

Efectos de algunas catecolaminas y sus catabolitos en la labilidad lisosomal en homogeneizados de hígados de ratas

C. M. UPMANN

*Lab. de Bioquímica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
La Habana, Cuba y del ICBP "Victoria de Girón"*

Recibido: 6 de enero de 1976

Recibido: 25 de enero de 1977

ABSTRACT. Earlier experiments indicated that adrenaline and noradrenaline were lysosomal labilizing factors. In order to determine if this action could be shared by other monoamines, experiments were performed injecting rats with dopamine (DA) and/or FLA-63, an inhibitor of DA- β -hydroxylase. We also tried to determine if the catabolic products of these monoamines were the responsible factors in the labilizing lysosomal effect. To accomplish this end, rats were treated with inhibitors of the enzymes that degrade the monoamines. It was observed that catecholamines produce a labilizing lysosomal effect per se which is not caused by their catabolic products. It was also observed that FLA-63 appears to produce a stabilizing lysosomal effect.

RESUMEN. Algunos experimentos realizados con anterioridad señalan a la adrenalina y noradrenalina como labilizantes lisosomales. Con el fin de determinar si esta acción labilizante puede ser compartida por otras monoaminas, se realizan experimentos in vivo inyectando a ratas con dopamina (DA) y/o FLA-63, inhibidor de la DA- β -hidroxilasa. También se trata de descartar, al inhibir las enzimas que degradan las monoaminas, el posible efecto labilizante de sus catabolitos. Se observa en estos experimentos que la adrenalina y/o noradrenalina producen un efecto labilizante lisosomal per se, y no debido a sus productos catabólicos. También se observa un posible efecto estabilizante lisosomal del FLA-63.

INTRODUCCION

Existen datos en la literatura científica que relacionan a las catecolaminas con la estabilidad de la membrana lisosomal. Ignarro y cols., (1972), mostraron que in vitro la adrenalina y la noradrenalina ejercían un efecto estabilizante sobre la membrana lisosomal. Loegering y cols.,

(1975), señalaron que in vivo la adrenalina produce labilidad lisosomal. Al igual que estos últimos autores, nosotros hemos hallado que tanto la adrenalina como la noradrenalina producen labilidad lisosomal en experimentos in vivo (Upmann, 1974), y que la adrenalina también la produce en perfusiones hepáticas in situ (Upmann, 1975). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no hallamos efecto alguno sobre la estabilidad de la membrana lisosomal in vitro (Upmann, 1975).

Ya que la dopamina es otra de las catecolaminas naturales, y posee una estructura semejante, tanto a la adrenalina como a la noradrenalina, nos pareció de interés investigar, cuán general para las catecolaminas era el efecto labilizante producido por la adrenalina y noradrenalina. Para tratar de demostrar lo anterior, era imprescindible utilizar un inhibidor de la dopamina β hidroxilasa, pues esta enzima transforma la dopamina en noradrenalina. El FLA-63, molécula diseñada por Carlson, (1967), ha sido descrita por éste y otros autores como un inhibidor muy potente y de alta especificidad de esta enzima (Svensson y Waldeck, 1969; y Svensson, 1971).

Otro aspecto que investigamos con estos trabajos fue el de descartar si el efecto labilizante adrenérgico podría ser atribuido total o parcialmente a sus catabolitos. Como se conocen inhibidores de las enzimas implicadas en la degradación de las catecolaminas que pueden actuar in vivo, consideramos que se podría descartar esta posibilidad con relativa facilidad.

Los dos grupos de enzimas más importantes en la degradación de las catecolaminas son: las monoamino oxidasas y las catecol-O-metil transferasas. Las primeras regulan los niveles intracelulares de catecolaminas, y cuando se las inhibe, los niveles celulares de estas últimas, aumentan (Neff y Costa, 1968). Uno de los agentes más usados en la inhibición de las monoamino oxidasas es la iproniazida (Biel y cols., 1959). Las catecol-O-metil transferasas, presentes mayormente en las células no neuronales, regulan en parte las concentraciones de catecolaminas circulantes (Bhagat, 1971), y por ello su inhibición, sí potencia las respuestas adrenérgicas. Entre los inhibidores usados para ellas tenemos al pirogalol (Nikojedevic y cols., 1970).

MATERIALES Y METODOS

Material biológico. Se emplearon ratas Wistar machos de 250-300 g de peso.

Drogas y reactivos. Las drogas y reactivos usados, fueron los siguientes: L-adrenalina, Merck; iproniazida, proporcionada por el Dr. Pavel Kaliman; dopamina. HCl, BDH; FLA-63 bis-(4-metil-1-homopiperazinil tiocarbonyl)-disulfuro), Astra Labemedel A.B.; pirogalol, Analar; y β glicerofosfato de sodio, Merck.

Equipos. Se utilizó un espectrofotómetro Unicam SP-600 y un baño termoregulado Gallenkamp. Los homogeneizadores tipo Dounce fueron fabricados en el CNIC utilizando tubos de calibre constante. Las homogeneizaciones fueron calibradas, contando por triplicado el número de células enteras, por cada 500 núcleos libres de tres homogeneizados diferentes.

Obtención de los homogeneizados del tejido hepático. Luego de proporcionarles un golpe en la nuca, las ratas fueron decapitadas para desangrarlas, extrayéndose el hígado inmediatamente y depositándose en sacarosa 0,25 M. Luego de desmenuzarlo con una tijera, el hígado fue homogeneizado en un homogeneizador tipo Dounce. La operación se realizó con 7 subidas y bajadas del émbolo, procedimiento que lleva a la obtención de un 90 a un 95% de núcleos libres y a una actividad libre de fosfatasa ácida de un 17 a un 22% de la actividad total. Luego de filtrar por una malla fina de nylon, el homogeneizado se diluye con sacarosa 0,25 M para obtener una concentración de un 20% (peso húmedo). Durante todo su procesamiento la temperatura se mantuvo entre 0 y 4°C.

Determinación de la fosfatasa ácida lisosomal E.C.3.1.3.2. (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). Se empleó la técnica descrita por Appelmans y De Duve, (1955). Las concentraciones finales de los reactantes fueron las siguientes: β glicerofosfato de sodio 0,05 M, sacarosa 0,25 M y buffer acetato de sodio 0,05 M, pH 5. La incubación se realizó durante 10 minutos a 37°C en un baño termoregulado sin agitación. La reacción enzimática se detuvo por adición de TCA al 8% en la proporción 1:5 para obtener una concentración final del 6,6%. En el sobrenadante, después de 10 minutos en baño de hielo y previo filtrado por Whatmann No. 42, se determinó el fósforo inorgánico liberado, con la técnica de Tausky y Shoor, (1953).

Las actividades enzimáticas se expresan como μ moles de Pi liberados/hora/mg de proteína. Los controles se prepararon incubando las muestras con la mezcla reactante sin sustrato. Este, incubano aparte, fue adicionado después de haber añadido el TCA.

Con esta metódica se determinaron:

Fosfatasa ácida libre, (Pasa L). El homogeneizado se incubó en las condiciones antes descritas.

Fosfatasa ácida total, (Pasa T). Para determinar la actividad total de la enzima en el tejido, los lisosomas se lisaron incluyendo en el medio de incubación Tritón-X-100 al 0,02% (v/v), concentración a la cual se obtiene el máximo de ruptura lisosomal.

Fosfatasa ácida libre con preincubación, (Pasa Li) y fosfatasa ácida total con preincubación, (Pasa Ti). Se ha descrito que los lisosomas presentan un cierto grado de labilización al ser incubados a 37°C en sacarosa 0,25 M, a pH5 durante 30 minutos (Gianetto y De Duve, 1955). A la actividad fosfatásica resultante de la preincubación en estas condiciones, la denominaremos Pasa Li y Pasa Ti, y representan un índice de labilidad lisosomal (prueba de labilidad).

Determinación de proteínas. Se determinaron con el reactivo de biuret en muestras pretratadas con desoxicolato de sodio al 2,5% (p/v), concentración final, a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para disolver el material orgánico. Las lecturas se hicieron a 540 mμ usando como referencia una solución patrón de albúmina calibrada con el método de Kjeldahl.

Grupos experimentales. Los animales se dividieron por grupos y fueron tratados de la siguiente forma:

A las ratas tratadas con dopamina, ésta les fue administrada por vía subcutánea a la dosis de 2,2 μ moles/kg, y se sacrificaron una hora después.

A otro grupo de ratas se les administró Fla-63 por vía intraperitoneal a la dosis de 50 mg/kg (Svensson, 1973) y éstas se sacrificaron 3 horas más tarde.

Un tercer grupo se trató con ambas drogas anteriores a esas mismas dosis; siendo la dopamina administrada 2 horas después del Fla-63 y las ratas se sacrificaron una hora después de administrada la dopamina.

El grupo tratado con adrenalina se inyectó por vía subcutánea a la dosis de 2,2 μ moles/kg y las ratas se sacrificaron una hora después.

La iproniazida y el pirogalol se inyectaron por vía intraperitoneal.

La iproniazida se inyectó a la dosis de 100 mg/kg (*Zeller y cols., 1959*) dos y media horas antes de sacrificar a las ratas en todos los grupos en la que ésta se empleó. El pirogalol se inyectó en una primera dosis a 200 mg/kg una y media hora antes de sacrificar a los animales y a 50 mg/kg en dos dosis subsiguientes con intervalos de media hora (*Crout, 1961*).

En el grupo de ratas tratadas con adrenalina, pirogalol e iproniazida, se mantuvieron las dosis, vías de administración y tiempos señalados.

Los controles fueron inyectados con las soluciones disolventes de las drogas; recibiendo éstas un número de inyecciones iguales al grupo que recibió el mayor número de inyecciones (cuatro).

Interpretación y análisis de los resultados. Los resultados se compararon por la t-Student's.

Tanto los incrementos como los decrementos de las actividades libres de los diferentes grupos, comparados con el grupo control, siempre que las actividades totales no se alteren, son muestras de una mayor labilidad o estabilidad lisosomal respectivamente. Cuando los niveles de la actividad total se encuentren alterados, con relación al control, proponemos comparar los incrementos % de las actividades libres con respecto al control, con los incrementos % de las actividades totales con respecto al control:

$$\frac{(\text{Pasa L})_m - (\text{Pasa L})_c}{(\text{Pasa L})_c} \cdot 100; \quad \frac{(\text{Pasa T})_m - (\text{Pasa T})_c}{(\text{Pasa T})_c} \cdot 100$$

c: control; m: grupo experimental

Si al comprar estos valores no se observan diferencias entre ellos, se consideran las alteraciones en la actividad libre como consecuencia de las alteraciones de la actividad total. Si los valores de la primera expresión son mayores a los de la segunda expresión, inferiremos labilidad, y si es a la inversa, estabilidad.

De igual forma se buscarán los incrementos % que se producen en la prueba de labilidad empleando la siguiente forma:

$$\frac{(\text{Pasa Li} - \text{Pasa L})_m - (\text{Pasa Li} - \text{Pasa L})_c}{(\text{Pasa Li} - \text{Pasa L})_c} \cdot 100$$

y se compararán con el incremento % de la actividad total.

RESULTADOS

En la Fig. 1 puede observarse representada la actividad libre preincubada de la fosfatasa ácida lisosomal de los homogeneizados de hígados de ratas luego de realizada la prueba de labilidad. Se observa como en el grupo de ratas tratadas con dopamina esta actividad se diferencia significativamente ($p < 0,02$) de los otros grupos representados.

En la Tabla I observamos estos resultados expuestos en forma numérica. El incremento de un 20% con respecto al control del grupo tratado con dopamina en Pasa Li es significativo ($p < 0,02$). FLA-63, al ser inyectado solo, también provoca un aumento significativo de las actividades libres y totales. En el grupo tratado con ambas drogas, ambos efectos desaparecen.

En la Fig. 2 pueden observarse representadas las actividades de la enzima libre de los diferentes grupos de ratas luego de realizada la prueba de labilidad. Tanto en el grupo de ratas tratadas con adrenalina, como en el grupo de ratas tratadas con ella más los inhibidores de ambas enzimas degradativas, se observan incrementos de un 25 y un 33% respectivamente con relación al control ($p < 0,01$).

En la Tabla II observamos los valores de las actividades libres y totales de la fosfatasa ácida. Como vemos, el último grupo presenta aumentos en las actividades totales, y esto trae como consecuencia que la relación porcentual de la actividad libre con respecto a la total no pueda mostrar si efectivamente ha ocurrido una mayor labilidad. Si comparamos sin embargo, los incrementos % antes descritos, observamos que éstos son del orden de un 17% en la total, y los de la libre son del orden de un 33%. Esto nos señala, que no todo el incremento de la actividad libre pueda explicarse por aumento de la actividad total. Los incrementos % están representados en la Tabla III.

TABLA I

Actividades de la fosfatasa ácida lisosomal en homogeneizados de hígados de ratas tratadas con dopamina in vivo

Actividad enz.	Se expresan en μ moles de fosfato liberados/hora/mg de proteína				% de la actividad libre con respecto a la total	
	Pasa L	Pasa Li	Pasa T	Pasa Ti	L/T %	Li/Ti %
Control	0,229 $\pm$ 0,037 (15)	0,295 $\pm$ 0,045 (15)	1,13 $\pm$ 0,12 (15)	1,13 $\pm$ 0,13 (14)	20,4 $\pm$ 3,6 (15)	26,1 $\pm$ 3,7 (14)
DA	0,221 $\pm$ 0,045 (10)	0,354 $\pm$ 0,063 **	1,14 $\pm$ 0,20 (10)	1,03 $\pm$ 0,19 (10)	18,7 $\pm$ 2,5 (10)	35,8 $\pm$ 6,0 *
FLA-63	0,267 $\pm$ 0,022 *	0,306 $\pm$ 0,094 (5)	1,30 $\pm$ 0,15 *	1,33 $\pm$ 0,11 *	20,8 $\pm$ 3,1 (5)	20,6 $\pm$ 4,8 *
DA + FLA-63	0,245 $\pm$ 0,016 (5)	0,304 $\pm$ 0,010 #	1,12 $\pm$ 0,09 (5)	1,10 $\pm$ 0,08 ‡	21,4 $\pm$ 1,6 (5)	27,7 $\pm$ 1,5 #

Los números entre paréntesis indican la cantidad de ratas de cada grupo.

El FLA-63 (50 mg/Kg, i.p.), se inyectó 3 horas antes de sacrificar las ratas, y la dopamina (3,9 mg/Kg, s.c.) se inyectó 1 hora antes de ser sacrificadas.

* Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el control, $p < 0,05$.

Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el grupo DA, $p < 0,05$.

‡ Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el grupo FLA-63, $p < 0,05$.

** Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el grupo control, $p < 0,02$.

TABLA II

Actividades de la fosfatasa ácida lisosomal en homogeneizados de hígados de ratas tratadas con adrenalina y/o inhibidores de la monoamino oxidasa y catecol-O-metil transferasa

Actividad enz.	Se expresan en μm de fosfato liberados/hora/mg de proteína				% de la actividad libre con respecto a la total	
	Pasa L	Pasa Li	Pasa T	Pasa Ti	L/T %	Li/Ti %
Control	$0,229 \pm 0,037$ (15)	$0,295 \pm 0,045$ (15)	$1,13 \pm 0,12$ (15)	$1,12 \pm 0,13$ (14)	$20,4 \pm 3,5$ (15)	$26,1 \pm 3,7$ (14)
Adr	$0,293 \pm 0,020$ *	$0,364 \pm 0,058$ (6)	$1,14 \pm 0,16$ (6)	$1,10 \pm 0,15$ (6)	$25,9 \pm 3,2$ *	$29,8 \pm 1,9$ (6)
Pir	$0,229 \pm 0,024$ (6)	$0,270 \pm 0,025$ (7)	$1,19 \pm 0,08$ (7)	$1,16 \pm 0,12$ (7)	$19,0 \pm 1,5$ (6)	$23,4 \pm 3,0$ (7)
Ipr + Pir	$0,250 \pm 0,030$ (5)	$0,316 \pm 0,074$ (5)	$1,24 \pm 0,09$ (5)	$1,20 \pm 0,05$ (5)	$20,1 \pm 1,3$ (5)	$26,4 \pm 6,6$ (5)
Ipr+Pir+Adr	$0,250 \pm 0,050$ (5)	$0,393 \pm 0,077$ **	$1,32 \pm 0,09$ * #	$1,31 \pm 0,15$ * #	$18,8 \pm 3,8$ #	$29,8 \pm 3,0$ (5)

Los números entre paréntesis indican la cantidad de ratas en cada grupo.

La Iproniazida se inyectó a la dosis de 100 mg/Kg i.p., 2½ horas antes de ser sacrificadas las ratas, y la adrenalina a la dosis de 4 mg/Kg, s.c., 1 hora antes de ser sacrificadas. El pirogalol se comenzó a inyectar, i.p., 1½ horas antes de ser sacrificadas las ratas, y a intervalos de ½ hora de ahí en adelante, siendo la primera dosis 200 mg/Kg, y la segunda y tercera de 50 mg/Kg.

* Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el control, $p < 0,05$.

Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el grupo Adr, $p < 0,05$.

** Indica que hay diferencia significativa al comparar en cada columna el valor dado con el grupo control, $p < 0,01$.

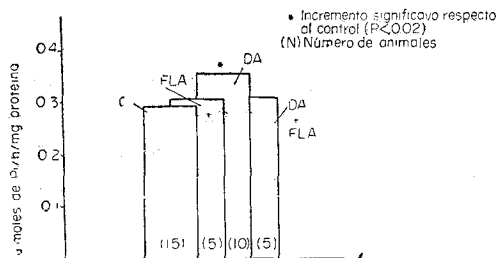


Fig. 1. Actividades fosfatásica libre preincubada (Pasa Li) en homogeneizados de hígado de ratas tratadas in vivo con dopamina.

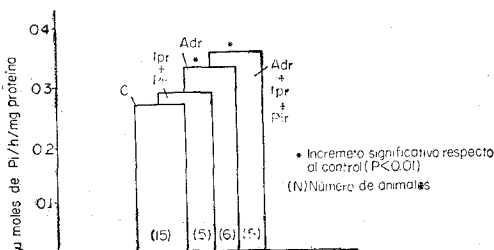


Fig. 2. Actividades de fosfatasa ácida libre preincubada (Pasa Li) en homogeneizados de ratas tratadas con Adrenalina e inhibidores de MAO y COMT.

TABLA III

Valores de los incrementos % de los grupos de ratas cuya actividad de la fosfatasa ácida total están aumentados significativamente con respecto al control

	$\frac{(Pasa T)_m - (Pasa T)_c}{(Pasa T)_c} \cdot 100$	$\frac{(Pasa L)_m - (Pasa L)_c}{(Pasa L)_c} \cdot 100$	$\frac{(Li-L)_m - (Li-L)_c}{(Li-L)_c} \cdot 100$	$\frac{(Pasa Li)_m - (Pasa Li)_c}{(Pasa Li)_c} \cdot 100$
FLA-63	16.6 % 	16.9 % 	-20.8 % 	3.7 % 
Ipr. + Pir. + Adren.	16.9 % 	9.2 % 	86 % 	33 % 

DISCUSION

Para el análisis de los resultados debemos separar éstos por grupos: los resultados relacionados con los efectos de la dopamina, los relacionados con el efecto producido por el FLA-63, los relacionados con los efectos de ambas drogas anteriores, y los relacionados con los inhibidores de las enzimas degradativas de las catecolaminas.

Efectos producidos por la dopamina sobre la labilidad lisosomal. En el grupo de ratas tratadas con dopamina observamos una mayor actividad de la fosfatasa ácida libre con posterioridad a la prueba de labilidad. Ya que las actividades de la fosfatasa ácida total y la libre no cambian, estos resultados pueden interpretarse como una acción labilizante de la dopamina in vivo sobre los lisosomas hepáticos.

Como se ha señalado la existencia de una dopamina hidroxilasa sérica (Markianos y Nyström, 1974), este efecto pudiera deberse a la dopamina per se o bien a su conversión en noradrenalina.

Efectos producidos por el FLA-63 sobre la labilidad lisosomal. En el grupo experimental de ratas tratadas con FLA-63, las actividades de la fosfatasa ácida total aumentan significativamente con respecto al control. Como ambas fosfatasas aumentan, esto nos sugiere que no se deba a una activación de la enzima durante la incubación sino a un mayor contenido enzimático en el homogeneizado, quedando como interrogante la posibilidad de una síntesis de novo de la enzima. Al analizar el resultado de la fosfatasa ácida libre podemos observar que su actividad se encuentra aumentada significativamente con respecto al control, pero que este aumento es proporcional al aumento observado en la fosfatasa ácida total, ambos del orden de un 17%. Sin embargo, con posterioridad a la prueba de labilidad la actividad enzimática no aumenta con relación al control sino que se mantiene igual a éste. Esto sugiere un efecto estabilizante del FLA-63. Al analizar los resultados por la expresión de los incrementos % con respecto a los controles nos da un incremento negativo de 21%. Ya que uno de los mecanismos involucrados en la prueba de labilidad usada en nuestros experimentos es la acción intrínseca de las catepsinas lisosomales (Fell y Dingle, 1963), podría señalarse también como posibilidad una inhibición de estas enzimas por la droga.

Efectos producidos por la dopamina más el FLA-63. Debido a los efectos del FLA-63, las interpretaciones en el grupo de ratas tratadas con ambas

drogas son difíciles de realizar. Es por esto que al comparar este grupo con el grupo control y encontrarlo en todo semejante, queda sin certeza si el FLA-63 pudo eliminar la acción de la dopamina al inhibir su paso a noradrenalina o si lo hizo al estabilizar la membrana lisosomal.

Efectos producidos en los grupos de ratas tratadas con los inhibidores de las monoamino oxidasas y catecol-O-metil transferasas. Los productos catabólicos de la adrenalina y la noradrenalina también guardan una estrecha relación estructural con ellas. Es razonable pensar que estos catabolitos aumenten su concentración al aumentar las concentraciones de catecolaminas circulantes, y que el efecto observado pudiese estar determinado por ellos. Sin embargo, en nuestros experimentos puede deducirse que ni los catabolitos generados por las monoamino oxidasas, ni los generados por las catecol-O-metil transferasas, ni los generados por la acción de ambas enzimas parecen contribuir al efecto labilizante de la adrenalina. Este efecto no sólo se mantuvo en presencia de los inhibidores de estas enzimas (iproniazida más pirogalol) sino que se acentuó. Un subproducto de interés en relación al catabolismo de las catecolaminas es el H_2O_2 que se genera en la reacción de desaminación oxidativa catalizada por las monoamino oxidasas. Ya que se ha observado una acción labilizante del H_2O_2 in vitro, podría pensarse en que éste fuera el mecanismo indirecto por el cual la adrenalina labiliza. Los resultados de estos experimentos descartan, creemos, esta posible explicación.

En cuanto al posible mecanismo de acción del efecto labilizante de la adrenalina, poco podemos aportar con relación a estos experimentos, salvo que el efecto labilizante parece ser debido a la adrenalina y no a sus productos catabólicos.

Un intermediario muy interesante a señalar es el AMP cíclico. Aunque experimentos de Ignarro señalan que este intermediario es un estabilizante lisosomal (Ignarro y George, 1973), experimentos de otros autores parecen sugerir lo contrario a nivel del tejido hepático. En el hígado tanto el glucagón como el AMP_c inducen autofagia (Deter y De Duve, 1967); Neely y Mortimore, 1973), y ha sido demostrada la relación entre la autofagia y la sensibilidad osmótica de los lisosomas (Neely y cols., 1974), encontrándose éstos aumentados de tamaño y vacuolizados. Al parecer estos cambios se deben a aumentos de la proteólisis, que como ya señalamos es probable que estén actuando en la prueba de labilidad que se emplea en estos experimentos.

CONCLUSIONES

En estos experimentos parece observarse que las catecolaminas producen un efecto labilizante per se, no debido a sus productos catabólicos. También se observó un posible efecto estabilizante lisosomal del FLA-63.

REFERENCIAS

- APPELMANS F. AND DE DUVE C. Tissue fractionation studies: 3— Further observations on the binding of acid phosphatase by rat liver particles. *Biochem. J.* 59, 426, 1955.
- BHAGAT B. D. Recent advances in adrenergic mechanism. Thomas B. T. Publisher, 1971.
- BIEL J. H., NUHFER P. A. AND CONWAY A. C. Structure and activity relationships of MAO inhibitors. *Annals of the N. Y. Acad. Sci.* 80, 568, 1959.
- CARLSON A. H., CORRODI L., FLORVALL L. AND ROSS S. The Swedish Patent Application 17198, 1967.
- CROUT J.R. Inhibition of catechol O methyl transferrases by pyrogallol in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 6, 47, 1961.
- DETER R. L. AND DE DUVE C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell. Biol.* 33, 437, 1967.
- FELL H. B. AND DINGLE J. T. Studies on the mode of action of excess vitamin A. *Biochem. J.* 87, 403, 1963.
- GIANETTO R. AND DE DUVE C. Tissue fractionation studies: 4— Comparative studies of the binding of acid phosphatase, β glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. *Biochem. J.* 59, 433, 1955.
- IGNARRO L.J., SLYWKA J. AND KRESSIKOFF N. Inhibition of lysosomal enzyme release by catecholamines. Probable mediation by c 3'5' AMP. *Life Sci.* 11, 1, 317, 1972.
- IGNARRO L. J. AND GEORGE W.J. Preservation of structural integrity of liver lysosomes and membrane stabilizing action of anti-inflammatory drugs, catecholamines and cAMP in isotonic salt media. *Biochem. Pharmacol.* 22, 1269, 1973.
- LOEGERING D.J., BONIN M.L. AND SMITH J.J. Effects of exercise, hypoxia and epinephrine on lysosomes and plasma enzymes. *Exp. and Mol. Path.* 22, 242, 1975.
- MARKIANOS VON E. AND NYSTRÖM I. Studies of dopamine β hydroxylase in serum. *Arzneimittelforschung* 24, 1021, 1974.

- NEELY A. N. AND MORTIMORE G. E. Reversible enlargement of hepatic lysosomes: Effects of insulin and amino acids. *Fed. Proc.* 32, 299, 1973.
- NEELY A. N., NELSON P. B. AND MORTIMORE G. E. Osmotic alterations of the lysosomes system during rat liver perfusion: reversible suppression by insulin and amino acids. *B. B. A.* 338, 458, 1974.
- NEFF N. H. AND COSTA E. Application of steady state kinetics to the study of catecholamines turnover after MAO inhibition or reserpine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 160, 40, 1968.
- NIKOJEDEVIC B., SENOI S., DALY J. W. AND CREVELING C. R. Catechol-O-methyl transferase II. A new class of inhibitors of COMT: 3,5-dihydroxy-4 methoxybenzoic acid and related compounds *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174, 83, 1970.
- SVENSSON T. H. AND WALDECK B. On the significance of central NA on motor activity: experiments with a new dopamine β hydroxylase inhibitor. *Eur. J. Pharm.* 7, 278, 1969.
- SVENSSON T. H. Thesis. Dptm. Pharmacol. Univ. Gottenburg. 1971.
- SVENSSON T. H. Increase of dopamine concentrations in the striatum in the mouse by FLA-63, a dopamine β Hydroxylase inhibitor. *J. Pharm. Pharmac.* 25, 73, 1973.
- TAUSKY H. H. AND SHOOR E. A microcolorimetric method for the determination of organic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202, 675, 1953.
- UPMANN C. M. Determinaciones de fosfatasa ácida lisosomal en homogeneizados de hígados de ratas tratadas con catecolaminas e iproniazida. *Revista Cenic* 5, 2, 13, 1974.
- UPMANN C. M. Tesis Dpto. Bioquímica del Cenic. Cuba, 1975.
- ZELLER P., PLETSCHER A., GEY K. F., GUTMANN H., HEGEDÜS B. AND STRAUB O. Amino acid and fatty acid hydrazides: Chemistry and action on monoamino oxidase. *Annals of the N. Y. Acad. Sci.* 80, 555, 1959.