

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares, que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca de España, 1975. Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria.

Fundación Juan March



FJM-Uni 48-Gar
Relación entre iones calcio, fármacos
García García, Antonio.
1031757



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica

Antonio García García

Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina Antonio García García

48

FJM

Uni-
48
Gar

Fundación Juan March
Serie Universitaria



48

Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica

Antonio García García



Fundación Juan March
Castelló, 77. Telef. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

La Fundación Juan March no se solidariza necesariamente con las opiniones de los autores cuyas obras publica.

Depósito Legal: M - 43303 - 1977
I.S.B.N. 84 - 7075 - 076 - 3
Ibérica, Tarragona, 34.-Madrid-7

I N D I C E

	Página
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	3
III.- METODOS	7
IV.- RESULTADOS	12
V.- DISCUSION	42
VI.- BIBLIOGRAFIA	57

I. RESUMEN.

1. Se ha estudiado la liberación de ^3H -noradrenalina (^3H -NA) y sus metabolitos deaminados (^3H -MD) y metilados inducida por el ionóforo X537A en la aurícula de cobayo aislada y superfundida con solución de Krebs oxigenada a 37°C .

2. X537A resultó ser un agente potente liberador de radiactividad a dosis de 10 y 30 μM .

3. La liberación de radiactividad inducida por el ionóforo no depende de la concentración de Ca extracelular y no se modifica por tetracaína, verapamil, ryanodine y rutenio rojo, fármacos que interfieren con los movimientos de Ca a nivel de la membrana celular de mitocondrias. Ello hace pensar que tampoco el Ca intracelular juega un papel relevante en los efectos secretores de X537A.

4. La radiactividad liberada por el ionóforo fué a expensas de ^3H -MD y sobre todo de ^3H -NA. Este patrón de liberación de NA y metabolitos contrasta con el inducido por tiramina, y aún cuando es más próximo al de reserpina, dista mucho de ser idéntico. El DMI, fármaco que bloquea la reincorporación de NA en las terminaciones nerviosas simpáticas, no

cambió el patrón de NA y metabolitos liberados por X537A. Ello sugiere una acción intraneuronal directa del ionóforo.

5. La liberación de ^3H -NA citoplasmática, extragranular, inducida por X537A en aurículas reserpinizadas fué cualitativamente similar a la obtenida en preparaciones normales. La tiramina se comportó en preparaciones reserpinizadas de manera muy distinta al ionóforo lo que sugiere mecanismos de acción diferentes para ambos agentes. El X537A actuaría como un transportador sacando directamente NA al espacio extracelular.

6. La privación de Na en el medio de superfusión inhibe el efecto liberador de X537A cuando el ionoforo se administra 15 min después de retirar el Na del medio. Este hecho sugiere que el transporte de iones Na al interior de la neurona adrenérgica pudiera despolarizar la terminación nerviosa lo que a su vez facilitaría la entrada de iones Ca que iniciarían el proceso de liberación del neurotransmisor.

7. Cuando el Na se retiró del medio y al mismo tiempo se administró X537A la liberación de tritio se potenció marcadamente. Esto va en contra de la explicación dada en el punto 6, en el sentido de que la despolarización sea la causa inmediata de los efectos secretores del X537A.

8. Experimentos llevados a cabo con N-etilmaleimida (NEM), un inhibidor de la ATPasa dependiente de Na y K, de la membrana citoplasmática, demostraron un comportamiento similar de este fármaco al de la privación de Na, en

lo que a los efectos secretores de X537A se refiere. Ello indica que la actividad ATPasica de la membrana condiciona de alguna forma los efectos de X537A.

9. A la vista de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sobre las complejas acciones de X537A y de su poca especificad para complejar y transportar un determinado ión, concluimos que se debe ser cauto a la hora de intentar acoplar las propiedades ionofóricas de este fármaco con sus efectos biológicos. Esto es especialmente cierto en lo que se refiere a estudios sobre el papel del Ca en los procesos de acoplamiento excitación-secreción.

10. La NEM es un bloqueante de la ATPasa dependiente de Na y K de la membrana que se comporta de forma similar a la privación de Na. Si se tiene en cuenta que la privación de Na lleva de la mano a una inhibición de la actividad ATPasica (Skou, 1957), podríamos sugerir que, en última instancia, sería la actividad de esta enzima la que condicionaría de alguna manera los efectos de X537A.

II. INTRODUCCION.

El progreso en el conocimiento de la regulación fisiológica de la transmisión del impulso nervioso simpático se debe fundamentalmente al hecho de disponer de fármacos que utilizados como herramientas de trabajo fisiológico han contribuido en forma decisiva al esclarecimiento de los procesos de biosíntesis, almacenamiento, liberación e inac-

tivación de NA. A este respecto, recientemente se ha obtenido un grupo muy interesante de fármacos que se conocen con el nombre de ionóforos y que tienen la propiedad de actuar como transportadores de cationes al incrementar selectivamente la permeabilidad de las membranas celulares para distintos iones (Pressman y col., 1967; Pressman, 1973). Estos fármacos son antibióticos y dos de ellos, el X537A (sintetizado por Hoffman la Roche) y el A23187 (sintetizado por Eli Lilly) incrementan selectivamente la permeabilidad de las membranas para el calcio y otros iones divalentes, por lo que pueden ser de gran importancia en estudios sobre el proceso de acoplamiento excitación-secreción de hormonas y neurotransmisores.

El ionóforo X537A posee un grupo terminal carboxílico que debe disociarse con el fin de poder formar complejos con iones, de tal manera que la carga del grupo carboxílico compense la del catión complejado y dé lugar así a un complejo eléctricamente neutro que es liposoluble y que, por lo tanto, atraviesa fácilmente las membranas. En la figura 1 se representa la estructura de este ionóforo en forma lineal y formando un complejo con iones Ba que ha sido caracterizado por cristalografía de rayos X (Johnson y col., 1970)

Puesto que estos ionóforos se han utilizado con el fin de estudiar los mecanismos envueltos en la liberación de neurotransmisores, y puesto que se sabe que la entrada de Ca en la neurona inicia el proceso secretor, se plantea el

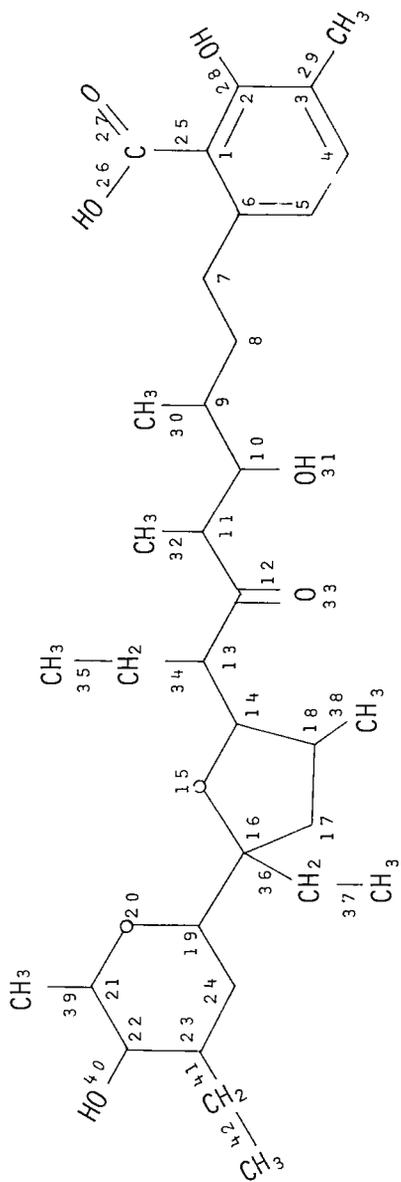


Figura 1.- Estructura química del ionóforo X537A en su forma lineal.

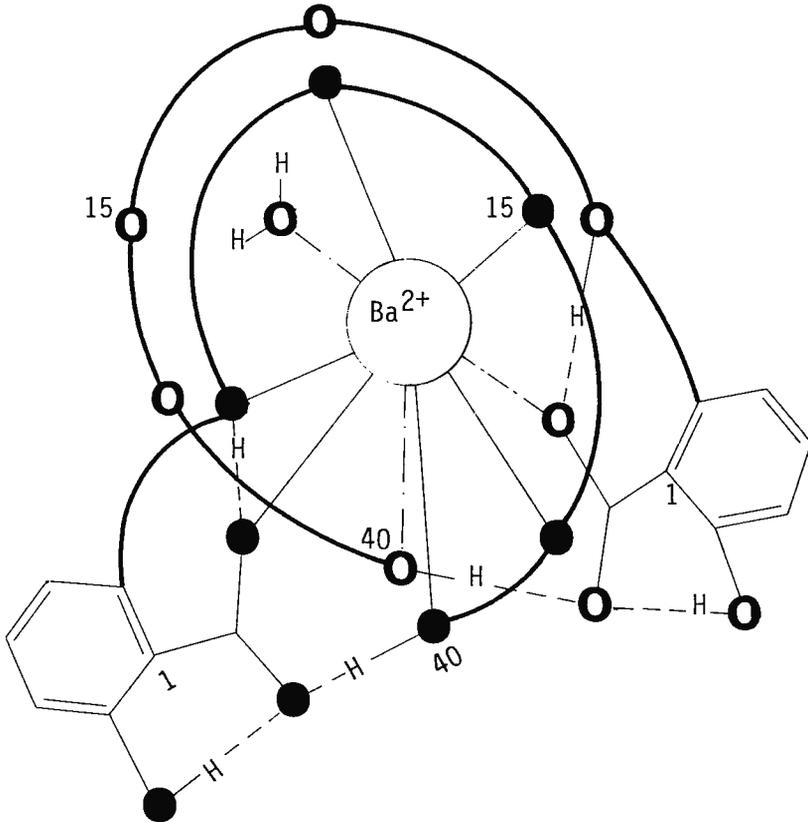


Figura 1 (cont.).- Estructura química del ionóforo X537A formando un complejo con Ba^{2+} . La estructura del complejo con Ba^{2+} ha sido caracterizada por cristalografía de Rayos X por Johnson y col., (1970).

problema de si realmente la capacidad secretora de los ionóforos y su capacidad de transportar iones están o no acopladas.

Este trabajo se planificó con la idea de estudiar la liberación de NA en la neurona adrenérgica periférica en respuesta a estímulos secretores fisiológicos (despolarización con concentraciones elevadas de K) ó farmacológicos (fármacos ionóforos, tiramina, reserpina, etc.) en un intento de aclarar el mecanismo de acción de los fármacos ionóforos a que nos hemos referido.

III. METODOS.

Se utilizaron cobayos de ambos sexos con peso aproximado de 500-700 g. Los animales fueron sacrificados de un golpe en la cabeza. El corazón se extrajo lo más rápidamente posible y se colocó en una cápsula de Petri que contenía una solución nutritiva de Krebs-bicarbonato a pH 7.4 equilibrado mediante burbujeo con 95% O₂ y 5% CO₂.

Se aisló la aurícula izquierda y se dividió en dos mitades de base a punta. Ambas mitades se colocaron en un tubo de ensayo con 2 ml de Krebs-bicarbonato manteniéndose así durante 15 min en un baño de incubación Dubnoff provisto de agitación a 37°C con el fin de que el tejido se equilibrase con el medio. Al cabo de este tiempo los tejidos se pasaron a otros tubos que contenían 2 ml de Krebs con 20 µCi de ³H-d, 1-NA y se continuó la incubación durante 30 min. Durante este periodo de tiempo la NA tritiada se incorporó a los depósitos de NA endógena de la terminación nerviosa en suficiente

cantidad para que posteriormente pudiera cuantificarse su liberación en respuesta a estímulos apropiados. Al cabo de los 30 min las 2 mitades se lavaron 3 veces con 50 ml de solución Krebs durante 5 min cada vez y se montaron en sendas cámaras de superfusión de 0.5 ml de capacidad. Estas cámaras estaban rodeadas por una segunda cámara de plástico por la que circulaba continuamente agua a 37°C.

Los tejidos se superfundieron durante una hora a una velocidad de 2.5 ml/min con una bomba peristáltica tipo Buchler con el fin de eliminar la radiactividad no ligada a las terminaciones nerviosas simpáticas. En experimentos preliminares se comprobó que después de una hora de superfusión la salida de radiactividad permanecía prácticamente constante.

Después de este periodo de lavado se iniciaba la toma de muestras a intervalos de 5 min, antes (liberación control o espontánea) y después de la introducción de fármacos en el sistema de superfusión. Inmediatamente de recogida la última muestra la aurícula se pesaba y se homogenizaba en 10 ml de ácido perclórico (APC) 0.4N. La radiactividad presente en las muestras colectadas y la que quedaba en el tejido al final del experimento se determinó según se detalla más adelante.

La solución nutritiva normal utilizada fué Krebs-bicarbonato cuya composición, así como la de las soluciones modificadas a partir de ella, aparece en la tabla I.

TABLA I
 COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES NUTRICIAS (mM)

Krebs	Normal	Sin Ca	Exceso Ca	Exceso K(a)	Sin Na. (b)
ClNa	118	118	118	18	0
CO ₃ HNa	25	25	25	25	0
ClK	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
PO ₄ H ₂ K	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Cl ₂ Ca	2.54	0	7.5	2.54	2.54
SO ₄ Mg	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18
Glucosa	10	10	10	10	10

(a) Para alcanzar la concentración de 140 mM de K en vez de la de 6mM del Krebs normal, se añadieron los 134 mM restantes en forma de SO₄K₂, reduciendo proporcionalmente la concentración de ClNa.

(b) La osmolaridad de la solución se mantenía mediante la adición de sucrosa y el pH se ajustó a 7.4 con buffer de Tris 5mM.

DETERMINACION DE LA LIBERACION TOTAL DE TRITIO, ^3H -NA Y SUS METABOLITOS DEAMINADOS Y METILADOS

Al final del experimento los tejidos se secaron en papel de filtro, se pesaron y se homogeneizaron en 10 ml de APC 0.4N. A continuación el homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min para precipitar las proteínas. Posteriormente, a 10 ml de solución de centelleo (Bray, 1960) se adicionaron alícuotas (0.5 ml) de sobrenadante y superfundido, contándose la radiactividad total en un contador de centelleo Nuclear Chicago Isocap-300. Todas las muestras se corrigieron para el "quenching" mediante el uso de un estándar externo automático de referencia.

La radiactividad presente en todas las muestras colectadas en un experimento y la que quedó en el tejido se sumaron y se la llamó radiactividad total (100%); en la mayoría de los casos los resultados se expresaron en porcentajes de esta radiactividad total (liberación fraccional).

En un grupo de experimentos se analizó la ^3H -NA intacta y sus metabolitos deaminados y metilados, según el método de Cubeddu y col. (1973). Las muestras se colectaron en tubos fríos que contenían 30 μg de NA no marcada, 3,4-dihidroxifeniletileneglicol (DOPEG) y normetanefrina, y fueron acidificadas a pH 2.6 con HCl 1 N. De las muestras colectadas en periodos de 15 min (liberación espontánea o inducida por fámacos) se preparó para su contaje una alícuota de 0.5 ml (tritio total). El resto de la muestra se pasó por una columna

Dowex-50-X4, H^+ (200-400 mesh) de intercambio iónico (5x0.4 cm). Una alícuota de 0.5 ml del efluente se contó con el fin de estimar los 3H -metabolitos deaminados totales. Las aminos se eluyeron completamente con 15 ml de HCl 2N y la NA se separó de la normetanefrina mediante adsorción en alúmina a pH 8.

Las recuperaciones de 50 μg de NA, normetanefrina y DOPEG pasados a través de un grupo paralelo de columnas fueron respectivamente, de 87, 86 y 90%. Los resultados no se corrigieron por el grado de recuperación, y se expresaron como cuentas por min y por g de tejido (cpm/g) o como el % de la cantidad total de 3H -liberado.

Los fármacos utilizados fueron los siguientes: 3,4-dihidroxifeniletileneglicol, clorhidrato de normetanefrina, clorhidrato de tiramina, clorhidrato de tetracaina, rutenio rojo y reserpina, de Sigma; ryanodine, de S.B. Penick; pargilina, de Abbott; Verapamil, de Knoll A.G.; y clorhidrato 3H -d,1-noradrenalina (6.6 Ci/mmol), de Amersham. Las soluciones se hicieron en HCl 0.01 N. Las concentraciones de los fármacos se expresaron en μg . de la base para NA y sus metabolitos y en términos molares para el resto.

Los resultados se analizaron estadísticamente según Snédecor y Cochran (1967). La significación entre grupos de experimentos pares o impares se determinó por la t de Student. Se consideró significativo el valor de $p = \bar{\sigma} < 0.05$.

IV. RESULTADOS.

a) Liberación de tritio inducida por X537A en la aurícula de cobayo superfundida.

La figura 2 representa la liberación de radiactividad evocada por X537A. En ella puede verse que la introducción de una solución 10 μM de ionóforo causa un marcado incremento en la salida de radiactividad frente a la ligera pero constante disminución que sufre la preparación control. Este incremento de liberación es lineal durante los 15 primeros min, alcanzando en este tiempo el pico de liberación para desde entonces ir disminuyendo lentamente. Una dosis de ionóforo 30 μM no eleva ulteriormente el pico de liberación si bien la fase ascendente de la curva es más pronunciada. Durante los 30 min. de superfusión con el ionóforo (10 y 30 μM) los tejidos pierden 40.4 y 49.3% de la radiactividad que contenían al comienzo de la colección de las muestras, comparadas con el 28.2% perdido por el tejido utilizado como control. La disminución de la liberación de radiactividad después de los primeros 15 min. de exposición al ionóforo podría deberse a la progresiva deplección de los depósitos de $^3\text{H-NA}$.

Teniendo en cuenta que la dosis menor con la que se obtenían resultados reproducibles era la de 30 μM , y por otro lado que dosis mayores no provocaban ulterior incremento significativo en la liberación de tritio, esta dosis fue utilizada en todos los experimentos que se describen en este

Fig. 2

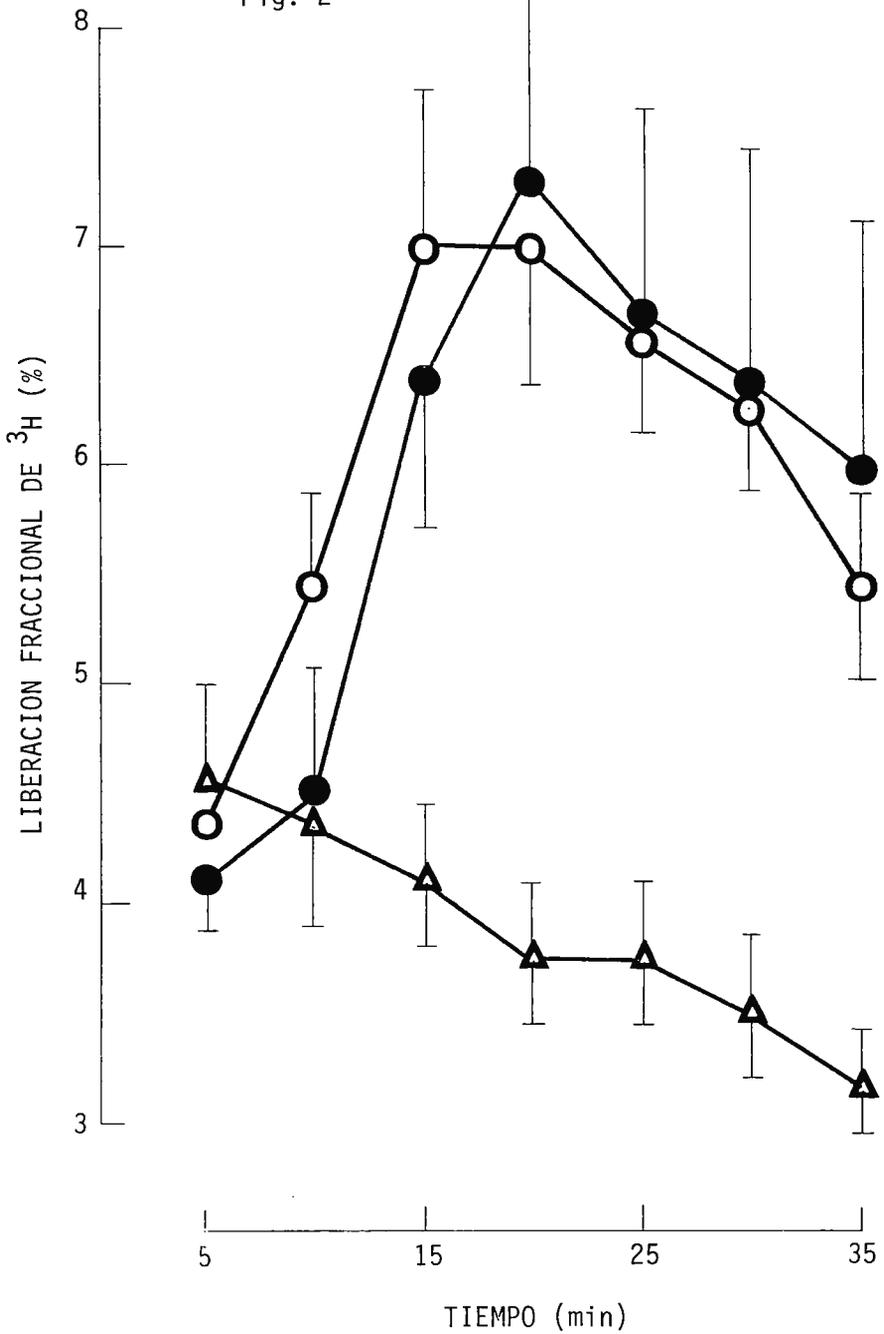


Figura 2.- Liberación fraccional de tritio (^3H) evocada por X537A. Los depósitos endógenos de noradrenalina (NA) se marcaron mediante incubación de las aurículas con ^3H -NA y a continuación fueron superfundidas con Krebs normal a 37°C . Cada punto representa la cantidad de radiactividad encontrada en cada muestra de 5 min colectada. Δ Liberación espontánea de radiactividad. \bullet Liberación inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$). \circ Liberación inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$). El ionóforo se superfundió desde el min 5 al 35. El punto primero (min 0 al 5) representa la liberación espontánea. Las líneas verticales reflejan el error estándar de la media para 8, 6 y 8 experimentos (liberación espontánea, liberación inducida por 10^{-5}M y $3 \times 10^{-5}\text{M}$ de X537A, respectivamente)

trabajo.

En la figura 3 aparece representada en el histograma de la derecha, la liberación inducida por X537A con la dosis de 30 μM y a la izquierda la correspondiente a la curva de lavado (liberación espontánea).

Estos datos, y los que aparecen en la figura 2, indican que frente a la ligera pero constante disminución de liberación de radiactividad espontánea (control), la introducción del X537A en el líquido de superfusión da lugar a un marcado incremento de liberación de ^3H cuyo valor máximo se obtiene a los 15 min, a partir de cuyo momento disminuye en forma progresiva. La liberación neta causada por el ionóforo representa el $16.7 \pm 1.9\%$ del contenido tisular inicial, entendiendo por liberación neta el valor resultante de sustraer en cada periodo de tiempo la liberación espontánea de la inducida por el ionóforo en cada situación experimental.

La expresión de los resultados en esta forma permite establecer comparaciones estadísticas entre grupos de distintos experimentos.

b) Relación entre los iones Ca y la liberación de tritio inducida por X537A

Puesto que en numerosos trabajos los efectos biológicos de los fármacos ionóforos se han asociado a su capacidad para transportar iones divalentes (ver Discusión) nos ha parecido interesante estudiar si la liberación de tritio in-

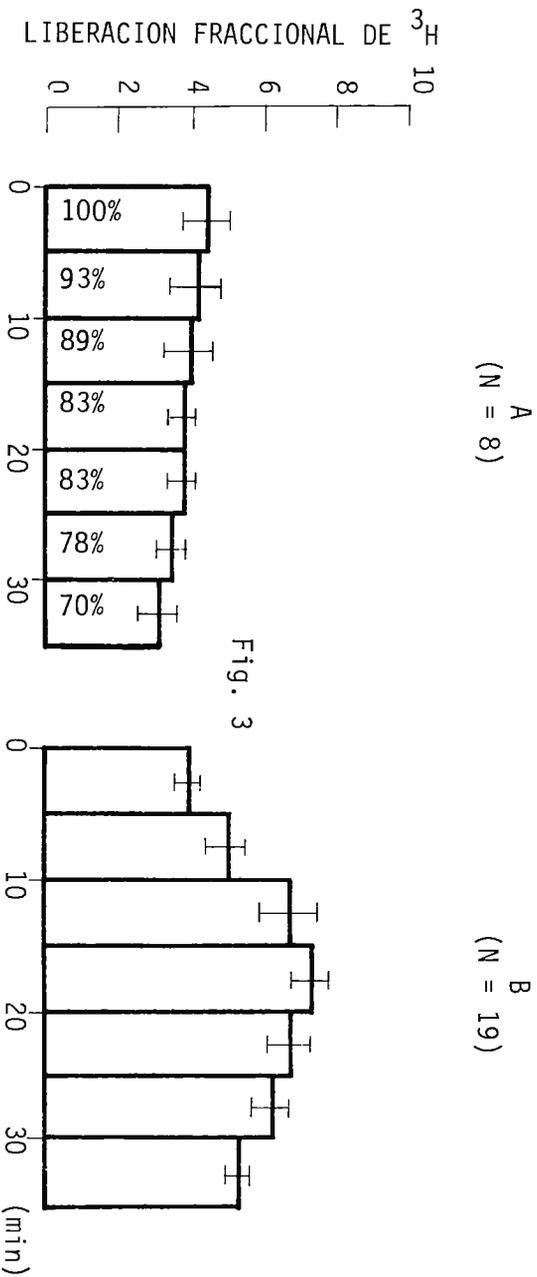


Figura 3.- Liberación fraccional de radiactividad en la aurícula aislada y superfundida de cobayo. A. Liberación espontánea. B. Liberación inducida por X537A. La caída media gradual de la radiactividad liberada espontáneamente (A) se sustrajo de cada muestra cuando se utilizó el X537A (B) con el fin de corregir esta caída espontánea y obtener la liberación neta de radiactividad (ver figura 6). N = número de experimentos. Líneas verticales = error estándar de la media.

ducida por X537A se modifica en ausencia de iones Ca, o en un medio con exceso de dicho ion.

La figura 4 muestra el resultado de 3 experimentos pares en los que una mitad de la aurícula se superfundi6 con 0 mM de Ca y la otra mitad con una concentraci6n de Ca 3 veces superior a la normal (7.5 mM), una hora antes de introducir el ion6foro. Obs6rvase la sorprendente identidad de ambos tipos de liberaci6n, hecho que muestra que la presencia en exceso o ausencia total de iones Ca, en el medio extracelular, no modifica la liberaci6n de tritio inducida por X537A. La liberaci6n neta en 0 Ca fue de $20.5 \pm 5.2\%$ y $21.8 \pm 7.6\%$ en 7.5 mM ($n = 3$; $p > 0.05$).

Como es probable que en el medio de superfusi6n con 0 Ca existan peque1as cantidades contaminantes de este i6n, se dise1aron una serie de experimentos pares en los que una mitad de la aurícula se superfundi6 con Krebs normal y la otra mitad con Krebs sin calcio conteniendo 1 mM de EGTA, un fuerte agente quelante de iones calcio. Esta soluci6n se introdujo 30 min antes de la estimulaci6n con X537A. La figura 5 muestra una vez m1s que la liberaci6n de tritio fue id6ntica tanto en presencia como en ausencia de iones calcio. La liberaci6n neta fue de $14.9 \pm 0.2\%$ y $15 \pm 3.1\%$ en 2.5 mM y 0 Ca + EGTA, respectivamente.

c) Efecto de diversos f1rmacos que interfieren con los movimientos de Ca sobre la liberaci6n de radiactividad inducida por X537A.

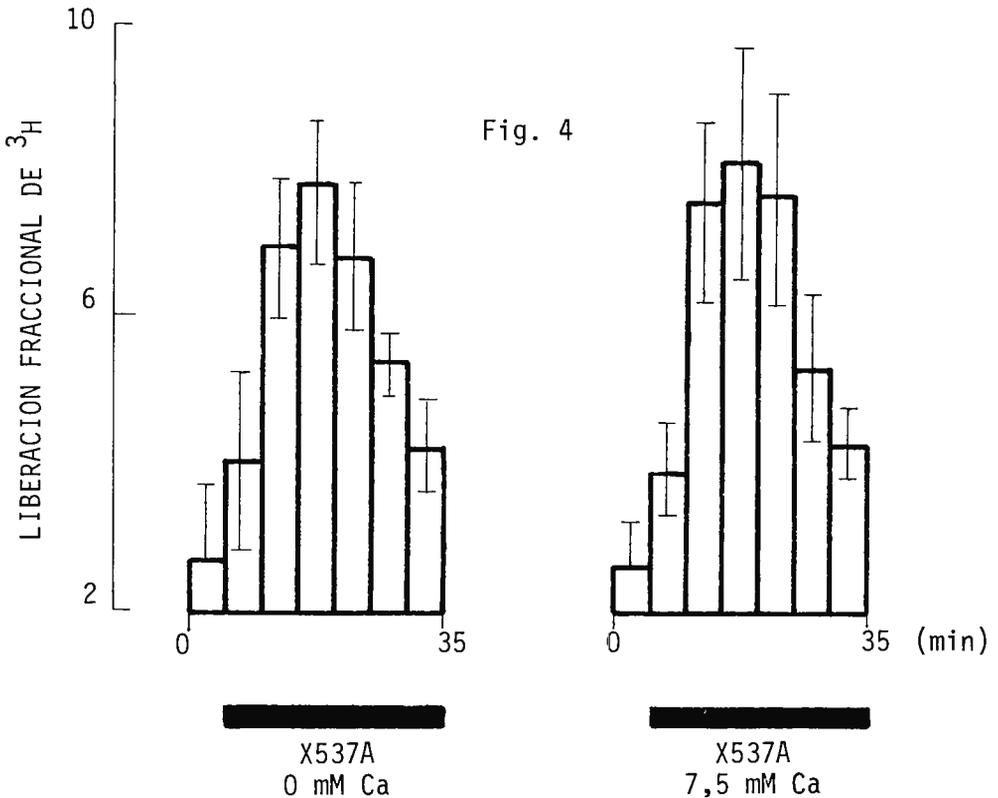


Figura 4.- Efecto de la deprivación de Ca (izquierda) o de un exceso de iones Ca (derecha) sobre la liberación fraccional de tritio (^3H) inducida por X537A. ($3 \times 10^{-5}\text{M}$). Las barras horizontales muestran el periodo de tiempo en que se administró el ionóforo. El experimento se llevó a cabo en dos mitades de una misma aurícula. Las líneas verticales muestran el error estándar de la media de 3 experimentos pares ($P > 0.05$).

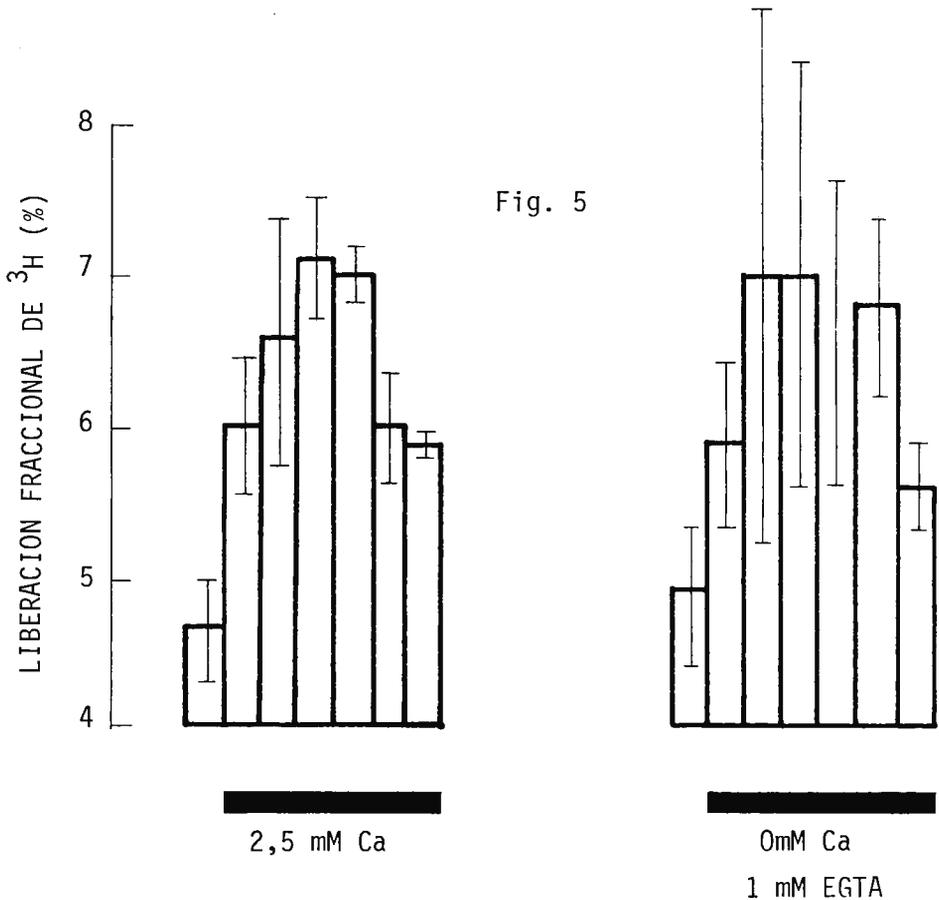


Figura 5.- Liberación de tritio (^3H) inducida por X537A en Krebs normal (izquierda) y Krebs carente de Ca y conteniendo 1 mM de EGTA. La preparación de la derecha fue superfundida con 0Ca + 1mM EGTA desde 30 min antes y durante la perfusión con X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$). Las líneas verticales señalan el error estandar de la media de 3 experimentos pares ($P > 0.05$).

Con el fin de estudiar con más detalle la aparente falta de contribución de los iones Ca a la liberación de radiactividad evocada por el ionóforo, se diseñaron grupos de experimentos pares en los cuales una mitad de la aurícula sirvió para estudiar la liberación-inducción por X537A (30 μM) sólo, y la otra mitad se trató con verapamil, ryanodine, rutenio rojo y tetracaína, (fármacos todos ellos que interfieren con los movimientos de calcio en membranas de diversos sistemas biológicos) (ver Discusión) antes de introducir el ionóforo.

La figura 6 resume los datos obtenidos. Obsérvese que ni la administración de verapamil ($3 \times 10^{-5}\text{M}$), rutenio rojo ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ni tetracaína (10^{-3}M) modifica la liberación neta de radiactividad inducida por el ionóforo. Únicamente ryanodine ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) disminuyó ligeramente la liberación ($p = 0.05$).

d) Liberación de ^3H -NA y sus metabolitos inducida por X537A.

Puesto que hasta este momento únicamente se ha medido la liberación de tritio, nos ha parecido de interés estudiar y analizar en qué porcentaje dicho isótopo está unido a la molécula de NA intacta o a sus metabolitos. Ello nos dará información cualitativa sobre el patrón de liberación de NA y sus metabolitos deaminados y metilados que nos permitirá compararla con el patrón de liberación inducido por tiramina, reserpina y estímulos fisiológicos.

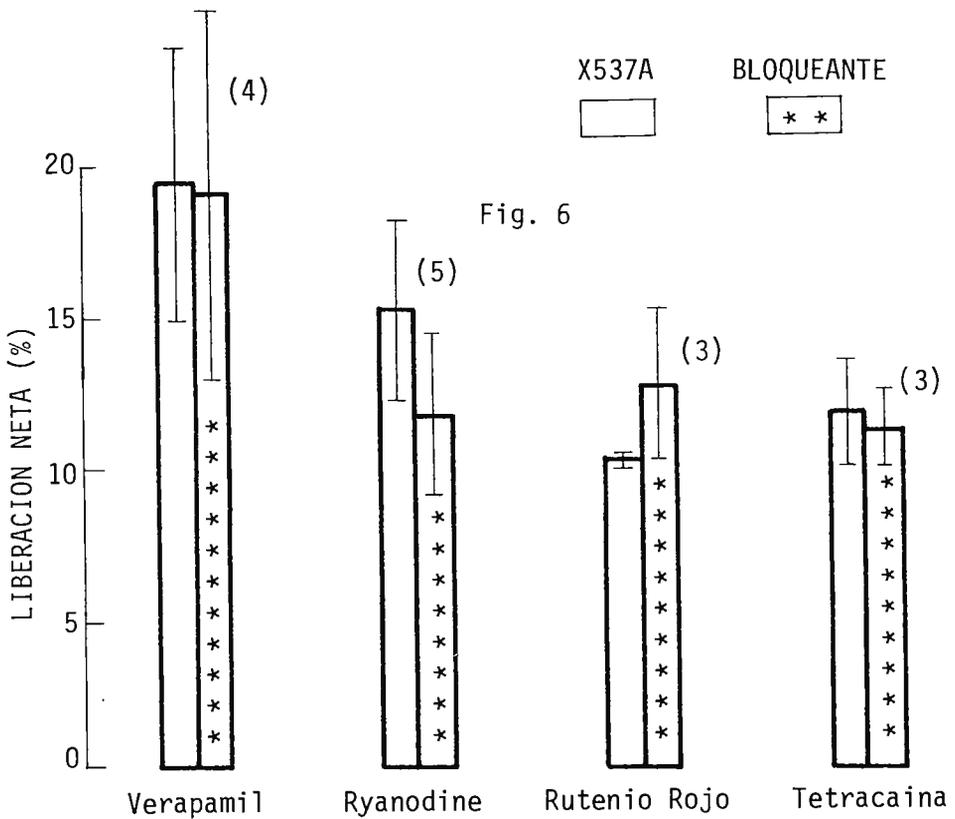


Figura 6.- Liberación neta de radiactividad inducida por el ionóforo X537A ($3 \times 10^{-5}M$) en ausencia (barras en blanco) y en presencia de fármacos que interfieren con los movimientos de Ca. Estos experimentos se llevaron a cabo en mitades de una misma aurícula, excepto los de tetracaina que son experimentos no pares. Los fármacos estuvieron presentes 10 min antes y durante el estímulo con X537A. Ninguno de estos fármacos, a las concentraciones utilizadas ($10^{-3}M$ para tetracaina y $3 \times 10^{-5}M$ para el resto) produjeron liberación de radiactividad ellos mismos. El número de experimentos viene reflejado encima de cada par de barras. Las líneas verticales son el error estándar de la media. *P = 0.05.

A continuación se va a analizar sucesivamente la liberación inducida por X537A, antes y después de inhibir la monoaminooxidasa con pargilina, tras bloquear el mecanismo de incorporación con desmetilimipramina (DMI) o con fenoxibenzamina, y se comparará con la liberación inducida por tiramina (amina simpaticomimética de acción indirecta).

a) Patrón de liberación inducido por X537A. Al analizar la liberación espontánea de tritio se observó que del total de radiactividad liberada, una gran proporción fué en forma de metabolitos deaminados ($^3\text{H-MD}$). En la figura 7 se representan los valores absolutos de la radiactividad liberada y en la figura 8 los valores expresados en % del total liberado en cada muestra de 15 min. La liberación espontánea de $^3\text{H-MD}$ fué de $82 \pm 0.91\%$, $^3\text{H-normetanefrina}$ ($^3\text{H-NM}$) de $0.65 \pm 0.08\%$ y $^3\text{H-NA}$ de $4.8 \pm 0.95\%$. Este patrón de metabolitos está de acuerdo con el encontrado previamente por Tarlov y Langer (1971). La separación de MD de los deaminados metilados ($^3\text{H-MDOM}$) mediante adsorción con alúmina daba unas cantidades de estos últimos prácticamente inapreciables, por lo cual no se han representado en la figura. Por otra parte, la cantidad tan pequeña de $^3\text{H-NM}$ obtenida hace sospechar que la catecol-O-metil transferasa (COMT) juega un papel menor en el metabolismo de NA en este sistema experimental.

La introducción de X537A ($30 \mu\text{M}$) dió un incremento notable de la radiactividad total liberada y en la proporción de NA y sus metabolitos. En efecto, mientras que en cifras

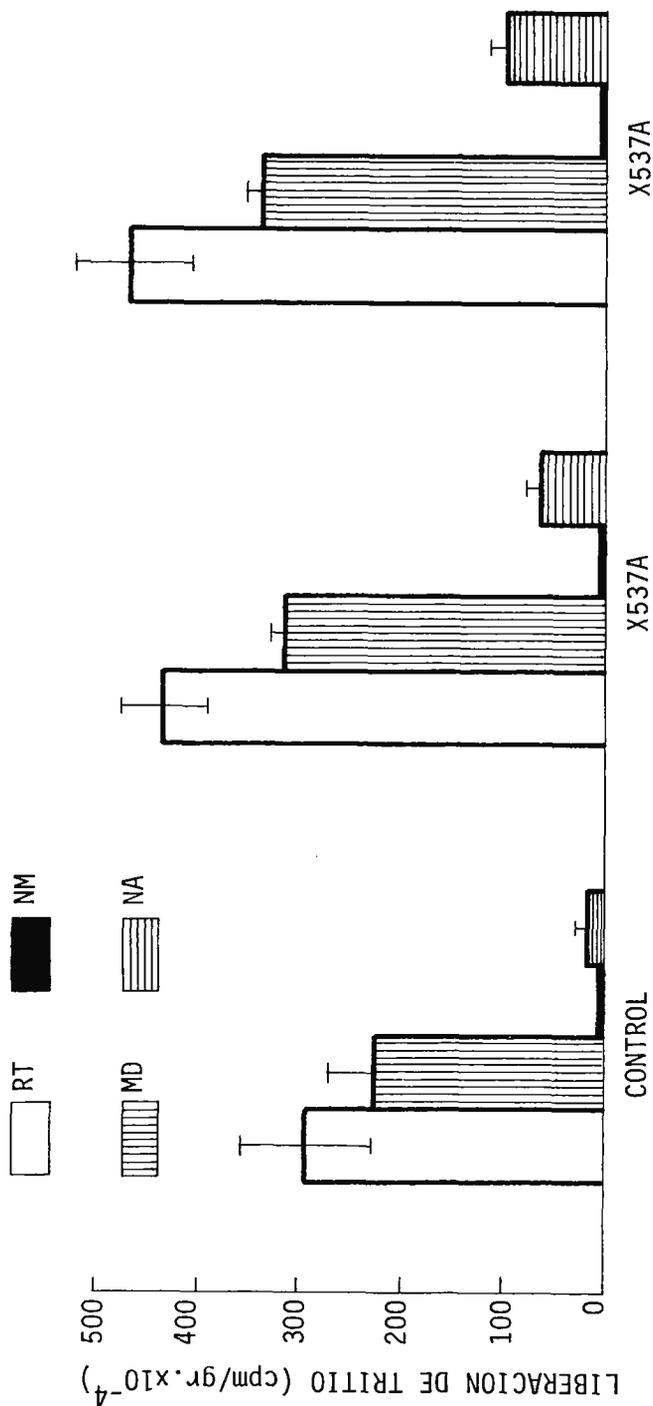


Fig. 7

Figura 7.- Influencia del ionóforo X537A ($3 \times 10^{-5}M$) sobre la liberación de radiactividad total (RT), metabolitos deaminados (MD), normetanefrina (NM) y noradrenalina (NA). El grupo de barras de la izquierda representa la liberación espontánea de radiactividad (min 0-15) y los dos grupos de la derecha representan la liberación inducida por el ionóforo durante los min 15-30 y 30-45 del experimento. Líneas verticales = error estándar de la media de 4 experimentos.

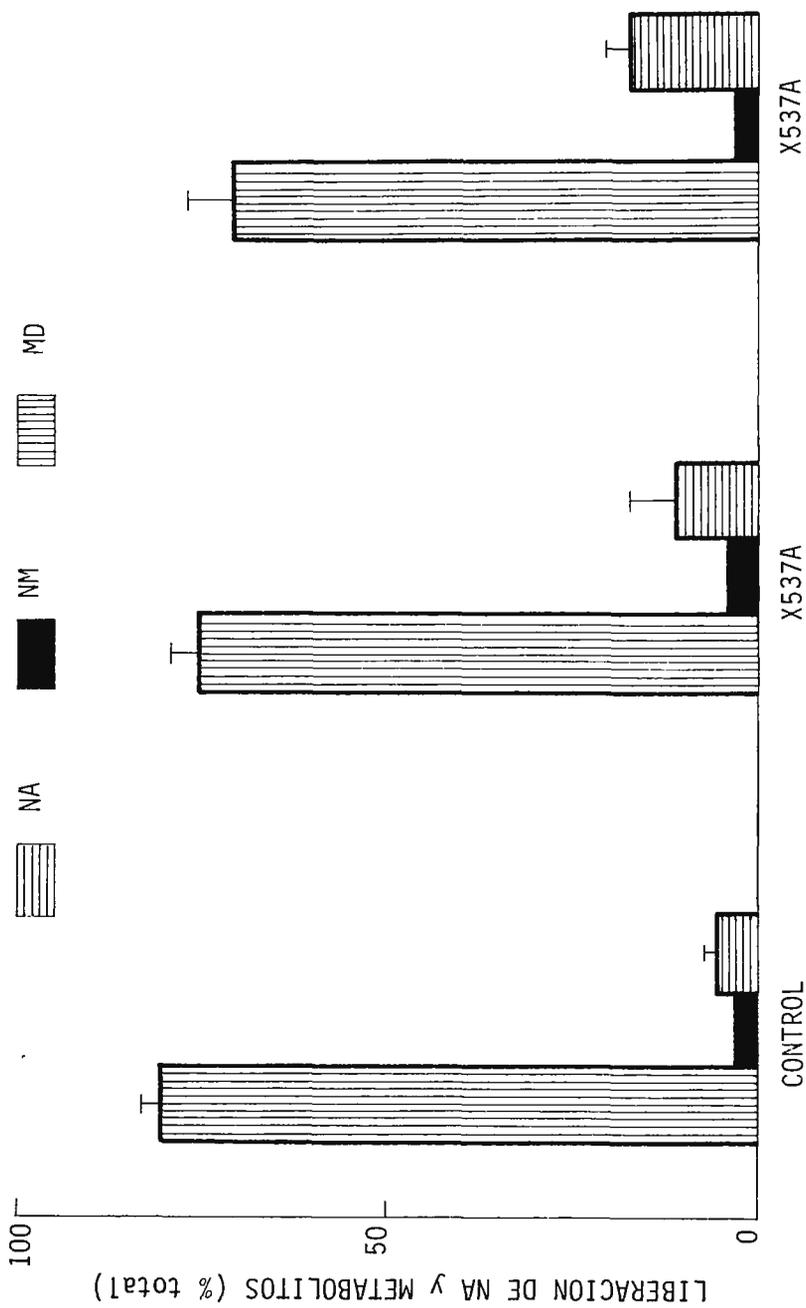


Figura 8.- Influencia del ionóforo X537A sobre la liberación de noradrenalina y sus metabolitos. Los datos se han tomado de los de la figura 7, representados en % de la radiactividad liberada.

absolutas la liberación de ^3H -MD se incrementa ligeramente y la de ^3H -NM no se modifica, la liberación de ^3H -NA intacta se aumentó drásticamente (figura 7).

Por otra parte, si se analiza la liberación en % del total (figura 8) se observa que los ^3H -MD disminuyeron del $82 \pm 0.91\%$ hasta $70.9 \pm 4\%$, mientras que la liberación de ^3H -NM se incrementó hasta un $2.1 \pm 0.3\%$ y la de ^3H -NA pasó desde un 4.8% hasta $17.2 \pm 2.6\%$. Este patrón de liberación, pues, indica que es distinto al evocado por reserpina, pues se sabe que este fármaco incrementa la liberación de radiactividad en la aurícula aislada de cobayo a expensas de MD en su totalidad (Brimjoin y Trendelenburg, 1971).

El tipo de liberación de NA y metabolitos inducido por X537A podría interpretarse en dos formas: 1. Que libere inicialmente la ^3H -NA vesicular directamente en el citoplasma de la terminación nerviosa, donde sería parcialmente metabolizada por MAO a ^3H -MD, liberándose el resto en la sinapsis como ^3H -NA intacta; y 2. Que la ^3H -NA fuera directamente liberada como tal a la hendidura sináptica, reincorporada posteriormente en la terminación nerviosa y finalmente metabolizada por MAO. Con la idea de explorar estas posibilidades se diseñaron los experimentos que se describen a continuación.

b) Patrón de liberación inducido por X537A con MAO inhibida. Con el fin de inhibir la MAO durante todo el expe-

rimento, desde la fase inicial de marcaje de los depósitos de NA endógena con ^3H -NA exógena hasta su terminación, el experimento se llevó a cabo en una solución de Krebs que contenía pargilina ($5 \times 10^{-4}\text{M}$).

La figura 9 resume los resultados obtenidos. Obsérvese el gran cambio sufrido en el patrón de NA y metabolitos liberados espontáneamente. El $81 \pm 0.7\%$ del total del tritio apareció ahora como NA intacta, mientras que sólo un 11 ± 0.1 y $5.8 \pm 1.6\%$ correspondió a ^3H -MD y ^3H -NM respectivamente. La liberación de ^3H -NA se incrementó muy marcadamente desde 265 ± 68 hasta 596 ± 70 cpm/g $\times 10^{-4}$, la liberación de ^3H -NM se incrementó sustancialmente y la de ^3H -MD de hecho disminuyó.

c) Patrón de liberación inducido por X537A después de bloquear el mecanismo de reincorporación de NA. En este grupo de 4 experimentos se administró una dosis de DMI (10^{-6}M) que se sabe bloquea en más de un 95% la incorporación de NA en las terminaciones nerviosas simpáticas. El fármaco estuvo presente 20 min antes y durante la administración de X537A.

En la figura 10 puede observarse que la presencia de DMI disminuyó notablemente la liberación de tritio. A pesar de dicha disminución, puede apreciarse que la liberación de ^3H -MD y de ^3H -NA se incrementa de forma cualitativamente similar a la obtenida con el ionóforo solo. Estos datos indican que el metabolismo de la NA liberada por

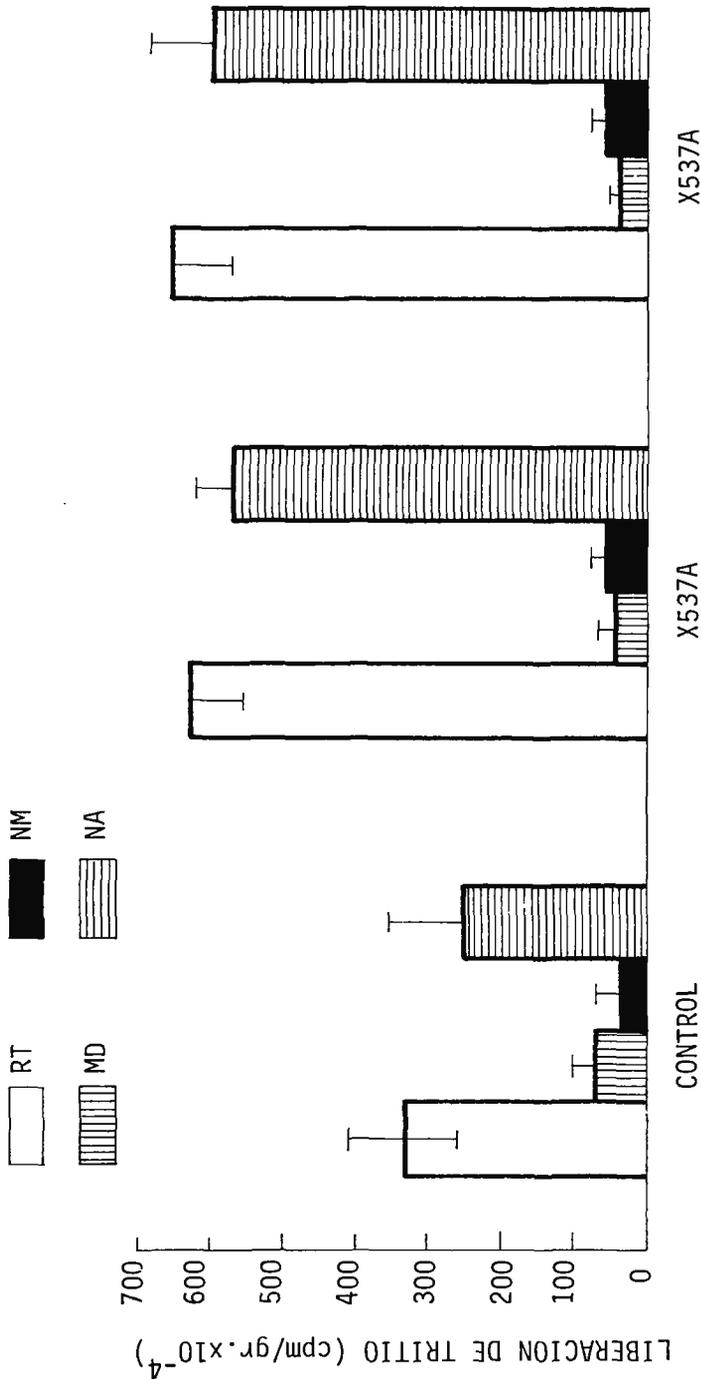


Figura 9.- Liberación de radiactividad total (RT), metabolitos deaminados (MD), nor-metanefrina (NM) y noradrenalina (NA) inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}M$) después de la inhibición de MAO. Pargilina ($5 \times 10^{-4}M$) estuvo presente durante todo el experimento. Ver figura 7 para más detalles. Líneas verticales = error estándar de la media de 3 experimentos.

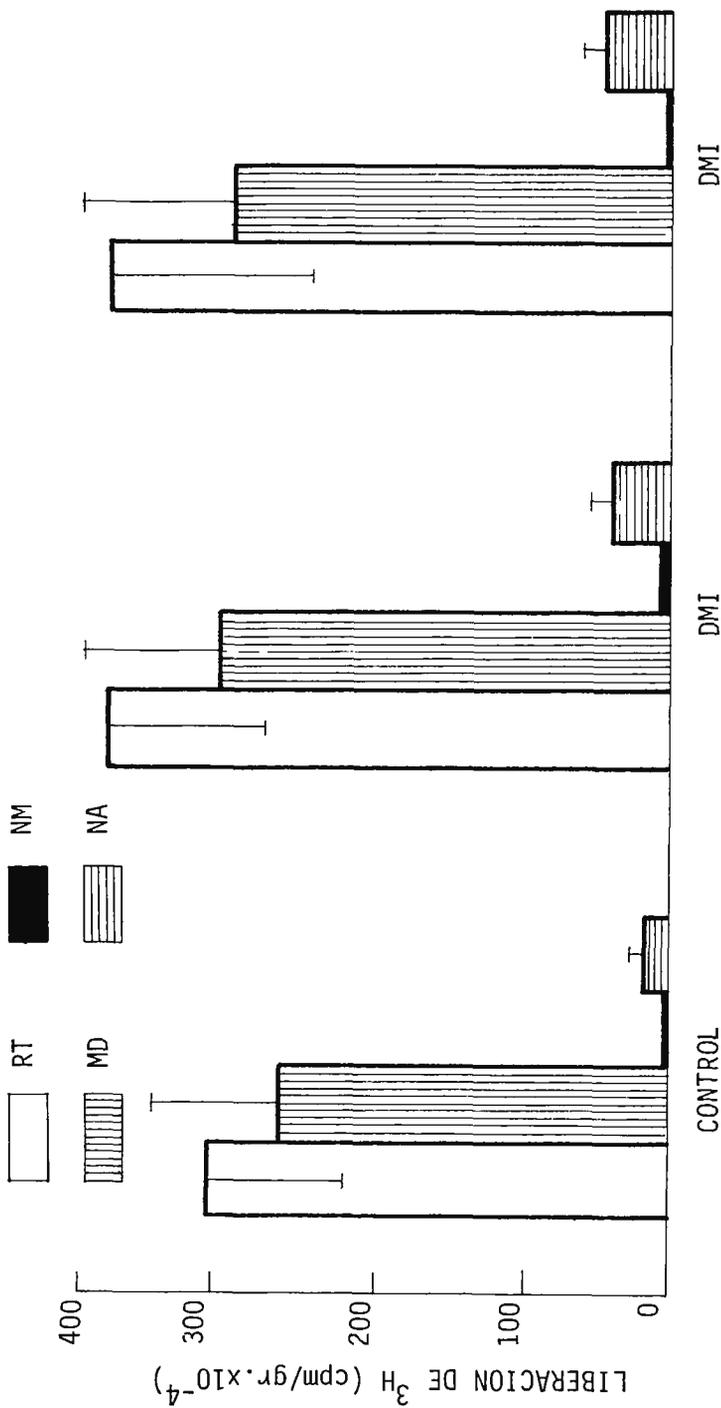


Figura 10.- Liberación de radiactividad total (RT), metabolitos deaminados (MD), nor metanefrina (NM) y noradrenalina (NA) inducida por X537A ($3 \times 10^{-5} M$) después del tratamiento con desmetilimipramina (DMI, $10^{-6} M$). La DMI se adicionó 20 min antes de iniciarse la colección de muestras y estuvo presente durante el resto del experimento. Ver figura 7 para más detalles. Líneas verticales = error de la media de 3 experimentos.

el ionóforo tiene lugar intraneuronalmente, pues la NA no necesita ser liberada al exterior y ulteriormente reincorporada para su posterior deaminación oxidativa en la terminación nerviosa (ver Discusión).

d) Patrón de liberación inducido por tiramina. Con el fin de comparar la liberación de NA y metabolitos evocada por X537A con la de tiramina, se diseñaron 2 experimentos en los que el estímulo secretor utilizado fué esta amina de acción indirecta.

La introducción de tiramina ($10^{-4}M$) en el sistema de superfusión produjo un incremento marcado de la liberación de tritio; dicho incremento se debió prácticamente en su totalidad a la liberación de 3H -NA pues, de hecho, la liberación de 3H -MD disminuyó (figura 11).

e) Liberación de 3H -NA "surplus" inducida por X537A en aurículas reserpinizadas.

La liberación de radiactividad en tejidos normales inducida por X537A tiene lugar probablemente a partir del "pool" granular de NA. Puesto que la NA liberada por estímulos fisiológicos procede directamente de las vesículas sinápticas (exocitosis) nos planteamos la posibilidad de que el ionóforo pudiera liberar 3H -NA acumulada extragranularmente en el citoplasma de la terminación nerviosa.

Para ello, se llevaron a cabo experimentos en cobayos que habían sido tratados 18-24 horas antes con reserpina

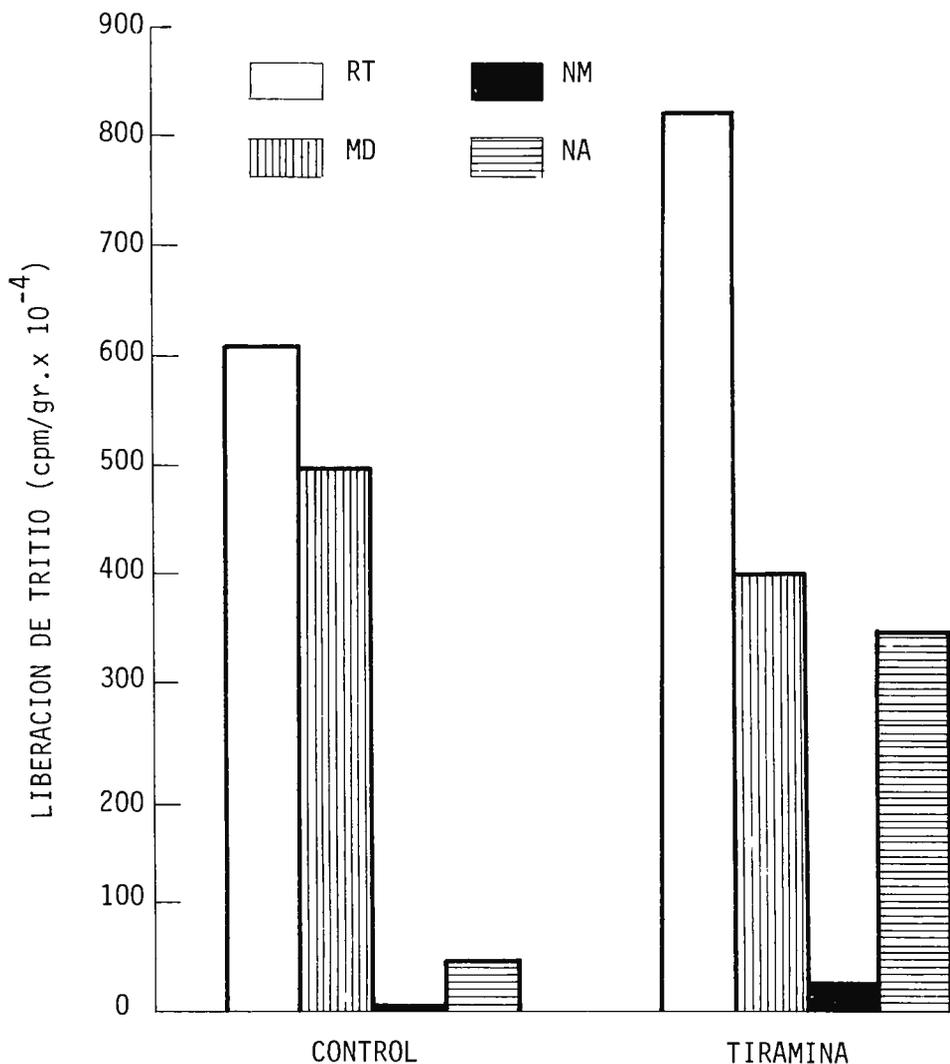


Figura 11.- Liberación de radiactividad total (RT), metabolitos deaminados (MD), normetanefrina (NM) y noradrenalina (NA) inducida por tiramina (10^{-4} M). El grupo de barras de la izquierda representa la liberación espontánea (min 0-15) y el de la derecha la inducida por tiramina (10^{-4} M). Las barras representan el valor medio de 2 experimentos.

(5 mg/kg) con el fin de "depletar" los depósitos granulares de NA. Las vesículas se incubaron con ^3H -NA en presencia de pargilina ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) con el fin de evitar la degradación de ^3H -NA y facilitar su retención citoplasmática (Furchgott y Sánchez-García, 1968).

En la figura 12 puede observarse que la liberación espontánea de tritio cae más lentamente que en el caso de preparaciones normales (ver figura 2) probablemente debido a que la presencia de pargilina durante todo el experimento previno la degradación de NA por MAO.

La administración de X537A originó un incremento rápido de la liberación de radiactividad que fué similar cualitativamente al observado en aurículas normales. Aún cuando el pico máximo de liberación fué más bajo, es interesante hacer notar que también la liberación control (espontánea) es menor por lo que la liberación neta es similar en preparaciones reserpinizadas y normales. En un experimento se suprimió el Ca del medio de superfusión pero el tipo de liberación fué similar.

La curva superior de la figura muestra la liberación de tritio inducida por tiramina a concentraciones equimolares a las de X537A ($30 \mu\text{M}$). Puede constatar que el curso temporal de la liberación es totalmente distinto al del ionóforo. La fase ascendente de la curva es mucho más pronunciada, el pico de liberación mayor y la curva cae muy rápidamente, probablemente debido a la deplección rápida de

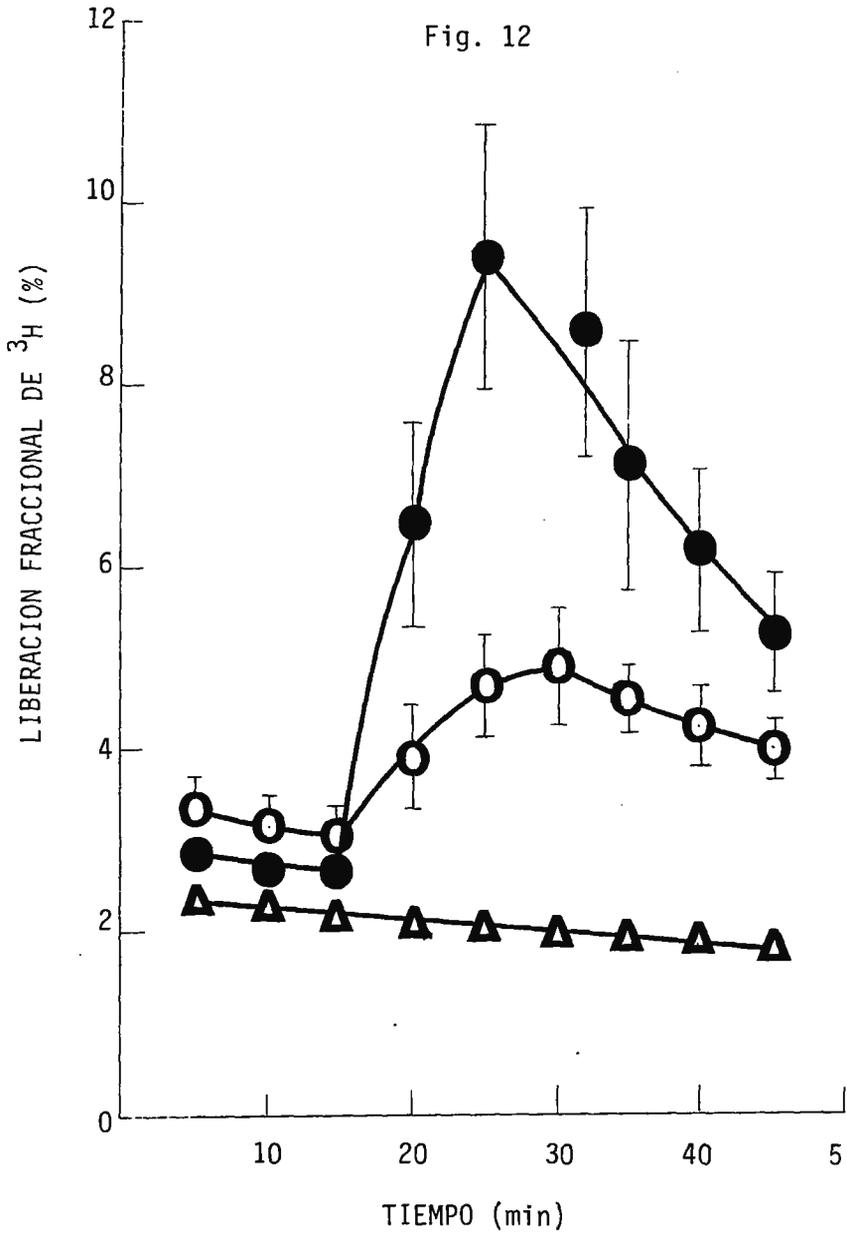


Figura 12.- Liberación de tritio (^3H) inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$; \circ) y tiramina ($3 \times 10^{-5}\text{M}$; \bullet) en la aurícula aislada y reserpinizada de cobayo. La reserpina (5 mg/kg de peso) se inyectó 18-24 hr antes por vía i.p. El diseño experimental fué, por lo demás, idéntico al descrito en la figura 2 excepto que pargilina ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) estuvo presente durante todo el experimento. La curva inferior (Δ) representa la liberación espontánea de ^3H . Inicialmente se colectaron 3 muestras de 5 min antes de adicionar tiramina o X537A. Las líneas verticales representan el error estandar de la media de 6 (X537A) y 3 (tiramina) experimentos.

la ^3H -NA "surplus".

Estos dos tipos de liberación tan distintos sugieren mecanismos diferentes de liberación para ambos fármacos. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se diseñó un grupo de experimentos en aurículas reserpinizadas cuyos resultados aparecen en la figura 13. La línea inferior muestra la liberación espontánea de radiactividad. Obsérvese cómo la introducción de X537A indujo una liberación de radiactividad que fué máxima 15 min después de su administración (ver figura 15). Cuando se alcanzó el "plateau" de liberación, y siempre en presencia del ionóforo, se administró tiramina ($30\ \mu\text{M}$), observándose un dramático incremento en la liberación que se superpone a la liberación inducida por X537A. Esto indica un mecanismo y/o lugar de acción diferente para ambos fármacos ya que, como dijimos más arriba, la dosis $30\ \mu\text{M}$ de X537A produce prácticamente el efecto máximo. Si el mecanismo de liberación de ambas sustancias fuera similar, no cabría esperar un incremento ulterior de la liberación después de la adición de tiramina.

f) Influencia de los iones Na sobre la liberación de radiactividad inducida por X537A.

El X537A tiene la capacidad de formar complejos no sólo con iones divalentes sino también con iones monovalentes del tipo del Na, a los que transporta a través de membranas lipoideas (Pressman, 1973). Aún cuando parece ser

Fig. 13

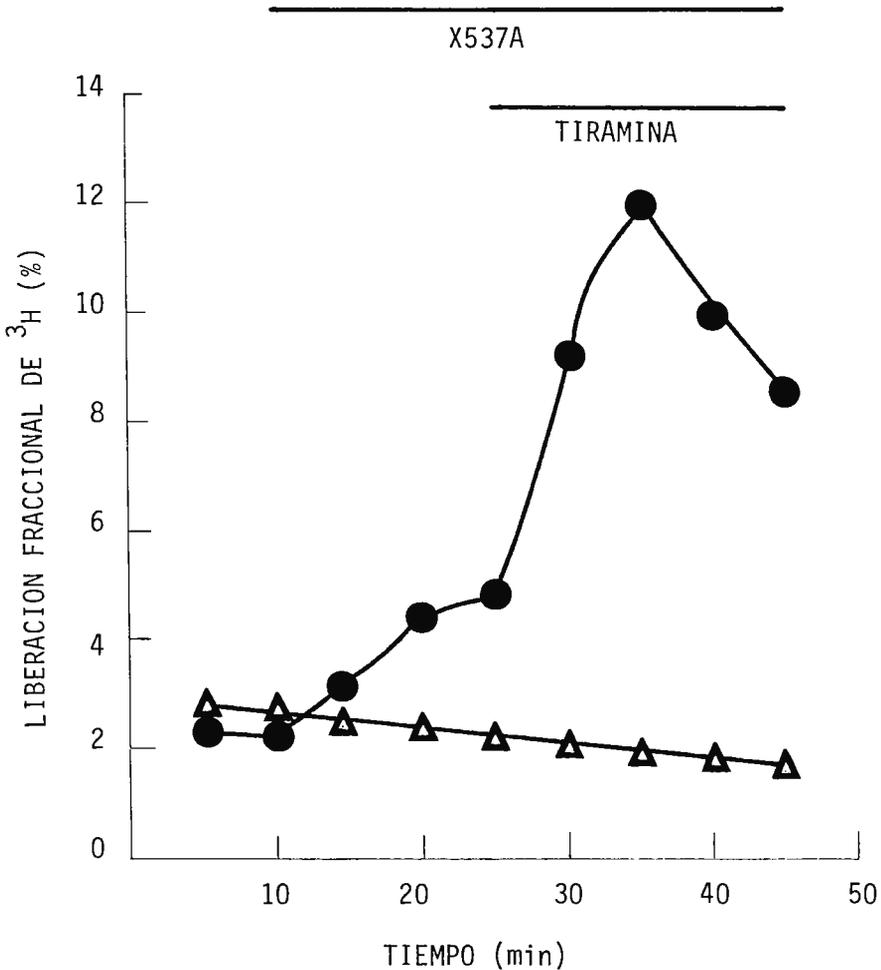


Figura 13.- Liberación de tritio (^3H) inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) y por tiramina ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) en aurícula reserpinizada. La línea inferior representa la liberación espontánea. En la línea superior aparece la liberación inducida por X537A; cuando se alcanzó el techo de la curva, se adicionó, todavía en presencia de X537A, tiramina. La curva representa un solo experimento demostrativo.

que el Ca es el único ión importante envuelto en la liberación fisiológica de NA (Rubin, 1970; Kirpekar, 1975), el Na puede, sin embargo, tener un papel en la liberación evocada por X537A. En efecto, el X537A puede complejar y transportar el Na al interior celular causando una despolarización de la terminación nerviosa e, indirectamente, la liberación del neurotransmisor.

La figura 14 muestra un grupo de experimentos en los que se ha estudiado la liberación de radiactividad en Krebs normal (curva de lavado), Krebs sin Na (Na sustituido isosmóticamente con sucrosa), Krebs sin Na al que se adició X537A 15 min después de la deprivación de Na y Krebs sin Na más X537A adicionados simultáneamente.

La simple deprivación de Na causa una liberación pronunciada de radiactividad que tiene un pico inicial durante los 5 min primeros de superfusión para ir luego subiendo progresivamente en una segunda fase. Este efecto liberador de la ausencia de Na coincide con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (García y Kirpekar, 1973a). En el tercer grupo de barras se representa el efecto del iónóforo (30 μ M) cuando se introduce en el sistema de superfusión 15 min después de la deprivación de Na, y se observa que el ionóforo no modifica la liberación desencadenada por la deprivación de Na.

Lo curioso de este grupo de experimentos fué el he

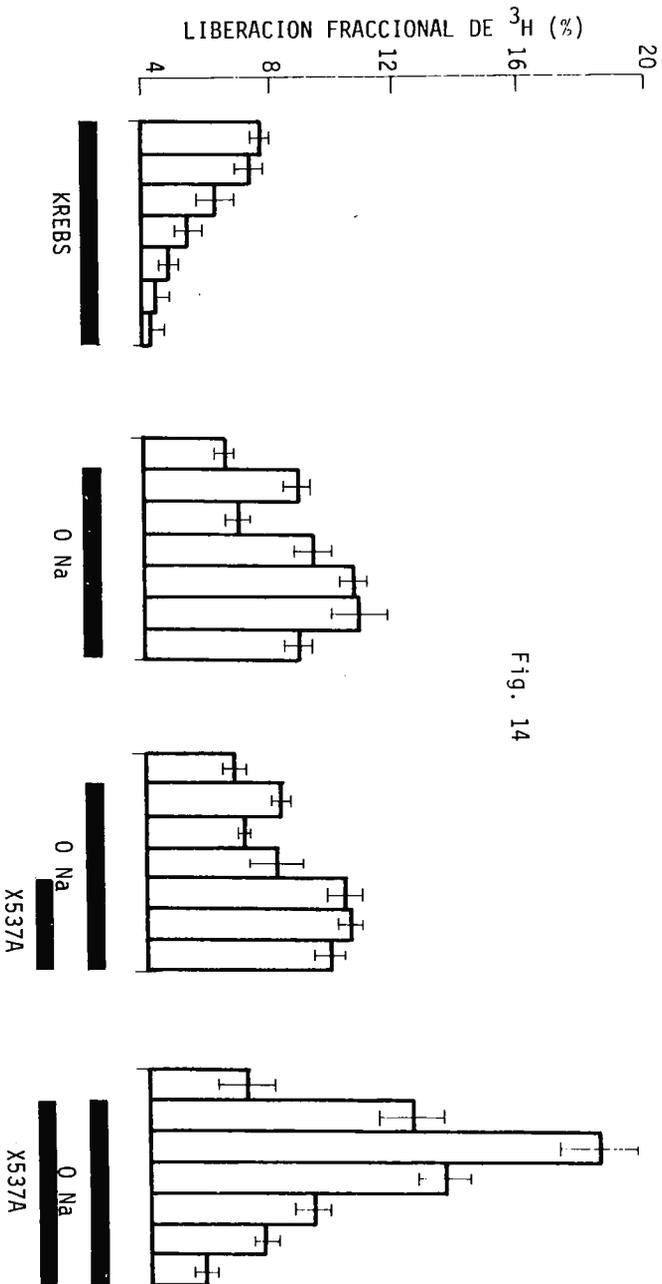


Fig. 14

Figura 14.- Liberación de tritio (^3H) inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) en un medio carente de Na (Na sustituido isosmóticamente por sucrosa). De izquierda a derecha, el primer grupo de barras representa la liberación espontánea, el segundo la liberación en ausencia de Na, el tercero la liberación inducida por X537A 15 min después de haber eliminado el Na y el cuarto, la liberación inducida por el ionóforo cuando se adicionó al mismo tiempo que se quitó el Na del medio. Las barras horizontales reflejan los distintos cambios iónicos y el momento de la adición de X537A. Las líneas verticales reflejan el error estandard de la media de 3 a 6 experimentos.

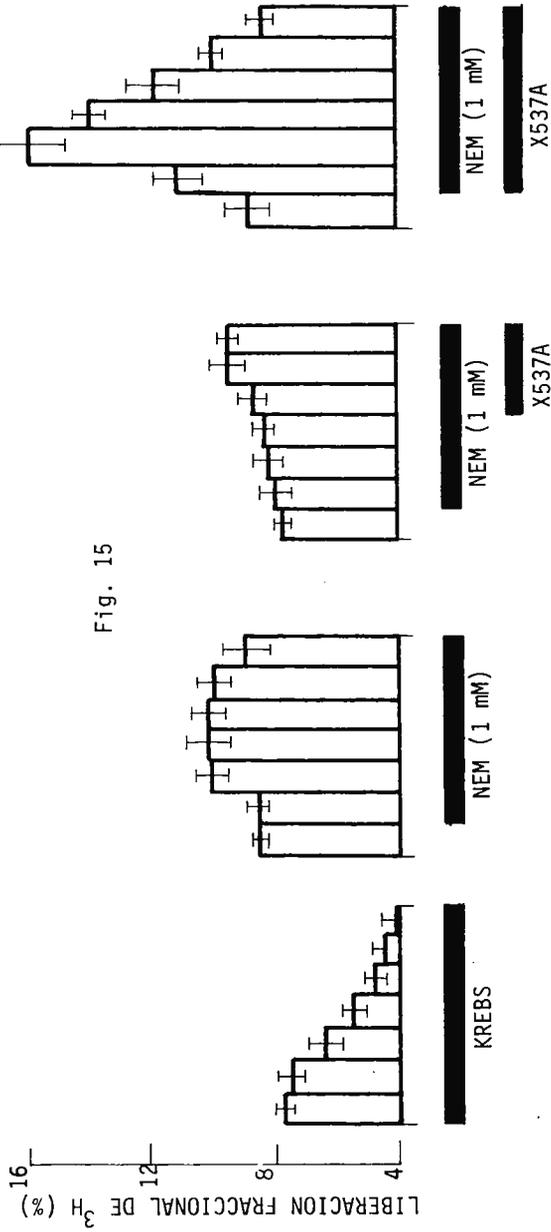


Fig. 15

Figura 15.- Liberación de tritio (^3H) inducida por X537A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) en presencia de N-etilmaleimida (NEM, 10^{-3}M). El diseño experimental es idéntico al de la figura 14, excepto que en vez de eliminar el Na del medio de superfusión, se adicionó al Krebs normal NEM. Líneas verticales = error estandar de la media de 3-6 experimentos.

cho de que al introducir el X537A simultáneamente con la solución sin Na hubo una liberación muy rápida e intensa, borrándose el primer pico de liberación que se observó con la simple privación de Na. La liberación alcanza su pico máximo en el minuto 10, para caer después bruscamente hasta valores controles. En resumen, parece ser que la superfusión previa con un medio carente de Na da lugar a ciertos cambios en la neurona adrenérgica que impiden el efecto liberador ulterior del X537A. Sin embargo, la exposición simultánea de la aurícula a un medio sin Na más el ionóforo ocasiona una marcada potenciación de la liberación de radiactividad.

García y Kirpekar (1973 a,b) han demostrado que algunas modificaciones iónicas y ciertos fármacos que producen una inhibición de la ATPasa Na-K-dependiente de la membrana neuronal, causan liberación de NA. Uno de estos procedimientos fué la privación de Na. Por ello se decidió llevar a cabo otro grupo de experimentos utilizando un inhibidor de la ATPasa, la N-etilmaleimida (NEM), con el fin de compararlos con los resultados obtenidos con la privación de Na y que se han expuesto previamente.

La figura 15 resume dichos experimentos. En ellos puede apreciarse que NEM (10^{-3} M) produce una liberación moderada de radiactividad (segundo grupo de columnas) que resulta apreciable si se compara con la caída de la liberación espontánea (primer grupo de columnas). La presencia de NEM en el líquido de superfusión 15 min antes de la introducción

de X537A produce un bloqueo casi total de la liberación que este fármaco induce normalmente en preparaciones controles. Este dato es interesante si se tiene en cuenta que por primera vez hemos obtenido una sustancia (NEM) capaz de interferir con el efecto liberador de X537A.

Sin embargo, véase en el último grupo de barras de la figura 15 que el X537A todavía conserva en su totalidad el efecto liberador de radiactividad cuando ambos, ionóforo y NEM, se introducen simultáneamente; es más, aparentemente existe una potenciación de los efectos de X537A, siendo el curso temporal de la liberación más rápido y la caída también más rápida que en condiciones normales (comparar con figura 2).

g) Liberación de radiactividad inducida por X537A en preparaciones sometidas a despolarización con K.

Se sabe que el incremento de la concentración de iones K en el medio extracelular produce una despolarización de las terminaciones nerviosas simpáticas, con la entrada de iones Ca en las mismas y liberación ulterior de NA (Kirpekar y Wakade, 1968a). En la actualidad se considera que este estímulo despolarizante es de tipo "fisiológico".

Con el fin de estudiar la capacidad de X537A para liberar radiactividad en preparaciones despolarizadas se diseñó un grupo de experimentos cuyo resultado se resume en la

figura 16. En una mitad de la aurícula se estudió la liberación de radiactividad provocada por K (140 mM). El Ca se eliminó del medio con el fin de producir despolarización y evitar la liberación de radiactividad inducida por K, pues se sabe que la liberación de NA inducida por concentraciones altas de este ión es dependiente de Ca (Kirpekar y Wakade, 1968b). A pesar de suprimir el Ca puede observarse que el K produce cierta liberación de radiactividad que, en todo caso, es mucho menor que la producida en presencia de Ca (datos sin publicar). En el grupo de barras de la derecha puede verse que la introducción de K junto con el ionóforo produce una marcada liberación de radiactividad que se aproxima a la suma de la inducida por K y la inducida por X537A en preparaciones controles. Estos datos inducen a pensar que el mecanismo de liberación de NA inducido por X537A no está relacionado con la despolarización de la neurona adrenérgica, ya que esta concentración de K tan elevada debe producir una despolarización prácticamente máxima.

V. DISCUSION.

Los resultados obtenidos demuestran que el ionóforo X537A tiene la capacidad de liberar ^3H -NA a partir de las terminaciones nerviosas simpáticas de la aurícula aislada y superfundida de cobayo. Así mismo, se ha demostrado que dicha liberación tiene una serie de características peculiares que la diferencia de la liberación inducida por estímulos fisio-

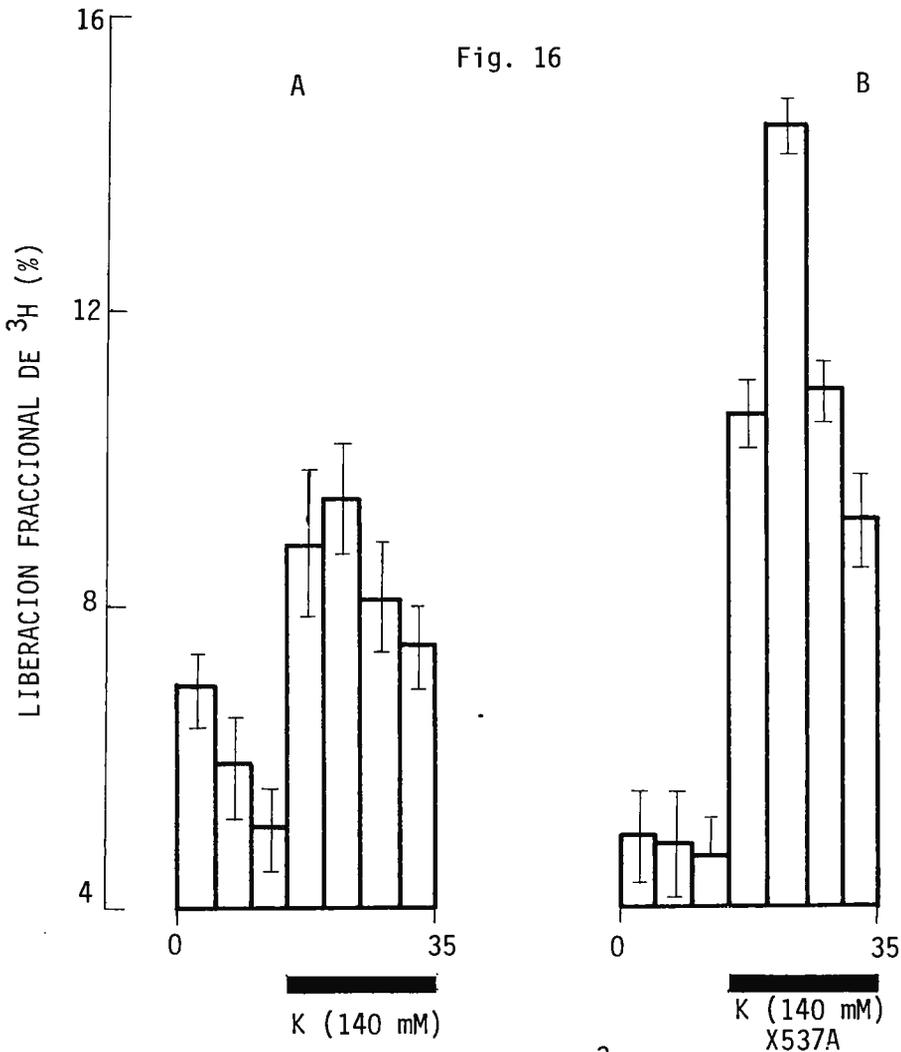


Figura 16.- Liberación de tritio (^3H) inducida por X537A en presencia de una concentración elevada de K. Con el fin de mantener la isotonicidad del medio rico en K, se redujo isosmóticamente la concentración de Na. El medio, además, no contenía Ca. Las barras horizontales muestran el momento de cambiar de un medio sig^{Ca} a un medio sin Ca rico en K, con o sin X537A ($3 \times 10^{-5} \text{M}$). Líneas verticales = error estandar de la media de 4 experimentos.

lógicos de los nervios simpáticos. Entre estas destaca una: la no dependencia de iones Ca en el medio extracelular para que el efecto liberador del X537A aparezca. Si se tiene en cuenta que la presencia de iones Ca en el medio extracelular es absolutamente necesaria para que se produzca la liberación de NA inducida por el estímulo eléctrico de los nervios simpáticos o bien por despolarización con K (Kirpekar y Misu, 1967; Kirpekar y Wakade, 1968 a,b), y además se considera que el X537A tiene la propiedad de transportar iones Ca a través de membranas biológicas (Pressman, 1973), se comprende porqué dicho fármaco se ha utilizado ampliamente en el estudio de los procesos envueltos en el mecanismo de acoplamiento excitación-secreción en diversos sistemas secretores.

Aún cuando está demostrada la importancia del Ca para la liberación de neurotransmisores y hormonas, se sabe muy poco, sin embargo, acerca de los mecanismos de entrada específica de este ión en la célula durante el proceso de liberación y se ignoran por completo los pasos intermedios envueltos en dicho proceso secretor. Experimentos recientes llevados a cabo en el axón gigante y ganglio del calamar demuestran que la liberación del neurotransmisor inducida por despolarización corre paralela a la fase tardía de la entrada de calcio a la célula y que esta fase es resistente a tetrodotoxina (Katz y Miledi, 1969; Baker y col., 1973).

Parece ser que la despolarización es el estímulo

que determina la entrada de Ca, el cual a su vez iniciaría la liberación del neurotransmisor. Hasta no hace mucho se creía que los canales de la membrana que utiliza el Ca para penetrar en la célula durante la despolarización serían accesibles al ión sólo desde fuera (Miledi y Slater, 1966; García y Kirpekar, 1973b), y que el Ca intracelular no estaría envuelto en el proceso secretor. Sin embargo, Miledi (1973) ha demostrado que la inyección intracelular de Ca en la sinapsis gigante del calamar sería un estímulo suficiente para iniciar el proceso secretor. Como se ha mencionado en la revisión inicial de este problema (ver Introducción) en la actualidad se piensa que la concentración de Ca intracelular libre, ionizado y no ligado a estructura subcelular alguna, sería el factor que condicionaría la iniciación del proceso secretor (Baker, 1975). De esta forma, cualquier procedimiento que incremente la concentración de Ca libre intracelular dará lugar a liberación del neurotransmisor. Que esto es así lo confirma el hecho de que ciertos procedimientos como la inactivación de la captación de Ca por las mitocondrias (envenenamiento de las neuronas con cianuro y "deplección" del ATP), estímulos despolarizantes que facilitan la entrada de Ca en la célula, la inyección directa de Ca intracelular, la deprivación de Na o la inhibición de la ATPasa de la membrana neuronal, incrementa la concentración de Ca libre citoplasmático y producen liberación del neurotransmisor.

Los fármacos ionóforos han venido a aclarar algunos de estos problemas y, en parte, a oscurecer aún más el complejo papel del Ca en los procesos secretores. Como dos de estos ionóforos, el A23187 (sintetizado por Eli Lilly) y el X537A forman complejos con el Ca, se han utilizado recientemente con el fin de demostrar una vez más que en la cadena de hechos que tienen lugar desde que un estímulo invade la terminación nerviosa hasta que se produce la liberación del neurotransmisor, el paso crítico es el transporte de iones Ca desde el exterior al interior celular o bien la movilización intracelular de iones Ca desde lugares de depósito (membrana celular, mitocondrias, microsomas). Ambos procesos producirían, en última instancia, un incremento citoplasmático de Ca libre e iniciarían el proceso secretor.

En el caso del A23187, un ionóforo selectivo para iones divalentes, parecen estar claros sus efectos secretores. Pudiera decirse, y existen numerosos trabajos que lo confirman, que el A23187 mimetiza el estímulo despolarizante. Por ejemplo García y col. (1975) han observado en la glándula suprarrenal perfundida de gato que existe una similitud sorprendente entre la secreción de catecolaminas inducida por estimulación de los nervios espláncnicos o por la perfusión de acetilcolina y la inducida por A23187. Así, la liberación por los tres tipos de estímulos es dependiente del Ca extracelular, es proporcional a la concentración de Ca en el líquido de perfusión, se suprime por Mg y se vuelve a

restaurar incrementando la concentración de Ca. Los efectos del A23187 parecen ser muy específicos puesto que no tenían lugar en ausencia de Ca aún a concentraciones muy elevadas del ionóforo. Estos resultados con A23187 fueron interpretados en base a su capacidad para transportar iones Ca (Reed y Lardy, 1972). El ionóforo facilitaría la entrada de iones Ca en la célula cromafín a través de su membrana incrementando la concentración de Ca libre intracelularmente e induciendo la liberación de catecolaminas. En este sentido, este ionóforo ha permitido apoyar con mayor intensidad la idea de que, independientemente del estímulo que la provoque, lo que realmente condiciona la liberación de un neurotransmisor u hormona es la elevación del Ca intracelular libre. Otros autores han demostrado también que la liberación de catecolaminas en la médula suprarrenal (Cochrane y col., 1975) y de NA en sinaptosomas (Colburn y col., 1975) y en conducto deferente de cobayo (Thoa y col., 1974) es dependiente de Ca.

Como en el caso del A23187, el ionóforo X537A ha sido ampliamente utilizado en el estudio de procesos secretores y de contracción muscular en los que el Ca juega un papel central. Pero el X537A es un ionóforo capaz de formar complejos no sólo con iones divalentes, sino también con iones monovalentes del tipo del Na y K (Pressman, 1973). Es probablemente dicha propiedad la que ha ocasionado una gran variabilidad en los datos que se han publicado sobre las acciones secretoras de este ionóforo en relación a los requerimientos

de Ca extracelular. Así, por ejemplo, mientras que Nakazato y Douglas (1974) han demostrado que la liberación de vasopresina en la neurohipófisis inducida por X537A es dependiente de Ca, Nordmann y Currel (1975) han demostrado en el mismo sistema experimental su total independencia del Ca extracelular. Por otra parte, Cochrane y Douglas (1974) han demostrado también que el efecto secretor de histamina en células mastoides inducido por X537A es dependiente de Ca mientras que Foreman y col. (1973) demostraron su independencia de Ca en el mismo sistema. No sabemos a qué atribuir dichas diferencias pero cabría pensar que la técnica experimental de Douglas y col. debe diferir notablemente de la de otros investigadores; que esto es así lo demuestra el que una vez más estos autores han observado que la liberación de catecolaminas en la suprarrenal perfundida de gato evocada por X537A es dependiente de Ca, ya que la privación de Ca junto con la adición de 1 ó 5 mM de EGTA suprimió, prácticamente en su totalidad, el efecto liberador del ionóforo (Cochrane y col. 1975). Por el contrario, Colburn y col. (1975), Thoa y col. (1974) y García y col. (1975) han observado que la liberación inducida por X537A no es dependiente de Ca.

Nuestros experimentos demuestran claramente que la supresión del Ca del medio extracelular, con o sin EGTA, no modificó la liberación inducida por el ionóforo. Estos experimentos han sido realizados en un sistema de superfusión a un velocidad que cambia 5 veces por min el líquido que baña

el tejido; por lo tanto, los iones Ca que puedan proceder del tejido se lavan rápidamente y cualquier pequeña cantidad de Ca contaminante es quelada por la presencia de EGTA. Otros autores han utilizado sistemas de incubación durante largos periodos de tiempo y ello puede explicar algunas de las discrepancias al respecto. Nuestros resultados permiten sugerir que "a priori" no se puede utilizar este ionóforo con el fin de estudiar el papel del Ca en los fenómenos de acoplamiento excitación-secreción y que se debe ser cauto a la hora de interpretar los resultados obtenidos con dicho fármaco.

Que el X537A, al contrario que el A23187, no mimita los efectos de estímulos despolarizantes fisiológicos lo prueba el hecho de que sus acciones secretoras no se modifiquen en ausencia o en un medio rico en Ca y que ciertos fármacos que interfieren de alguna forma con los movimientos de Ca no afecten la liberación evocada por el ionóforo pero si la producida por estímulos despolarizantes. Así por ejemplo, se sabe que tetracaina, un anestésico local, inhibe la liberación de catecolaminas en la médula suprarrenal inducida por despolarización con K o acetilcolina; el Ca antagoniza dicho efecto inhibitor y bloquea la incorporación de Ca⁴⁵ en la glándula (Rubin y col., 1967). Por otra parte, el alcaloide ryanodine interfiere con la fijación o secuestro del Ca en el músculo (Jenden y Fairhurst, 1969), el verapamil es un antagonista competitivo del Ca en el tejido muscular liso (Haeusler, 1972) y el rutenio rojo reduce los poten-

ciales sinápticos en la placa motora por interferir con el transporte de Ca a través de las membranas mitocondriales (Rahaminoff y Alnaes, 1973). En nuestros experimentos, ninguno de estos 4 fármacos modificó aparentemente los efectos secretores de X537A, lo que prueba una vez más que dichos efectos no están asociados a la capacidad del ionóforo para formar complejos con iones Ca y transportarlos a través de membranas biológicas. Sin embargo, no podemos descartar que la movilización de algún depósito intracelular pudiera mediar los efectos del ionóforo, aunque los experimentos llevados a cabo con los bloqueantes del Ca no apoyan esta idea.

Si el ionóforo X537A no parece mimetizar los efectos de estímulos fisiológicos, sí pudiera reproducir la liberación producida por fármacos del tipo de tiramina o reserpina. Sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos en los que se analizó la radiactividad liberada en forma de NA intacta o de sus metabolitos deaminados o metilados no parecen sugerir acciones de tipo tiraminico o reserpínico. Mientras que tiramina produjo un incremento de la liberación de radiactividad que se hizo a expensas de NA intacta, y reserpina libera prácticamente solo ^3H -MD (Brimijoin y Trendelenburg, 1971), el X537A da lugar a un patrón de liberación de MD y un gran incremento de la liberación de NA. El hecho de que la liberación de NA aumente después de haber inhibido MAO y de que el patrón de metabolitos liberados por X537A no se modifique tras el bloqueo del sistema

de reincorporación de NA por DMI habla en favor de que el lugar de acción de X537A es intraneuronal, probablemente a nivel de las vesículas que almacenan el neurotransmisor (ver figura 17). Los resultados indican que la vía B del esquema sería la utilizada por X537A.

Estas ideas podrían encajar mejor teniendo en cuenta que el X537A puede formar complejos directamente con NA y actuar como un transportador para dicha amina (Schadt y Haeusler, 1974). Si ello fuera cierto, el X537A penetraría fácilmente la varicosidad simpática dada su liposolubilidad, fijaría la NA vesicular y/o citoplasmática y la transportaría al exterior celular. Puesto que el complejo X537A-NA es reversible, a su paso por el citoplasma se disociaría parcialmente separándose la NA que sería metabolizada intrneuronalmente por MAO, y finalmente liberada como metabolitos deaminados al lado de la NA, intacta, sin metabolizar (figura 17).

Los experimentos llevados a cabo en preparaciones reserpinizadas apoyan la idea de que X537A actúa como un transportador para NA. En efecto, se sabe que el estímulo eléctrico es incapaz de liberar NA "surplus", no almacenada en vesículas, pero el K produce una marcada liberación de NA citoplasmática que no es dependiente del Ca extracelular (Wakade y Kirpekar, 1974). En este sentido, estos autores hablan de un doble componente en la liberación de NA inducida por despolarización de la neurona adrenérgica con

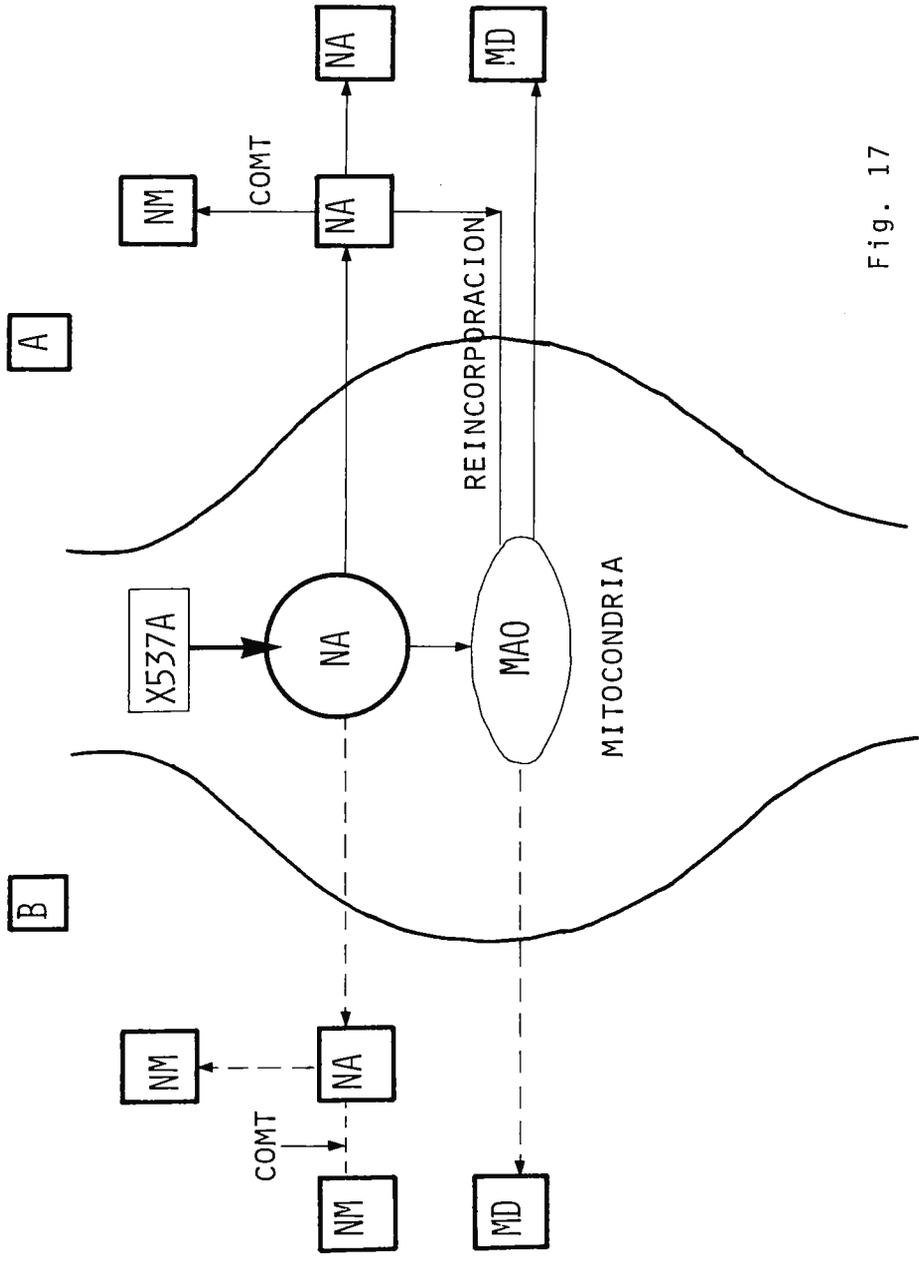


Fig. 17

Figura 17.- Ecuema que representa una terminación nerviosa simpática con las posibles vías metabólicas que sigue la noradrenalina (NA) liberada por X537A. Vía A (línea continua). La NA sería liberada inicialmente a la hendidura sináptica, de ésta, una parte sería metabolizada por catecol-O-metiltransferasa (COMT) a normetanefrina (NM), otra parte se recogería como tal en el efluyente y el resto se reincorporaría a la terminación nerviosa para ser secundariamente metabolizada por monoamio oxidasa (MAO) a metabolitos deaminados (MD) Vía B (línea de puntos). En este caso el efecto del ionóforo haría que la NA liberada fuese inicialmente deaminada por MAO en el interior de la terminación nerviosa y sólo una parte alcanzaría la hendidura sináptica como tal NA donde una pequeña cantidad sería metabolizada por COMT a NM.

K: uno de tipo fisiológico dependiente de Ca y que tendría lugar por exocitosis; y otro, no fisiológico y, por tanto no dependiente de Ca, que liberaría NA extragranular probablemente debido a que la despolarización sostenida con K permitiría la difusión pasiva de NA hasta el espacio extraneuronal en virtud de un gradiente de concentración favorable. En este sentido, la liberación de NA producida por el X537A podría semejarse a la liberación de NA extragranular inducida por K. Esta idea tiene cierta lógica si se piensa que uno de los iones por los que tiene una afinidad más elevada el X537A es precisamente el K (Schadt y Haeusler, 1974). Sin embargo, resulta difícil correlacionar la capacidad del ionóforo para complejar iones K y la facultad que ambos, ionóforo y K, tienen para liberar NA extragranular por un mecanismo independiente del Ca.

Kita y Van der Kloot (1974) han demostrado que el X537A produce un incremento notable pero transitorio de la frecuencia de los potenciales miniatura y, por tanto, de la liberación de acetilcolina que es totalmente dependiente de Ca. Estos resultados están en clara contradicción con los nuestros. Sin embargo, creemos que se necesita una gran dosis de imaginación para aceptar que siendo los iones Ca un requerimiento universal para la secreción de neurotransmisores y hormonas (Rubin, 1970; Kirpekar, 1975) vaya un fármaco que modifique los movimientos de dichos iones a comportarse de manera diferente en distintos sistemas experimentales. Quizás puede arrojar alguna luz sobre el problema el

reciente trabajo de Statham y Duncan (1975). Estos autores sugieren que los efectos del X537A sobre la placa motora pueden explicarse porque dicho fármaco incrementa la permeabilidad de la membrana neuronal para los iones Na. Como consecuencia de ello, el potencial de reposo disminuiría causando a su vez, y de manera indirecta, un incremento de la permeabilidad para los iones Ca que en última instancia iniciarán el proceso secretor.

En nuestros experimentos hemos observado que cuando el ionóforo se aplica 15 min después de someter el tejido a un medio sin Na sus efectos secretores se abolen. Esto corroboraría la idea de Statham y Duncan de que los efectos secretores de X537A estarían mediados por una despolarización de las terminaciones nerviosas secundaria a un incremento de la permeabilidad de la membrana para iones Na. Sin embargo, sometiendo la preparación simultáneamente a la privación de Na y al ionóforo observamos una gran potenciación de la liberación. Statham y Duncan no mencionan en su trabajo el tiempo que tuvieron su preparación en un medio pobre en Na antes de añadir el ionóforo; ésta es probablemente la razón por la que no observaron dicha potenciación.

Esta potenciación es un dato interesante y podría interpretarse en base a los recientes estudios de Dubey y col. (1975). Estos autores han demostrado en el corazón de conejo perfundido que la liberación de NA inducida por privación de Na es dependiente de Ca sólo en los primeros 5



min, pero no a partir del min 5 de perfusión. García y Kirpekar (1973a) demostraron que la liberación de NA inducida por un medio carente de Na era independiente del Ca extracelular con periodos de incubación prolongados (30-120 min). Sin entrar en detalles sobre el posible mecanismo envuelto en esta liberación inicial dependiente de Ca, podemos esperar que cuando el X537A se introduce inicialmente junto con un medio sin Ca, el efecto liberador inicial de la privación de Na y el del X537A se sumen. Pero en realidad esto no ocurre así, y, de hecho, existe una verdadera potenciación, siendo el curso temporal de la respuesta totalmente distinto al de ambos estímulos secretores por separado (Krebs sin Na y X537A). La explicación que damos a este fenómeno puede basarse en el hecho de que la disminución de los iones Na del medio extracelular incrementa la incorporación de Ca en la célula (Luttgau y Niedengerke, 1958) y, dado que X537A puede transportar dicho Ca, sería plausible que en estas condiciones favorables, en las que la membrana neuronal se ha hecho más permeable a los iones Ca, pudieran ambos factores producir un incremento drástico de la concentración de Ca libre e ionizado en el citoplasma neuronal que llevaría de la mano a una liberación muy pronunciada de NA. En resumen, no cabe duda que esos experimentos clara y terminantemente contradicen la idea de un efecto despolarizante mediado a través del transporte de iones Na por X537A.

VI. BIBLIOGRAFIA

- BAKER, P.F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. En "Calcium movement in excitable cells". Ed. P.F. Baker and H. Reuter, pp. 9-53, 1975.
- BAKER, P.F.; MEVES, H. and RIDGWAY, E.B.: Calcium entry in response to maintained depolarization of squid axons. J. Physiol. 231: 225-248, 1973.
- BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1: 279-285, 1960.
- BRIMIJOIN, S. and TRENDELENBURG, U.: Reserpine induced release of norepinephrine from isolated spontaneously beating guinea-pig atria. J. Pharmac. Exp. Ther. 176: 149-159, 1971.
- COCHRANE, D.E. and DOUGLAS, W.W.: Calcium-induced extrusion of secretory granules (exocytosis) in mast cells exposed to 48/80 or ionophores A-23187 and X537A. Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 408-412, 1974.

- COCHRANE, D.E.; DOUGLAS, W.W.; MOURI, T. and NAKAZATO, Y.: Calcium and stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: contrasting stimulating effects of the ionophores X537A and A23187 on catecholamine output. *J. Physiol.* 252: 363-378, 1975.
- COLBURN, R.W.; THOA, N.B. and KOPIN, I.J.: Influence of ionophores which bind calcium on the release of norepinephrine from synaptosomes. *Life Sci.* 17: 1395-1399, 1975.
- CUBEDDU, L.; LANGER, S.Z. and WEINER, N.: The relationships between alpha receptor block, inhibition of norepinephrine uptake and the release and metabolism of ^3H -norepinephrine. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 188: 368-385, 1973.
- DUBEY, M.P.; MUSCHOLL, E. and PFEIFFER, A.: Muscarinic inhibition of potassium-induced noradrenaline release and dependence on the calcium concentration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 291: 1-15, 1975.
- FOREMAN, J.C.; MONGAR, J.L. and GOMPERS, B.D.: Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. *Nature.* 245: 249-251, 1973.
- FURCHGOTT, R.F. and SANCHEZ-GARCIA, P.: Effects of inhibition of monoamine oxidase on the actions and interactions of norepinephrine, tyramine and other drugs on guinea-pig left atrium. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 163: 98-122, 1968.

- GARCIA, A.G.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; SANCHEZ-GARCIA, P. and PASCUAL, R.: On the mechanism of release of ^3H -noradrenaline (^3H -NA) from the guinea-pig atrium by the calcium ionophore X537A. 6th Int. Cong. Pharmac. 1156 abs. Helsinki, 1975.
- GARCIA, A.G. and KIRPEKAR, S.M.: Release of noradrenaline from the cat spleen by sodium deprivation. Br. J. Pharmac. 47: 729-747, 1973a.
- GARCIA, A.G. and KIRPEKAR, S.M.: Release of noradrenaline from the cat spleen by pretreatment with calcium, strontium and barium, J. Physiol. 235: 693-713, 1973b.
- GARCIA, A.G.; KIRPEKAR, S.M. and PRAT, J.C.: A calcium ionophore stimulating the secretion of catecholamines from the cat adrenal. J. Physiol. 244: 253-262, 1975.
- HAEUSLER, G.: Differential effect of verapamil on excitation-contraction coupling in smooth muscle and on excitation-secretion coupling in adrenergic nerve terminal. J. Pharmac. Exp. Ther. 180: 672-681, 1972.
- JENDEN, D.J. and FAIRHURST, A.S.: The pharmacology of ryanodine, Pharmac. Rev. 21: 1-23, 1969.
- JOHNSON, S.M.; HERRIN, J.; LIW, S.J. PAUL, I.C.: Crystal structure of barium complex of antibiotic X537A, $\text{Ba}(\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Chem. Commun, 1: 71-72, 1970.

- KATZ, B. and MILEDI, R.: Tetrodotoxin resistant electric activity in presynaptic terminals. *J. Physiol.* 203: 459-487, 1969.
- KIRPEKAR, S.M.: Factors influencing transmission at adrenergic synapses. *Prog. Neurobiol.* 4: 163-212, 1975.
- KIRPEKAR, S.M. and MISU, Y.: Release of noradrenaline by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium. *J. Physiol.* 188: 219-235, 1967.
- KIRPEKAR, S.M. and WAKADE, A.R.: Release of noradrenaline from the cat spleen by potassium. *J. Physiol.* 194: 595-608, 1968a.
- KIRPEKAR, S.M. and WAKADE, A.R.: Factors influencing noradrenaline release from the cat spleen by potassium. *J. Physiol.* 194: 609-625, 1968b.
- KITA, H. and VANDERKLOOT, W.: Calcium ionophore X537A increases spontaneous and phasic quantal release of acetylcholine at frog neuromuscular junction. *Nature* 250: 658-660, 1974.
- LUTTGAU, H.C. and NIEDERGERKE, R.: The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J. Physiol.* 143: 637-638, 1958.
- MALMFORS, T. and THOENEN, H.: 6-hydroxy-dopamine and catecholamine neurons. North Holland. Amsterdam, 1971.

- MILEDI, R.: Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. Proc. Roy. Soc. London B. 183: 421-425, 1973.
- MILEDI, R. and SLATER, C.H.: The action of calcium on neuronal synapses in the squid. J. Physiol. 184: 473-498, 1966.
- NAKAZATO, Y and DOUGLAS, W.W.: Vasopressin release from the isolated neurohypophysis induced by a calcium ionophore, X537A. Nature 249: 479-481, 1974.
- NORDMANN, J.J. and CURRELL, G.A.: The mechanism of calcium ionophore induced secretion from the rat neurohypophysis. Nature. 253: 646-647, 1975.
- PRESSMAN, B.C. Properties of ionophore with broad cation selectivity. Fed. Proc. 32: 1698-1703, 1973.
- PRESSMAN, B.C.; HARRIS, E.J.; JAGGER, W.S. and JOHNSON, J.H.: Antibiotic mediated transport of alkali ions across lipid barriers. Proc. Nat. Acad. Sci. 58: 1949-1956, 1967.
- RAHAMINOFF, R. and ALNAES, E.: Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 3613-3616, 1973.
- REED, P.W. and LARDY, H.A.: A23187: A divalent cation ionophore, J. Biol. Chem. 247: 6970-6977, 1972.

- RUBIN, R.P.: The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmac. Rev.* 22: 389-428, 1970.
- RUBIN, R.P.; FEINSTEIN, M.B.; JAANUS, S.D. and PAIMRE, M.: inhibition of catecholamine secretion and calcium exchange in perfused cat adrenal glands by tetracaine and magnesium. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 155: 463-471, 1967.
- SCHADT, M. and HAEUSLER, G.: Permeability of lipid bilayer membranes to biogenic amines and cations: Changes induced by ionophore and correlations with biological activities. *J. Membr. Biol.* 18: 277-294, 1974.
- STATHAM, H.E. and DUNCAN, C.J.: The action of ionophores at the neuromuscular junction. *Life. Sci.* 17: 1401-1406, 1975.
- TARLOV, S.R. and LANGER, S.Z.: The fate of ^3H -norepinephrine released from isolated atria and vas deferens: effect of field stimulation. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 179: 186-197, 1971.
- THOA, N.B.; COSTA, J.L.; MOSS, J. and KOPIN, I.J.: Mechanism of release of norepinephrine from peripheral adrenergic neurones by the calcium ionophores X537A and A23187. *Life Sci.* 14: 1705-1719, 1974.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

1. — *Semántica del lenguaje religioso / A. Fierro*
(Teología. España, 1973)
2. — *Calculador en una operación de rectificación discontinua/A. Mulet*
(Química. Extranjero, 1974)
3. — *Skarns en el batolito de Santa Olalla/F. Velasco*
(Geología. España, 1974)
4. — *Combustión de compuestos oxigenados/J.M. Santiuste*
(Química. España, 1974)
5. — *Películas ferromagnéticas a baja temperatura/José Luis Vicent López*
(Física. España, 1974)
6. — *Flujo inestable de los polímeros fundidos/José Alemán Vega*
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
7. — *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
8. — *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos/José Plá Carrera*
(Matemáticas. España, 1974)
9. — *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
10. — *El teatro español en Francia (1935—1973) / F. Torres Monreal*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
11. — *Simulación electrónica del aparato vestibular/J.M. Drake Moyano*
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
12. — *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
13. — *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
14. — *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra/Carlos del Valle Rodriguez*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*
Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos/Carlos Solís Santos*
(Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica./ Gumerindo Ruíz Bravo*
(Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-Adrenérgicos./ José Salvador Serrano Molina*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial./Miguel Durán-Lóriga*
(Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información./ Antonio Pascual Acosta*
(Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile*
Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*
Teoría y realizaciones. /Juan Manuel Martín Sánchez
(Ingeniería. España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 27.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 28.— *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* /Vicente Zugasti Arbizu
(Física. España, 1975)
- 29.— *Transferencia de carga en aleaciones binarias./ Julio A. Alonso*
(Física. Extranjero, 1975)
- 30.— *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastian Franco.
(Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.* Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudio sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.* / Eduardo Acosta Mendez (Filosofía. España, 1973)
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.* / Salvador Ordoñez Delgado (Geología. España, 1975).
- 34 *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obrero y empleados.* / Federico Durán López (Derecho. España, 1975)
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.* / Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.* / Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.* / Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos, Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.* / José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.* / José Luis Blasco Olcina (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.* / M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología, España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.* / Francisco Sandoval Hernandez (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.* / José Antonio Pero-Sanz Elorz (Ingeniería. España, 1974).
- 43.— *Virus de insectos: Multiplicación, aislamiento y bioensayo de baculovirus.* / Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
- 44.— *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.* / Lucas Sanchez Rodriguez. (Biología. España, 1976).

45. – *Sistema automático para la exploración del campo visual.*
José Ignacio Acha Catalina (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
España, 1975).
46. – *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección*
mecánica/ Margarita Ruiz Altisent (Ciencias Agrarias.España 1975)
47. – *El uso del ácido salicílico para la medida del p^H intracelular en*
las células de Ehrlich y en escherichia coli/ Francisco Javier
García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
Extranjero, 1974).

