EL DESARROLLO DEL CORAZON Y CEREBRO

En el animal en desarrollo el corazón experimenta una serie de cambios tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Se sabe, por ejemplo, que durante el período postnatal se produce un rápido aumento en el contenido de noradrenalina, el cual parece estar relacionado con modificaciones en la frecuencia cardíaca (101). A nivel bioquímico se ha visto que durante las primeras semanas de vida de la rata, hay un descenso progresivo en la velocidad de síntesis de DNA en el tejido cardíaco y que el órgano ya adulto parece ser incapaz de replicar dicho ácido nucleico (102). Esta pérdida de la capacidad para sintetizar DNA durante el desarrollo es acelerada al administrar agonistas adrenérgicos, lo que sugiere que el sistema simpático podría participar en la diferenciación del tejido cardíaco (103).

Dentro de los factores que determinan las respuestas cardíacas a la estimulación neuronal durante el desarrollo tenemos: 1) el establecimiento de la inervación simpática del corazón, 2) la maduración de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en dicho órgano, y 3) la capacidad del tejido cardíaco para

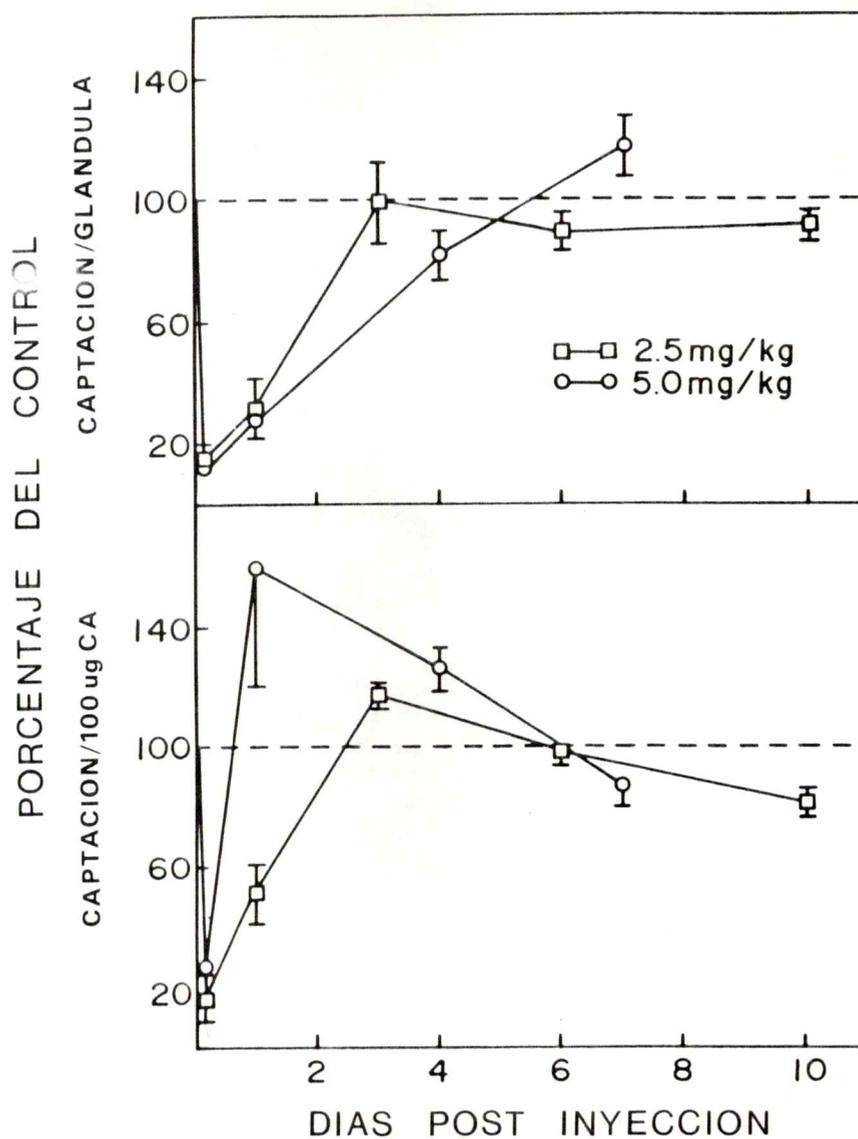


Fig. 10. Efectos de la reserpina sobre la captación de adrenalina- $^3\text{H}$  en vesículas de almacenamiento aisladas de adrenales de ratas adultas (50 días de edad), expresadas por glándula y por 100  $\mu\text{g}$  de catecolaminas endógenas. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de cinco o seis determinaciones.

responder a la estimulación de dichos receptores. Sin embargo, se desconoce en qué momento durante el desarrollo se establecerían las conexiones funcionales entre los nervios simpáticos y las células cardíacas. Este problema es de suma importancia puesto que permitiría saber a partir de qué momento los estímulos provenientes del SNC podrían influenciar el desarrollo del tejido cardíaco, y en qué forma la administración neonatal de drogas que alteran la transmisión adrenérgica podrían afectar dichas influencias.

En la rata adulta la estimulación simpática incrementa la actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC) en el tejido cardíaco (104) y por lo tanto aumenta el contenido de poliaminas y conduce finalmente a una hipertrofia del corazón (105, 106). En este estudio el rápido aumento en la actividad de la ODC, observado después de la administración de drogas simpático-miméticas, fue utilizado como un índice para evaluar la participación del sistema adrenérgico en el desarrollo y crecimiento del corazón en las ratas controles y en las tratadas con reserpina.

Estudios recientes han demostrado que, en cerebros en desarrollo, los períodos de máxima actividad de la ODC corresponden a los de mayor multiplicación celular. Se sabe además que la administración de hormonas tales como tiroxina y cortisol produce alteraciones en el desarrollo de la actividad de la ODC en cerebro de rata durante el desarrollo, acompañado de anomalías en el comportamiento (107). Esto último sugiere que los cambios de actividad de la ODC en el tiempo podrían ser utilizados como un índice precoz de anomalías en el desarrollo del cerebro. Por ello, simultáneamente con los estudios realizados en corazón, se midieron los efectos de la reserpina sobre el desarrollo de la actividad de la ODC en cerebro.

## 1. Estimulantes y bloqueadores adrenérgicos

Con el propósito de determinar las drogas adecuadas que permitieran evaluar la participación del sistema simpático en las respuestas de la ODC en corazón, se ensayaron varias drogas estimulantes y bloqueadoras adrenérgicas. En el corazón de rata adulta con función simpática intacta, la administración de nicotina produjo un aumento marcado en la actividad de la ODC a las 3 hrs (Tabla 5). Al estimular los receptores  $\beta$  directamente con isoproterenol se obtuvo una respuesta similar, aunque más acentuada. En los animales pretratados con clorisondamina o con propranolol (bloqueador  $\beta$ ) se obtuvo una inhibición total de la estimulación inducida por nicotina, indicando que dicha respuesta estaría mediada por el sistema simpático. La estimulación de la ODC inducida por isoproterenol fue inhibida totalmente al pretratar las ratas con propranolol. Sin embargo, el pretratamiento con clorisondamina inhibió sólo parcialmente dicha respuesta. Esto confirma que los aumentos de la ODC en corazón inducidos por isoproterenol están mediados principalmente por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Estudios similares realizados en ratas de 11 días de edad (no mostrados) produjeron resultados idénticos.

De lo anterior se concluye que la nicotina puede ser utilizada como un indicador de las conexiones simpáticas al corazón y el isoproterenol como un índice directo de las respuestas  $\beta$ -adrenérgicas de la ODC.

Ambas drogas fueron utilizadas para establecer si la depleción de neurotransmisores del sistema simpático producida por reserpina, era capaz de alterar los efectos estimulantes de las drogas adrenérgicas mencionadas más arriba sobre la ODC en ratas adultas y en ratas recién nacidas.

Ninguna de las drogas empleadas en estos estudios afectaron la actividad de la ODC directamente, de acuerdo a los

TABLA 5

Efectos de isoproterenol y nicotina sobre la actividad de la ornitina decarboxilasa en corazón de rata adulta\*

Primera Inyección	Segunda Inyección (1 hr después)	Ornitina decarboxilasa (nmoles <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> producidos/hr/g) (3 hr después de la segunda inyección)
Sol. Salina	Sol. Salina	0,30 ± 0,05 (6)
Sol. Salina	Nicotina	1,45 ± 0,28†(6)
Sol. Salina	Isoproterenol	3,03 ± 0,39*(5)
Clorisondamina	Nicotina	0,18 ± 0,03 (6)
Propranolol	Nicotina	0,49 ± 0,10 (6)
Clorisondamina	Isoproterenol	1,92 ± 0,18*(3)
Propranolol	Isoproterenol	0,25 ± 0,03 (6)
Clorisondamina	Sol. Salina	0,10 ± 0,03§(6)
Propranolol	Sol. Salina	0,14 ± 0,06 (6)

\*Las dosis administradas fueron: nicotina, 10 mg/kg, s.c.; isoproterenol, 0,17 mg/kg, s.c.; clorisondamina, 7,5 mg/kg, s.c.; y propranolol, 10 mg/kg, s.c. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.). Las cifras en paréntesis indican el número de determinaciones.

†P<0,001, †P<0,005, §P<0,01 comparado con sol. salina - sol. salina.

resultados obtenidos al agregar las drogas "in vitro" al medio de incubación; hasta una concentración 0,1 mM para la reserpina y 1 mM para la nicotina e isoproterenol.

## 2. Ratas adultas

En el transcurso de dos semanas, las ratas controles aumentaron de peso de 248 a 334 g; el corazón y el cerebro aumentaron de 0,81 a 0,98 g y de 1,76 a 1,90 g respectivamente (Fig. 11). Las ratas inyectadas con 2,5 mg/kg de reserpina mostraron un menor aumento en el peso corporal durante la primera semana, con una recuperación parcial a la segunda semana. El peso del corazón tuvo un desarrollo similar, mientras que el del cerebro solo mostró ligeras alteraciones. Las ratas inyectadas con 5 mg/kg de reserpina mostraron deficiencias mayores tanto en el peso corporal como en el del corazón, estando éstos aún por debajo de lo normal a los 14 días post-reserpina. El peso del cerebro nuevamente mostró pocas alteraciones.

Tres horas y media después de la administración de 2,5 ó 5 mg/kg de reserpina a ratas adultas, se produjo una disminución significativa en la actividad de la ODC en corazón (Fig. 12) y a las 24 hr los niveles enzimáticos habían descendido prácticamente a cero; la actividad enzimática se normalizó en 2 semanas aproximadamente. A continuación, se estudiaron los efectos de la reserpina sobre la capacidad de la nicotina para estimular la ODC. Veinticuatro horas después de la administración tanto de la dosis menor de reserpina como de la mayor, los incrementos en ODC inducidos por nicotina fueron marcadamente inferiores a los valores controles (Fig. 12). A los dos días post-reserpina (dosis mayor), la estimulación no fue significativamente diferente de cero. Las respuestas disminuídas fueron seguidas de valores supranormales a los 7 y 14 días post-reserpina (dosis menor y mayor

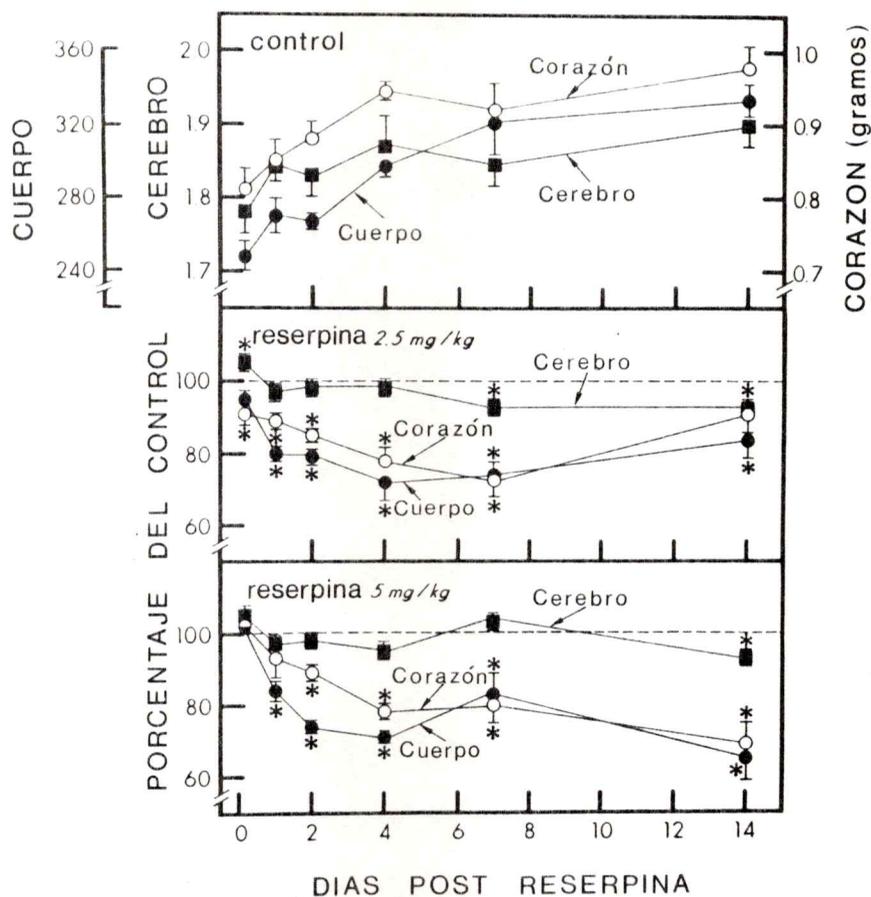


Fig. 11. Peso corporal, del corazón y cerebro de ratas adultas después de la administración de una dosis única de reserpina. El primer punto corresponde a las 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> horas después de la inyección de la droga. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 a 12 determinaciones; los asteriscos indican los grados de significancia ( $P < 0,05$  o menor) comparado con los controles.

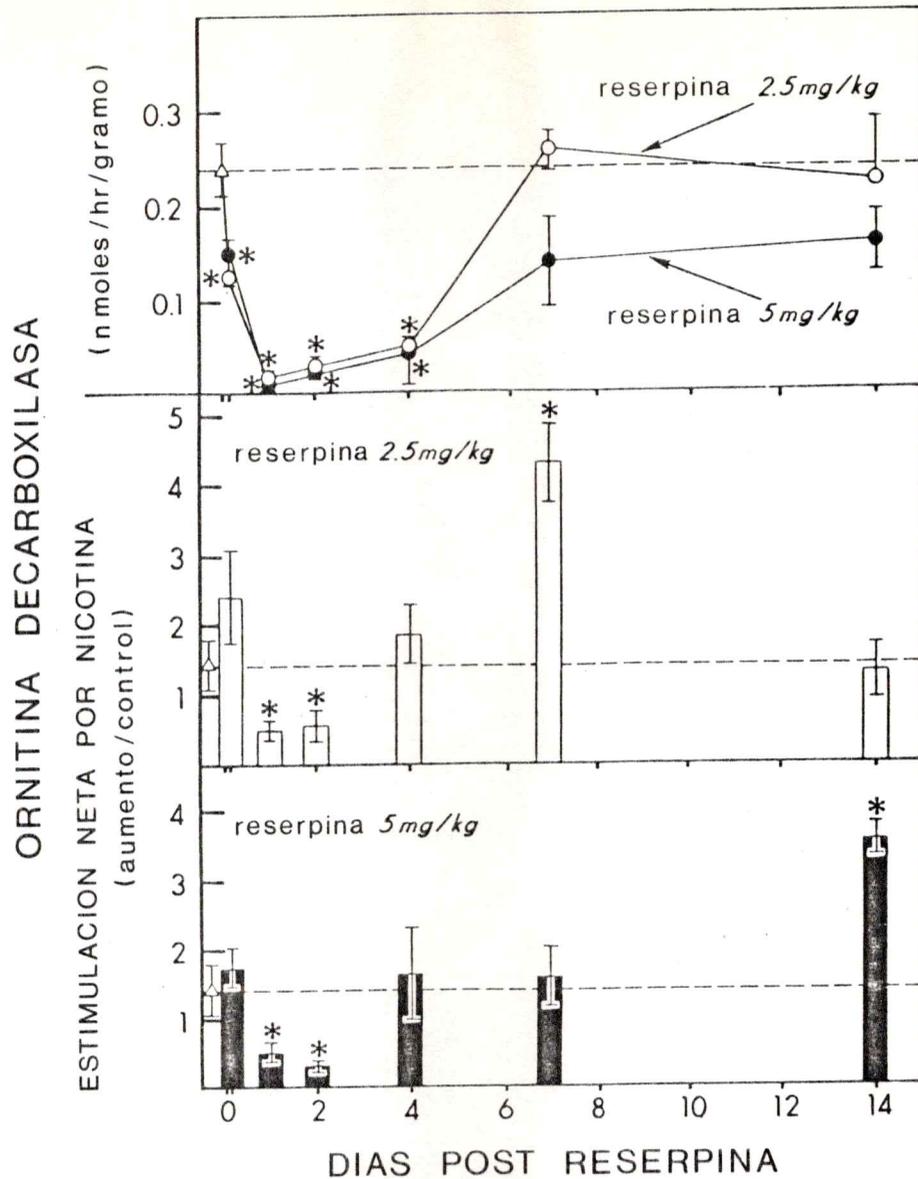


Fig. 12. Efectos de la administración de una dosis única de reserpina a ratas adultas sobre la actividad de la ODC de corazón y sobre las respuestas de la ODC cardíaca a la estimulación con nicotina inyectada a diferentes tiempos después de la reserpina. La estimulación neta se calculó de la siguiente manera: para las ratas controles, (estimuladas con nicotina-controles)/controles; para las ratas tratadas con reserpina, (tratadas con reserpina y estimuladas con nicotina-tratadas con reserpina solamente)/controles. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 4 a 6 determinaciones; los asteriscos indican los grados de significancia ( $P < 0,05$  o menor) comparado con la estimulación neta de las ratas controles con nicotina (triángulos y líneas discontinuas).

respectivamente). La reserpina redujo también los incrementos de ODC inducidos por isoproterenol (Fig. 13), sin embargo estas disminuciones fueron inferiores a las observadas para la nicotina. La normalización de la capacidad del isoproterenol para estimular la ODC se alcanzó a los 4 días, siendo las respuestas supranormales a los 7 días con cualquiera de las dos dosis de reserpina empleadas.

En todos los casos ensayados, la administración de nicotina produjo una depleción significativa de las catecolaminas adrenales (Tabla 6), a pesar de que la reserpina "per se", y como ya se dijo anteriormente, produce una marcada pérdida de aminas adrenales.

### 3. Ratas en desarrollo

Durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal, las ratas controles aumentaron de peso de 9 g a la edad de 1 día a 47 g a los 15 días de edad (Fig. 14). Durante el mismo período de tiempo, el peso del corazón aumentó de 0,045 a 0,2 g y el del cerebro de 0,32 a 1,45 g. La administración de reserpina (5 mg/kg) a ratas recién nacidas, produjo marcadas deficiencias en el peso durante la primera semana de edad. A pesar de que tanto el corazón como el cerebro habían alcanzado sus pesos normales a los 8 días de edad, el peso corporal estaba todavía un 10% por debajo del de las ratas controles durante la segunda semana.

En la Fig. 15 se observa el perfil normal de la ODC de corazón de ratas en desarrollo. A las 24 hr de edad la actividad de la ODC era superior a 1 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  producido/hr/g, disminuyendo lentamente durante el transcurso de las 2 semanas siguientes. La administración de reserpina a ratas recién nacidas redujo marcadamente la actividad de la ODC, obteniéndose luego valores supranormales a los 5 días de edad, con normalización de la respuesta a los 8 días. En las ratas controles

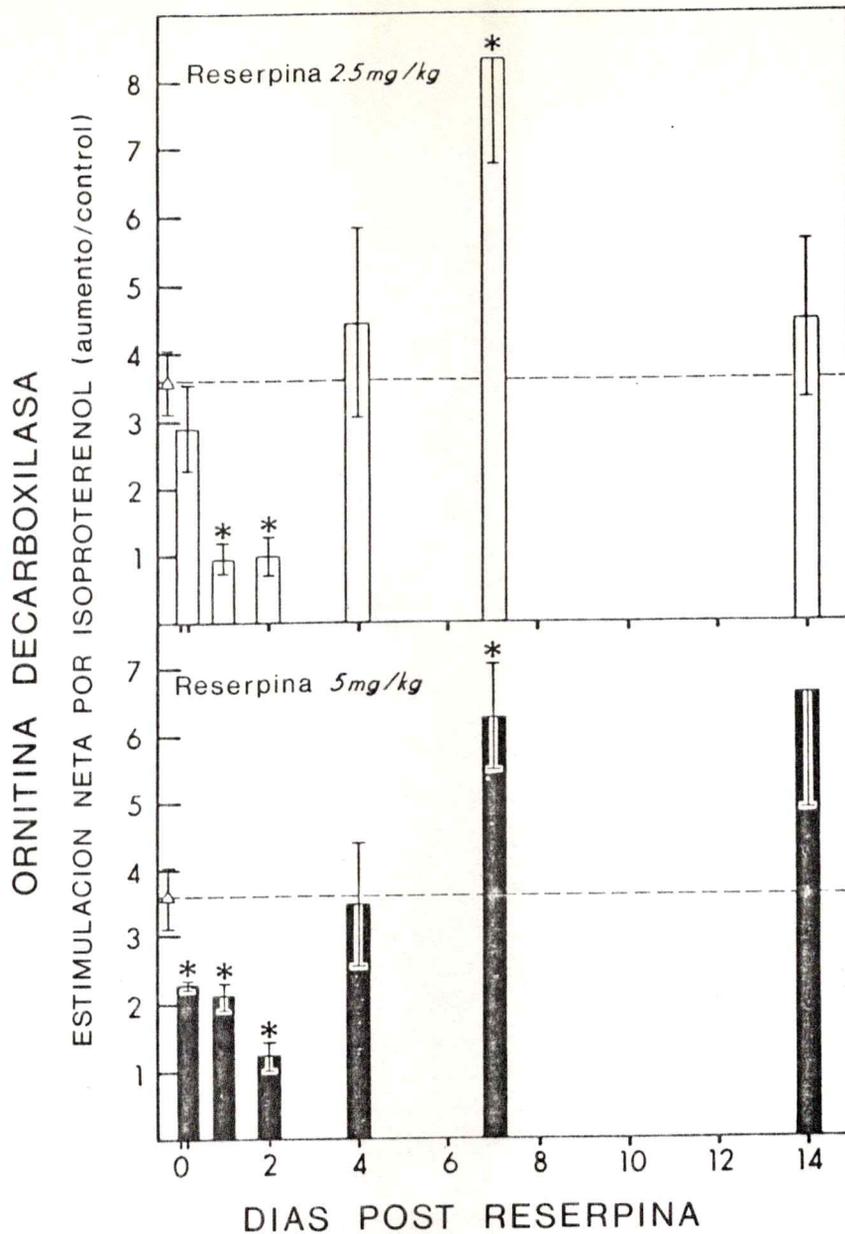


Fig. 13. Efectos de la administración de una dosis única de reserpina a ratas adultas sobre las respuestas de la ODC cardíaca a la estimulación con isoproterenol inyectado a diferentes tiempos después de la reserpina. La estimulación neta se calculó de la siguiente manera: para las ratas control, (estimuladas con isoproterenol-control)/control; para las ratas tratadas con reserpina (tratadas con reserpina y estimuladas con isoproterenol-tratadas con reserpina solamente)/control. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 4 a 6 determinaciones; los asteriscos indican los grados de significancia ( $P < 0,005$  o menor) comparado con estimulación neta de las ratas control mediante isoproterenol (triángulos y líneas discontinuas).

TABLA 6

Efectos de reserpina y nicotina (10 mg/kg, s.c.) sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas adultas\*

Días después de reserpina	Catecolaminas (Porcentaje del control)			
	Reserpina (2,5 mg/kg) sola	Tratamiento con reserpina y nicotina	Reserpina (5 mg/kg) sola	Tratamiento con reserpina y nicotina
0	100 ± 7 (31)	79 ± 4†(30)	100 ± 7 (30)	76 ± 6§ (29)
3 <sup>1</sup> /2 hr	104 ± 6 (6)	58 ± 5*(6)	64 ± 3 (5)	47 ± 3 †(5)
1	25 ± 1 (5)	13 ± 4†(5)	24 ± 5 (6)	8 ± 3*(4)
2	54 ± 6 (6)	25 ± 5 †(6)	38 ± 5 (5)	10 ± 2*(6)
4	120 ± 8 (4)	79 ± 6 †(5)	77 ± 5 (6)	38 ± 5*(6)
7	101 ± 5 (6)	65 ± 12*(4)	91 ± 8 (5)	69 ± 4*(5)
11	99 ± 3 (4)	76 ± 6†(5)	106 ± 6 (5)	85 ± 4*(5)

\*Las ratas fueron sacrificadas 3 horas después de la administración de nicotina. El valor control fue 10,0 ± 0,7 µg/glándula (61 animales), y el control tratado con nicotina fue 7,70 ± 0,50 (59 animales; P<0,001 vs el valor control). Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.). Las cifras en paréntesis indican el número de determinaciones.

†P<0,001, + P<0,005, §P<0,01, ¶P<0,02, \*P<0,05 comparado con reserpina sola.

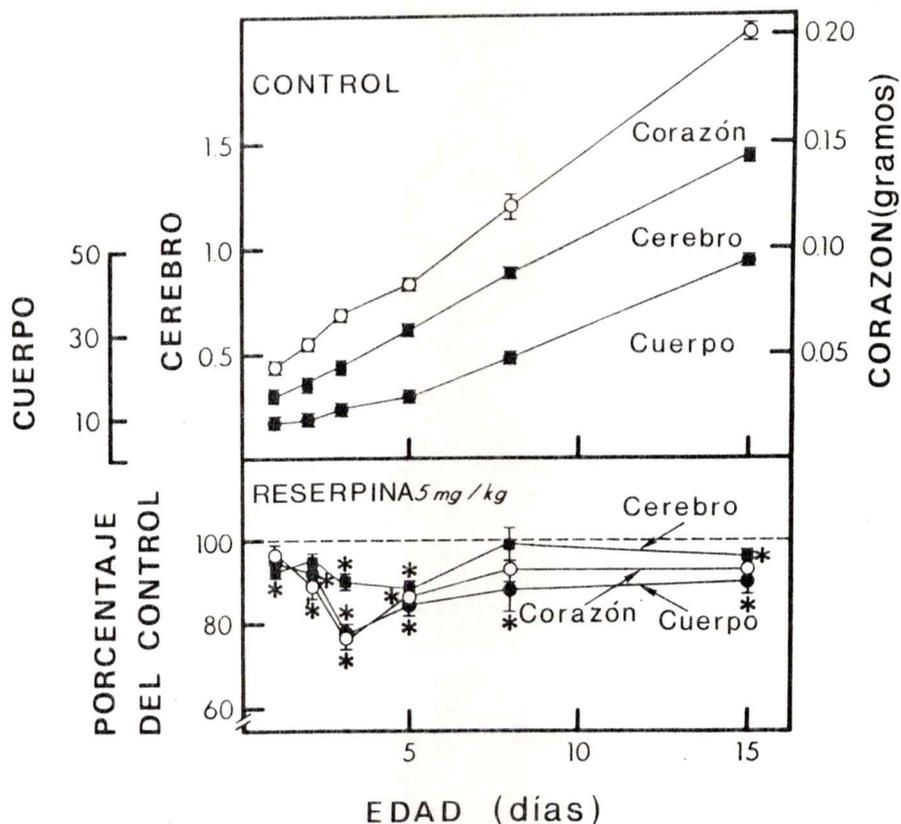


Fig. 14. Peso corporal, del corazón y cerebro de ratas en desarrollo después de una dosis única de reserpina administrada a la edad de 1 día. El primer punto corresponde a las 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> hr después de la inyección de la droga. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 18 a 44 determinaciones; los asteriscos indican los grados de significancia ( $P < 0,05$  o menor) comparado con los controles.

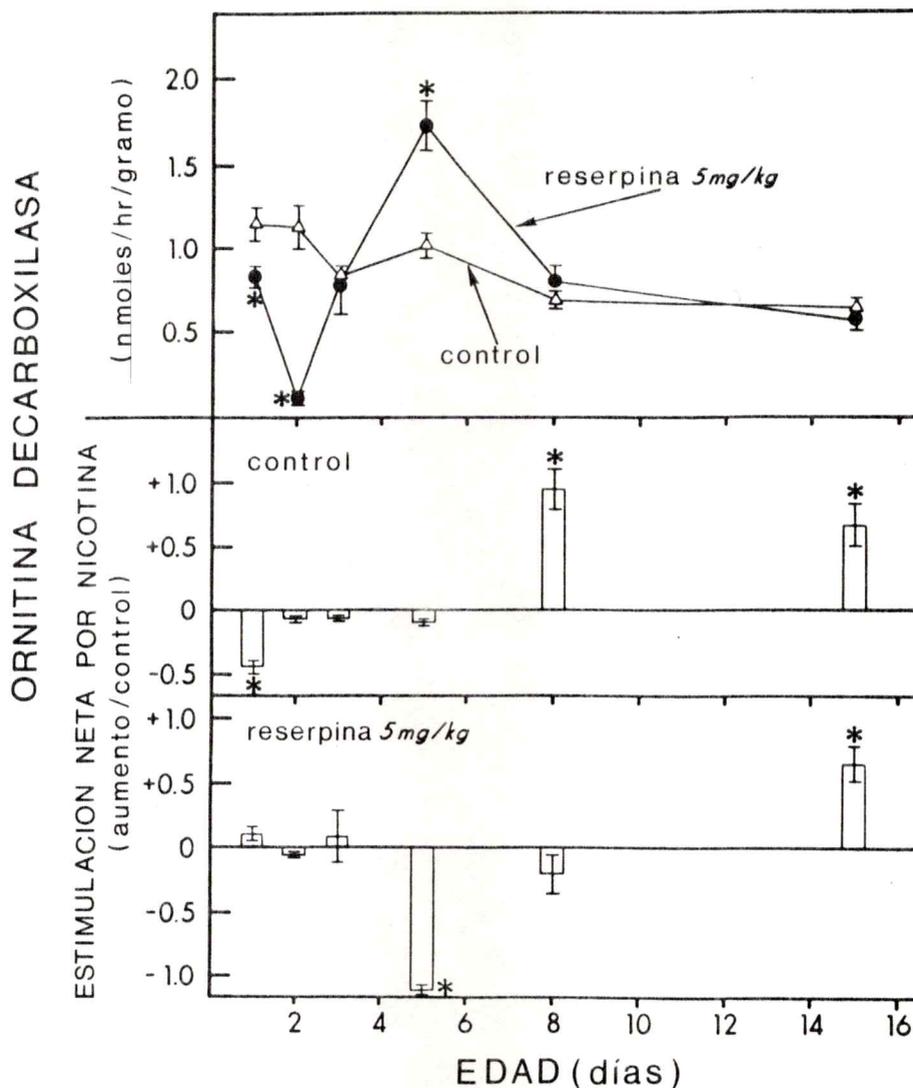


Fig. 15. Efectos de una dosis única de reserpina administrada a la edad de 1 día en el desarrollo de la actividad de la ODC de corazón, y en las respuestas de la ODC cardíaca a la estimulación con nicotina inyectada a diferentes tiempos después de la reserpina. La estimulación neta se calculó en la forma descrita en la Fig. 12. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 a 12 determinaciones; los asteriscos indican los grados de significancia ( $P < 0,05$  o menor) comparado con los controles.

la nicotina fue incapaz de estimular la ODC en corazón durante los 5 primeros días de edad observándose incluso, en algunos casos, una disminución de la actividad (Fig. 15). En cambio, la administración de isoproterenol (0,1 mg/kg) a ratas de 4 días produjo un gran aumento en la actividad ODC de corazón (aumento/control =  $3,40 \pm 0,42$  ;  $P < 0,001$ ; 10 animales). En las ratas tratadas con reserpina la respuesta de tipo "inmadura" persistía aún a los 8 días de edad.

En la médula adrenal en desarrollo, la administración de nicotina redujo significativamente el contenido de catecolaminas, tanto en las ratas controles como en las tratadas con reserpina (Tabla 7).

La actividad de la ODC en cerebro de ratas controles en desarrollo disminuyó de 1,42 nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  producidos/hr/g a las 24 hrs de edad a 0,08 unidades a los 15 días de edad (Fig. 16). Tres y media hora después de haber administrado reserpina, la ODC cerebral estaba significativamente disminuida. Sin embargo, a los 3 días se observaron valores supranormales con normalización de la actividad a los 5 días.

## C. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION POSTNATAL DE GUANETIDINA EN EL DESARROLLO DE LA MEDULA ADRENAL Y DEL CEREBRO

### 1. Efectos de la guanetidina sobre la médula adrenal

Durante el desarrollo, las catecolaminas (CA) aumentaron de 0,43  $\mu\text{g}/\text{glándula}$  a los 3 días de edad a 9,72  $\mu\text{g}/\text{glándula}$  a los 49 días (Tabla 8). Durante el mismo período de tiempo, las actividades de la tirosina hidroxilasa (TH) y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH) aumentaron aproximadamente 10 veces.

La administración de guanetidina a ratas en desarrollo aumentó significativamente los niveles de CA, TH y DBH (Fig. 17). A los 3 y 5 días de edad, la TH estaba aumentada en un

TABLA 7

Efectos de reserpina y nicotina sobre el contenido de catecolaminas adrenales de ratas en desarrollo\*

Edad (días)	Catecolaminas (Porcentaje del control)		
	Nicotina (10 mg/kg) sola	Reserpina (5 mg/kg) sola	Tratamiento con reserpina y nicotina
1	50 ± 2*(6)	66 ± 4 (20)	51 ± 5*(12)
2	79 ± 4*(11)	23 ± 3 (10)	13 ± 3*(10)
3	64 ± 5*(12)	57 ± 5 (12)	44 ± 5 (11)
5	73 ± 3*(12)	72 ± 3 (18)	58 ± 3§(10)
8	64 ± 3*(12)	84 ± 5 (18)	65 ± 4¶(12)
15	77 ± 5†(12)	97 ± 4 (18)	73 ± 5§(11)

\*La reserpina fue administrada a la edad de 1 día; la nicotina fue inyectada a las edades indicadas y las ratas se sacrificaron 3 hr después de la nicotina. El primer punto corresponde a las 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> hr después de la inyección de reserpina. Los valores controlados expresados en µg/glándula fueron: 1 día, 0,204 ± 0,009 (17); 2 días, 0,305 ± 0,011 (18); 3 días, 0,394 ± 0,013 (18); 5 días, 0,732 ± 0,038 (18); 8 días, 1,07 ± 0,05 (17); 15 días, 2,28 ± 0,16 (17). Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.). Las cifras en paréntesis indican el número de determinaciones.

§P<0,001 comparado con reserpina sola

¶P<0,005

\*P<0,05

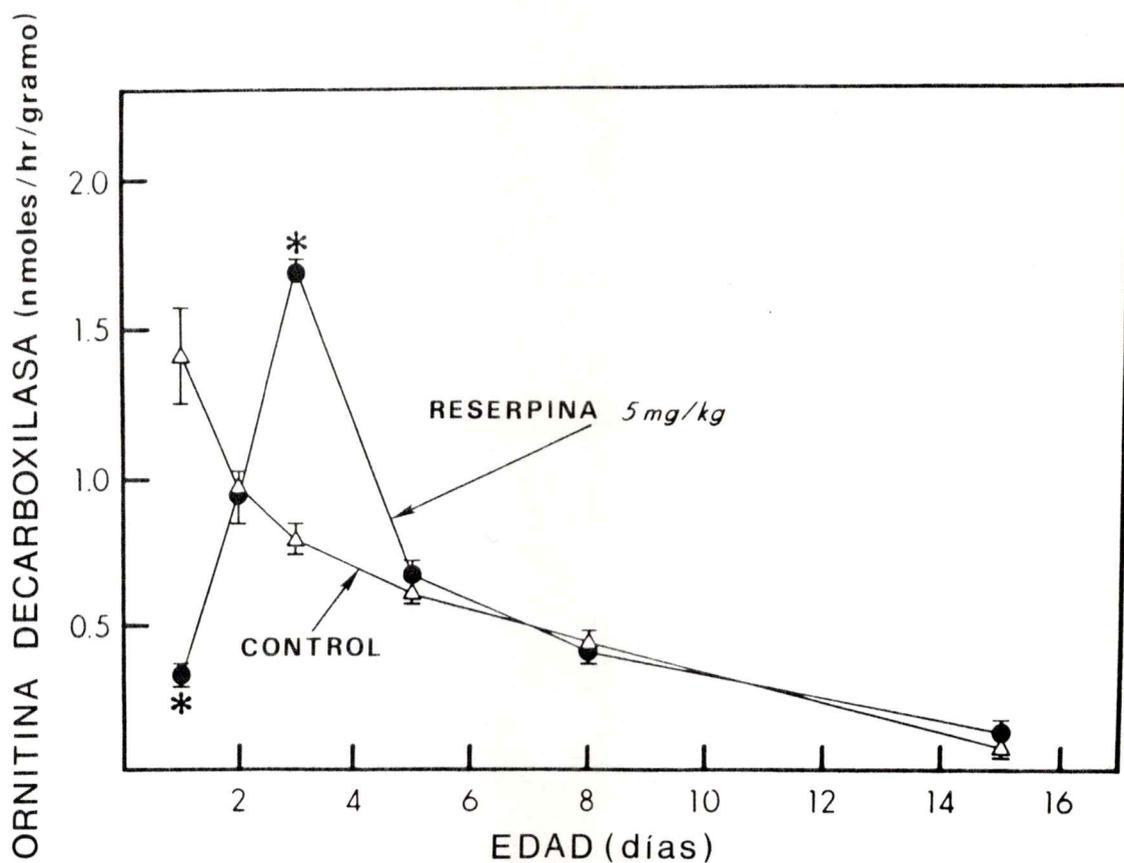


Fig. 16. Efectos de una dosis única de reserpina administrada a la edad de 1 día en el desarrollo de la actividad de la ODC en cerebro. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 11 a 14 determinaciones; los asteriscos indican los grados de significancia ( $P < 0,05$  o menor) comparado con los controles.

TABLA 8

Contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas controles en desarrollo\*

Edad (días)	Catecolaminas ( $\mu\text{g}/\text{glándula}$ )	Tirosina hidroxilasa ( $^{14}\text{CO}_2$ producidos/ glándula/hr)	Dopamina $\beta$ -hidroxilasa (nmoles octopamina- $^3\text{H}$ producidos/ glándula/hr)
3	0,428 $\pm$ 0,027	0,93 $\pm$ 0,04	0,096 $\pm$ 0,004
5	0,697 $\pm$ 0,024	1,27 $\pm$ 0,05	0,083 $\pm$ 0,005
7	0,611 $\pm$ 0,021	1,37 $\pm$ 0,11	0,145 $\pm$ 0,006
11	0,999 $\pm$ 0,083	1,32 $\pm$ 0,11	0,180 $\pm$ 0,012
20	2,53 $\pm$ 0,12	2,09 $\pm$ 0,13	0,335 $\pm$ 0,010
31	5,86 $\pm$ 0,31	5,47 $\pm$ 0,32	0,555 $\pm$ 0,043
39	6,00 $\pm$ 0,34	6,02 $\pm$ 0,18	0,601 $\pm$ 0,040
49	9,72 $\pm$ 0,51	9,64 $\pm$ 0,36	0,897 $\pm$ 0,073

\*A partir de los 2 días de edad, las ratas fueron inyectadas con una dosis diaria de solución vehículo (NaCl 0,9%-ácido ascórbico 0,1%-pH 7,4; recién preparado) durante 5 días. Las ratas con 3 y 5 días de edad fueron sacrificadas 24 hr después de la inyección previa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 4 a 11 determinaciones.

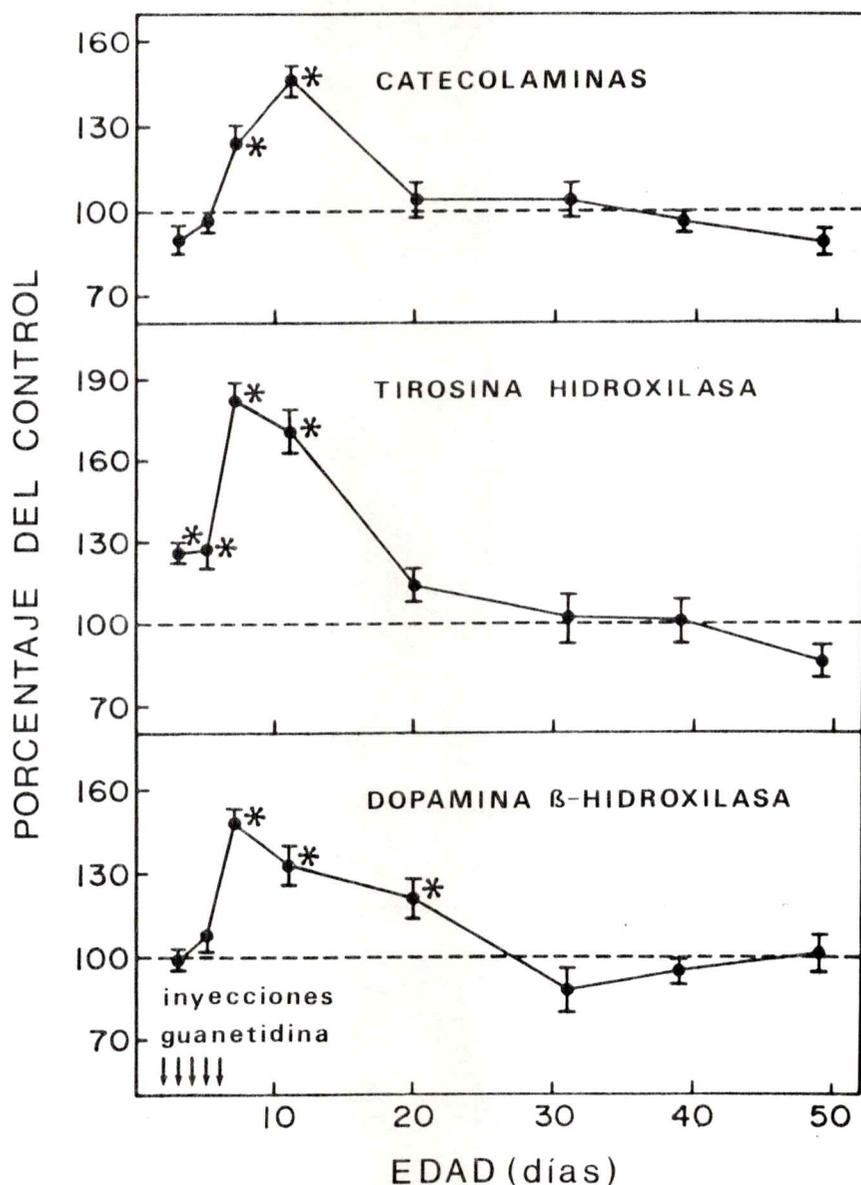


Fig. 17. Contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas en desarrollo tratadas con guanetidina (50 mg/kg, s.c.). Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones; los asteriscos indican diferencias significativas con los controles ( $P < 0,05$  o menor). Los valores controles aparecen en la Tabla 8.

30% aproximadamente, mientras que las CA y la DBH no habían variado. Entre los 7 y 11 días de edad, los tres parámetros alcanzaron sus aumentos máximos (entre un 40 y 80% sobre los controles), retornando a los valores normales 2 ó 3 semanas después de la última inyección. Las ratas tratadas con guanetidina no presentaron diferencias significativas en el peso en relación a los controles, como tampoco se observaron alteraciones en la conducta y actividad.

Para determinar si el aumento en los niveles de CA producidos por la administración de guanetidina se debía a la estimulación directa de los adrenales vía receptores nicotínicos, se inyectaron ratas con clorisondamina 30 min antes de la administración de guanetidina. Como se observa en la Tabla 9, la clorisondamina bloqueó completamente el aumento de la TH. La clorisondamina sola, por su parte, no alteró la TH adrenal ( $P > 0,1$ ).

El mismo tratamiento con guanetidina practicado en ratas adultas no alteró el contenido de CA adrenales, como tampoco las actividades de TH y DBH (resultados no mostrados).

## 2. Efectos de la guanetidina sobre el cerebro

Durante el desarrollo, el peso del cerebro de las ratas controles aumentó de 0,41 g a los 3 días a 1,7 g a los 49 días (Tabla 10). Durante el mismo período de tiempo los niveles de TH aumentaron aproximadamente 10 veces.

La administración de guanetidina produjo pequeñas disminuciones en el peso de los cerebros a los 3 y 7 días de edad (Fig. 18). La actividad de la TH aumentó a los 5 días de edad, con déficits posteriores a los 11 y 20 días y con una tendencia a los valores subnormales durante el resto del tiempo experimental. La guanetidina no mostró ningún efecto sobre la TH cerebral en ratas adultas (resultados no mostrados).

TABLA 9

Efectos de la clorisondamina sobre los aumentos en la actividad de la tirosina hidroxilasa inducidos por la guanetidina en médula adrenal de ratas de 2 días de edad\*

Primera inyección	Segunda inyección (30 min después )	Tirosina hidroxilasa (24 hr después de la segunda inyección)
Sol. salina	Sol. salina	100 ± 7
Clorisondamina	Sol. salina	86 ± 5
Sol. salina	Guanetidina	127 ± 8†
Clorisondamina	Guanetidina	94 ± 5

\*Las dosis de clorisondamina y guanetidina fueron de 10 mg/kg, s.c. y 50 mg/kg, s.c. respectivamente. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.) de 6 a 18 determinaciones. El valor control fue  $1,27 \pm 0,9$  nmoles  $^{14}\text{CO}_2$  producido/glándula/hr.

†P<0,02 comparado con sol. salina - sol. salina.

TABLA 10

Peso del cerebro y actividad de ornitina decarboxilasa y tirosina hidroxilasa cerebrales en ratas controles en desarrollo\*

Edad (días)	Peso cerebral (g)	Ornitina decarboxilasa (nmoles <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> producidos/cerebro/hr)	Tirosina hidroxilasa
3	0,411 ± 0,006	1,20 ± 0,09	3,31 ± 0,11
5	0,561 ± 0,007	1,82 ± 0,11	6,90 ± 0,39
7	0,764 ± 0,009	-	10,4 ± 0,5
11	1,04 ± 0,01	0,243 ± 0,048	18,7 ± 0,6
20	1,37 ± 0,04	0,031 ± 0,003	27,5 ± 0,9
31	1,58 ± 0,03	-	43,9 ± 1,4
39	1,68 ± 0,04	-	49,6 ± 2,5
40	1,70 ± 0,04	-	37,1 ± 1,7

\*A partir de los 2 días de edad, las ratas fueron inyectadas con una dosis diaria de solución vehículo (NaCl 0,9%-ácido ascórbico 0,1%-pH 7,4; recién preparado) durante 5 días. Las ratas con 3 y 5 días de edad fueron sacrificadas 24 hr después de la inyección previa. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 a 16 determinaciones.

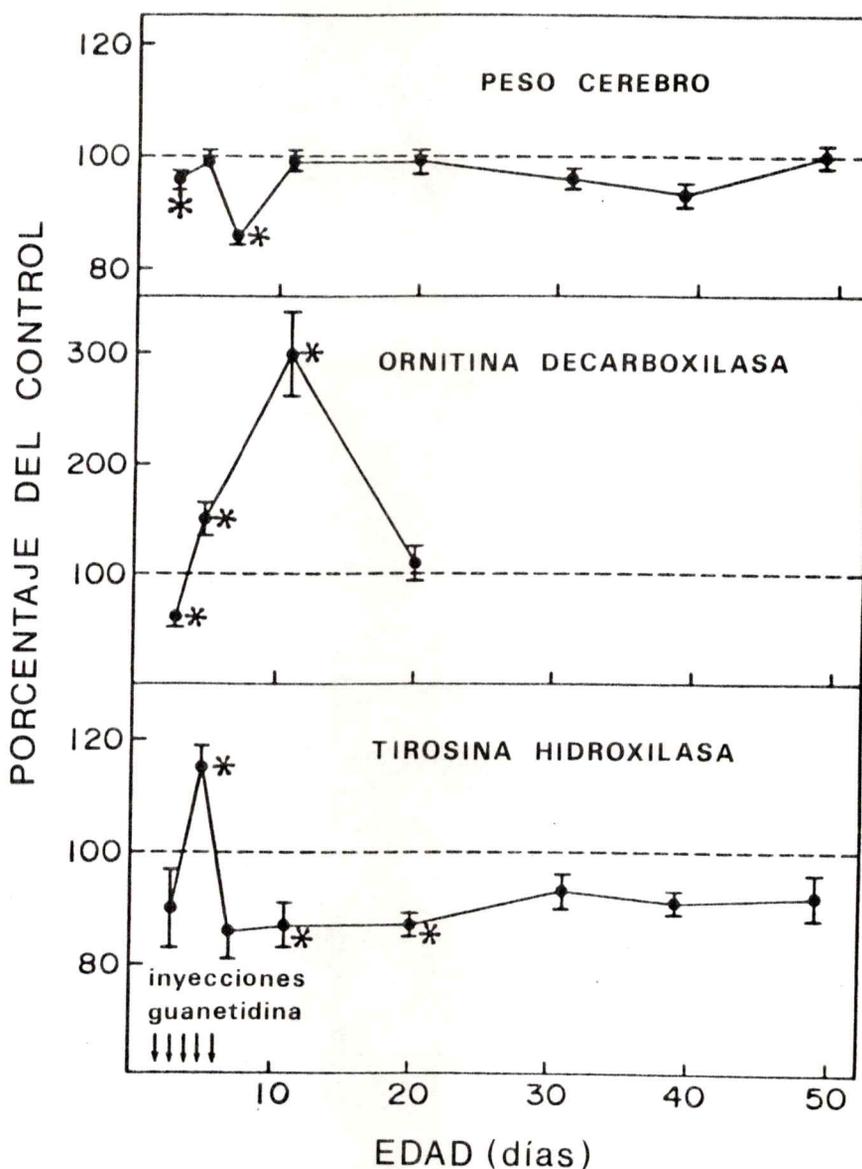


Fig. 18. Peso del cerebro y actividad de ornitina decarboxilasa y tirosina hidroxilasa en cerebro de ratas en desarrollo tratadas con guanetidina (50 mg/kg, s.c.). Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones; los asteriscos indican diferencias significativas con los controles ( $P < 0,05$  o menor). Los valores controles aparecen en la Tabla 3.

Como se observa en la Tabla 10, la actividad de la ODC en las ratas controles disminuyó de 1.2 nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  producido/cerebro/hr a los 3 días de edad a 0.031 unidades a los 20 días. A los 3 días de edad la actividad de las ratas tratadas con guanetidina fue inferior a la de las ratas controles (Fig. 18); sin embargo, desde los 5 a los 11 días la ODC se mantuvo supranormal retornando a los valores controles a los 20 días.

#### D. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION PRENATAL DE RESERPINA EN EL DESARROLLO DE LA MEDULA ADRENAL Y DEL CEREBRO

##### 1. Administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento: efectos sobre la médula adrenal

Durante el desarrollo, el peso corporal de las ratas controles aumentó de 8 g a la edad de 1 día, a 185 g a los 45 días (Fig. 19). A los 36 días de edad, los niveles de catecolaminas (CA) y la captación de adrenalina por glándula habían aumentado aproximadamente en la misma proporción (30 veces los valores observados a la edad de 1 día), indicando el origen paralelo de ambos aumentos. Durante el mismo período experimental, la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) aumentó de 0,84 nmoles/glándula/hr a la edad de 1 día a 7,8 unidades a los 45 días, y la actividad de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH) de 0,078 nmoles/glándula/hr a 0,91 unidades. En el mismo lapso de tiempo, la captación de adrenalina- $^3\text{H}$  por 100  $\mu\text{g}$  de CA endógenas se mantuvo entre 16 y 30 nmoles/30 min.

La administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento produjo un déficit inicial en el peso corporal, el cual se recuperó rápidamente (Fig. 20). En ningún momento se observó alguna alteración significativa en el desarrollo de los valores normales de CA en las ratas expuestas a la reserpina (Fig. 21). Las actividades de la TH y DBH adrenales

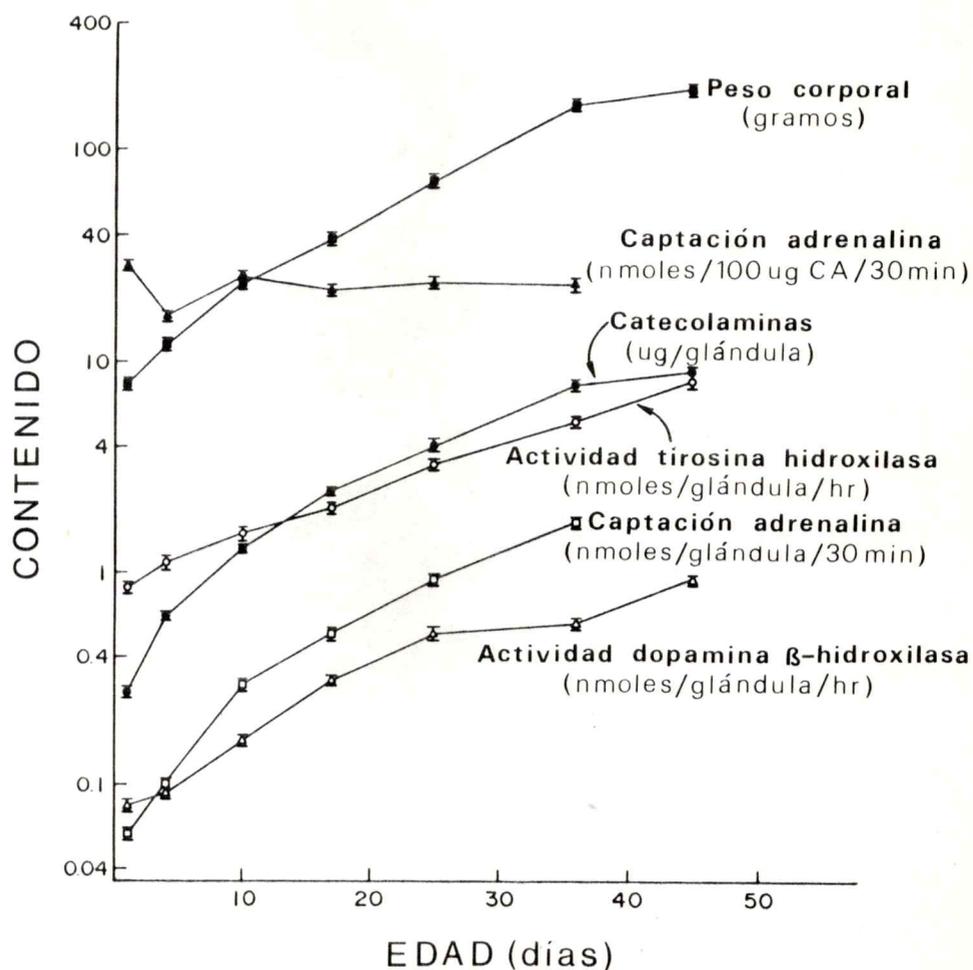


Fig. 19. Peso corporal, contenido de catecolaminas, actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y captación de adrenalina por glándula y por 100  $\mu$ g de catecolaminas endógenas, en ratas controles en desarrollo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones. La ordenada es logarítmica.

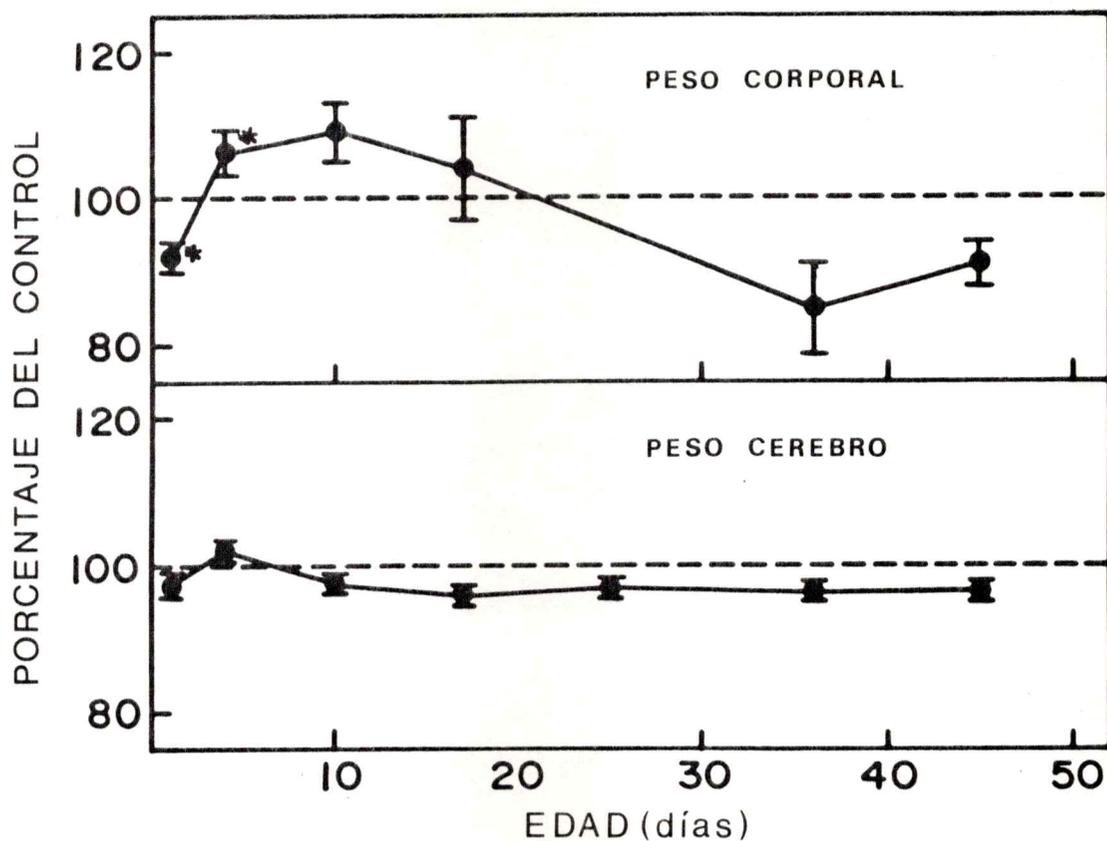


Fig. 20. Peso corporal y del cerebro de ratas en desarrollo cuyas madres fueron inyectadas con reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 9, 8 y 7 antes del parto. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones; los asteriscos indican diferencias significativas comparado con los controles ( $P < 0,05$  o menor). Los valores controles aparecen en las Figuras 19 y 23.

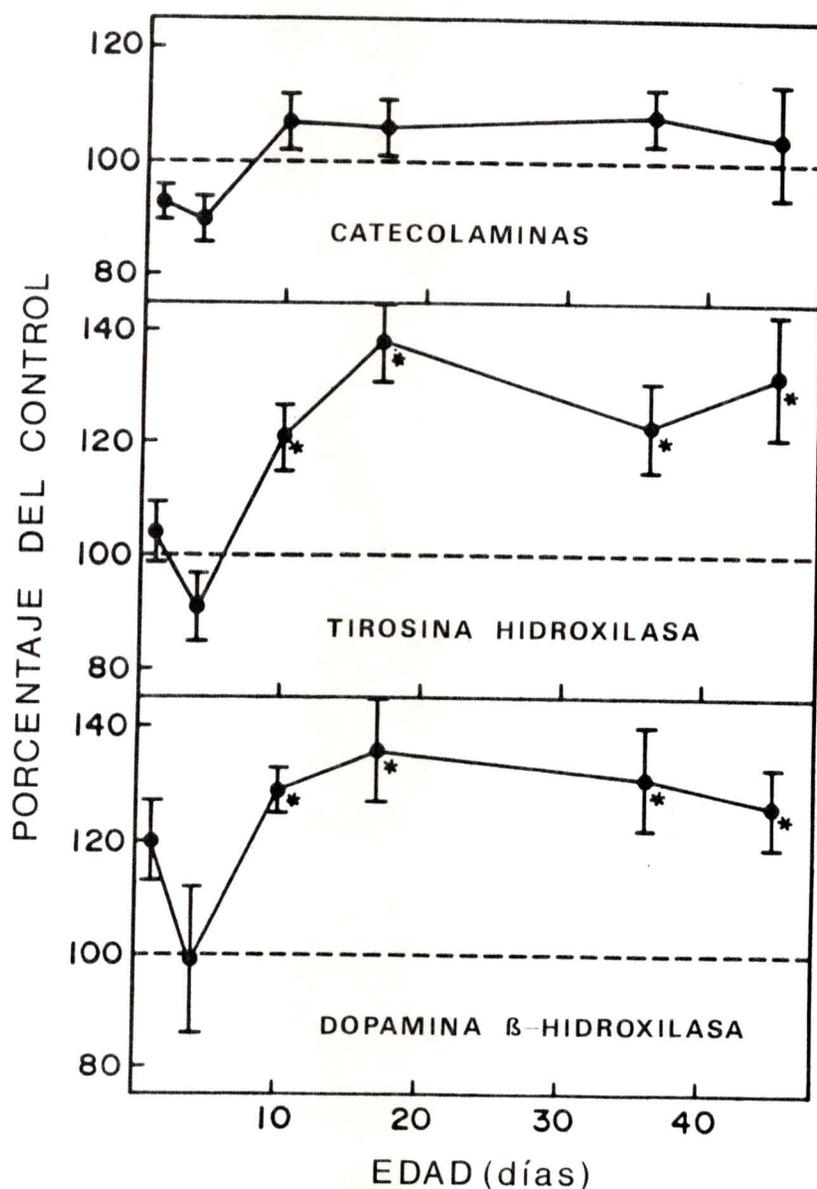


Fig. 21. Contenido de catecolaminas y actividad de tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en adrenales de ratas cuyas madres fueron inyectadas con reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 9, 8 y 7 antes del parto. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones; los asteriscos indican diferencias significativas comparados con los controles ( $P < 0,05$  o menor). Los valores controles aparecen en la Figura 19.

tampoco fueron significativamente diferentes de los valores controles tanto en las ratas de 1 como de 4 días de edad (Fig. 21). Sin embargo, a los 10 días de edad se observó un aumento de un 21% en la TH y de un 29% en la DBH en las ratas que fueron expuestas a la reserpina. Las actividades enzimáticas persistieron aumentadas a los 45 días de edad (rata adulta joven), con elevaciones entre 23 y 38%.

La captación de adrenalina-<sup>3</sup>H en preparaciones de vesículas de almacenamiento provenientes de ratas experimentales, expresada por glándula, mostró una alteración similar a la de las enzimas, con valores normales a la edad de 1 y 4 días de edad seguido de un 34% de aumento a los 10 días, el cual persistía aún en la rata adulta joven (Fig. 22). La captación por unidad de CA experimentó también un aumento de un 20 a 25% entre los 10 y 36 días de edad (Fig. 22).

Para determinar si los valores obtenidos a partir de los 10 días de edad reflejaban un cambio en la respuesta de las adrenales mismas, se administró nicotina (5 ó 10 mg/kg, s.c.) a ratas de 3 y 14 días de edad con el objeto de producir una estimulación adrenal directa. Como se observa en la Tabla 11, la nicotina produjo deplecciones similares (4 hr después de haber sido inyectada) en las ratas experimentales y en las controles, indicando por lo tanto una reactividad adrenal equivalente frente a la estimulación directa.

## 2. Administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento: efectos sobre la presión arterial

Como se observa en la Tabla 12, a pesar del mayor grado de actividad adrenal observado a partir de los 10 días de edad en las ratas que habían sido expuestas a la reserpina "in útero" los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento, la presión arterial sistólica determinada en dichos animales (a los 46 días de edad), no fue significativamente diferente de los valores

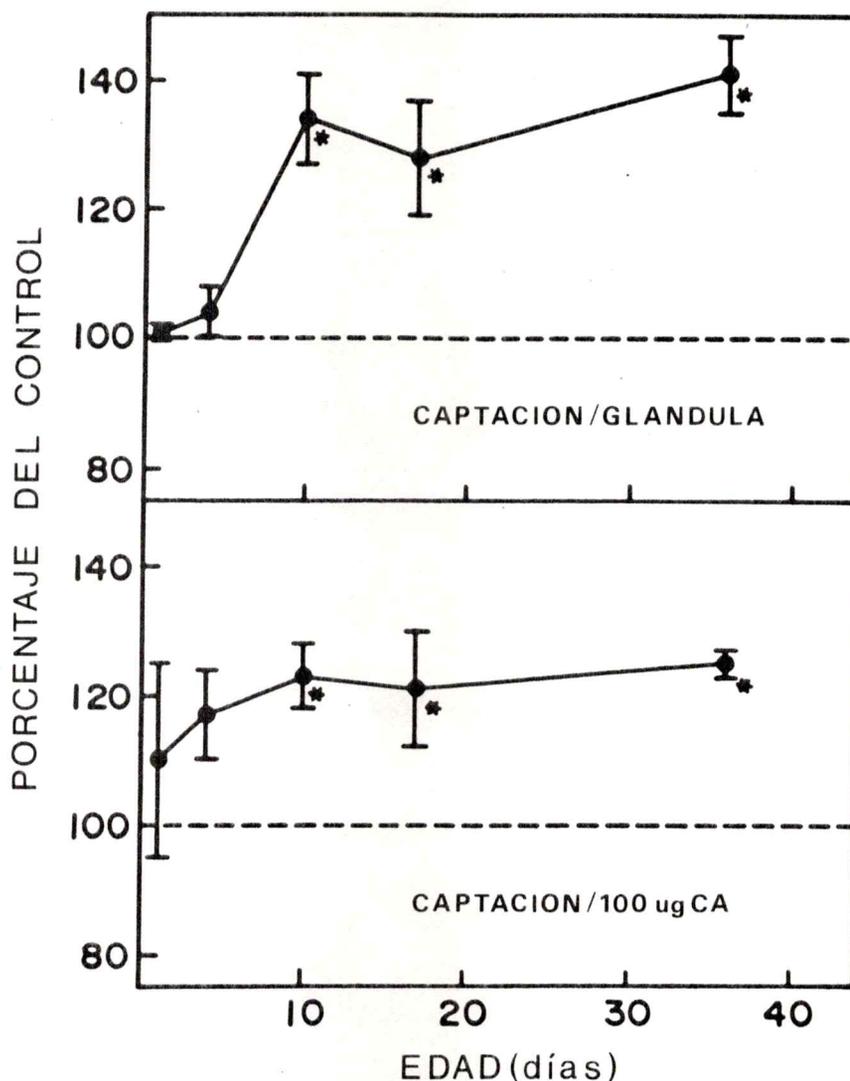


Fig. 22. Captación de adrenalina en vesículas de almacenamiento de adrenales aisladas de ratas en desarrollo (expresadas por glándula y por 100  $\mu$ g de catecolaminas endógenas) cuyas madres fueron inyectadas con reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 9, 8 y 7 antes del parto. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones; los asteriscos indican diferencias significativas comparado con los controles ( $P < 0,05$  o menor). Los valores controles aparecen en la Figura 19.

TABLA 11

Efectos postnatales de la nicotina sobre las catecolaminas adrenales de ratas expuestas a la reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento\*

Tratamiento	Catecolaminas ( $\mu\text{g}/\text{glándula}$ )			
	3 días de edad postnatal		14 días de edad postnatal	
	Control	Reserpina	Control	Reserpina
Sol. Salina	0,519 $\pm$ 0,053	0,546 $\pm$ 0,020	2,25 $\pm$ 0,13	2,43 $\pm$ 0,09
Nicotina, 5 mg/kg	0,480 $\pm$ 0,033	0,496 $\pm$ 0,060	1,52 $\pm$ 0,08 <sup>†</sup>	1,78 $\pm$ 0,07 <sup>†</sup>
Nicotina, 10 mg/kg	0,373 $\pm$ 0,034*	0,465 $\pm$ 0,000*	1,64 $\pm$ 0,11 $\S$	1,54 $\pm$ 0,07 $\S$

\*Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de cinco o seis determinaciones. Las ratas fueron sacrificadas 4 hr después de la inyección (s.c.) de nicotina.

<sup>†</sup> P<0,001, \*P<0,05,  $\S$ P<0,01 comparado con el control.

TABLA 12

Efecto de la DL-p-clorofenilalanina (PCPA) sobre la presión arterial sistólica de ratas adultas normales y de ratas adultas cuyas madres fueron tratadas con reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 9, 8 y 7 antes del parto\*

Sexo	Presión arterial (mm Hg)					
	PCPA					
	Control	Reserpina	Control	Reserpina	Control	Reserpina
			Un día después de la 1a. inyección	Un día después de la 2a. inyección		
Machos	118 ± 3	121 ± 3	121 ± 2	126 ± 3	127 ± 2	130 ± 2
Hembras	114 ± 2	100 ± 2	115 ± 3	107 ± 2	109 ± 2	110 ± 2

\*Una vez determinados los valores de la presión arterial sistólica en las ratas normales y en las e puestas a la reserpina, los animales recibieron una inyección de PCPA (150 mg/kg, s.c.), dos días seguidos y se determinó nuevamente la presión arterial un día después de cada inyección. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 a 10 determinaciones.

controles. El pretratamiento con p-clorofenilalanina (PCPA), droga que realiza los efectos estimulantes simpatoadrenales de otras drogas tales como insulina y anfetamina (108, 109), probablemente a través de una depleción central de serotonina (110), tampoco alteró la presión arterial en las ratas experimentales ni en las controles.

### 3. Administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento: efectos sobre el cerebro

Durante el desarrollo, el peso del cerebro en las ratas controles aumentó de 0,35 g a la edad de 1 día a 1,65 g a los 45 días de edad (Fig. 23). En el transcurso de las primeras tres y media semanas de edad, la actividad de la TH por cerebro aumentó 20 veces, mientras que la captación sinaptosomal de tiramina y la síntesis de octopamina aumentaron 6 y 4 veces respectivamente. La captación de tiramina disminuyó ligeramente entre los 25 y 45 días de edad.

La administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento no alteró los aumentos normales en el peso de el cerebro (Fig. 20). La actividad de la TH estuvo elevada durante los 10 primeros días de edad, aunque ninguno de los aumentos fue estadísticamente significativo (Fig. 24). Sin embargo, a los 36 y 45 días de edad se observaron déficits en la actividad de la TH de un 15 y 20% respectivamente. Tanto la captación sinaptosomal de tiramina como la síntesis de octopamina no mostraron desviaciones significativas del perfil de desarrollo normal.

### 4. Administración de reserpina los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento: efectos sobre la médula adrenal y el cerebro

La administración de reserpina en este período más avanzado de gestación, produjo una reducción en el peso corporal

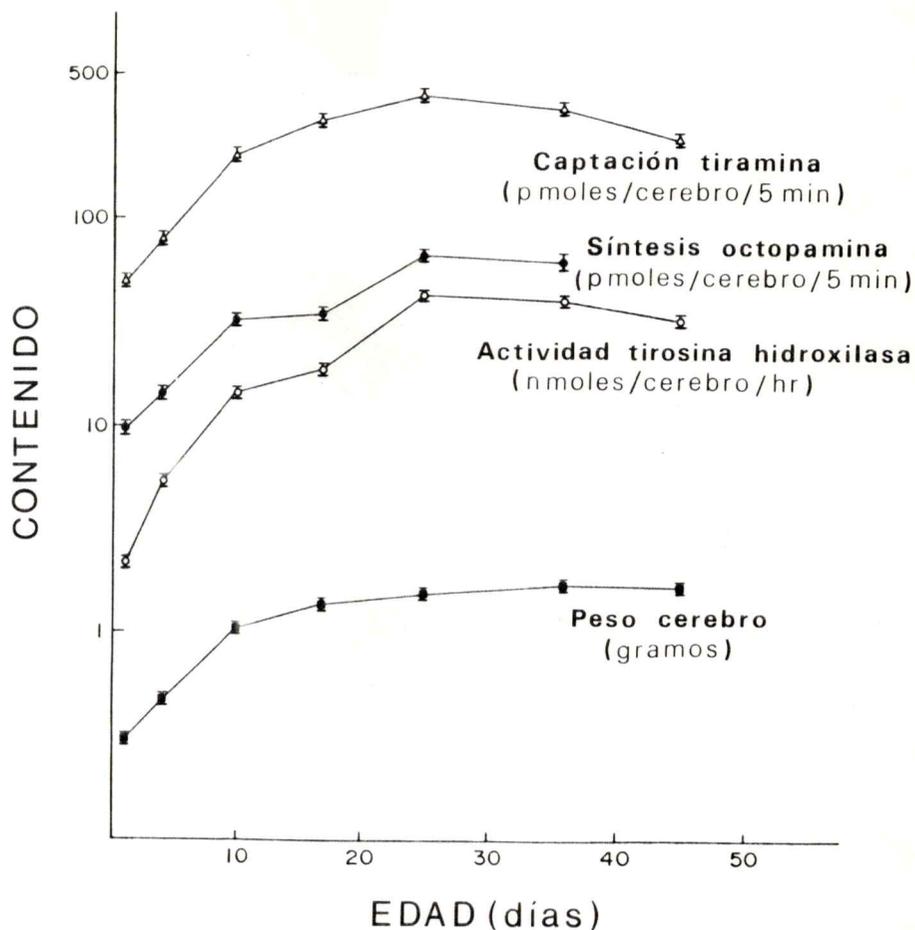


Figura 23. Peso del cerebro, actividad de la tirosina hidroxilasa y captación sinaptosomal de tiramina y síntesis de octopamina en ratas controles en desarrollo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones. La ordenada es logarítmica.

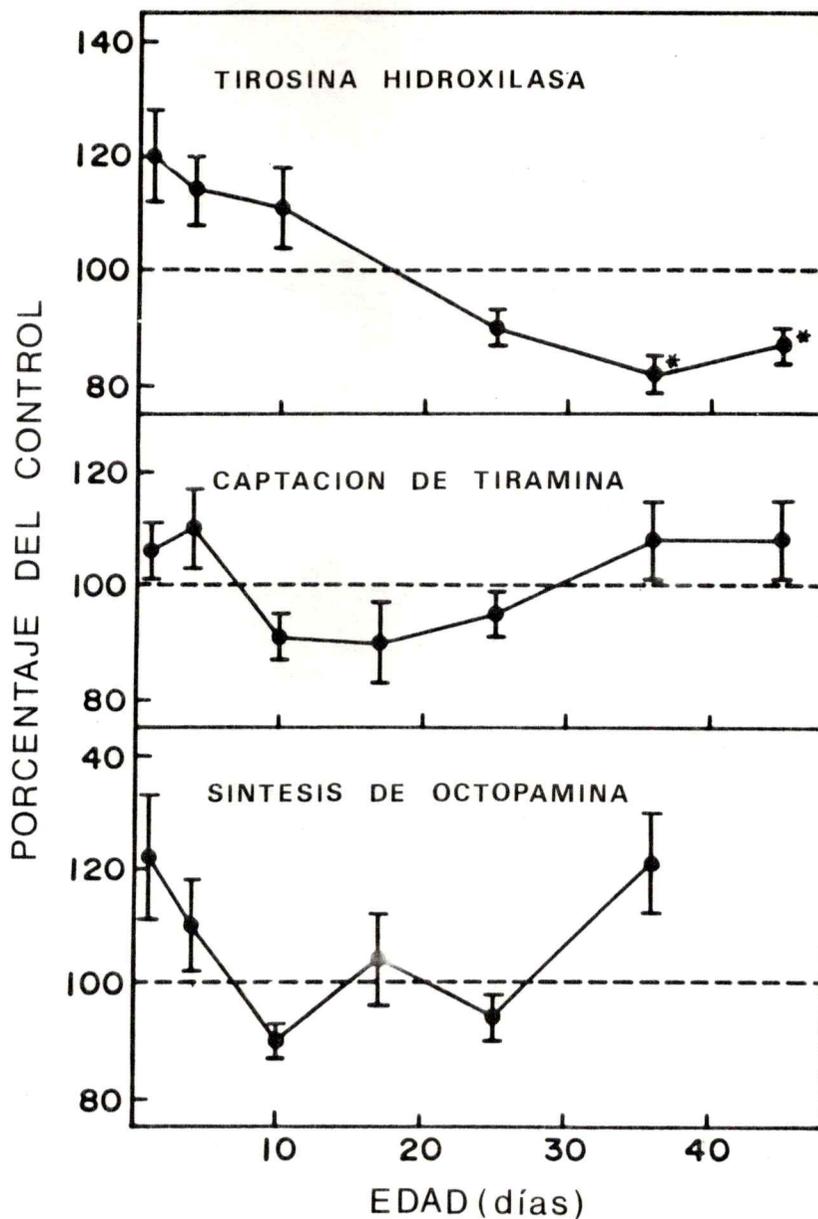


Fig. 24. Actividad de la tirosina hidroxilasa y captación sinaptosomal de tiramina y síntesis de octopamina en ratas en desarrollo cuyas madres fueron inyectadas con reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 9, 8 y 7 antes del parto. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de 5 ó 6 determinaciones; los asteriscos indican diferencias significativas comparados con los controles ( $P < 0,05$ ). Los valores controles aparecen en la Figura 23.

y en el contenido de CA en las ratas de 1 día de edad comparada con los controles (Tabla 13). Contrastando con los efectos producidos por la administración de reserpina los días 9, 8 y 7, las actividades de la TH y DBH no presentaron elevaciones persistentes; se observaron solamente ligeros aumentos en las actividades de ambas enzimas a los 10 días de edad, sin alteraciones significativas en la captación de adrenalina-<sup>3</sup>H.

El peso del cerebro fue un 12% inferior al valor normal a la edad de 1 día, mientras que la actividad de la TH presentó valores normales durante los 4 primeros días de edad (Tabla 14). Sin embargo, esta situación se invirtió entre los 10 y 17 días de edad; el peso del cerebro era normal y la actividad de la TH fue inferior a los controles. El desarrollo de la captación sinaptosomal y capacidad de síntesis de octopamina fueron inferiores a los controles a la edad de 1 día, recuperando los valores normales a los 4 días.

##### 5. Administración de reserpina los días 4, 3 y 2 antes del nacimiento: efectos sobre la médula adrenal (Tabla 15)

La administración de reserpina durante los últimos días de gestación produjo un acentuado déficit en el peso corporal en las ratas recién nacidas acompañado de una mantenida depleción de CA (1 y 4 días de edad) (Tabla 15). A la edad de 1 día, la actividad de la TH era ligeramente inferior a la normal; 3 días después, mostraba un pronunciado déficit.

TABLA 13

Administración de reserpina (1 mg/kg. s.c.) los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento: efectos sobre la médula adrenal\*

Edad postnatal	Peso corporal	Catecol-aminas	Tirosina hidroxilasa	Dopamina $\beta$ -hidroxilasa	Captación de adrenalina	
					Por glándula	Por 100 $\mu$ g CA
días					Porcentaje del control	
1	77 $\pm$ 2*	74 $\pm$ 4†	109 $\pm$ 3	115 $\pm$ 8	91 $\pm$ 12	107 $\pm$ 12
10	98 $\pm$ 3	107 $\pm$ 2	114 $\pm$ 4§	117 $\pm$ 5§	106 $\pm$ 6	99 $\pm$ 5
17	105 $\pm$ 3	86 $\pm$ 2 *	85 $\pm$ 12	86 $\pm$ 11	115 $\pm$ 10	115 $\pm$ 5
25	97 $\pm$ 7	114 $\pm$ 7	112 $\pm$ 7	102 $\pm$ 10	109 $\pm$ 11	94 $\pm$ 7

\* Los valores controles aparecen en la Fig. 19. Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error tipo de la media (S.E.M.) de cinco o seis determinaciones.

† P<0,001, § P<0,002, § P<0,05 comparado con el control.

TABLA 14

Administración de reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento; efectos sobre el cerebro\*

Edad días	Peso del cerebro	Tirosina hidroxilasa	Captación de tiramina	Síntesis de octopamina
	Porcentaje del control			
1	88 ± 1*	99 ± 4	71 ± 5*	65 ± 9 †
4	97 ± 2	100 ± 8	115 ± 6	124 ± 8
10	96 ± 2	72 ± 7§	93 ± 3	90 ± 1
17	96 ± 1	82 ± 2 †	109 ± 9	118 ± 8
25	95 ± 1	88 ± 5	92 ± 6	94 ± 5

\*Los valores controles aparecen en la Fig. 23. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.) de cinco o seis determinaciones.

\*P<0,001, † P<0,02, §P<0,01 comparado con el control.

TABLA 15

Administración de reserpina (1 mg/kg, s.c.) los días 4, 3 y 2 antes del nacimiento; efectos sobre la médula adrenal\*

Edad	Peso corporal	Catecolaminas	Tirosina hidroxilasa
días		Porcentaje del control	
1	76 ± 2*	59 ± 2*	90 ± 4 †
4	93 ± 3 †	76 ± 3*	71 ± 7 §

\*Los valores controles aparecen en la Fig. 19. Cada valor representa el promedio ± el error tipo de la media (S.E.M.) de cinco o seis determinaciones.

†P<0,001, †P<0,05, §P<0,02 comparado con el control'

## DISCUSION

### A. ADMINISTRACION POSTNATAL DE RESERPINA

#### 1. Efectos sobre adrenales

La depleción de catecolaminas (CA) que se observa en las ratas adultas después de la administración de reserpina es bi fásica: inicialmente (las primeras 4 hr) hay una secreción refleja de las CA adrenomedulares (con la dosis mayor solamente), seguida de una depleción más lenta (24 a 48 hr con cualquiera de las dos dosis), debida a la inhibición de la captación vesicular de aminas por la reserpina (35-38). A diferencia de lo observado en las ratas adultas, la administración de 2,5 mg/kg de reserpina a ratas recién nacidas produjo una disminución aguda del contenido de aminas a las 4 hr. Se plantearon varias hipótesis que podrían explicar este fenómeno: 1) La estimulación esplácnica producida por la reserpina podría ser mayor en las ratas recién nacidas. Esta hipótesis fue descartada cuando se observó que el bloqueo de las aferencias neuronales adrenales, mediante clorisondamina (111), no inhibió la depleción aguda inducida por la reserpina en las ratas recién nacidas. La misma dosis de clorisondamina administrada a las ratas adultas impidió el efecto estimulante de la dosis mayor de reserpina. 2) La reserpina podría inhibir más intensamente la captación de aminas por las vesículas de almacenamiento en las ratas recién nacidas. Esta hipótesis fue descartada después de los experimentos realizados "in vitro", en que se vio que el grado de inhibición de la captación por la reserpina en el animal recién nacido es menor que el obtenido en el animal adulto. Estudios realizados "in vitro" confirmaron además que el curso temporal del bloqueo vesicular era similar en adultos y en recién nacidos. 3) El recambio de CA podría ser normalmente elevado en las ratas recién nacidas,

realizando, de esta manera, el efecto depletor de la reserpina. Esta hipótesis también fue descartada de los estudios realizados con  $\alpha$ -metil-p-tirosina, droga que inhibe la síntesis de CA (53). Si la mayor depleción de CA se debiera solamente a un mayor recambio, la  $\alpha$ -metil-p-tirosina debería producir una pérdida de CA equivalente a la obtenida después de la administración de reserpina; sin embargo, la droga no alteró los niveles de CA. 4) La reserpina podría estimular la secreción de las CA adrenales a través de un mecanismo no neurogénico o independiente de los receptores nicotínicos. Esta hipótesis es la más probable, puesto que la depleción aguda de CA ocurre demasiado pronto para que pueda ser atribuida a efectos directos de la reserpina sobre las vesículas o a una alteración en la velocidad de recambio. Se sabe además que la estimulación eléctrica directa del nervio esplácnico o la administración de drogas que aumentan su actividad, no producen secreción de CA en ratas y terneros recién nacidos (15, 100), mientras que ciertas drogas y algunas situaciones de stress sí la producen (15, 100, 112). En este estudio se vio que los receptores nicotínicos no participarían en la pérdida aguda de CA, descartando así la participación neurogénica en dicha depleción.

Otro factor que podría estar relacionado con la pérdida aguda de CA inducida por la reserpina, en las ratas recién nacidas, es la menor capacidad para metabolizar drogas a esa edad (13). Sin embargo, el efecto de la administración de reserpina sobre el mecanismo de captación de aminas, "in vivo", fue equivalente tanto en intensidad como en duración en los adultos y en los recién nacidos. Esto indicaría que prácticamente no habrían diferencias en la intensidad o persistencia de los efectos directos de la droga. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de Mueller y Shideman (114), quienes encontraron que aunque el metabolismo de la reserpina

es menor en la rata recién nacida, la vida media de la droga en el organismo es inferior a 2 horas.

En las ratas adultas, uno de los factores más importantes en la recuperación de los depósitos de CA, después de la pérdida inducida por reserpina, es la inducción transináptica de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH) (13, 115-117). Puesto que la inducción requiere de aferencias neuronales funcionales y ya que éstas parecen estar ausentes al nacer (15, 100), se midió la actividad de ambas enzimas en las ratas tratadas con reserpina para averiguar si éstas aumentaban, modificando la recuperación de los depósitos de CA. La reserpina no produjo ningún aumento en la TH y solamente se observó un incremento pequeño en la actividad de la DBH a los 4 días de edad (Figs. 5 y 8); las adrenales necesitaron 2 semanas para recuperar sus niveles normales de CA (Fig. 4). Contrastando con los resultados anteriores, la administración de reserpina a ratas adultas produjo un gran aumento en las actividades de TH y DBH, y las CA estaban ya recuperadas en un 90% a los 3 días (Fig. 9). Estos resultados demuestran que la reserpina ejerce un efecto más intenso y más prolongado sobre las CA de las ratas recién nacidas, comparado con las adultas. Esta diferencia se debe, en parte, a la incapacidad de las adrenales de los animales recién nacidos para contrarrestar la depleción mediante inducción enzimática. Por lo tanto, la administración de reserpina a ratas recién nacidas produce un retardo de casi 2 semanas en los aumentos normales de las CA adrenales durante el desarrollo.

La ausencia de inducción de la TH en los animales recién nacidos tratados con reserpina plantea dos interrogantes importantes, ¿están las adrenales de las ratas recién nacidas incapacitadas para inducir la TH? y ¿en qué momento del desarrollo aparece por primera vez la inducción enzimática provocada por la reserpina?. Con el objeto de averiguar la capacidad del

tejido para inducir TH, se administró nicotina a ratas de 4 días de edad, obteniéndose un rápido (24 hrs) y marcado aumento en la actividad de la TH; ello indica que la adrenal está en realidad capacitada para inducir enzimas y aún más, que los receptores nicotínicos son ya funcionales a esa edad. Sin embargo, la reserpina sólo indujo la TH cuando se la administró a ratas de 8 o más días de edad, cuando la inervación de la médula adrenal es ya funcional. Puesto que en los adultos la reserpina provoca un aumento en la actividad enzimática a través de un incremento en la actividad neuronal, estos estudios sugieren que la incapacidad de la reserpina para inducir la TH, en las ratas recién nacidas, se debe a la ausencia de conexiones funcionales entre el SNC y la médula adrenal y no a deficiencias inherentes al tejido adreno-medular mismo. Esta hipótesis es apoyada por estudios recientes realizados por otros investigadores en ratas adultas con una de sus adrenales denervada (13). En estos animales, la reserpina provoca una prolongada depleción de CA, no induce TH y aumenta moderadamente la actividad de la DBH en la glándula denervada. Este tipo de respuesta es cualitativamente similar al observado en las ratas recién nacidas tratadas con reserpina. La inducción de la DBH mediante drogas en ausencia de aferencias neuronales, en adrenales adultas denervadas (13) o en las ratas recién nacidas, podría deberse a mecanismos regulatorios diferentes a los transsinápticos.

Estos estudios indican efectos de la reserpina completamente diferentes a los observados en las ratas adultas; hay una depleción no-neurogénica sin inducción compensadora de las enzimas de la biosíntesis de CA. Ello se debe, en parte, a la ausencia de conexiones funcionales entre las adrenales de las ratas recién nacidas y el sistema nervioso central. Estas diferencias con el animal adulto se traducen en un marcado retardo en los aumentos de las CA adrenales durante el desarrollo

en las ratas tratadas con reserpina al nacer.

## 2. Efectos sobre el corazón y el cerebro

En el corazón adulto con función simpática intacta, la estimulación ganglionar mediante nicotina o de los receptores  $\beta$  cardíacos directamente con isoproterenol produjo un gran aumento en la actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC), confirmando los hallazgos recientes de Warnica y col. (104) para el isoproterenol. La utilización de agentes bloqueadores específicos corroboró el sitio específico de acción de cada droga. La administración de nicotina a ratas tratadas previamente con reserpina produjo una pérdida adicional de las CA adrenales, a pesar de que éstas estaban ya disminuídas por efectos de la reserpina y aún cuando la estimulación cardíaca de la ODC por la nicotina estaba completamente inhibida. Esto confirma que la estimulación cardíaca de la ODC por la nicotina se realiza por la vía sináptica y no a través de los efectos de la droga sobre las adrenales.

Contrastando con los grandes aumentos de la ODC obtenidos en el corazón adulto después de la administración de nicotina, la misma droga inyectada a ratas en desarrollo fue incapaz de estimular la ODC cardíaca durante los 5 primeros días de edad. Por otro lado, la administración de isoproterenol a ratas de 4 días de edad provocó un gran aumento en la actividad de la ODC. Esto indica que la falta de respuesta a la nicotina, en las ratas inmaduras, no puede ser atribuida a la ausencia de receptores  $\beta$  cardíacos o del mecanismo de respuesta de la ODC. Aún más, hay estudios recientes que prueban que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos son ya funcionales en la etapa embrionaria (118). La falta de respuesta de la ODC a la estimulación nerviosa, hasta los 5 a 8 días de edad, corresponde con la aparición temporal de terminaciones nerviosas bioquímicamente funcionales (119) y con el tiempo durante el desarrollo en que el

sistema simpático modificaría por primera vez la frecuencia cardíaca (101). Nuevamente queda descartada la participación de las CA adrenales en las respuestas cardíacas de la ODC, puesto que la pérdida de aminas adrenales provocadas por la nicotina era ya acentuada antes que la droga fuera capaz de inducir la ODC cardíaca. En consecuencia, estos resultados indican que el crecimiento del corazón de la rata sólo se vería influido por el sistema nervioso simpático a partir del momento en que las terminaciones de éste en el corazón se hacen funcionales (5 a 8 días de edad postnatal).

La administración de reserpina a ratas adultas produjo una aguda reducción en la actividad de la ODC cardíaca. Es probable que ello se deba a la disminución del tono simpático basal sobre el corazón, debido a la depleción de noradrenalina cardíaca (40, 120, 121), y a efectos directos de la droga sobre el miocardio. Apoya lo primero el hecho que la reserpina inhibió casi completamente los aumentos de la ODC inducidos por la nicotina. La reserpina disminuyó también las respuestas de la ODC a la estimulación de los receptores  $\beta$  directamente con isoproterenol; esto último podría deberse a efectos tóxicos generalizados de la reserpina sobre el tejido cardíaco (122). La recuperación de las respuestas de la ODC a la nicotina y al isoproterenol, después de la administración de reserpina, fue seguida en el animal adulto por una supersensibilidad a dichas drogas. Puesto que tales respuestas están presentes ya sea al estimular los receptores  $\beta$  directamente, como también al liberar los neurotransmisores endógenos mediante nicotina, es probable que la supersensibilidad esté localizada a nivel postsináptico; esta supersensibilidad de la ODC es similar a otras respuestas mediadas por receptores  $\beta$  (123). En las ratas adultas, la pérdida de CA adrenales inducida por la nicotina fue normal tanto en el período de subsensibilidad como en el de

supersensibilidad, descartando así a las CA como posibles mediadores en las respuestas cardíacas alteradas.

Aunque no se midieron los niveles de noradrenalina cardíca después de la administración de reserpina, hay estudios (124) que indican que las aminas cardíacas se encontrarían aún disminuidas durante el período de recuperación de las respuestas de la ODC frente a la estimulación simpática (4 días). Esto estaría de acuerdo con la observación de Shore (120) referente a que basta una pequeña proporción de neurotransmisor para que se realice la transmisión sináptica efectiva.

Contrastando con la prolongada disminución de la ODC cardíaca provocada por la reserpina en las ratas adultas, la administración de la droga a ratas en desarrollo produjo solamente un descenso transitorio de la actividad enzimática, seguido rápidamente por respuestas de tipo supranormal. Estudios anteriores realizados con otras drogas y hormonas indican que este perfil de la ODC representa un retardo en la proliferación y diferenciación celular (107, 125, 126). Esto estaría de acuerdo con la menor ganancia de peso del corazón en las ratas tratadas con reserpina. Sin embargo, es improbable que el retardo en el crecimiento y el "perfil de retardo" de la ODC en dicho órgano se deban a las acciones simpaticolíticas de la reserpina, puesto que tales efectos aparecen antes de que las aferencias simpáticas al corazón sean funcionales. El mismo tipo de respuesta se observó en el cerebro; un retardo en el desarrollo de la actividad de la ODC y una disminución en la velocidad de crecimiento, lo que confirma el origen más general de los efectos iniciales de la reserpina durante el desarrollo.

Por otro lado, los efectos de la reserpina sobre las respuestas de la ODC a la nicotina, en corazón de ratas recién nacidas, indican claramente una interferencia de la droga con el establecimiento de la inervación simpática funcional. Es así como aún cuando los aumentos de la ODC producidos por la nicotina

fueron evidentes a partir de los 8 días de edad en las ratas normales, las respuestas a la nicotina eran aún de tipo inmaduro a esa edad en las ratas tratadas con reserpina. Es probable que este retardo se deba a la depleción de noradrenalina en los nervios simpáticos. Las ratas adultas recuperaron la respuesta a la nicotina a los 4 días post reserpina, mientras que las ratas en desarrollo tratadas con reserpina, mostraban aún un perfil inmaduro a esa edad. Es probable que ello se deba a que la reserpina, como ya se dijo anteriormente, produce en los animales recién nacidos una depleción de CA más intensa y de mayor duración que la observada en la rata adulta. Una vez más queda descartada la participación de las CA adrenales en el retardo del desarrollo funcional de la inervación provocado por la reserpina, puesto que la administración de nicotina a dichas ratas siempre produjo una reducción de las CA adrenales, manteniéndose, sin embargo, el retardo en el desarrollo de las respuestas cardíacas de la ODC.

Otra diferencia entre los efectos de la reserpina en las ratas adultas y en las recién nacidas es que en estas últimas no hubo supersensibilidad. Esto se puede deber a que el sistema inductor de la ODC podría ser incapaz de dar respuestas supranormales a esa edad, al enmascaramiento de la supersensibilidad debido a la prolongada depleción de neurotransmisores inducida por la reserpina o a efectos directos de la droga sobre el corazón.

Estos resultados indican que las conexiones entre el SN y las células cardíacas estarían ausentes durante los primeros días de vida postnatal, estableciéndose ellas en algún momento entre los 5 y 8 días de edad. Por lo tanto, solamente a partir de ese momento las aferencias simpáticas pueden alterar la actividad de la ODC en corazón y por lo tanto regular el crecimiento y diferenciación de dicho órgano. La administración de reserpina a ratas recién nacidas demora el establecimiento de

las conexiones funcionales entre el SN y las células cardíacas y retarda, por lo tanto, el desarrollo del corazón. Sin embargo, la reserpina podría retardar además el crecimiento de dicho órgano a través de algún otro mecanismo.

## B. ADMINISTRACION POSTNATAL DE GUANETIDINA

### 1. Efectos sobre las adrenales

La administración de guanetidina a ratas durante los primeros días después del nacimiento produjo un aumento en el contenido de CA y en la actividad de TH y DBH en las adrenales. Esto indica que la guanetidina habría inducido una aceleración en los incrementos normales de dichas enzimas durante el desarrollo y, por lo tanto, de las CA en esta rama del sistema nervioso simpático. Este tipo de respuesta es similar a la que se obtiene en ratas adultas después de la administración crónica de drogas que ocasionan una estimulación directa o refleja de las adrenales (13, 127, 128). Sin embargo, sabemos que en la rata en desarrollo la inervación de la médula adrenal por el nervio esplácnico no es funcional hasta los 8 a 10 días de edad. Por lo tanto, el hecho de que los aumentos inducidos por la guanetidina aparezcan antes de los 8 días de edad, descarta la posibilidad de que tales efectos se deban a estímulos transinápticos o a reflejos autonómicos. Sin embargo, a pesar de la ausencia de inervación funcional durante los primeros días de vida postnatal, quedó demostrado en este estudio que los receptores nicotínicos sí son funcionales a esa edad. Al bloquear dichos receptores mediante clorisondamina, antes de la administración de guanetidina, se inhibió completamente la inducción de la TH indicando, por lo tanto, que la guanetidina probablemente estaría produciendo una estimulación nicotínica directa en las adrenales de la rata en desarrollo.

Contrastando con los resultados anteriores, la administración de guanetidina a ratas adultas no alteró el contenido de las CA ni la actividad de TH y DBH en las adrenales. La ausencia de inducción de TH por la guanetidina en el animal a adulto ya había sido descrita anteriormente (42). Por lo tanto, el efecto estimulante de la droga se manifestaría solamente en el animal en desarrollo. Estos resultados sugieren que durante el desarrollo cambiaría la especificidad de los receptores nicotínicos o que, tal vez, la presencia de la inervación funcional impediría el efecto estimulante directo de la droga.

## 2. Efectos sobre el cerebro

En el cerebro, la guanetidina produjo una alteración en el desarrollo de la actividad de la ornitina decarboxilasa, compatible con un posible retardo en la proliferación celular. Este efecto podría estar relacionado con el menor peso inicial del cerebro en las ratas tratadas con guanetidina.

Los efectos de la guanetidina sobre el desarrollo de la actividad de la TH fueron los siguientes: primeramente se obtuvo un aumento transitorio, lo que indicaría un efecto estimulante de la droga; posteriormente la actividad de la TH fue inferior a la de los controles. Esto último estaría de acuerdo con un posible daño de las neuronas aminérgicas en el sistema nervioso central. Esta hipótesis es apoyada por otros estudios que demuestran que la administración de guanetidina, a ratones recién nacidos, ocasiona una disminución prolongada en el contenido de CA cerebrales (30).

En el cerebro adulto, la guanetidina no provocó ninguna alteración, concordando con resultados obtenidos por otros investigadores (30). Esto demostraría que la barrera hematoencefálica de las ratas recién nacidas no estaría completamente desarrollada y que, por lo tanto, sería incapaz de proteger al cerebro de los efectos neurotóxicos de la droga.

## C. ADMINISTRACION PRENATAL DE RESERPINA

### 1. Efectos sobre las adrenales

La administración de reserpina a ratas adultas produce una depleción de CA a través de dos mecanismos, 1) bloqueo de la captación de aminos por las vesículas de almacenamiento (35-38) y 2) secreción de CA inducida por reflejos centrales vía nervio esplácnico (129). Como consecuencia de esta estimulación refleja se produce un aumento en la actividad de TH y DBH, tanto en las neuronas adrenérgicas como en la médula adrenal ("inducción transináptica") (12, 115-117), y en la síntesis de vesículas de almacenamiento (130, 131). Estos cambios permiten una rápida recuperación de los depósitos de CA (13, 131).

Las ratas provenientes de madres que habían sido tratadas con reserpina los días 6, 5 y 4 ó 4, 3 y 2 antes del parto presentaban una depleción de las CA adrenales. Esto confirma que los efectos clásicos de la droga pueden ser obtenidos cuando ésta es administrada por vía materna (40). El peso corporal de estas ratas, al nacer, fue inferior al de las ratas controles. Cuando la reserpina se administró más tempranamente durante la gestación, los niveles de CA adrenales de las ratas recién nacidas ya se habían recuperado. En ninguno de los casos la depleción de CA fue acompañada de inducción de TH o DBH; por el contrario, las ratas expuestas a los efectos de la droga los días 4, 3 y 2 antes del nacimiento mostraban disminuciones postnatales en la TH adrenal.

De los estudios realizados en la primera parte de la Tesis quedó claramente establecido que la inervación esplácnica de la médula adrenal de rata no es funcional hasta los 8 a 10 días de edad. Por lo tanto, las drogas que evocan un aumento transináptico en las actividades de las enzimas de la

biosíntesis de CA son incapaces de producir tales incrementos durante el período previo a la inervación. En este sentido, los resultados obtenidos al administrar reserpina los días 6, 5 y 4 ó 4, 3 y 2 antes del parto, son similares a los que se obtienen cuando se administra la droga directamente a ratas recién nacidas.

En las ratas expuestas a la reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento, no se encontró ninguna alteración en las actividades de TH y DBH durante el período previo a la inervación. Sin embargo, después del establecimiento de las conexiones funcionales entre la médula adrenal y el sistema nervioso, las enzimas estaban aumentadas, manteniéndose así hasta la edad adulta. Puesto que la DBH es una enzima asociada principalmente con las vesículas de almacenamiento (57, 69-71), estos resultados indican además que la cantidad de vesículas también habría aumentado a partir de los 10 días de edad. Esta hipótesis fue confirmada al encontrar un aumento equivalente en la capacidad de captación de aminas por glándula (la cual depende principalmente de la cantidad de vesícu - las de almacenamiento).

Puesto que tanto las actividades enzimáticas como la síntesis de nuevas vesículas están relacionadas directamente con el grado de estimulación de las adrenales, estos resultados sugieren que las ratas expuestas a la reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento tendrían un mayor grado de estimulación adrenal en el período postinervación.

Este fenómeno podría explicarse de dos maneras: una de ellas es que las adrenales estarían respondiendo más frente a igual número de estímulos presinápticos, y la otra, es que el número de impulsos nerviosos que llegan a las adrenales estaría aumentado. Sin embargo, cuando se estimularon las adrenales directamente mediante nicotina, antes o después del establecimiento de las conexiones funcionales, se obtuvo el mismo grado de depleción de CA en los animales expuestos a la reserpina y en los controles. Esto indica, por lo tanto, que la

respuesta inherente del tejido adrenomedular no ha sido alterada por efectos de la droga. En consecuencia, el aumento paralelo en la actividad de ambas enzimas y en el número de vesículas, asociados al tiempo en que estos incrementos aparecen por primera vez y a la ausencia de cambios en el grado de respuesta de la adrenal misma, sugieren que el tono nervioso simpático adrenal se encontraría permanentemente aumentado en las ratas que han sido expuestas a los efectos de la reserpina tempranamente durante la gestación. Sin embargo, a pesar del mayor grado de actividad adrenal, la presión arterial sistólica de los animales adultos no fue significativamente diferente a los valores controles, incluso cuando se incrementó la estimulación adrenal refleja mediante la administración de p-clorofenilalanina. Es probable que ello se deba a la intervención de mecanismos autorreguladores centrales.

Es interesante el hacer notar que, en las ratas adultas, la administración de drogas que generan un aumento similar en las descargas simpáticas (tales como nicotina, 6-hidroxidopamina y morfina) producen el mismo efecto sobre las adrenales, es decir, aumentos en la actividad de TH y DBH y en la captación vesicular, con poca o ninguna variación en los niveles de CA (12, 116, 127, 128).

El hecho de que no se observen efectos similares después de la inervación, en las ratas expuestas a la reserpina más tardíamente (días 6, 5 y 4 antes del nacimiento), indica que existen períodos críticos para estos efectos teratológicos de tipo bioquímico. De la misma manera, se han demostrado períodos críticos para alteraciones de larga duración en el comportamiento y en los niveles de CA producidos por la reserpina en pollos (27, 28), y para ciertos cambios morfológicos en la rata (132). Las dosis y los tiempos escogidos en este estudio no ocasionaron ninguna alteración morfológica aparente.

## 2. Efectos sobre el cerebro

En el cerebro, la administración de reserpina los días 6, 5 y 4 antes del nacimiento produjo un retardo en la sinap to g e n e s i s (indicada por la menor captación sinaptosomal de t i r a m i n a -<sup>3</sup>H) y en el peso del cerebro comparado con los co n t r o l e s, lo que sugiere un deterioro general del desarrollo en d i c h o s animales. La menor síntesis de octopamina indica además que persiste la inhibición directa de la captación de aminas por las vesículas, ocasionada por la reserpina. Cuando se a d m i n i s t r a d o l e s 9, 8 y 7 antes del nacimiento, no se observó ninguna alteración en el peso del cerebro, en la captación de tiramina y en la síntesis de octopamina durante el desarrollo.

En el cerebro, la administración prenatal de reserpina, produjo también, al igual que en la médula adrenal, un efecto retardado en la actividad de la TH durante el desarrollo. Sin embargo, en este caso los cambios fueron opuestos a los o b s e r v a d o s en la adrenal; la administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento produjo valores subnormales en la TH cerebral después de los 25 días de edad postnatal, m i e n t r a s que al administrar la droga más tardíamente durante la g e s t a c i o n, se obtuvo un descenso en la actividad de la enzima a partir de los 10 días de edad. Las alteraciones observadas en la TH en cerebro obtenidas en dos períodos diferentes de administración de la reserpina, sugieren que el período c r i t i c o en el cual la droga es capaz de alterar el desarrollo de la TH cerebral es más amplio que en el caso de la adrenal.

## CONCLUSIONES

Estos estudios realizados en ratas en desarrollo indican efectos tanto de la reserpina como de la guanetidina completamente diferentes a los que se obtienen en el animal adulto. A continuación y con el objeto de llamar la atención sobre los posibles riesgos que podría tener el uso de dichas drogas en el ser humano, ya sea administradas directamente al individuo en desarrollo o indirectamente a través de la madre, quiero destacar los aspectos más relevantes de las acciones de dichas drogas observadas en la rata. Sin embargo, hay que hacer la salvedad que tales efectos podrían no ser comparables y/o similares en el hombre.

La administración de reserpina a ratas recién nacidas produjo una depleción no-neurogénica de catecolaminas (CA) en las adrenales, sin inducción compensadora de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH). Ello se debería, en parte, a la ausencia de conexiones funcionales entre dichas glándulas y el sistema nervioso simpático en las ratas recién nacidas. Estas diferencias con el animal adulto se traducen en un marcado retardo en el desarrollo de las adrenales en estos animales. La reserpina demoró también el establecimiento de las conexiones funcionales entre los nervios simpáticos y las células cardíacas y, en consecuencia, disminuyó la velocidad de desarrollo de dicho órgano. Sin embargo, la droga podría retardar también el crecimiento del corazón a través de otros mecanismos. En el cerebro, la reserpina retardó el desarrollo de la actividad de la enzima ornitina decarboxilasa (ODC), lo que indicaría una disminución en la proliferación celular en dicho órgano; ello

estaría de acuerdo con el bajo peso del cerebro observado en estos animales.

La administración de reserpina los días 9, 8 y 7 antes del nacimiento no alteró los niveles de CA en las adrenales durante los primeros días de edad, pero produjo elevaciones permanentes en las actividades de las enzimas TH y DBH y en la velocidad de síntesis de las vesículas de almacenamiento de aminas a partir de los 10 días de edad. Puesto que tanto las actividades de dichas enzimas como la síntesis de nuevas vesículas están relacionadas con el grado de estimulación de las adrenales, los resultados obtenidos sugieren que estos animales tendrían un mayor tono simpatoadrenal en el período postinervación. En el cerebro se obtuvo un retardo en la sinaptogénesis y en la actividad de la TH, lo que sugiere un deterioro general del desarrollo en estos animales.

La administración de guanetidina durante los primeros días de edad aumentó los niveles de CA y la actividad de TH y DBH en las adrenales, lo que indica una aceleración en el desarrollo normal de dichas glándulas. Por otro lado, la guanetidina retardó el desarrollo de la actividad de la ODC en el cerebro; la TH mostró una estimulación inicial, pero posteriormente los valores fueron subnormales. Esto último podría estar relacionado con el desarrollo incompleto de la barrera hematoencefálica en las ratas recién nacidas.

## BIBLIOGRAFIA

1. L. J. IGNARRO y F. E. SHIDEMAN. Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 159, 38-48 (1968)
2. B. HOKFELT. Noradrenaline and adrenaline in mammalian tissues.  
*Acta Physiol. Scand.*, 25, supl. 92 (1951)
3. L. L. IVERSEN, J. DE CHAMPLAIN, J. GLOWINSKI y J. AXELROD. Uptake, storage and metabolism of norepinephrine in tissues of the developing rat.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 157, 509-516 (1967)
4. F. W. HEGGENESS, J. DILIBERTO y V. DiSTEFANO. Effect of growth velocity on cardiac norepinephrine content in infant rats.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133, 1413-1416 (1970)
5. B. L. MIRKIN. Ontogenesis of the adrenergic nervous system: functional and pharmacologic implications.  
*Fed. Proc.*, 31, 65-73 (1972)
6. R. L. PATRICK y N. KIRSHNER. Developmental changes in rat adrenal tyrosine hydroxylase, dopamine- $\beta$ -hydroxylase and catecholamine levels: effect of denervation.  
*Develop. Biol.*, 29, 204-213 (1972)
7. H. THOENEN, R. KETTLER y A. SANER. Time course of the development of enzymes involved in the synthesis of norepinephrine in the superior cervical ganglion of the rat from birth to adult life.  
*Brain Res.*, 40, 459-468 (1972)
8. M. LEVITT, S. SPECTOR, A. SJOERDSMA y S. UDENFRIEND. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 148, 1-8 (1965)
9. L.-G. ELFVIN. The development of the secretory granules in the rat adrenal medulla.  
*J. Ultrastruct. Res.*, 17, 45-62 (1967)
10. N. KARKI, R. KUNTZMAN y B. B. BRODIE. Storage, synthesis, and metabolism of monoamines in the developing brain.  
*J. Neurochem.*, 9, 53-58 (1962)

11. T. A. SLOTKIN. Maturation of the adrenal medulla - I. Uptake and storage of amines in isolated storage vesicles of the rat.  
Biochem. Pharmacol., 22, 2023-2032 (1973)
12. R. L. PATRICK y N. KIRSHNER. Effect of stimulation on the levels of tyrosine hydroxylase, dopamine- $\beta$ -hydroxylase and catecholamines in intact and denervated rat adrenal glands.  
Molec. Pharmacol., 7, 87-96 (1971)
13. R. L. PATRICK y N. KIRSHNER. Acetylcholine-induced stimulation of catecholamine recovery in denervated rat adrenals after reserpine-induced depletion.  
Molec. Pharmacol., 7, 389-396 (1971)
14. I. B. BLACK. Development of adrenergic neurons in vivo: inhibition by ganglionic blockade.  
J. Neurochem., 20, 1265-1267 (1973)
15. R. S. COMLINE y M. SILVER. The development of the adrenal medulla of the foetal and new-born calf.  
J. Physiol., London, 183, 305-340 (1966)
16. L. ERANKO y O. ERANKO. Effect of guanethidine on nerve cells and small intensely fluorescent cells in sympathetic ganglia of newborn and adult rats.  
Acta Pharmacol. Toxicol., 30, 403-416 (1971)
17. P. U. ANGELETTI y R. LEVI-MONTALCINI. Growth inhibition of sympathetic cells by some adrenergic blocking agents.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 86-88 (1972)
18. E. M. JOHNSON, Jr., E. CANTOR y J. R. DOUGLAS, Jr. Biochemical and functional evaluation of the sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 193, 503-512 (1975)
19. E. M. JOHNSON, Jr., F. O'BRIEN y R. WERBITT. Modification and characterization of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats.  
Eur. J. Pharmacol., 37, 45-54 (1976)

20. G. BURNSTOCK, B. EVANS, B. J. GANNON, J. W. HEATH y V. JAMES. A new method of destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine.  
Br. J. Pharmacol., 43, 295-301 (1971)
21. G. D. NIELSEN. Guanethidine induced sympathectomy in the adult rat. I. Functional effects following subacute administration.  
Acta Pharmacol. Toxicol., 41, 203-208 (1977)
22. G. D. NIELSEN. Guanethidine induced sympathectomy in the adult rat. II. Functional effects following chronic administration.  
Acta Pharmacol. Toxicol., 41, 209-207 (1977)
23. A. S. KULKARNI y F. E. SHIDEMAN. Sensitivities of the brains of infant and adult rats to the catecholamine-depleting actions of reserpine and tetrabenazine.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 153, 428-433 (1966)
24. S. R. TONGE. Permanent alterations in catecholamine concentrations in discrete areas of brain in the offspring of rats treated with methylamphetamine and clorpromazine.  
Br. J. Pharmacol., 47, 425-427 (1973).
25. S. R. TONGE. Catecholamine concentrations in discrete areas of the rat brain after the pre- and neonatal administration of phencyclidine and imipramine.  
J. Pharm. Pharmacol., 25, 164-166 (1973)
26. V. NAIR. Prenatal exposure to drugs: Effect on the development of brain monoamine systems.  
Advan. Behav. Biol., 8, 171-211 (1974)
27. R. B. LYDIAR y S. B. SPARBER. Evidence for a critical period for postnatal elevation of brain tyrosine hydroxylase activity resulting from reserpine administration during embryonic development.  
J. Pharmacol. Exp. ther., 189, 370-379 (1974)
28. S. B. SPARBER y F. E. SHIDEMAN. Prenatal administration of reserpine: Effect upon hatching, behavior, and brainstem catecholamines of the young chick.  
Develop. Psychobiol., 1, 236-244 (1968)
29. S. B. SPARBER. Effects of drugs on the biochemical and behavioral responses of developing organisms.  
Ped. Proc., 31, 74-80 (1972)

30. A. LIUZZI, F. H. FOPPEN y P. U. ANGELETTI. Adrenaline, noradrenaline and dopamine levels in brain and heart after administration of 6-hydroxydopamine and guanethidine to newborn mice.  
Biochem. Pharmacol., 23, 1041-1044 (1974)
31. Y. NOMURA, F. NAITOH y T. SEGAWA. Regional changes in brain catecholamine content following administration of guanethidine to neonatal rats.  
Jap. J. Pharmacol., 25, 773-779 (1975)
32. A. ALOUISE y N. WEINER. The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: effect of nerve stimulation, cocaine, and catecholamine-releasing agents.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 56, 1491-1496 (1966)
33. N. WEINER y M. RABADJIJA. The effect of nerve stimulation on the synthesis and metabolism of norepinephrine in the isolated guinea-pig hypogastric nerve-vas deferens preparation.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 160, 61-71 (1968)
34. M. M. AMES, P. LERNER y W. LOVENBERG. Tyrosine hydroxylase. Activation by protein phosphorylation and end product inhibition.  
J. Biol. Chem., 253, 27-31 (1978)
35. N. KIRSHNER. Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla.  
J. Biol. Chem., 237, 2311-2317 (1962)
36. A. CARLSSON, N.-A. HILLARP y B. WALDECK. A  $Mg^{2+}$ -ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla.  
Med. Exp., 6, 47-53 (1962)
37. A. CARLSSON, N.-A. HILLARP y B. WALDECK. Analysis of the  $Mg^{2+}$ -ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla.  
Acta Physiol. Scand., 59 suppl. 215, 1-38 (1963)
38. A. PHILIPPU, H. MATTHAEI y H. LENTZEN. Uptake of dopamine into fractions of pig caudate nucleus homogenates.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 287, 181-190 (1975)
39. A. IGGO y M. VOGT. Preganglionic sympathetic activity in normal and in reserpine-treated cats.  
J. Physiol. London, 150, 114-133 (1960)

40. B. KOVACIC y R. L. ROBINSON. The effect of reserpine on catecholamine levels in the gravid rat and its offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 152, 37-41 (1966)
41. L. MAITRE, M. STAEHELIN y H. BRUNNER. Antihypertensive and noradrenaline-depleting effects of guanethidine metabolites. *J. Pharm. Pharmacol.*, 23, 327-331 (1971)
42. B. BHAGAT. Role of catecholamines in induction of adrenal tyrosine hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.*, 23, supl. 1, 131-133 (1974)
43. R. CASS, R. KUNTZMAN y B. B. BRODIE. Norepinephrine depletion as a possible mechanism of action of guanethidine (SU 5864), a new hypotensive agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103, 871-872 (1960)
44. R. KUNTZMAN, E. COSTA, G. L. GESSA y B. B. BRODIE. Reserpine and guanethidine action on peripheral stores of catecholamines. *Life Sci.*, 3, 65-74 (1962)
45. B. EVANS, T. IWAYAMA y G. BURNSTOCK. Long-lasting supersensitivity of the rat vas deferens to norepinephrine after chronic guanethidine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 185, 60-69 (1973)
46. J. F. GERKENS. Effect of long-term treatment with guanacine or guanethidine on sympathetic function. *Eur. J. Pharmacol.*, 26, 143-150 (1974)
47. R. A. MAXWELL, A. J. PLUMMER, F. SCHNEIDER, H. POVALSKI y A. I. DANIEL. Pharmacology of (2-(octahydro-1-azocinyl)-ethyl)-guanidine sulfate (SU 5864). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 128, 22-29 (1960)
48. R. CASS y T. L. B. SPRIGGS. Tissue amine levels and sympathetic blockade after guanethidine and bretylium. *Br. J. Pharmacol.*, 17, 442-450 (1961)
49. A. L. A. BOURA y A. F. GREEN. The actions of bretylium adrenergic neurone blocking and other effects. *Br. J. Pharmacol.*, 14, 536-548 (1959)
50. J. R. MITCHELL y J. A. OATES. Guanethidine and related agents. I. Mechanism of the selective blockade of adrenergic neurons and its antagonism by drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172, 100-107 (1970)

51. A. LUND. Fluorometric determination of adrenaline in blood. III. A new sensitive and specific method. *Acta Pharmacol. (Kbh)* 5, 231-247 (1949)
52. R. J. MERRILLS. A semiautomatic method for determination of catecholamines. *Analyt. Biochem.*, 6, 272-282 (1963)
53. T. NAGATSU, M. LEVITT y S. UDENFRIEND. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 239, 2910-2917 (1964)
54. S. UDENFRIEND, P. ZALTZMAN-NIRENBERG y T. NAGATSU. Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.*, 14, 837-845 (1965)
55. N. WEINER. Regulation of norepinephrine biosynthesis. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 10, 273-290 (1970)
56. J. M. MUSACCHIO. Subcellular distribution of adrenal tyrosine hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.*, 17, 1470-1473 (1968)
57. P. LADURON y F. BELPAIRE. Tissue fractionation and catecholamines - II. Intracellular distribution patterns of tyrosine hydroxylase, dopa decarboxylase, dopamine- $\beta$ -hydroxylase, phenylethanolamine N-methyl-transferase and monoamine oxidase in adrenal medulla. *Biochem. Pharmacol.*, 17, 1127-1140 (1968)
58. R. A. MUELLER, H. THOENEN y J. AXELROD. Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. *Science*, 163, 468-469 (1969)
59. B. PETRACK, F. SHEPPY y V. FETZER. Studies on tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J. Biol. Chem.*, 243, 743-748 (1968)
60. T. NAGATSU, M. LEVITT y S. UDENFRIEND. Conversion of L-tyrosine to 3,4-dihydroxy-phenylalanine by cell-free preparations of brain and sympathetically innervated tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 14, 543-549 (1964)

61. J. T. COYLE y J. AXELROD. Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics.  
*J. Neurochem.*, 19, 1117-1123 (1972)
62. R. HOELDTKE y S. KAUFMAN. Bovine adrenal tyrosine hydroxylase. Purification and properties.  
*J. Biol. Chem.*, 252, 3160-3169 (1977)
63. J. C. WAYMIRE, R. BJUR y N. WEINER. Assay of tyrosine hydroxylase by coupled decarboxylation of dopa formed from 1-<sup>14</sup>C-L-tyrosine.  
*Analyt. Biochem.*, 43, 588-600 (1971)
64. P. HOLTZ. Role of L-dopa decarboxylase in the biosynthesis of catecholamines in nervous tissue and adrenal medulla.  
*Pharmacol. Rev.*, 11, 317-329 (1959)
65. W. LOVENBERG, H. WEISSBACH y S. UDENFRIEND. Aromatic L-amino acid decarboxylase.  
*J. Biol. Chem.*, 237, 89-93 (1962)
66. J. G. CHRISTENSON, W. DAIRMAN y S. UDENFRIEND. Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 141, 356-367 (1970)
67. E. Y. LEVIN y S. KAUFMAN. Studies of the enzyme catalyzing the conversion of 3,4-dihydroxyphenyletylamine to norepinephrine.  
*J. Biol. Chem.*, 236, 2043-2049 (1961)
68. C. R. CREVELING, J. W. DALY, B. WITKOP y S. UDENFRIEND. Substrates and inhibitors of dopamine- $\beta$ -oxidase.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 64, 125-143 (1962)
69. N. KIRSHNER. Pathway of noradrenaline formation from dopa.  
*J. Biol. Chem.*, 226, 821-825 (1957)
70. M. OKA, K. KAJIKAWA, T. OHUCHI, H. YOSHIDA y R. IMAIZUMI. Distribution of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in subcellular fractions of adrenal medulla.  
*Life Sci.*, 6, 461-465 (1967)

71. D. F. KIRKSEY, R. L. KLEIN, J. McC. BAGGET y M. S. GAS-PARIS. Evidence that most of the dopamine  $\beta$ -hydroxylase is not membrane bound in purified large dense cored noradrenergic vesicles. *Neuroscience*, 3, 71-81 (1978)
72. D. S. DUCH, O. H. VIVEROS y N. KIRSHNER. Endogenous inhibitor(s) in adrenal medulla of dopamine  $\beta$ -hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.*, 17, 255-264 (1968)
73. H. WINKLER, HEIDE HORTNAGL y H. NORTNAGL. Membranes of the adrenal medulla. Behaviour of insoluble proteins of chromaffin granules on gel electrophoresis. *Biochem. J.*, 118, 303-310 (1970)
74. T. NAGATSU, H. KUZUYA y H. HIDAKA. Inhibition of dopamine  $\beta$ -hydroxylase by sulfhydryl compounds and the nature of the natural inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 319-327 (1967)
75. I. W. CHUBB, B. N. PRESTON y L. AUSTIN. Partial characterization of a naturally occurring inhibitor of dopamine  $\beta$ -hydroxylase. *Biochem. J.*, 111, 243-244 (1969)
76. J. C. ORCUTT y P. B. MOLINOFF. Endogenous inhibitors of dopamine  $\beta$ -hydroxylase in rat organs. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1167-1174 (1976)
77. S. FRIEDMAN y S. KAUFMAN. 3,4-Dihydroxyphenylethylamine  $\beta$ -hydroxylase. Physical properties, copper content, and role of copper in the catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, 240, 4763-4773 (1965)
78. R. A. STONE, N. KIRSHNER, J. REYNOLDS y T. C. VANAMAN. Purification and properties of dopamine  $\beta$ -hydroxylase from human pheochromocytoma. *Molec. Pharmacol.*, 10, 1009-1015 (1974)
79. M.-T. MIRAS-PORTUGAL. La dopamine- $\beta$ -hydroxylase du s erum humaine. Thesis. Universite Louis Pasteur de Strasbourg.
80. R. GRZANNA y J. T. COYLE. Rat adrenal dopamine- $\beta$ -hydroxylase: purification and immunologic characteristics. *J. Neurochem.*, 27, 1091-1096 (1976)

81. A. E. PEGG y H. G. WILLIAMS-ASHMAN. Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat. *Biochem. J.*, 108, 533-539 (1968)
82. D. H. RUSSELL y S. H. SNYDER. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 60, 1420-1427 (1968)
83. J. JANNE y A. RAINA. Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver: Relation to increased ornithine decarboxylase activity. *Acta Chem. Scand.*, 22, 1349-1351 (1968)
84. N. FAUSTO. Studies on ornithine decarboxylase activity in normal and regenerating livers. *Biochim. Biophys. Acta*, 190, 193-201 (1969)
85. S. H. SNYDER y D. H. RUSSELL. Polyamine synthesis in rapidly growing tissues. *Fed. Proc.*, 29, 1575-1582 (1970)
86. P. HANNONEN, A. RAINA y J. JANNE. Polyamine synthesis in the regenerating rat liver: stimulation of S-adenosyl-methionine decarboxylase, and spermidine and spermine synthases after partial hepatectomy. *Biochim. Biophys. Acta*, 273, 84-90 (1972)
87. D. H. RUSSELL y S. H. SNYDER. Amine synthesis in regenerating rat liver: extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Molec. Pharmacol.*, 5, 253-262 (1969)
88. J. JANNE y H. G. WILLIAMS-ASHMAN. On the purification of L-ornithine decarboxylase from rat prostate and effects of thiol compounds on the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 246, 1725-1732 (1971)
89. N. KIRSHNER. Function and organization of chromaffin vesicle. *Life Sci.*, 14, 1153-1167 (1974)
90. G. TAUGNER. The effects of univalent anions on catecholamine fluxes and adenosine triphosphatase activity in storage vesicles from the adrenal medulla. *Biochem. J.*, 130, 969-973 (1972)

91. A. PLETSCHER, M. Da PRADA, H. STEFFEN, B. LUTOLD y K. H. BERNEIS. Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. *Brain. Res.*, 62, 317-326 (1973)
92. T. A. SLOTKIN y N. KIRSHNER. Uptake, storage, and distribution of amines in bovine adrenal medullary vesicles. *Molec. Pharmacol.*, 7, 581-592 (1971)
93. T. A. SLOTKIN y N. KIRSHNER. Recovery of rat adrenal amine stores after insulin administration. *Molec. Pharmacol.*, 9, 105-116 (1973)
94. M. I. STEINBERG y C. B. SMITH. Effects of desmethylimipramine and cocaine on the uptake, retention and metabolism of H<sup>3</sup>-tyramine in rat brain slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 173, 176-192 (1970)
95. P. M. LADURON. Evidence for a localization of dopamine- $\beta$ -hydroxylase within the chromaffin granules. *FEBS-Letters*, 52, 132-134 (1975)
96. C. LAU y T. A. SLOTKIN. Indirect and direct inhibition of dopamine  $\beta$ -hydroxylase by amphetamine in storage vesicles and synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.*, 57, 223-228 (1976)
97. H. B. BOSMANN y B. H. HEMSWORTH. Synaptic vesicles. Incorporation of choline by isolated synaptosomes and synaptic vesicles. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 133-141 (1970)
98. F. B. BYROM y C. WILSON. A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J. Physiol.*, 93, 301-304 (1938)
99. PARKS ELECTRONICS LABORATORY, Route 2, Beaverton, Oregon U.S.A.
100. T. A. SLOTKIN. Maturation of the adrenal medulla. II. Content and properties of catecholamine storage vesicles of the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 22, 2033-2044 (1973)
101. D. R. WEKSTEIN. Heart rate of the preweanling rat and its autonomic control. *Am. J. Physiol.*, 208, 1259-1262 (1965)

102. W. C. CLAYCOMB. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Deoxyribonucleic acid synthesis and nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerase activity.  
J. Biol. Chem., 250, 3229-3235 (1975)
103. W. C. CLAYCOMB. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Possible control of deoxyribonucleic acid synthesis and cell differentiation by adrenergic innervation and cyclic adenosine 3': 5'-mono-phosphate.  
J. Biol. Chem., 251, 6082-6089 (1976)
104. J. W. WARNICA, P. ANTONY, K. GIBSON y P. HARRIS. The effect of isoprenaline and propranolol on rat myocardial ornithine decarboxylase.  
Cardiovasc.Res., 9, 793-796 (1975)
105. D. H. RUSSELL, K. T. SHIVERICK, B. B. HAMRELL y N. R. ALPERT. Polyamine synthesis during initial phases of stress-induced cardiac hypertrophy.  
Am. J. Physiol., 221, 1287-1291 (1971)
106. R. MATSUSHITA, K. SOGANI y M. S. RABEN. Ornithine decarboxylase in cardiac hypertrophy in the rat.  
Circul. Res., 31, 699-709 (1972)
107. T. R. ANDERSON y S. M. SCHANBERG. Effect of thyroxine cortisol on brain ornithine decarboxylase activity, and swimming behaviour in developing rat.  
Biochem. Pharmacol., 24, 495-501 (1975)
108. E. M. GAL, A. E. ROGGEVEEN y S. A. MILLARD. DL-(2-<sup>14</sup>C)p-Chlorophenylalanine as an inhibitor of tryptophan 5-hydroxylase.  
J. Neurochem., 17, 1221-1235 (1970)
109. G. R. BREESE, B. R. COOPER y R. A. MUELLER. Evidence for involvement of 5-hydroxytryptamine in the actions of amphetamine  
Br. J. Pharmacol., 52, 307-314 (1974)
110. A. ITO y S. M. SCHANBERG. Central nervous system mechanisms responsible for blood pressure elevation induced by p-chlorophenylalanine.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 181, 65-74 (1972)

111. O. H. VIVEROS, L. ARQUEROS y N. KIRSHNER. Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VI. Effect of reserpine on the dopamine  $\beta$ -hydroxylase and catecholamine content and on the buoyant density of adrenal storage vesicles.  
Molec. Pharmacol., 7, 434-443 (1971)
112. T. R. ANDERSON y T. A. SLOTKIN. Maturation of the adrenal medulla - IV. Effects of morphine.  
Biochem. Pharmacol., 24, 1469-1474 (1975)
113. R. KATO, P. VASSANELLI, G. FRONTINO y E. CHIESARA. Variation in the activity of liver microsomal drug-metabolizing enzymes in rats in relation to the age.  
Biochem. Pharmacol., 13, 1037-1051 (1964)
114. R. A. MUELLER y F. E. SHIDEMAN. A comparison of the absorption, distribution and metabolism of reserpine in infant and adult rats.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 163, 91-97 (1968)
115. R. A. MUELLER, H. THOENEN y J. AXELROD. Increase in tyrosine hydroxylase activity after reserpine administration.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 169, 74-79 (1969)
116. H. THOENEN, R. A. MUELLER y J. AXELROD. Trans-synaptic induction of adrenal tyrosine hydroxylase.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 169, 249-254 (1969)
117. A. GUIDOTTI y E. COSTA. Trans-synaptic regulation of tyrosine 3-mono-oxygenase biosynthesis in rat adrenal medulla.  
Biochem. Pharmacol., 26, 817-823 (1977)
118. M. A. ROBKIN, T. H. SHEPARD y D. C. DYER. Autonomic receptors of the early rat embryo heart: growth and development.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 799-803 (1976)
119. G. F. ATWOOD y N. KIRSHNER. Postnatal development of catecholamine uptake and storage of the newborn rat heart.  
Develop. Biol., 49, 532-538 (1976)
120. P. A. SHORE. Release of serotonin and catecholamines by drugs.  
Pharmacol. Rev., 14, 531-550 (1962)

121. L. STJARNE. Studies of catecholamine uptake storage and release mechanisms.  
*Acta Physiol. Scand.*, 62, supl. 228 (1964)
122. T. IWAYAMA, W. W. FLEMING y G. BURNSTOCK. Ultrastructure of mitochondria in atrial muscle associated with depression and supersensitivity produced by reserpine.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 184, 95-105 (1973)
123. U. TRENDELENBURG. Mechanisms of supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines.  
*Pharmacol. Rev.*, 18, 629-640 (1966)
124. H. S. ALPERS y P. A. SHORE. Specific binding of reserpine. Association with norepinephrine depletion.  
*Biochem. Pharmacol.*, 18, 1363-1372 (1969)
125. S. R. BUTLER y S. M. SCHANBERG. Effect of maternal morphine administration on neonatal rat brain ornithine decarboxylase (ODC).  
*Biochem. Pharmacol.*, 24 1915-1918 (1975)
126. T. A. SLOTKIN, C. LAU y M. BARTOLOME. Effects of neonatal or maternal methadone administration on ornithine decarboxylase activity in brain and heart of developing rats.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 199, 141-148 (1976)
127. T. A. SLOTKIN y F. J. SEIDLER. Acute and chronic effects of nicotine on synthesis and storage of catecholamines in the rat adrenal medulla.  
*Life Sci.* 16, 1613-1622 (1975)
128. T. R. ANDERSON y T. A. SLOTKIN. Effects of morphine on the rat adrenal medulla.  
*Biochem. Pharmacol.*, 24, 671-679 (1975)
129. O. H. VIVEROS, L. ARQUEROS, R. J. CONNETT y N. KIRSHNER. Mechanism of secretion from the adrenal medulla. IV. The fate of the storage vesicles following insulin and reserpine administration.  
*Molec. Pharmacol.*, 5, 69-82 (1969)
130. T. A. SLOTKIN y K. EDWARDS. Effects of reserpine on the content and properties of rat adrenal medullary storage vesicles.  
*Biochem. Pharmacol.*, 22, 549-560 (1973)
131. T. A. SLOTKIN. Effects of reserpine on the adrenal medulla of the spontaneously hypertensive rat.  
*Br. J. Pharmacol.*, 53, 349-356 (1975)

132. A. S. GOLDMAN y W. C. YAKOVAC. Teratogenic action in rats of reserpine alone and in combination with salicylate and immobilization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118, 857-862 (1965)

## ADDENDUM

### LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

1. J. BARTOLOME y T. A. SLOTKIN. Prenatal reserpine administration: Permanent changes in adrenal tyrosine hydroxylase and dopamine  $\beta$ -hydroxylase. *Psychopharmac. Comm.*, 1, 465-472 (1975)
2. J. BARTOLOME y T. A. SLOTKIN. Effects of postnatal reserpine administration on simptho-adrenal development in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1513-1519 (1976)
3. J. BARTOLOME, M. BARTOLOME, F. J. SEIDLER, T. R. ANDERSON y T. A. SLOTKIN. Effects of early postnatal guanethidine administration on adrenal medulla and brain of developing rats. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 2387-2390 (1976)
4. J. BARTOLOME, F. J. SEIDLER, T.R. ANDERSON y T. A. SLOTKIN. Effects of prenatal reserpine administration on development of the rat adrenal medulla and central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 197, 293-302 (1976)
5. J. BARTOLOME, C. LAU y T.A. SLOTKIN. Ornithine decarboxylase in developing rat heart and brain: role of synpathetic development for responses to autonomic stimulants and the effects of reserpine on maturation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 202, 510-518 (1977)