# DETERMINACION MANOMETRICA DE AMINOXIDASA EN GLANDULA HEPATICA DE PYURA SP

MARIO I. ALARCON A. y SONIA CID M.

## RESUMEN

1.— Se estudia la actividad de la aminoxidasa en diversos órganos de ratón haciendo una comparación de su acción sobre los sustratos clorhidrato de tiramina y bencilamina en homogenizado de hígado de ratón.

2.— Se aplica este estudio en la valoración de aminoxidasa en diversos órganos de especies del género Pyura. Sólo la glándula hepática manifiesta acción aminoxidásica.

3.— En ambos casos se obtiene una mayor actividad usando como sustrato bencilamina.

4.— Iproniazida tiene una acción inhibitoria sobre la aminoxidasa de glándula hepática de Pyura.

5.— Se requieren altas concentraciones de clorhidrato de adrenalina, para estimular in vivo a especies de Pyura. Esta acción se potencia por acción de Iproniazida.

6.— Se discuten estos resultados.

## SUMARY

1.— The activity of aminoxidase is studied in the different organs of mice by making a comparison of its action on the sustrates clorhydrate of tyramine and benzylamine on the homogenized liver of mice.

2.— This investigation is used in the determination of amineoxidase in different organs of Pyura sp. Only the hepatic gland presents an amineoxidase activity.

3.— A mayor activity is obtained in both cases using benzylamine as sustrate.

4.— Iproniazid has an inhibitory action on the amineoxidase of the Pyura's hepatic gland.

5.— High concentrations of clorhydrate of adrenaline are needed to stimulate "in vivo" Pyura sp. This effect is potenciated by the action of Iproniazid.

6.— The significance of these findings is discussed.

## INTRODUCCION

En experiencias de laboratorio hemos encontrado que la respuesta de la musculatura de Ascidias y muy especialmente la musculatura sifonal, tanto oral como cloacal, a la acción de la adrenalina, requiere concentraciones muy elevadas, lo que podría deberse a que en estas especies biológicas las aminas biogénicas, entre ellas, la adrenalina, no tendrían aquí (1), la importancia fisiológica señalada en animales superiores; o bien, a que sus sistemas aminoxidásicos, complejos enzimáticos clásicamente aceptados como inhibidores de la acción de estas aminas biogénicas (2–3–4–5–5–7), fueran muy eficaces en los Ascidias.

A determinar la presencia y actividad de la aminoxidasa en una Ascidia, presente en nuestro medio, género Pyura sp. (8–9), está destinado este trabajo.

Para determinar la acción de la aminoxidasa se han empleado técnicas manométricas (10), usando como sustrato de este complejo enzimático, clorhidrato de tiramina y bencilamina.

El empleo de clorhidrato de tiramina se hizo ya que la información bibliográfica obtenida, lo señala como una de las sustancias con la que mejores resultados se ha obtenido en experiencias manomátricas (2–3–5–11–12–13), ya que, como lo indican otros autores, el complejo enzimático que oxida a la tiramina también lo hace sobre otras aminas simpaticomiméticas, incluyendo a la adrenalina (3).

Por otra parte, en trabajos demostrativos hemos obtenido, en nuestras condiciones experimentales, buen rendimiento con bencilamina, sustrato éste, que también ha sido utilizado por otros autores (3, 14).

El clorhidrato de adrenalina si bien se acepta que es oxidado in vivo por la aminoxidasa, no puede valorarse esta acción in vitro por experiencias manométricas, pues no reacciona sensiblemente (3), probablemente por ausencia de las sustancias indicadas como protectoras de la adrenalina in vivo; algunos aminoácidos, glutatión, ácido ascórbico que actúan como sustancias reductoras (15).

No existiendo información bibliográfica sobre valoración de este sistema enzimático en Ascidias, nos ha parecido de interés efectuar un estudio comparativo del trabajo aminoxidásico que permiten tanto el clorhidrato de tiramina como la bencilamina en diferentes órganos de ratón, y luego de obtener los rendimientos óptimos, hemos procedido a adaptar la técnica para efectuar las determinaciones en diferentes órganos de Pyura sp. y en especial de glándula hepática que demostró ser el órgano que revela una mayor concentración del complejo enzimático señalado.

La técnica empleada es la propuesta por Robinson (11), y como ésta, hay otras indicadas exclusivamente para efectuar estas determinaciones en tejido de vertebrados superiores (2–5–7–

16–17), de ahí que se haya hecho indispensable proceder a una modificación adecuada, para poder utilizarla en la determinación de aminoxidasa en tejidos de invertebrados marinos, como es el caso de las especies pertenecientes al género Pyura consideradas en este trabajo.

## METODICA

### 1.— DETERMINACION DE AMINOXIDASA

Básicamente se aprovechó la técnica descrita por J. Robinson (11), mediante la cual es posible medir el consumo de oxígeno que realizan los tejidos cuando se colocan en un sistema manométrico de Warburg descrito por Umbreit (10).

La técnica aprovecha la inhibición de todos los sistemas enzimáticos respiratorios a nivel de los citocromos por acción de cianuros, con excepción del sistema de la aminoxidasa.

Buenos resultados se obtienen en nuestras condiciones experimentales por el empleo de una atmósfera reaccional oxigenada como la descrita por Robinson (11) y empleando como sustrato bencilamina.

En las experiencias efectuadas se utilizaron series de manómetros dejando uno como termobarómetro y otro como control en el cual no se incluye sustrato, para determinar la reactividad espontánea que escapa al límite de sensibilidad de la técnica.

La calibración de matraces y manómetros debe hacerse con el objeto de conocer el espacio reaccional de que dispone el sistema enzimo-sustrato, determinando el volúmen total que se designa "Vg" calculado por el método indicado por Scholander y Niemeyer (18), que junto con otras variables, como temperatura, presión, solubilidad del oxígeno, etc., nos da la constante "K" de cada manómetro. Esta constante, multiplicada por el desnivel de la columna de Brodie en el sistema manométrico, nos da un valor que corresponde al volúmen de oxígeno consumido por efecto de la acción enzimática.

### 2.— DETERMINACION DE SENSIBILIDAD A ADRENALINA

Se coloca un ejemplar de Pyura en agua de mar fresca en un baño regulado (temperatura no más de 20°C). Se conectan sus sifones con un sistema de registro sobre un quimógrafo dejando que el animal se ambiente, lo que se consigue en plazos variables (1 a 6 horas) que permiten un registro normal de sus contracciones (8). Conseguido éste, se ensayan las sustancias cuya acción se desea determinar in vivo.

### 3.— INSTRUMENTAL USADO

a) Aparato Warburg (Precisión Scientific Co. Chicago);
b) Homogenizador Bühler (Karl Kolb 1963, Nº 279950);
c) Quimógrafo: Palmer Nº 12;
d) Potenciómetro Beckman Modelo H-2.

## 4.— SOLUCIONES Y REACTIVOS

**Soluciones Buffer pH:** 7,4: Mezcla descrita por Umbreit (10), se obtiene mezclando en el momento de usar 2 ml. de fosfato bibásico de potasio al 0.9070% y 8 ml. de fosfato monobásico de potasio al 1,187% (E. Merck); lo que da el pH de trabajo señalado en la técnica.

**Solución de cianuro de potasio 0.1 Molar:** preparado y neutralizado con ácido clorhídrico normal usando como indicador azul de bromotimol (E. Merck).

**Mezcla de cianuro de potasio e hidróxido de potasio 2 normal:** Descrita por Umbreit (10) (E. Merck); Clorhidrato de Tiramina (N. B. Co) 0.1 Molar; **Bencilamina** (Riedel de Haenag - Seelze - Hannover). 0.1 Molar; **Clorhidrato de Adrenalina** (Clin & Cie Comar & Cie **Phciens.** París); **Taurocolato de sodio** (Baltimore Biological Laboratory Inc. Baltimore, Md.); **Azul de Evans** (Merck); **Cloruro de sodio** (Merck); **Iproniazida** (F. Hoffmann - La Riche & Co. Ltd.) Basilea-Suiza; **Acido sulfúrico** (Merck); **Bicromato de potasio** (Merck).

## 5.— TECNICAS USADAS

**Obtención de homogenizados:**

A) Se extraen los tejidos a emplear inmediatamente después de sacrificado el animal, en este caso ratón, se lava con abundante solución buffer de pH : 7,4 y se procede a homogenizar (utilizando homogenizador Bühler (Modelo Nº 279950), con mínima cantidad de solución buffer. Se tritura hasta obtener una suspensión homogénea y se hace la dilución correspondiente, en este caso, los tejidos empleados provienen de diferentes órganos, experiencias realizadas para determinar qué órgano presenta una mayor actividad y así poder obtener un buen nivel comparativo en cuanto a la actividad de la aminoxidasa y a los sustratos usados.

B) Se extrae la glándula hepática de Pyura sp. frescos y recién sacrificados y se procede a homogenizar en solución buffer haciendo las diluciones correspondientes. También se emplearon otros órganos para verificar la concentración de aminoxidasa.

Se hizo el montaje en el sistema manométrico de Warburg según la técnica ya señalada y se efectuaron mediciones del consumo $O_2$ en un lapso de tiempo de 30 minutos, tiempo fijado por la técnica, pues más allá la presencia de cianuros altera la reacción en lo que se refiere a la captación y desprendimiento de gases (11).

## DETERMINACION DE AMINOXIDASA

Nº 27
Origen y dilución del enzimo: glándula hepática 80%.
Sustrato: Bencilamina
Dilución: O.1M
Especie biológica utilizada: Pyura sp.
Osc/min: 120 A
Manómetros: A

Tiempo: 1 hora.
Temperatura ambiente: 22ºC
Temperatura reacción: 30ºC
Presión atmosférica: 758 mm.
Atmósfera reacción: $O_2$
pH Buffer: 7,4.

| Manómetros y contenido | | Tiempo en minutos | | | | | | | Constantes y cálculos | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0' | 5' | 10' | 15' | 20' | 25'' | 30' | h | K | V | V' |
| 9) | Termobarómetro | 15 | 15,2 | 15 | 15,1 | 15,3 | 15,3 | 15,3 | 0,3 | 1,456 | 0,436 | —— |
| 10) | Control | 15 | 14,6 | 14,6 | 14 | 14 | 14 | 14 | 1 | 1,406 | 1,406 | 0,970 |
| 11) | Reaccional | 15 | 15,5 | 13,7 | 13,7 | 13,4 | 13 | 12,8 | 2,2 | 1,462 | 3,216 | 2,246 |
| 13) | " | 15 | 14,3 | 13,7 | 13,7 | 13,2 | 13 | 12,8 | 2,2 | 1,363 | 2,998 | 2,028 |
| 14) | " | 15 | 14,1 | 13,7 | 13,5 | 13,5 | 13,3 | 12,3 | 2,7 | 1,362 | 3,677 | 2,707 |
| 16) | " | 15 | 14,1 | 14,1 | 13,9 | 13,6 | 13,6 | 12,3 | 2,7 | 1,392 | 3,758 | 2,788 |
| 17) | " | 14,9 | 13,9 | 14 | 13,8 | 13,8 | 13,5 | 12,2 | 2,7 | 1,273 | 3,437 | 2,467 |
| 18) | " | 15 | 14,1 | 14,1 | 13,7 | 13,5 | 13,4 | 11,3 | 3,7 | 1,333 | 4,931 | 3,961 |

Observaciones: h = desnivel leído a los 30'; K = constante de cada manómetro,
v = volumen de gas; V' = volumen de gas corregida la variación de presión y la actividad espontánea del control.

## 6.— VALORACION Y COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE LA AMINOXIDASA EN LOS ORGANOS ENSAYADOS

La valoración se hace en volúmen $O_2$ captado por el sistema reaccional, restándole la actividad espontánea que se produce en el manómetro control como también haciendo las modificaciones que indica los cambios en el termobarómetro.

Para los cálculos estadísticos hemos seguido las indicaciones de Lacey (19) y de Bancroft (20).

## RESULTADOS

1.— Determinación de la actividad aminoxidásica en diferentes órganos de ratón.

2.— Acción comparativa de aminoxidasa de hígado de ratón sobre clorhidrato de tiramina y bencilamina.

3.— Determinación de la actividad aminoxidásica en glándula hepática de Pyura sp.

4.— Actividad comparativa de aminoxidasa de glándula hepática de Pyura sp. sobre clorhidrato de tiramina y bencilamina.

5.— Acción del clorhidrato de adrenalina "in vivo" sobre Pyura. Límite de sensibilidad a su acción.

6.— Acción coordinada de Iproniazida y clorhidrato de adrenalina sobre Pyura sp.

### TABLA Nº 1

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA AMINOXIDASA, EXPRESADA EN VOLUMENES DE OXIGENO CONSUMIDO, EN HOMOGENIZADOS DE DIFERENTES ORGANOS DE RATON**

Dilusión 20% **Sustrato: Clorhidrato de tiramina**

| Organo | ml de $O_2$ consumido | % de actividad relación - hígado bencilamina (*) | Nº de Experiencias |
|---|---|---|---|
| (1) | (2) | (3) | (4) |
| Hígado | 6.29 ± 0.11 | 70.92% | 73 |
| Pulmón | 2.86 ± 0.85 | 32.28% | 10 |
| Riñón | 2.74 ± 0.24 | 30.81% | 10 |
| Cerebro | 2.31 ± 0.10 | 26.07% | 24 |
| Estómago | 1.25 ± 0.17 | 14.10% | 10 |
| Bazo | 0.98 ± 0.03 | 11.06% | 10 |
| Testículo | 0.91 ± 0.17 | 10.27% | 10 |

(*) Siendo la mayor reactividad del homogenizado de hígado en preparados con bencilamina como sustrato, se tomó este valor como acción 100%.

## TABLA Nº 2

### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA AMINOXIDASA, EXPRESADA

Dilución: 20% Sustrato: BENCILAMINA

| ORGANO | ml. de $O_2$ consumido | % de actividad en relación: hígado-bencilamina | Nº de Experiencias |
|---|---|---|---|
| (1) | (2) | (3) | (4) |
| Hígado | 8.86 ± 0.11 | 100.00% | 58 |
| Cerebro | 3.17 ± 0.24 | 35.89% | 12 |
| Estómago | 2.54 ± 0.38 | 28.66% | 7 |
| Pulmón | 0.76 ± 0.20 | 8.57% | 6 |
| Testículo | 0.35 ± 0.22 | 3.99% | 6 |
| Riñón | ——— | —— | 6 |
| Bazo | ——— | —— | 6 |

## TABLA Nº 3

### EN VOLUMENES DE OXIGENO CONSUMIDO, EN GLANDULA HEPATICA DE PYURA AL 20% Y 80% USADO COMO SUSTRATO CLORHIDRATO DE TIRAMINA Y BENCILAMINA

| Concentración del homogenizado | Clorhidrato de tiramina ml. de O2 consumido | Nº de Experiencias | Bencilamina ml. de O2 consumido | Nº de Experiencias |
|---|---|---|---|---|
| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) |
| 50% | ——— | 10 | 0.85 ± 0.17 | 7 |
| 80% | 0.48 ± 0.15 | 10 | 2.48 ± 0.16 | 65 |

## TABLA Nº 4

### DETERMINACION DE pH DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS COMO BUFFER

| Soluciones | pH |
|---|---|
| (1) | (2) |
| Buffer fosfato según Umbreit (10) | 7.4 |
| Agua de mar fresca | 7.6-7.8 |

## DISCUSION

Como se ha señalado por las referencias bibliográficas obtenidas (2–3–5–11–12–13), el clorhidrato de tiramina permite obtener buenos resultados cuando se lo usa como sustrato en experiencias manométricas de determinación de actividad aminoxidásica.

La bencilamina como sustrato de este sistema enzimático había permitido obtener en experiencias anteriores buenos niveles de rendimiento.

Se procedió a efectuar un análisis comparativo para precisar cuál sería la amina que en nuestras experiencias podríamos utilizar y que nos indicara un porcentaje de actividad detectable fácilmente.

Se indican en las Tablas N.os 1 y 2 y en el Gráfico Nº 1, los resultados obtenidos por ambas aminas, y como en ellos se puede observar, el rendimiento alcanzado por la bencilamina es superior. En un trabajo anterior (2), se indica una serie de valores en la actividad de la aminoxidasa en diferentes órganos de ratón usando como sustrato clorhidrato de tiramina, valores que controlamos y que no varían sensiblemente con los que se obtuvieron (Tabla Nº 1). Considerando el buen rendimiento obtenido con bencilamina como sustrato, también procedimos a determinar la actividad de la aminoxidasa en diferentes órganos de ratón usando como sustrato bencilamina. Estos valores no guardan una proporcionalidad con los señalados para la tiramina y aún más, en el caso de riñón y bazo no se presentó actividad lo que está de acuerdo también con otros autores (12), (Tabla Nº 2 y Gráfico Nº 1).

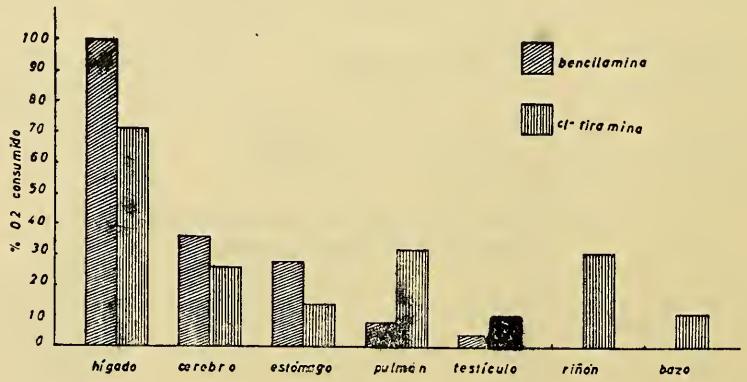


**Gráfico Nº 1.**— Comparación de la actividad de la aminoxidasa de diferentes órganos de ratón sobre clorhidrato de tiramina y bencilamina.

Establecidas estas condiciones para mamíferos se utilizó la técnica para efectuar mediciones de actividad aminoxidásica en tejidos de un tunicado presente en nuestro medio (Pyura sp.),

modificándola de acuerdo con las exigencias de esta especie. Como primera condición fue necesario efectuar las experiencias a 30ºC pues a 37ºC las respuestas fueron prácticamente nulas. Por otra parte diversos investigadores señalan 30ºC como temperatura óptima para valoraciones enzimáticas en especies biológicas inferiores (1–15–21).

Los órganos empleados, fueron diversos pero no hubo respuesta apreciable (sangre, estómago, tejido branquial, túnica, manto, glándula hepática, etc.).

Siendo el medio habitual de estas especies las aguas costeras, también se efectuaron experiencias utilizando en vez de solución buffer fosfato de pH 7,4; agua de mar fresca que en nuestro medio presentó un pH 7,6 - 7,8. Tampoco hubo reacción (Tabla N 4).

Descartada esta posibilidad se procedió a efectuar las experiencias con el buffer fosfato indicado por Umbreit (10) y que presenta un pH 7,4; óptimo para la enzima.

Las concentraciones de los homogenizados (20%) indicados por la técnica original en animales superiores, proporcionaron en Pyura valores bajos imposibles de apreciar por técnicas manométricas; sólo la glándula hepática manifiesta una actividad mínima, usando como sustrato bencilamina (Tabla Nº 3), y por lo tanto en este órgano se hicieron las determinaciones.

La glándula hepática se presenta como un órgano voluminoso, de aspecto arborescente y de color café pardo (8) y para obtener valores mayores fáciles de cuantificar, elevamos la concentración de este homogenizado al 80%, empleando como sustrato clorhidrato de tiramina y bencilamina alternativamente, obtuvimos los resultados que se indican en la Tabla Nº 3, precisando que la máxima actividad, en las condiciones experimentales establecidas, se obtienen con homogenizado de glándula hepática al 80% y usando como sustrato bencilamina (Gráfico Nº 2).

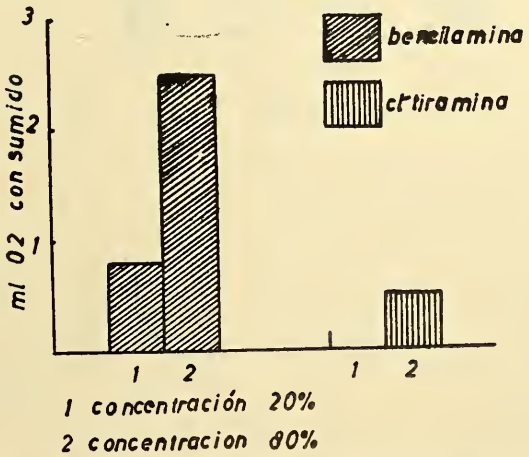


Gráfico Nº 2.— Volúmen de O2 consumido por acción de la aminoxidasa de glándula hepática de Pyura sobre clorhidrato de tiramina y bencilamina.

La baja actividad de aminoxidasa, sistema enzimático que se estima degrada las aminas biogénicas (3–4–22), revelada en tejidos de Pyura, nos ha inducido a pensar que siendo un sistema enzimático presente en bajas concentraciones, también las aminas biogénicas deben encontrarse en bajos niveles y la sensibilidad a la adrenalina y nor-adrenalina debe ser a elevadas concentraciones ya que este sistema hormonaenzima no tendría en Pyura la importancia señalada en organismos superiores (1–8).

Consideramos de interés efectuar un control con adrenalina in vivo, pues la baja actividad manifestada con tiramina en experiencias manométricas, nos hizo suponer la ninguna relación que podría tener el complejo aminoxidasa empleado en manometría con la adrenalina; pero sus respuestas in vivo tanto aisladamente como con Iproniazida establecieron una relación directa.

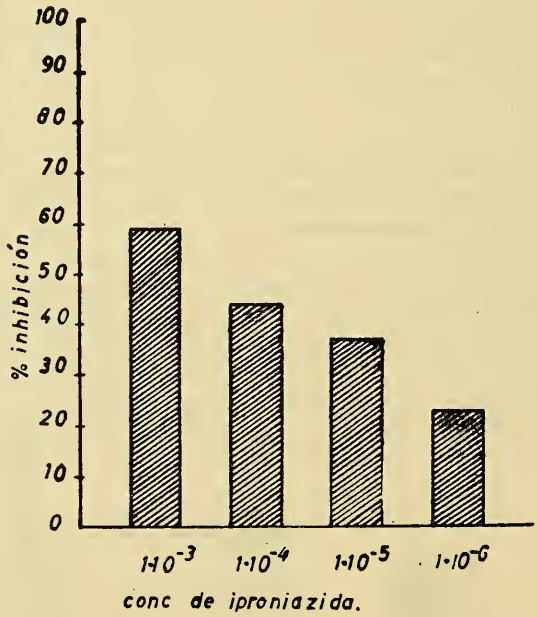


**Gráfico Nº 3.**— Inhibición de la actividad de la aminoxidasa por acción de Iproniazida en glándula hepática de Pyura.
**Homogenizado: 80%**
**Sustrato: bencilamina**

Para comprobar este hecho, se ubica ejemplares de Pyura en un baño adecuado, oxigenado y en agua de mar a no más de 20ºC, se deja los ejemplares un tiempo fluctuante entre 1 y 6 horas con el objeto de que se adapten a su ambiente (8). Mediante un sistema de registro quimográfico, inscribimos las curvas producto de las contracciones de los sifones oral y cloacal de esta especie.

En el registro normal (Gráfico Nº 4) se observa diferente grado de intensidad en las contracciones del sifón oral (NS2) y cloacal (NS1), e indica una acción más intensa en la expulsión que en la inhalación.

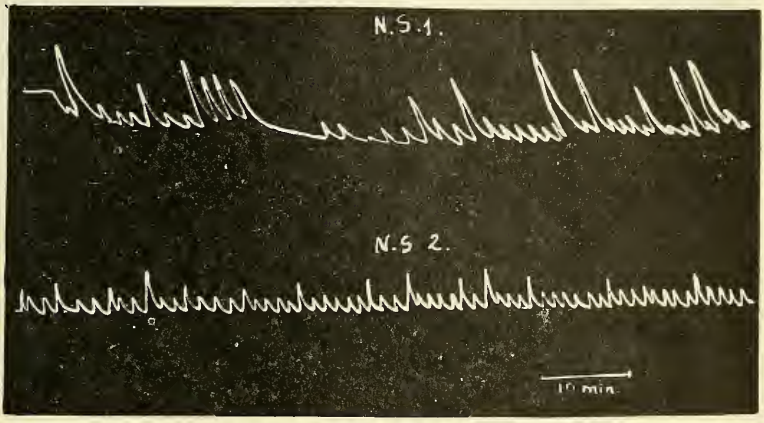


**Gráfico Nº 4.**— Registro normal y simultáneo de sifones oral (NS2) y cloacal (NS1) de Pyura sp.

La inhalación en el sifón bucal es sostenida y rítmica; la contracción efectuada por este sifón es pareja con ligeras contracciones superiores a la tónica general, en lapsos irregulares, lo que está en relación inversa con la concentración en fitoplancton en el medio en que vive (a mayor cantidad de alimentos, menor número de contracciones).

Las contracciones del sifón cloacal mantienen una tónica similar a las del bucal, salvo las que escapan al ritmo normal que son de mayor intensidad, más irregulares y más sostenidas que las correspondientes al sifón bucal. La razón fisiológica es obvia: debe alejar del sifón bucal vecino los productos de desecho para que no penetren nuevamente al sistema.

Obtenido el registro de las contracciones normales, se hizo actuar sobre el ejemplar clorhidrato de adrenalina en soluciones crecientes a través del sifón oral, con el objeto de precisar a qué concentración ejerce su acción sobre él. Se agregó clorhidrato de adrenalina en soluciones crecientes ($1 \times 10^{-6}$ g; $1 \times 10^{-5}$ g; $1 \times 10^{-4}$ g; $1 \times 10^{-3}$ g); agregando 1 ml. cada dos minutos y hasta 5 ml. Después del último ml. se esperó 10 minutos antes de continuar la experimentación con la solución siguiente. La respuesta se obtiene a los 10 minutos a altos niveles $2 \times 10^{-3}$ g. para animales de 25 g. de peso aproximadamente; el tiempo de recuperación a esta acción es cercano a una hora (Gráfico Nº 5). Las respuestas se manifiestan por contracciones sostenidas más intensas y frecuentes y muy por sobre la tónica normal.

La sensibilidad se registró tanto en sifón bucal como cloacal y no varió sensiblemente.

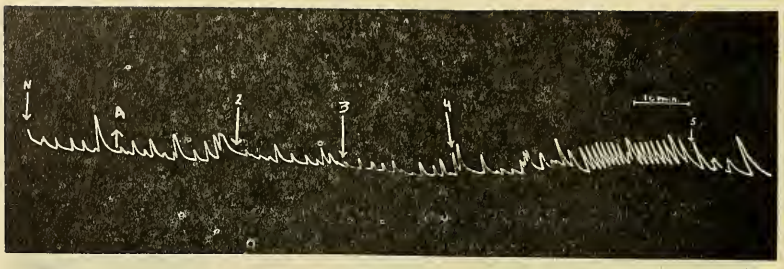


**Gráfico Nº 5.**— Determinación del límite de sensibilidad al clorhidrato de adrenalina en Pyura sp.: sifón cloacal (Sl).

Como la respuesta del sifón cloacal es más enérgica y más fácil de registrar se prosiguieron las experiencias usando sólo este sifón.

Conociendo la clásica inhibición de la aminoxidasa por acción de la Iproniazida (6–23–24–25–26–27–28–29), se buscó la concentración umbral de este inhibidor sobre Pyura, utilizando soluciones seriadas en concentración creciente, con el objeto de potenciar la acción de la adrenalina y determinar si hay una relación entre esta hormona y la aminoxidasa revelada en la glándula hepática de Pyura.

**Gráfico Nº 6.**— Determinación de sensibilidad a Iproniazida de Pyura sp.: sifón cloacal.

Como se observa en el Gráfico Nº 6, se obtiene una sensibilidad a la Iproniazida a concentraciones elevadas (8 x $10^{-3}$ g.) (punto 4); dando una respuesta que se manifiesta por una contracción sostenida, de frecuencia y amplitud irregular, de muy lenta y difícil recuperación.

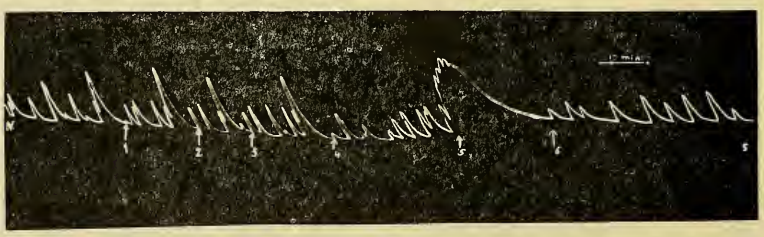


**Gráfico Nº 7.**— Acción de Iproniazida y clorhidrato de adrenalina sobre sifón cloacal de Pyura sp.

En otra experiencia (Gráfico Nº 7), se agregó Iproniazida a una concentración inferior a la sensibilidad establecida (8 x $10^{-4}$ g.), para evitar la respuesta inmediata (punto 1); luego adrenalina en concentraciones crecientes, como se ha indicado an-

teriormente, hasta 1 x $10^{-4}$ g. (punto 4). Inmediatamente de agregada esta concentración de adrenalina, se produjo una respuesta irregular que se manifestó en forma máxima a los 20 minutos por una contracción brusca, sostenida y corta, de rápida recuperación (punto 5).

La respuesta a la acción de la Iproniazida a través de contracciones sobre el registro normal se explica aceptando que su efecto inhibidor sobre la aminoxidasa permite una mayor acción de la escasa adrenalina normalmente presente (presencia aceptada por Fedele y citada por Grassé) (8). Esto mismo explica la elevación de la sensibilidad a la adrenalina cuando ésta se agrega al medio.

Por otra parte, si bien es cierto que las respuestas corresponden cualitativamente a la acción de estas substancias, las concentraciones que se necesitan para obtener estas respuestas son demasiado elevadas y no corresponden a niveles fisiológicos en esta especie (1).

Las experiencias manométricas en las que se empleó Iproniazida como inhibidor de un sistema en que la glándula hepática de Pyura suministró el complejo enzimático y la bencilamina fue empleada como sustrato (Gráfico Nº 3), indica que si bien hay inhibición no corresponde a los niveles que se han señalado en las experiencias en que se emplea como sustrato clorhidrato de tiramina y fuente enzimática, hígado de ratón (3–5–13–25).

La respuesta a la adrenalina se manifiesta a elevadas concentraciones y suponemos junto a otros autores (1–30–31), que la escasa sensibilidad a esta hormona, se debe a que no tiene una acción fisiológica marcada en esta especie.

Por otra parte, comprobamos directamente a través de experiencias manométricas, e indirectamente inhibiendo in vivo la aminoxidasa con Iproniazida, que los niveles de aminoxidasa en glándula hepática de Pyura son bajos, y serían proporcionales a la concentración de aminas biogénicas presentes, siempre que la presencia de aminoxidasa en este órgano, no se deba a otra acción bioquímica que excede los límites de este trabajo.

Se hace notar que en las experiencias manométricas para valorar aminoxidasa en glándula hepática de Pyura, la bencilamina demostró una mayor especificidad manifestada en un mayor trabajo, incluso este sistema enzimático mostró una mayor resistencia frente a la acción inhibitoria de la Iproniazida.

Es necesario un mayor estudio para establecer si el sistema aminoxidásico de la glándula hepática de Pyura se trata de un complejo enzimático diferente y que como Bergeret (32), podríamos llamar benzilaminoxidasa por los buenos rendimientos obtenidos al emplear bencilamina como sustrato.

## BIBLIOGRAFIA


1.— NICOL, J. A.: The Biology of Marines Animals. Sir Isaac Pitman & Sons Ltd. London, 444 (1960).

2.— LECANNELIER, R. S.; BARDISA, U. L.; TAMAYO, R. L., y ALARCON, A. M.: Modificación de la Actividad Aminoxidásica por acción de algunos depresores del Sistema Nervioso Central. Tesis de Químicos Farmacéuticos. Concepción. IX-X - 1 (1959).

3.— BLASCHKO, M. D. H.: Enzymic Oxidation of amines. British Med. Bull. **9** : 146 (1953).

4.— VON EULER, U. S. and HELLNER BJÖRMAN, S.: Noradrenaline and adrenaline content of cats organs, effects of amineoxidase inhibitors on. Acta Physiol. Scand, 33 : 118 (1955).

5.— WEINER, N: Substrate Specificity of Brain Amine Oxidase of Several Mammals. Arch. Biochem. and Biophys. **91:** 182,, (1960).

6.— TRZEBSKI, A: The action adrenaline, noradrenaline and monoamine oxidase inhibitor injected directly into the reticular formation of the Brain Stem. Bull. Acad. Polon. Sc. VIII: 11, (1960).

7.— SPINKS, A., Burn, J. H.: Thyroid activity and amine oxidase in the liver. Brit. J. Pharmacol. **7**: 93, (1952).

8.— GRASSE, P. P.: Traité de Zoologie. Masson et Cie. Editeurs París. XI: 618, (1948).

9.— D'ANCONA, H.: Tratado Zoología. Editorial Labor S. A. Barcelona - Madrid. 812, (1959).

10.— UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFFER, J. F.: Manometric ttechniques. Burgers Publishing Co. Minneapolis. 1, (1959).

11.— ROBINSON, J.: Aminoxidase in the iris and nictitating membrane of the cat and the rabitt. Brit. J. Pharmacol. **7:** 99, (1952).

12.— HOPE, D. B., SMITH, A. D.: Distribution and activity of monoamine oxidase in mouse tissues. Biochem. Jour. **74:** 101, (1960).

13.— SELLER, A.: Some remarks about monoamine oxidase and monoamine oxidase inhibitors. J. of neuropsychiat. Suppl. 1: 125, (1961).

14.— BLASCHKO, H., BONNEY, R.: Spermine oxidase and benzylamine oxidase. Distribution, Development and Substrate Specificity. Proc. Roy. Soc. **156:** 268, (1952).

15.— HOUSSAY, B. A., LEWIS, J., ORIAS, O., BRAUN, M. E., HUG, E., FOGLIA., V., LELOR, L.: Fisiología Humana. El Ateneo. Buenos Aires. 1380, (1958).

16.— BLASCHKO, H., HAWKINS, J.: Observations on amine oxidase in cephalopods. J. Physiol. **118:** 88, (1952).

17.— BLASCHKO, H., HIMMS, J.: The inhibition of amine oxidase and spermine oxidase by amidines. Brit. J. Pharmacol. **10:** 451, (1955).

18.— SCHOLANDER, P., NIEMEYER, H., LLOYD, C.: Simple calibrator for Warburg Respirometers. Science. **112:** 437, (1950).

19.— LACEY OLIVER, L.: Stadistical Methods in Experimentation. Mac Millan Co., New York. 132, (1953).

20.— BANCROFT, H.: Introducción a la bioestadística. Eudeba. Buenos Aires. (1960).

21.— BLASCHKO, H., COLHOUN, E. H., FRONTALI, H.: Occurence of amine oxidase in an insect, Periplaneta Americana L. J. Physiol. **156**: 28, (1961).

22.— SCHAYER, R., SMILEY, R.: The metabolisme of Epinephrine containing isotopic carbon. J. Biol. Chem. **202**: 425, (1953).

23.— TAYLOR, J. D., WYKES, A. A., GLADISH, Y. C., MARTIN, W. B.: New Inhibitor of Monoamine Oxidase. Nature. **187:** 941, (1960).

24.— TABACHNICK, I. I. A., RUBIN, A. A.: Some relationships between peripheral monoamine oxidase Inhibition and Brain 5 Hydroxytryptamine levels in rats. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **101:** 7, (1962).

25.— ZELLER, A., SATYAPRIYA, S.: XIX. Inhibition of monoamine oxidase by phenylcyclopropylamines and Iproniazid. J. Biol. Chem. **237**: 7, (1962).

26.— HORITA, A., PARKER, R. G.: Comparison of monoamine oxidase inhibitory effects of iproniazid and its phenyl congener. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. **99** (3); 617, (1958).

27.— GRIESEMER, E. C., BARSKY, J., ZELLER, A: Potentiating effect of Iproniazid on the Pharmacological action of sympathomimetic amines. Proc. Soc. Exper. Biol. **84:** 699, (1957).

28.— ZELLER, A., BARSKY, J.: In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-isonicotinyl-2-isopropyl hidracine. Proc. Soc. Eper. Biol. **81:** 459, (1952).

29.— DAVISON, A. N.: The mechanism of the irreversible inhibition of rat-liver monoamine oxidase by Iproniazid (Marsilid). Biochem. Jour. **67:** 316, (1957).

30.— BACQ, Z. M.: L'acétylcholine et l'adrenaline chez les Invertébrés. Biol. Rev. **22:** 73, (1947).

31.— WATERMAN, A. J.: The action of drugs on the compaund ascidian Perophore viridis as indicated by the activity of the intact heart. Physiol. Zool. **15:** 61, (1942).

32.— BERBERET, B., BLASCHKO, M. D. H., HAWES, R.: Occurrence of an amineoxidase in horse serum. Nature. Lond. **180:** 1127, (1957).