

1 ejem
N° 15



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**INTERACCIONES TAURINA-CALCIO: POSIBLE MECANISMO
DE LA ACCION ANTICONVULSIVA DE LA TAURINA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Ma. Elena Arzate Valdés

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Introducción.....	1
Materiales y Métodos	9
Resultados	12
Discusión	19
Referencias	26

INTRODUCCION

TAURINA

La taurina (ac. 2-amino etano sulfónico), es un aminoácido azufrado que fue descubierto hace aproximadamente un siglo en la bilis del toro (1). En los años siguientes a su descubrimiento fue demostrada su presencia en una amplia variedad de tejidos animales. La taurina se encuentra desde los grupos más elementales de la escala filogenética, como protozoarios, grupos de metazoarios simples, poríferos, braquiópodos y sipuncúlidos (2). El Phylum de los moluscos es el grupo en el cual se encuentran probablemente los niveles más altos de taurina. Se ha descrito también su presencia en anélidos (poliquetos), en artrópodos y en crustáceos marinos donde los niveles de este aminoácido en el músculo son considerables (2). En los vertebrados, la taurina ha sido identificada en diversos tejidos de urocordados y en todos los Phyla de los cordados se encuentra como un componente normal de gran número de tejidos. En anfibios, reptiles y aves se localiza particularmente en los tejidos muscular y nervioso (2). En los mamíferos, la taurina tisular se encuentra en concentraciones milimolares, siendo éstas particularmente elevadas en los músculos esquelético, cardíaco y liso, en las glándulas de secreción interna, en el bazo, el riñón y la retina. El cerebro contiene también niveles muy elevados de taurina, entre 2 y 10 mM. La distribución regional de este aminoácido ha sido estudiada en el cerebro de la rata (3, 4, 5), el gato (6) y en el cerebro humano (7, 8), encontrándose que ciertas regiones tales como la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo raquídeo y el cerebelo,

contienen altos niveles de taurina, de 6 a 10 mM, (6,9,10) mientras que en otras como la médula espinal, el hipotálamo y el cuerpo estriado, sus niveles son de 2 a 5 veces menores. Esta distribución heterogénea podría ser indicativa del papel funcional de este aminoácido en áreas específicas del sistema nervioso central.

Una observación interesante es que la taurina total del cerebro se incrementa en el feto en desarrollo (11), llegando a su máximo - aproximadamente al tiempo del destete (3), y decreciendo de allí lentamente con la edad (12); ésto ha llevado a suponer que la taurina pudiera tener un papel como factor del crecimiento en ciertos tejidos (13).

Por lo que respecta a la síntesis de la taurina, sus vías de formación parecen ser múltiples y no están totalmente esclarecidas. Su precursor es la cisteína y la vía mas conocida es aquella en la que - por oxidación de la cisteína se forma el ácido cisteinsulfínico, el cual se descarboxila para dar lugar a la hipotaurina, y ésta mediante una oxidación originará la taurina (14, 15, 16). Tanto los intermediarios como las enzimas de esta vía de síntesis han sido encontrados en el tejido nervioso así como en la mayoría de los tejidos animales (17). La degradación metabólica de la taurina se ha descrito como una lenta conversión a ácido isetiónico a través de una reacción de transaminación (4, 18).

El recambio de las pozas tisulares de taurina, en los animales - carnívoros al menos, está en función sobre todo, de las velocidades relativas de los procesos de captación y eliminación. El recambio de

la taurina es rápido en tejidos tales como el hígado, el riñón y las glándulas suprarrenales, y lento en el cerebro, el corazón y el músculo esquelético (19).

A pesar de que la taurina se encuentra presente en la mayoría de los grupos de la escala zoológica y en la mayor parte de los tejidos, a veces en muy altas concentraciones, su función aún no es clara. En el sistema nervioso central se ha pensado que podría ser un neurotransmisor inhibitorio, ya que cuando es aplicado iontoforéticamente produce un efecto hiperpolarizante en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso (20, 21, 22, 23). Esta acción parece estar relacionada con una modificación de la permeabilidad de la membrana al potasio y al cloro (24). Sin embargo, este efecto depresor de la taurina es muy generalizado ya que un gran número de neuronas responden a sus acciones. Por otra parte, no se han encontrado antagonistas específicos para el efecto de este aminoácido, pues en médula espinal su acción se ve antagonizada por la estricnina y en corteza cerebral por la bicuculina (20, 25), sustancias que son conocidas como bloqueadores - específicos de los efectos de la glicina y del GABA (ácido gamma aminobutírico), respectivamente. Esto puede deberse a la similitud estructural de la taurina con estos aminoácidos lo que le permitiría el acceso a sus receptores y la consiguiente modificación en la membrana postsináptica. La especificidad del efecto de la taurina, por lo tanto, debe aguardar a la identificación de un antagonista particular a la acción de este aminoácido. Una característica que podría asimismo identificar a la taurina como un neurotransmisor, es el hecho de que se ha encontrado un sistema de captación de alta afinidad para este aminoácido en termina-

ciones sinápticas aisladas (26, 27), el cual es dependiente de sodio y energía. Por otra parte, la liberación de la taurina es estimulada por agentes depolarizantes (28, 29, 30), pero a diferencia de lo observado para la mayoría de los neurotransmisores, esta liberación es independiente de calcio (31, 32), lo que la hace diferente de la observada en la mayoría de los neurotransmisores conocidos. Como consecuencia de estas observaciones, el papel de la taurina como neurotransmisor se ha puesto en duda y se ha considerado como una alternativa - la posibilidad de que actuara como neuromodulador, modificando la liberación de neurotransmisores, o que estuviera involucrada en la función sináptica de alguna manera no aclarada hasta ahora. Por otra parte, se ha demostrado que la taurina regulariza el ritmo cardíaco en arritmias producidas por adrenalina (33, 34) y que sus niveles en el corazón aumentan en individuos con insuficiencia cardíaca congestiva (35), y en tejido muscular en casos de distrofias congénitas (36). Estas observaciones y la alta concentración de taurina en tejido musculares y cardíaco han sugerido su participación en fenómenos contráctiles. Su acción se ha situado a nivel del transporte de potasio y/o calcio, tanto por lo que respecta a sus efectos farmacológicos como a su posible función en el tejido normal.

En el sistema nervioso, la acción de la taurina como anticonvulsivo ha sido estudiada a raíz de que se observara una diferencia en las concentraciones de este aminoácido entre un foco epileptógeno y el tejido perifocal (37, 38), tanto en humanos como en animales de experimentación. Esta observación provocó que se llevaran a cabo los primeros

experimentos sobre el efecto de la taurina como agente anticonvulsivo. A partir de entonces la taurina se conoce como un eficaz agente protector contra las convulsiones producidas en diferentes modelos experimentales de epilepsia como son los causados por la ouabaina, la estriquina, la penicilina, o el cobalto (37, 39, 40, 41). También se han llevado a cabo estudios sobre su acción antiepiléptica en humanos con resultados prometedores (40, 42, 43). Un aspecto interesante de la acción de la taurina como anticonvulsivo es que, a diferencia de las drogas comúnmente usadas, se trata de un componente natural de los tejidos excitables y parece actuar restaurando las condiciones fisiológicas del sistema nervioso, al menos en lo que respecta a los niveles de aminoácido, alterados en el foco epileptógeno (37). El mecanismo por el cual la taurina lleva a cabo su acción anticonvulsiva se desconoce. Se ha sugerido que podría ser consecuencia de su posible acción como neurotransmisor inhibitorio o en forma más general, como modulador de la excitabilidad neuronal, en virtud de su acción sobre la amplia variedad de modelos convulsivos y el gran número de neuronas sensibles a su acción depresora. El mecanismo por el cual la taurina podría estar ejerciendo este efecto neuromodulador puede situarse a varios niveles, uno de ellos sería a través de una modificación en el transporte y la redistribución de calcio en la membrana, pues se conoce que existe una relación clara entre estos procesos y el estado de excitabilidad de las membranas neuronales. Estos mecanismos podrían ser modificados por la taurina, pues como se ha observado recientemente, este aminoácido reduce el transporte de calcio a la terminal nerviosa (44), pro-

bablemente manteniéndolo en la vecindad de la membrana. Otra posibilidad sería la de una acción de la taurina a nivel de la liberación de neurotransmisores, que se ha sugerido por la observación de un decremento producido por la taurina en la liberación de GABA de sinaptosomas aislados de cerebro de rata (45).

4-AMINOPIRIDINA

La 4-aminopiridina (4-AP) es una droga que tiene un considerable interés para la investigación de los mecanismos de la transmisión sináptica, ya que aparentemente incrementa en forma selectiva la liberación de neurotransmisores, tanto en placa neuromuscular como en otros tipos de sinapsis. El estudio de la 4-AP cobró interés cuando se vio que esta droga era entre 20 y 30 veces más potente que el tetraetilamonio y la guanidina en la recuperación de la parálisis producida por la inyección de toxinas botulínicas, las cuales actúan reduciendo la liberación de neurotransmisores específicos (46). En vista de esta observación, se sugirió que la 4-AP aumenta la liberación de neurotransmisores mediante un incremento en los niveles de calcio libre dentro de las terminales nerviosas presinápticas.

Más adelante, el efecto de la 4-AP incrementando la liberación de neurotransmisores se demostró en una amplia variedad de preparaciones biológicas. La 4-AP produce un aumento en la liberación de acetilcolina de las terminaciones nerviosas motoras, así como de las de los nervios autónomos colinérgicos (47, 48, 49). En el bazo, la 4-AP produce un incremento en la liberación de norepinefrina (50). Un efecto similar se observa en el conducto deferente y en diversas preparacio-

nes vasculares, in vitro (51,52,53).

En el sistema nervioso central de vertebrados se ha visto que la 4-AP incrementa los reflejos monosinápticos, facilitando la transmisión tanto en vías excitatorias como inhibitorias de la médula espinal (54,55,56); esto ha sugerido que esta droga actúa de manera inespecífica provocando un incremento en los potenciales postsinápticos en ambos tipos de sinapsis.

Una posible explicación a estos efectos generalizados de la 4-AP sería que este compuesto sustituyera al calcio en el proceso de liberación de neurotransmisores y de esta manera aumentara su liberación; sin embargo, se ha demostrado en diferentes ocasiones que la 4-AP no produce sus efectos en ausencia de calcio extracelular (46,47). Con estos resultados se descarta la posibilidad de que la droga reemplace al calcio o libera iones de calcio de sitios intracelulares en la terminal nerviosa durante la liberación estimulada. Con el mismo enfoque existen experimentos realizados recientemente en médula espinal de rana en donde se demuestra que la depresión provocada por EGTA o magnesio es antagonizada por la acción facilitadora de la 4-AP (56). Estas observaciones sugieren que esta droga aumenta la transmisión sináptica por interactuar con los flujos de entrada de calcio necesarios para que se lleve a cabo la liberación de neurotransmisores, probablemente a través de afectar la permeabilidad al calcio actuando sobre los canales de calcio sensibles a voltaje.

TAURINA y 4-AP

Tomando en consideración por una parte, que la 4-AP incrementa la

actividad del sistema nervioso en el sentido de aumentar la liberación de neurotransmisores inespecíficamente, probablemente a través de un incremento en la entrada de calcio a la terminal y por otra parte que la taurina podría ejercer su efecto anticonvulsivo por medio de restablecer la excitabilidad de la membrana modulando flujos de calcio, en este trabajo se estudió el efecto antagónico de ambas sustancias, tanto in vivo como in vitro. In vivo se probó el posible efecto protector de la taurina contra las convulsiones producidas por la 4-AP; in vitro, y con el objeto de profundizar en el mecanismo de la acción anticonvulsiva de la taurina, se estudió el efecto de la 4-AP sobre el transporte de calcio en presencia y ausencia de taurina, en terminaciones nerviosas aisladas de cerebro de ratón.

MATERIALES Y METODOS

Inyección de drogas.

Se utilizaron ratones de 15-17 días que pesaban entre 5-6 g . Los ratones se inyectaron intraperitonealmente, en grupos de seis animales, con taurina, 4-AP, ácido etilendiamino-tetracético (EDTA), GABA y glicina, a los tiempos indicados en cada experimento. Las dosis utilizadas fueron las siguientes: taurina, 2.66 y 1.33 g/kg; GABA y glicina, 2.66 g/kg, 4-AP, 5mg/kg, y EDTA, 200 μ moles/kg.

Separación de terminaciones nerviosas aisladas (Sinaptosomas).

Para medir la acumulación de ^{45}Ca en la fracción sinaptosomal cruda (P_2), ésta se preparó por el método de Gray y Whittaker (58). Los ratones se sacrificaron por decapitación y los cerebros se homogeneizaron en sacarosa 0.32 M (10% peso/volumen). El homogeneizado se centrifugó a 900 x g, durante 10 minutos y el sedimento se lavó en el mismo volumen de sacarosa y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, el sedimento corresponde a la fracción nuclear (P_1). Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se mezclaron y se centrifugaron durante 20 min a 9 000 x g; el sedimento de esta centrifugación se resuspendió en el mismo volumen de sacarosa 0.32 M y se repitió la centrifugación. El sedimento así obtenido corresponde a la fracción sinaptosomal cruda (P_2) la cual se resuspendió en glucosa 0.32 M. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C.

Captación de ^{45}Ca .

Se tomaron alícuotas de la fracción sinaptosomal conteniendo entre 0.7 y 1.0 mg de proteína y se incubaron a 37°C durante 5 minutos, con agitación, en un ml de los siguientes medios dependiendo de los parámetros a observar:

- Medio Krebs-bicarbonato: NaCl 118 mM; KCl 4.7 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; -- MgSO_4 1.17 mM; CaCl_2 2.5 mM; NaHCO_3 25 mM; y glucosa 5.6 mM.
- Medio Blaustein: NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgCl_2 1.3 mM; CaCl_2 0.1 mM; glucosa 5 mM; TRIS 50 mM; pH 7.4
- Medio despolarizante: NaCl 73 mM; KCl 77 mM; MgCl_2 1.3 mM; CaCl_2 -- 0.1 mM; glucosa 5 mM; TRIS 50 mM; pH 7.4
- Medio con veratrina: composición idéntica a la del medio Blaustein conteniendo veratrina 1.6 mg/ml

Todos los medios de incubación contenían además $^{45}\text{CaCl}_2$ y la taurina, 4-AP o ambos se agregaron en las concentraciones indicadas en cada experimento.

Después de la incubación se tomaron alícuotas de 0.3 ml y se centrifugaron por un minuto en una microfuga Beckman. El sedimento se lavó superficialmente con agua destilada y se solubilizó con 0.3 ml de NCS (solubilizador de tejidos, Amersham) y la radioactividad incorporada se midió adicionando 5 ml de Tritosol (PPO, 3 g; Tritón X-100, 27 ml; Etilenglicol, 37 ml; Etano, 106 ml y Xilol, 600 ml, para un volumen final de un litro).

Con el propósito de excluir el pegado inespecífico de $^{45}\text{CaCl}_2$ se hicieron blancos en paralelo en cada experimento, en los que el tejido se incubó con MgSO_4 (20 mM) y rojo de ruténio (20 μM). Los valores obtenidos en los tubos en estas condiciones fueron restados a los valores

de los tubos experimentales en todos los casos.

Captación de ^{35}S -taurina en cerebro de ratón in vivo.

Se estudiaron 4 lotes de ratones de 12-15 días, cada lote de 4 - animales, los que se inyectaron intraperitonealmente con taurina a una dosis de 2.66 g/kg conteniendo 10 μCi de ^{35}S -taurina. El primer lote se sacrificó a los 15 min, tomando una muestra de sangre y de corteza cerebral por duplicado, los siguientes lotes se sacrificaron a los -- 30, 60 y 90 min. Las muestras de sangre se colectaron en tubos conteniendo heparina (400 unidades/ml) y se centrifugaron inmediatamente a 500 x g por 20 min para obtener el plasma. A 0.5 ml de plasma se les agregaron 0.5 ml de NCS y los tubos se calentaron durante 30-40 min - para solubilizar el tejido. Las muestras de corteza cerebral se pesaron y se solubilizaron con NCS (0.5 ml) y se midió la radioactividad acumulada expresándose los resultados en cpm/mg de tejido.

Determinación de proteínas.

Se llevó a cabo por el método de Lowry y colaboradores (59) utilizando una curva patrón de albúmina desarrollada paralelamente a los datos experimentales.

RESULTADOS

Efecto de la 4-AP

Para el estudio de los efectos in vivo de la 4-AP, se probaron diferentes dosis de esta droga inyectada por vía intraperitoneal. La dosis seleccionada fue de 5 mg/kg. Con esta dosis se presentó un cuadro muy reproducible de alteraciones motoras en los ratones, a tiempos muy definidos y marcadamente constantes de experimento a experimento. Estas alteraciones consistieron en temblores generalizados, que se iniciaron entre los 5 y 6 minutos después de la inyección de la 4-AP y que fueron seguidos por movimientos circulares y convulsiones clónicas a los 5-7 min después de la inyección. Aproximadamente en un 80% de los animales se presentaron convulsiones tónicas típicas 20 min después de la administración de la droga y la mayor parte de los ratones murieron durante las mismas.

Los parámetros utilizados para cuantificar el efecto de la taurina sobre las alteraciones motoras producidas por la 4-AP fueron: -

- 1) tiempo de latencia en la iniciación de los desórdenes motores.
- 2) presentación de convulsiones tónicas, expresada en forma porcentual.
- 3) mortalidad postconvulsiva, también expresada en forma porcentual.

Efecto de la taurina contra las convulsiones producidas por 4-AP.

La inyección intraperitoneal de la 4-AP a una dosis de 5 mg/kg provocó la muerte de un 80-90% de los animales; esta cifra se redujo a 30% cuando la taurina se inyectó a una dosis de 2.66 g/kg, media hora antes de la administración de la 4-AP; esta protección no se observó

cuando la taurina se inyectó a la mitad de la dosis (Fig. 1). La aplicación de la taurina media hora o quince minutos antes de la inyección de la 4-AP redujo asimismo el porcentaje de muertes post-convulsivas a 22% y 25%, respectivamente. (Fig. 2).

Se midió también el efecto de la taurina sobre el tiempo de iniciación de las alteraciones motoras; este estado de excitación en los animales se presentó regularmente después de la inyección de la 4-AP entre 5 y 7 minutos. Cuando se administró la taurina media hora antes de la inyección de 4-AP, se observó un retardo en la aparición de estas alteraciones que se presentaron a los 20 min en los animales tratados con taurina y a los 7 en los controles (Fig. 3A). Cuando la taurina se inyectó 15 min o una hora antes de la administración de la 4-AP el retraso en la aparición de convulsiones clónicas fue menor (Fig. 3,B,C). El efecto de la taurina sobre la frecuencia de aparición de convulsiones tónicas se observa en la Fig. 4. Después de la inyección intraperitoneal de la 4-AP se presentaron convulsiones tónicas en un 90% de los ratones que generalmente antecedían a la muerte del animal. Después de la inyección de la taurina, media hora antes de la inyección de la 4-AP, el porcentaje de convulsiones tónicas se redujo a un 30% (Fig. 4 A). Tal como se observó para los otros parámetros estudiados, cuando la taurina se administró quince min o una hora antes (Fig. 4, B.C.), su efecto protector sobre la frecuencia de convulsiones tónicas fue menor.

Efecto de GABA y glicina.

Con el propósito de verificar si el efecto anticonvulsivo de la

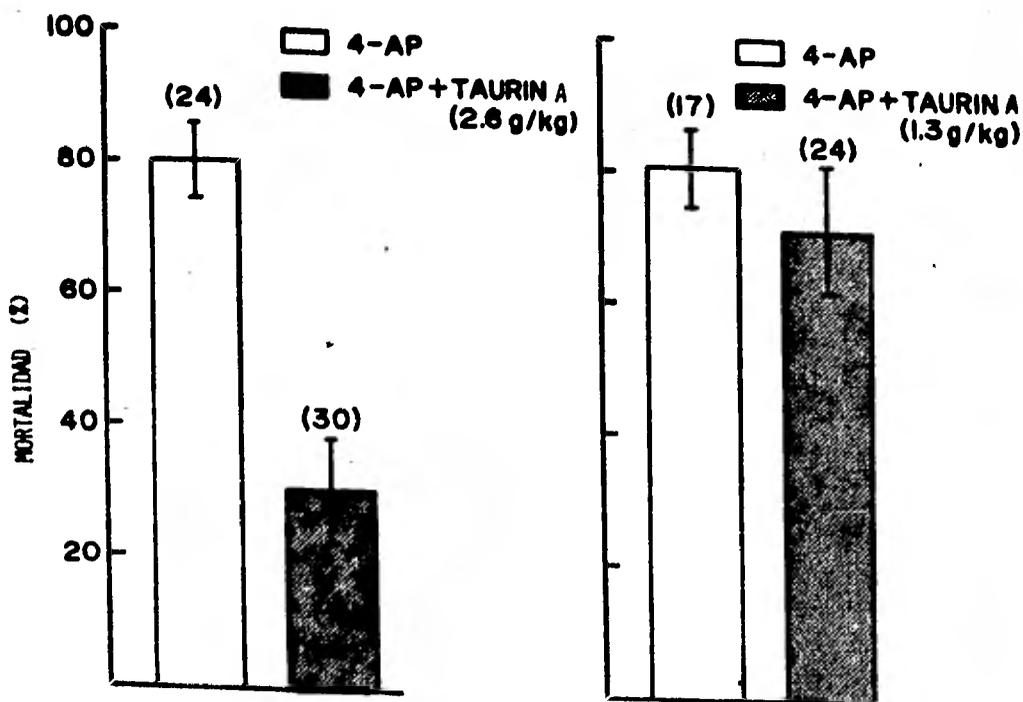


Fig. 1 Efecto de taurina (2.66 g/kg y 1.33 g/kg) sobre la letalidad inducida por 4-AP (5 mg/kg). Se utilizaron ratones de 12-15 días. Las dosis de taurina fueron administradas media hora antes de la inyección de 4-AP, ambos tratamientos por vía intraperitoneal. (Promedio y error standard de los animales indicados entre paréntesis).

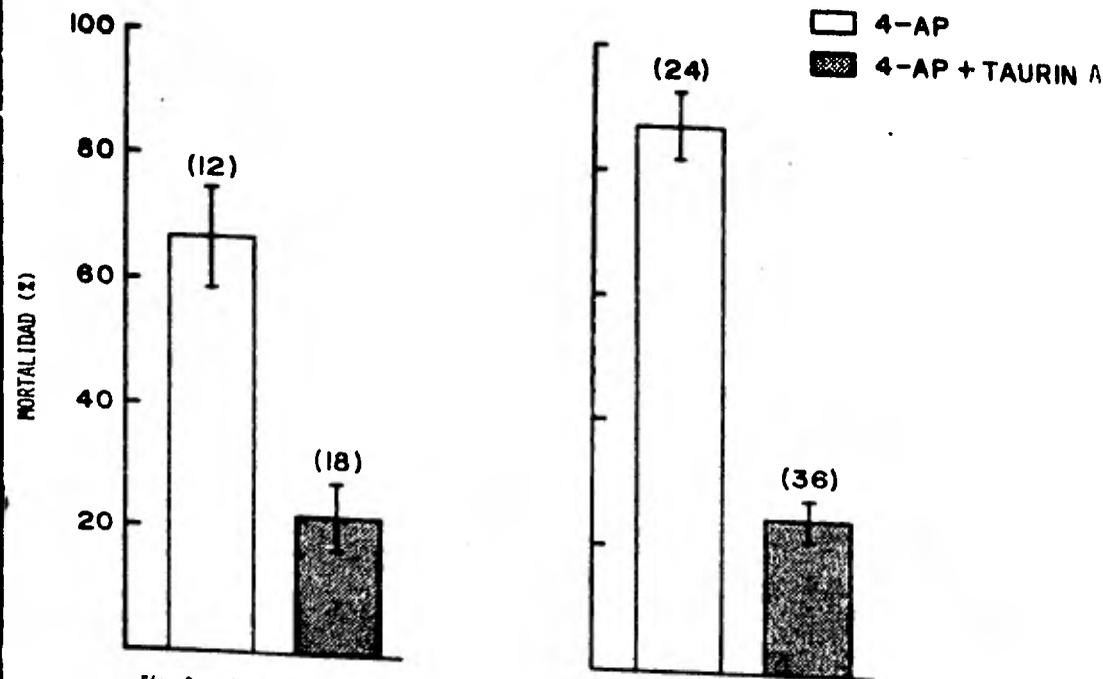


Fig. 2 Efecto de la inyección de taurina (2.66 g/kg) a diferentes tiempos, sobre la letalidad inducida por 4-AP (5 mg/kg). La gráfica de la izquierda muestra el efecto de la inyección intraperitoneal de taurina, cuando se administró media hora antes de la inyección de 4-AP. La gráfica de la derecha muestra el efecto de la taurina cuando se inyectó 15 min antes de la inyección de 4-AP. (Promedio y error standard del número de animales que se indica entre paréntesis).

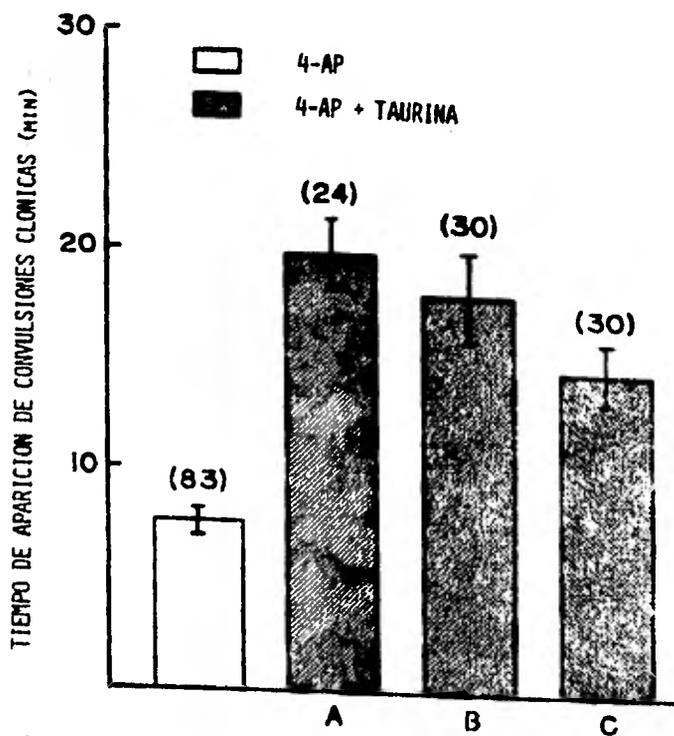


Fig. 3. Efecto de taurina sobre el tiempo de aparición de convulsiones clónicas inducidas por 4-AP (5 mg/kg). La taurina se administró en una dosis de 2.66 g/kg a los siguientes tiempos: (A) 30 min (B) 15 min y (C) una hora antes de la inyección de 4-AP. (Promedio y error standard del número de animales que se indica entre paréntesis).

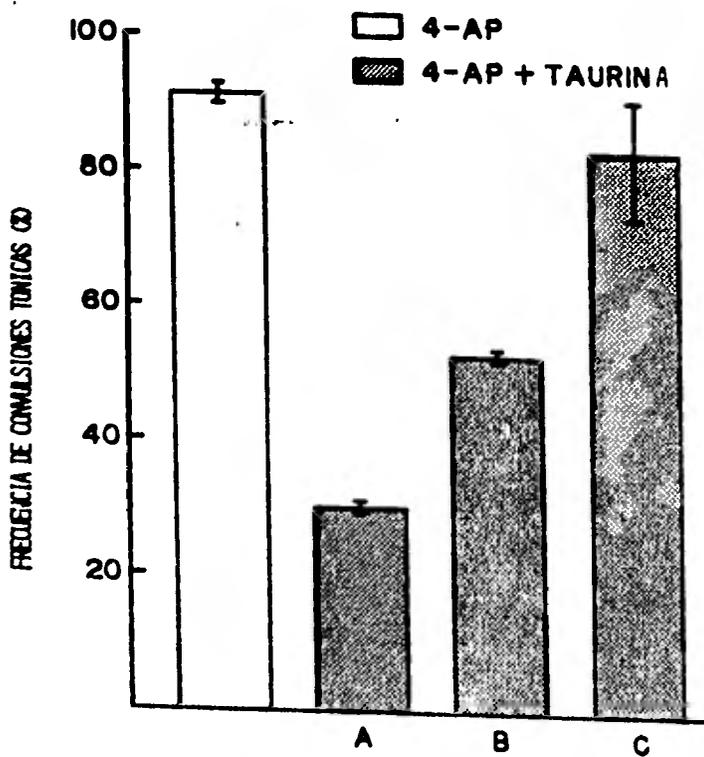


Fig. 4. Efecto de la taurina (2.66 g/kg) sobre la frecuencia de aparición de convulsiones tónicas inducidas por 4-AP (5 mg/kg). (A) 30 min, (B) 15 min (C) una hora antes de la inyección de 4-AP. (Promedio y error standard del número de animales que se indica entre paréntesis en la Fig. 3)

taurina era específico, se probaron dos aminoácidos neuroactivos, que presentan un efecto depresor sobre la actividad neuronal aún más potente que la taurina, el GABA y la glicina. Estos aminoácidos se administraron en la dosis y tiempo optimos observados para el efecto anticonvulsivo de la taurina, es decir, 2.66 g/kg y media hora antes de la administración de la 4-AP. El resultado se observa en la Fig. 5, en donde se demuestra la especificidad del efecto anticonvulsivo de la taurina, pues la glicina y el GABA lejos de reducir la mortalidad de los animales la incrementaron a un 100% y ninguno de los parámetros observados, tales como el tiempo de aparición de convulsiones clónicas o la frecuencia de convulsiones tónicas se modificó favorablemente por dichos aminoácidos.

Efecto del EDTA.

Con el propósito de esclarecer el probable mecanismo a través del cual la taurina está ejerciendo su acción anticonvulsiva, se inyectó intraperitonealmente un quelante de calcio (EDTA), en una dosis de 200 μ mol/kg, 15 min antes de la inyección de la 4-AP. En estas condiciones se observó una potenciación de la mortalidad producida por la 4-AP, debido probablemente por un efecto sumatorio de la droga y el EDTA. El efecto anticonvulsivo de la taurina se modificó substancialmente en presencia del EDTA. La Fig. 6 muestra que cuando se inyectó el EDTA 15 min antes de la inyección de taurina, el efecto protector del aminoácido no se observó (Fig. 6) y la mortalidad postconvulsiva de los animales inyectados con 4-AP no fue diferente de aquellos que recibieron 4-AP y taurina.

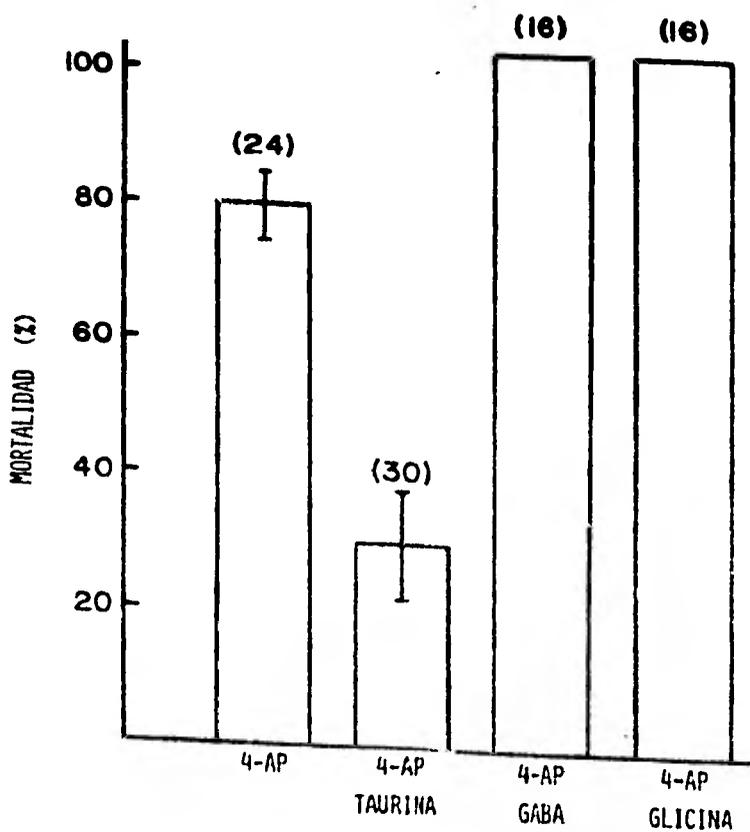


Fig. 5 Efecto del GABA y glicina sobre la mortalidad inducida por 4-AP. El GABA, la glicina y la taurina se inyectaron en una dosis de 2.66 g/kg media hora antes de la inyección de 4-AP (5 μ g/kg). (Promedio y error standard del número de animales que se indica entre paréntesis).

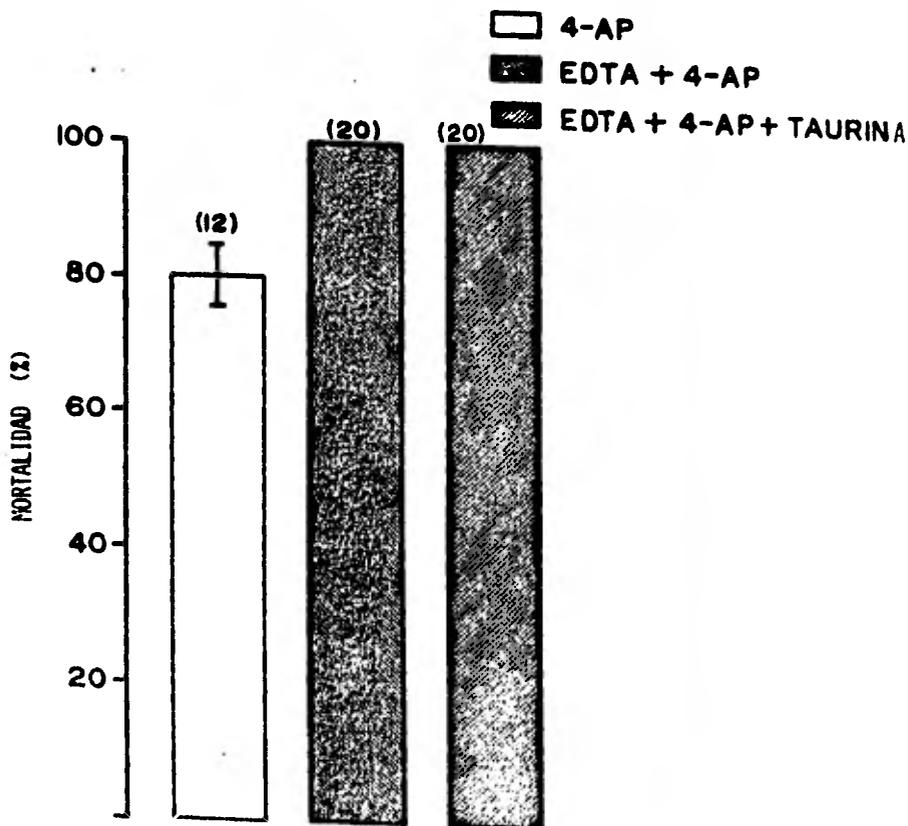


Fig. 6 Efecto de EDTA y taurina sobre la mortalidad en ratones tratados con 4-AP. El EDTA se administró en una dosis de 0.2 μ moles/g 15 min antes de la inyección de 4-AP. Los animales tratados con taurina (2.66 g/kg) se les inyectó este aminoácido 15 min antes de la inyección de EDTA, y 30 min después se administró la 4-AP. (Promedio y error standard del número de animales que se indica entre paréntesis).

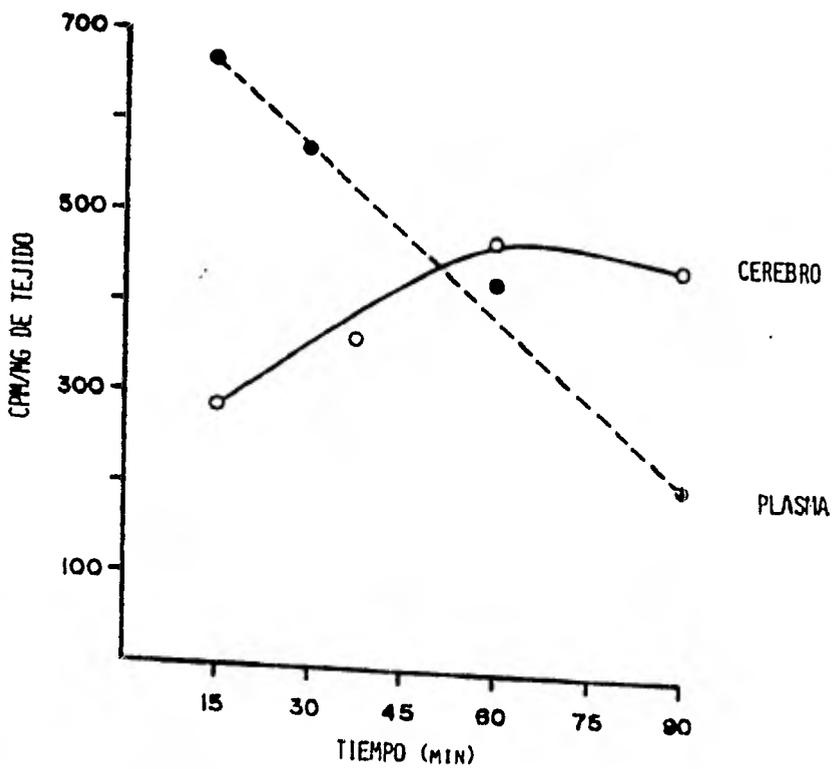


Fig. 7. Captación de ^{35}S -taurina en cerebro de ratón in vivo. La taurina se inyectó intraperitonealmente en una dosis de 2.66 g/kg conteniendo 10 uCi de ^{35}S -taurina. Cada dato es promedio de 4 animales.

Captación de taurina en el cerebro de ratón, in vivo.

Con el objeto de medir el tiempo óptimo de acumulación de la taurina en el cerebro, se inyectó ^{35}S -taurina, intraperitonealmente a ratones de 15-17 días de edad y los animales se sacrificaron a diferentes tiempos. Se tomaron muestras paralelamente de cerebro y de sangre cada 15 min para seguir el trayecto de la marca. En la Fig. 7 se observa que en el cerebro la acumulación de radioactividad se incrementó progresivamente desde los 15 min hasta una hora, tiempo en el que se alcanzó el máximo de acumulación. En el mismo tiempo se observó un descenso correspondiente de la radioactividad en la sangre.

Efectos de la taurina y la 4-AP sobre la acumulación de ^{45}Ca en terminales nerviosas aisladas de cerebro de ratón.

La captación de ^{45}Ca por los sinaptosomas aislados de cerebro de ratón se midió en 2 condiciones experimentales: 1) en un medio conteniendo CaCl_2 a una concentración de $100\ \mu\text{M}$, y usando amortiguador TRIS (Medio Blaustein) y 2) en un medio Krebs-bicarbonato conteniendo $2.5\ \text{mM}$ de CaCl_2 . Estos dos medios se utilizaron debido a que en el primero se ha estudiado el efecto de despolarizantes de acción bien conocida, que inducen un incremento en la captación de calcio a través de los canales sensibles a voltaje y nos interesaba comparar su efecto con el de la 4-AP, en experimentos paralelos. El segundo medio fue utilizado debido a que su composición iónica refleja la del medio extracelular y la del líquido cefalorraquídeo.

La Fig. 8 muestra el efecto de la 4-AP sobre la captación de ^{45}Ca en el medio Blaustein, en presencia de condiciones despolarizantes. Al

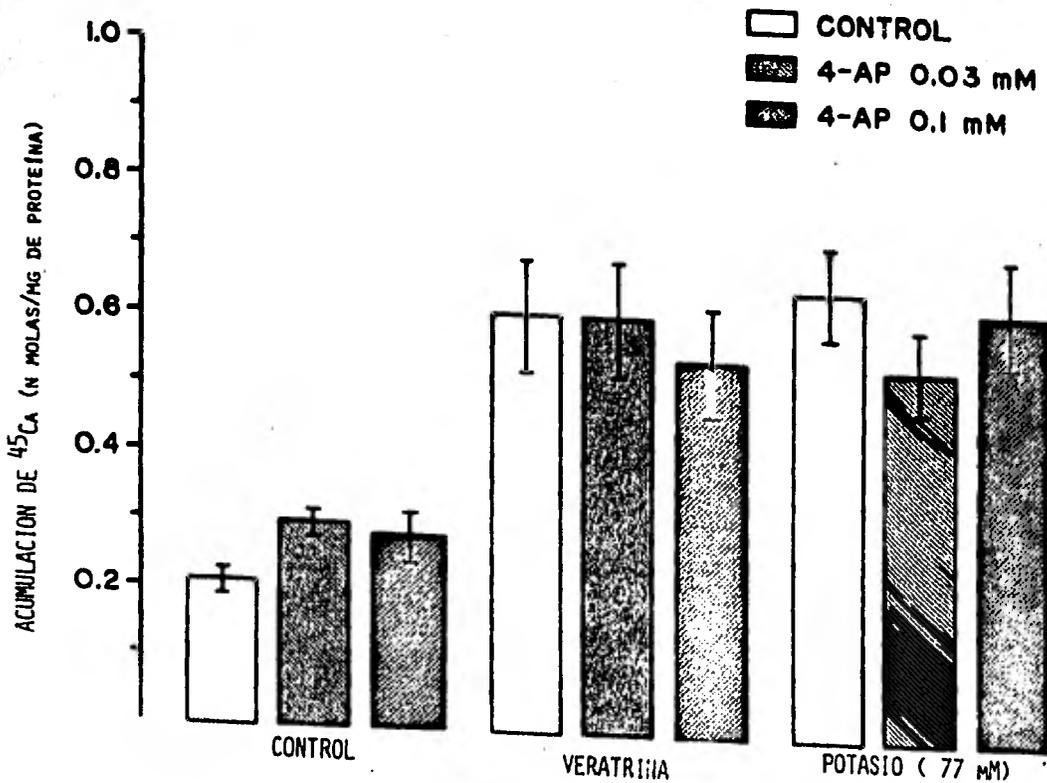


Fig. 8 Efecto de diferentes concentraciones de 4-AP y depolarizantes sobre la acumulación de ^{45}Ca en sinaptosomas de cerebro de ratón en medio Blaustein. Las concentraciones de 4-AP fueron 0.033 mM y 0.1 mM. Los medios depolarizantes contenían KCl 77 mM o veratrina 1.6 mg/ml. (Promedio y error estándar de 5 experimentos).

agregar la 4-AP al medio de incubación a concentraciones de 0.33 y 0.1 mM se observó un ligero aumento sobre la acumulación de ^{45}Ca - equivalente a 47% sobre el control. Cuando la incubación se llevó a cabo en medios despolarizantes, ya sea por su alta concentración de potasio (77 mM) o por la presencia de veratrina (1.6 mg/ml), se observó un aumento muy significativo en la acumulación de ^{45}Ca , aproximadamente de 200%, en las dos condiciones (Fig. 8). La 4-AP adicionada a estos medios no sumó su efecto al de ellos. La taurina no modificó la acumulación de ^{45}Ca por sinaptosomas ni por si misma, ni en presencia de la 4-AP o de los medios despolarizantes.

En la Fig. 9 se muestra el efecto de la 4-AP a concentraciones de 0.1, 1.0 y 2 mM sobre la acumulación de calcio por sinaptosomas incubados en el medio Krebs-bicarbonato. En este medio la 4-AP produjo un aumento sobre la acumulación de calcio dependiendo de la concentración de 0.5 a 5 veces aproximadamente sobre la captación espontánea. La presencia de taurina en este medio redujo la acumulación de calcio por los sinaptosomas, tanto la espontánea como la inducida por la 4-AP. La taurina revirtió el efecto de la acumulación de calcio inducida por la 4-AP a valores muy cercanos a los de los controles.

Con la finalidad de discernir entre una acumulación neta de ^{45}Ca y una probable formación de complejos amorfos inducida por 4-AP, se midió el efecto de la 4-AP sobre los flujos de ^{45}Ca en presencia de MgSO_4 . Existen suficientes evidencias que indican que concentraciones elevadas de magnesio inhiben tanto el transporte de calcio como su unión a la membrana. En nuestras condiciones, (Tabla 1), la presencia

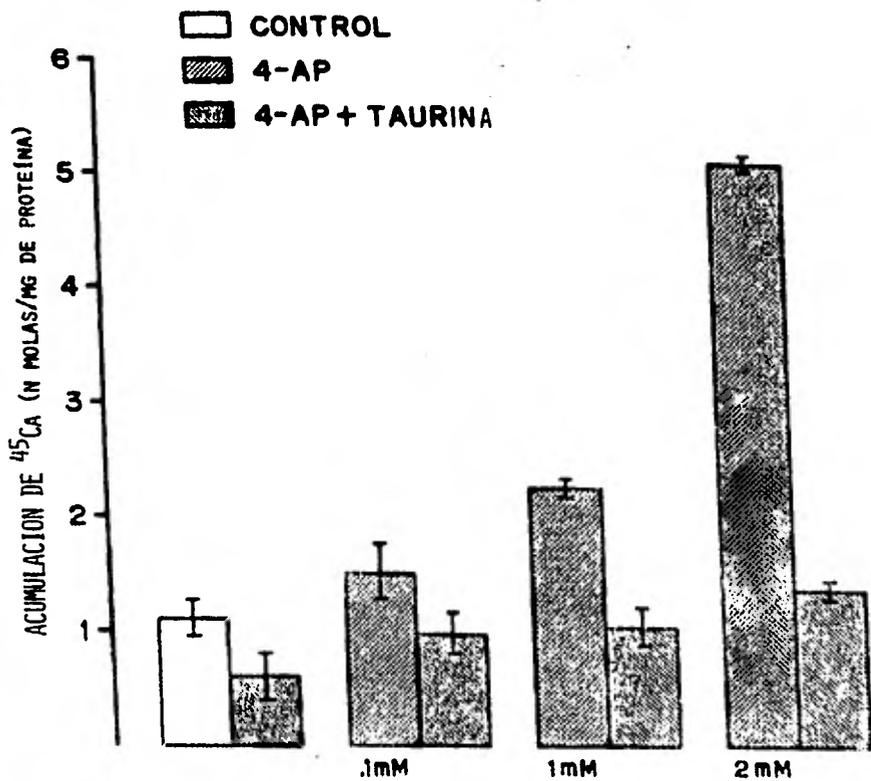


Fig. 9 Efecto de taurina y diferentes concentraciones de 4-AP sobre la captación de ^{45}Ca en sinaptosomas de cerebro de ratón en medio Krebs-bicarbonato. La taurina se añadió al medio de incubación a una concentración de 25 mM y la 4-AP a concentraciones de 0.1, 1.0 y 2.0 mM. (Promedio y error standard de 6 experimentos).

de $MgSO_4$ (20 mM) en el medio de incubación, redujo la acumulación de ^{45}Ca por los sinaptosomas a menos de 20% de los valores observados en los controles en ausencia de magnesio. La acumulación de ^{45}Ca estimulada por la 4-AP también fue sensible a la acción del magnesio (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de MgSO_4 (20 mM) sobre la acumulación de ^{45}Ca inducida por 4-AP (1 mM) en terminales nerviosas aisladas.

Condiciones de incubación	Captación de ^{45}Ca (nmol/mg de proteína)
Control	1.35 ± 0.12 (5)
4-AP	3.12 ± 0.12 (5)
MgSO_4	0.57 ± 0.02 (5)
4-AP + MgSO_4	0.62 ± 0.07 (5)

Los resultados son promedios \pm S.E.M. del número de experimentos indicados en el paréntesis.

DISCUSION

La taurina, en las dosis y tiempos apropiados, mostró ser un eficaz agente protector contra las convulsiones producidas por la 4-AP; - estas observaciones coinciden con las realizadas en diferentes laboratorios en donde se ha visto que la taurina presenta efectos anticonvulsivos en una amplia variedad de modelos experimentales de convulsiones. Este efecto generalizado ha sugerido que su mecanismo de acción podría situarse a un nivel muy básico en los procesos que mantienen la excitabilidad de la membrana. Dicha acción podría localizarse a través de un efecto sobre los flujos de calcio, como se ha propuesto en base a los - estudios realizados por Izumi y colaboradores (50), quienes demostraron un requerimiento de calcio libre extracelular para que pudiera manifestarse el efecto protector de la taurina contra las convulsiones producidas por el metrazol. Parte de los resultados observados en el presente trabajo muestran también dicho requerimiento, ya que la inyección intraperitoneal del EDTA en ratones, previno el efecto protector de la taurina contra las convulsiones producidas por la 4-AP. Estos resultados, sumados a los experimentos recientes de Pasantes-Morales y Gamboa (44), quienes demostraron que la taurina reduce la acumulación de calcio en terminales sinápticas aisladas de cerebro de rata, y tomando en cuenta las evidencias que sugieren que la 4-AP podría incrementar los niveles de calcio en la terminal presináptica, se pensó en un posible efecto - antagónico entre ambas sustancias a nivel del transporte de calcio, que explicaría sus efectos opuestos en la excitación de los animales in vivo.

Sin embargo, primero tuvo que investigarse si, efectivamente la 4-AP produce un aumento en la liberación de neurotransmisores mediado por un incremento en la concentración de calcio dentro de la terminal nerviosa presináptica, ya que si bien el efecto de la 4-AP sobre la liberación de transmisores es bien conocido, no lo es el mecanismo por el cual este liberación se induce.

Locke en 1894 observó que el calcio extracelular es necesario para que se lleve a cabo la transmisión sináptica neuromuscular (61). Posteriormente fue desarrollada por Katz y Milédi (62), la hipótesis del calcio, que sugiere que al arribo del impulso nervioso, el calcio atraviesa la membrana presináptica y que este incremento en la concentración intraneuronal provoca la liberación de los neurotransmisores. Otro intento para demostrar la importancia del calcio en la transmisión nerviosa fue realizado por Milédi quien comprobó que la inyección de calcio intraterminal iba acompañada por un incremento en el número de potenciales postsinápticos (63). Recientemente se ha demostrado que la entrada facilitada de calcio por el ionóforo de calcio A23187, induce un incremento en la liberación de neurotransmisores (64,65). A partir de estos experimentos, la evidencia en favor de que un aumento en la concentración de calcio intracelular provoca liberación de neurotransmisores ha aumentado considerablemente (66).

Los sinaptosomas aislados de diferentes regiones del sistema nervioso, constituyen una herramienta útil para estudiar los diferentes mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo funciones específicas del sistema nervioso central. En este caso los sinaptosomas han sido útiles para comprobar la hipótesis del calcio propuesta por Katz

y Miledí, ya que se ha demostrado que estas estructuras, ya aisladas, mantienen sus propiedades de excitabilidad, susceptibilidad a diferentes iones, captación y liberación de neurotransmisores en forma dependiente de calcio, etc. En su primera parte, esta hipótesis propone -- que el calcio entra a la terminal presináptica como consecuencia de una despolarización, ésta se lleva a cabo naturalmente por el impulso nervioso, lo que provoca una inversión en la polaridad de la membrana y -- como consecuencia la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje. Debido al gradiente de calcio que se establece por las concentraciones tan elevadas de calcio extracelular, se produce una entrada masiva de iones calcio procedentes del medio externo, incrementando los niveles de calcio intraterminal, lo que induce la liberación de neurotransmisores.

En el estudio del sistema de acoplamiento estimulación-secreción, las propiedades de tratamientos despolarizantes, tales como altas concentraciones de potasio, veratrina y ouabaina, han sido usadas comúnmente para mimetizar el efecto despolarizante del potencial de acción. Todos estos tratamientos tienen en común el cambiar la polaridad de la membrana, afectando así los canales de calcio sensibles a voltaje y aumentando la liberación de transmisores. Estos efectos con medios despolarizantes han sido extensamente estudiados por Blaustein (67,68,69), quien ha logrado ver en medios modificados conteniendo bajas concentraciones de calcio (100 μ M), que la acumulación de 45 Ca en terminales nerviosas aisladas se incrementa en forma dependiente de la concentración de potasio o de veratrina.

Sin embargo, es necesario hacer notar que estos efectos no se han podido observar en medio Krebs-bicarbonato, el cual tiene todas las ca

racterísticas iónicas del medio extracelular, hecho para el cual hasta ahora no se tiene explicación.

Considerando las propiedades de la preparación sinaptosomal, y los experimentos realizados sobre la entrada de calcio a terminales nerviosas, en este trabajo se realizaron experimentos en paralelo para investigar si la 4-AP incrementa la entrada de calcio en forma similar a la inducida por los despolarizantes. De ser así podría explicarse su efecto convulsivo con base a un incremento generalizado en la liberación de neurotransmisores como se ha mencionado.

Estudios de diferentes laboratorios ha mostrado que el calcio extracelular es necesario para que se lleve a cabo la acción de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores (47,48,49,50,51,52,53). Añadido a estas observaciones está el hecho de que la 4-AP bloquea el canal de potasio, lo que resulta en una prolongación de la duración del potencial de acción con lo que se mantendría durante más tiempo despolarizada la membrana y la acumulación de calcio dentro de la terminal nerviosa sería mayor.

Con estos antecedentes se ha planteado la posibilidad de que la 4-AP podría interactuar con los canales de calcio sensibles a voltaje, pero de una forma diferente a la de los despolarizantes clásicos, es decir, su efecto no estaría mediado por un cambio en la polaridad de la membrana sino por una modificación directa sobre el canal de calcio sensible a voltaje.

Por otro lado se ha probado que el efecto de esta droga no es postsináptico, pues cuando se añade en preparaciones de fibras musculares de rata o rana, no tiene ninguna influencia sobre la amplitud

y frecuencia de los potenciales postsinápticos mixtura; con lo que se demuestra que no afecta al receptor postsináptico (70).

Nuestros resultados muestran que bajo estas condiciones la 4-AP a bajas concentraciones, provoca un pequeño incremento en la acumulación de calcio en terminales nerviosas aisladas, bastante menos importante sin embargo, que el observado para los depolarizantes, por lo que estos resultados no justificarían el efecto tan eficiente que esta droga presenta en las diferentes preparaciones estudiadas in vivo sobre la liberación de neurotransmisores. El hecho de que no se presente un efecto sumatorio en medios con 4-AP y despolarizantes puede interpretarse como que la acumulación de calcio en ambas condiciones se efectúa a través del mismo sistema de transporte, mediado tal vez, por mecanismos diferentes.

Cuando se estudió el efecto de la 4-AP sobre la acumulación de calcio en medio Krebs-bicarbonato se observó que en estas condiciones esta droga produce un aumento muy importante en la acumulación de calcio, en forma dependiente de su concentración; este incremento en la acumulación de calcio se reduce notablemente en presencia de altas concentraciones de manganeso y rojo de rutenio, que son conocidos antagonistas de la unión del calcio a la membrana sináptica. Por el momento no hemos podido diferenciar si el aumento en la radioactividad producido por la 4-AP se debe a una entrada neta de calcio a la terminal o a una unión específica o inespecífica en la vecindad de la membrana. Sin embargo, volviendo a la idea original del trabajo, que intenta explicar el efecto convulsivo de la 4-AP a través de mecanismos mediados por calcio, las dos situaciones ofrecen una posibilidad

de explicación para el efecto convulsivo de esta droga. En el primer caso, si la 4-AP estuviera incrementando los niveles de calcio intraterminal, se induciría la liberación inespecífica de neurotransmisores y las convulsiones dependerían de la proporción de neurotransmisores - inhibidores y excitadores. Considerando la segunda posibilidad, si la 4-AP aumentara la unión de calcio en la vecindad de la membrana, esta unión estaría fijándose posiblemente en condiciones diferentes a las que se encuentran naturalmente y que mantienen el umbral normal de excitabilidad, alterando por ejemplo, su interacción con las cargas negativas fijas en la membrana. Con esto se produciría un efecto similar sobre la excitabilidad de la membrana al que se observa con magnesio o EDTA. Estas consideraciones sin embargo, deben tomarse en forma estrictamente especulativas, hasta que no se conozca con exactitud el mecanismo - íntimo y los componentes membranales involucrados en el proceso mediante el cual el calcio mantiene la excitabilidad de la membrana en el tejido nervioso.

La taurina redujo en forma bastante eficaz tanto las alteraciones en la excitabilidad como los incrementos en la acumulación de calcio -- producidos por la 4-AP. El mecanismo por medio del cual la taurina está llevando a cabo estas acciones no se ha podido esclarecer aún. En un estudio realizado por Pasantes-Morales y Gamboa (44), se observó -- que la taurina no tiene efecto sobre la entrada de calcio a sinaptosomas inducida por condiciones despolarizantes, básicamente debido a que la acción del aminoácido requiere la presencia de bicarbonato y que este íón usado como amortiguador, impide la visualización del efecto de los despolarizantes. Este es un resultado conflictivo, ya que por una parte, el amortiguador de bicarbonato es el que funciona en condiciones

fisiológicas, a diferencia de los sistemas de TRIS, HEPES y otros, que son artificiales.

Por otra parte, se ha observado que el bicarbonato modifica las concentraciones iónicas del medio intracelular (71), a diferencia de los otros amortiguadores para los que la membrana celular es impermeable. Sin embargo, las condiciones despolarizantes, tales como alta concentración de potasio y veratrina, son capaces de inducir la liberación de los neurotransmisores en medios con diferentes amortiguadores.

El efecto de la taurina sobre la acumulación de calcio en sinaptosomas requiere asimismo la presencia de fosfato (45). Es probable, entonces, que el mecanismo de acción de la taurina requiera la formación previa de un complejo calcio-bicarbonato, calcio-fosfato o calcio-bicarbonato-fosfato y de acuerdo con los resultados observados en este trabajo, el incremento en la acumulación del calcio producido por la 4-AP también requiere la presencia, al menos de bicarbonato. Estos resultados sugieren que la taurina y la 4-AP pueden estar actuando a nivel del mismo mecanismo, en forma antagónica.

REFERENCIAS

1. Tiedemann, F. y Cmelin, L. (1827). Einige neue Bestandtheile der Galle des Oschen. Ann. Physik. Chem., 9, 326-337.
2. Jacobsen, J.G. y Smith, L.L.H. (1968). Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. Physiol. Rev. 48, 424-511.
3. Lombardini, J.B. (1975). An enzymatic derivative double isotope assay for measuring tissue levels of taurine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 193: 301-308.
4. Peck, E.J. y Awapara, J. (1967). Formation of taurine and isethionic acid in rat brain. Biochim. Biophys. Acta, 141: 499-506.
5. Karlsson, A., Fonnum, F., Malthe-Sorensen, D. y Storm-Mathise, J. (1974). Effect of the convulsive 3-mercaptoproprionic acid on the levels of GABA, other amino acids and glutamate decarboxylase in different regions of the rat brain. Biochem. Pharm., 23:3053-3061.
6. Guidotti, A., Badiani, G. y Papeu, G. (1972). Taurine distribution in cat brain. J. Neurochem. 19: 431-435.
7. Perry, T.L., Berry, K., Hansen, S., Kiamond, S. y Mok, C. (1971) Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. J. Neurochem., 18: 513-519.
8. Perry, T.L., Hansen, S., Berry, K., Mok, C. y Lesk, K. (1971) Free amino acids and related compounds in biopsias of human brain. J. Neurochem. 18: 521-528.
9. Collins, C.C.S. (1974). The rates of synthesis, uptake and disappearance of (¹⁴C)-taurine in eight areas of rat central nervous system. Brain. Res. 76: 447-459.
10. Shank, R.P. y Aprison, M.H. (1970). The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas of the rat nervous system. J. Neurochem. 17: 1461-1475.
11. Kaczmarek, E.K., Agrawal, H.C. y Davison, A.N. (1970). Biochemical studies of taurine in the developing rat brain. Biochem.J. 119:45.
12. Sturman, J.A. and Gaull, G.E. (1975). Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. J. Neurochem. 25: 831-835.
13. Martin, W.G. y Patrick, H. (1961). The effect of taurine on the sulfate-S³⁵ retention by chicks. (1961) Poultry Sci. 40: 267.
14. Awapara, J. (1956). The taurine concentration of organs from fed and fasted rats. J. Biol. Chem. 218: 571-576.

15. Chatagner, F., y Bergeret, B. (1952). Désulfination et decarboxylation enzymatiques de l'acide L-cystéine-sulfonique; sa transformation quantitative en alanine et en hypotaurine. Biochem Biophys. Acta, 9: 141-147.
16. Fromageot, C., Chatagner, F. y Bergeret, B. (1948). La formation d'alanine par désulfation enzymatique de l'acide L-cystéinsulfonique Biochem. Biophys. Acta, 2:294-301.
17. Bergeret, B., Chatagner, F., y Fromageot, C. (1956). Etude des decarboxylations de l'acide L-cystéinsulfonique de l'acide L-cystéique et de l'acide L-glutamique par divers organes du lapin. Influence du phosphate de piridoxal et des groupements thiols. Biochim. Biophys. Acta, 250:558-567.
18. Huxtable, R., y Bressler, R. (1972) Taurine a isetionic acid: distribution and interconversion in the rat. J. Nutr. 102: 805-814.
19. Spaeth, D. G., y Shneider, D. L. (1976) Taurine metabolism: effect of diet and bile salt metabolism. En Taurine (editores: R. Huxtable y A. Barbeau), pp. 35-44, Raven Press, New York.
20. Curtis, D. R., Hosli, L., y Johnston, G.A.R. (1968). A pharmacological study of the depression of spinal neurons by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res., 6: 1-18.
21. Curtis, D. R., y Tébecie, A. K. (1972), Bicuculline and thalamic inhibition. Exp. Brain Res., 16: 210-218.
22. Curtis, D. R., y Watkins, J. C. (1960). The excitation and depression of spinal neurons by structurally related aminoacids. J. Neurochem., 6: 117-141.
23. Pasantes-Morales, H., Bonaventure, N., Wioland, N., y Mandel, P. (1973) Effect of intravitreal injections of taurine and GABA on chicken ERG. Int. J. Neurosci., 5: 235-241.
24. Gruener, R. y Bryant, H. J. (1975). Excitability modulation by taurine. Actions on axon membrane permeabilities. J. Pharmacol. Exp. Ther., 194: 514-521.
25. Haas, H. L. y Hosli, L. (1973). The depression of brain stem neurons by taurine and its interaction with strychnine and bicuculline. Brain Res., 52: 399-402.
26. Lahdesmaki, P., y Oja, S. S. (1973) On the mechanism of taurine transport at brain cell membranes. J. Neurochem., 20: 1411-1417.
27. Hruska, R. E., Huxtable, R., Yamamura, H. I. (1978). High-affinity, temperature-sensitive, and sodium-dependent transport of taurine in rat brain. En: Taurine and Neurological Disorders (Eds.: A. Barbeau y R. Huxtable), pp. 109-117, Raven Press, New York.

28. Hammerstad, J. P., Murray, J. E., y Cutler, R. W. P. (1971). Efflux of aminoacid neurotransmitters from rat spinal cord slices. II. Factors influencing the electrically induced efflux of 14 C-glycine and 3 H-GABA. Brain Res., 36:357-367.
29. Kacmarek, L.K., y Davison, A.N., (1972). Uptake and release of taurine from rat brain slices. J. Neurochem., 19: 2355-2362.
30. Collins, G.C.S., y Topiwala, S.H. (1974). The release of 14 C-Taurine from slices of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium concentration. Proc. B. Pharm.Soc. 451-452.
31. Sieghart, W. y Heckl, K. (1976). Potassium evoked release of taurine from synaptosomes fractions of rat cerebral cortex. Brain Res., 116: 538-543.
32. Clark, R. M., y Collins, G.C.S., (1975). The release of endogenous aminoacids from the mammalian visual cortex. J. Physiol (Lond) 246:16.
33. Read, W.O. y Walty, J.D. (1963). Effect of taurine on epinephrine and digoxin-induced irregularities of dog heart. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 139: 283-289.
34. Walty, J.D. y Read, W.O. (1964). Studies of some cardiac effects of taurine. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 144: 110-115.
35. Huxtable, R., y Bressler, R. (1974). Elevation of taurine in human congestive heart failure. Life Sci. 14: 1353-1359.
36. Baskin, S.L. y Dagimanjian, R. (1973). Possible involvement of taurine in the genesis of muscular dystrophy. Nature, Lond. 245: 464.
37. Van Gelder, N.M., Sherwin, A.L., y Rasmussen, T. (1972). Aminoacid content of epileptogenic human brain: Focal versus surrounding regions. Brain Res. 40:385-393.
38. Van Gelder, N. M. Sherwin, A.L., Sacks, C. y Anderman, F. (1975). Biochemical observations following administration of taurine in patients with epilepsy. Brain, Res., 94: 297-306.
39. Izumi, K., Donaldson, J., Minnich, J. L. y Barbeau, A., (1976) Ouabain induced seizures in rats: Suppressive effects of taurine and aminobutyric acid. Can J. Physiol. Pharmacol. 51: 885-889.
40. Izumi, K., Igieu, H., Fukuda, T. (1974). Suppression of seizures by taurine-specific or non specific. Brain, Res., 76:171-174.
41. Joseph, M.H., Emerson, P.C. (1976). Taurine and cobalt induced epilepsy in the rat: A biochemical and electrographic study, J. Neurochem., 27: 1495-1501.

42. Sbarbaro, V. (1974). Electroclinical effects of taurine in some epileptic patients. Preliminary results, Acta Neurol. (Napoli), 29: 33-37.
43. Striano, S., Grasso, A., Buscaino, G. A., y Perretti, P. (1974). Primi risultati sugli effetti della epilessia umana. Acta Neurol (Napoli), 29: 537-542.
44. Pasantes-Morales, H. y Gamboa, A. (1980). Effect of taurine on ⁴⁵Ca accumulation in rat brain synaptosomes. J. Neurochem 34 (1): 244-246.
45. Pasantes-Morales, H. y Morán, J., (1980). Taurine as a neuromodulator: its action on calcium fluxes and neurotransmitter release (impresión).
46. Lundh, H., Leander, S., y Thesleff, S. (1977). Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat: The effects of Tetraethylammonium, Guanidine y 4-Aminopyridine. J. Neurological Sci. 32:29-43.
47. Moritoki, H., Taki, M., Nakamoto, N., y Ishida, Y., (1978) Actions of amino-pyridines on guinea-pig ileum. Archs int. Pharmacodyn. Théor. 232: 28-41.
48. Vizi, E. E., Van Duk, J. y Foldes, F.E. (1977). The effect of 4-aminopyridine on isolated papillary muscles of the rabbit. Acta Physiol.Scand. 30.
49. Yanagisawa, T., Satoh, K. y Taira, N. (1978). Excitation of autonomic nerves by 4-aminopyridine in the isolated, blood-perfused sino-atrial node preparation of the dog. Eur. J. Pharmac 49: 189-192.
50. Kirpekar, M., Kirpekar, S.M. y Prat, J. C. (1977), Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation. J. Physiol., Lond. 272: 517-528.
51. Johns, A., Golko, K.S., Lanson, P.A., y Paton, D.M., (1976). The potentiating effects of 4-aminopyridine on adrenergic transmission in the rabbit vas deferens. Eur. J. Pharmac. 38: 71-75.
52. Leander, S., Arner, A. y Johansson, B. (1977). Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro. Eur. J. Pharmac. 46: 351-361.
53. Glover, W. E. (1973). Potentiation of vasoconstrictor responses by 3- and 4-aminopyridine. Br. J. Pharmac. 63: 577-585.
54. Lemeignan M. (1972) Analysis of the action of 4-aminopyridine on the cat lumbar spinal cord I. Modification of the afferent volley, the monosynaptic discharge amplitude and the polysynaptic evoked responses. Neuropharmacology, 11: 551-558.
55. Lemeignan M. (1973). Analysis of the action of 4-aminopyridine on the lumbar spinal cord of the cat II. Modifications of certain spinal inhibitory phenomena, post-tetanic potentiation and dorsal root potential. Neuropharmacology 12: 641-651.

56. Galindo, J. y Rudomin, P. (1978). Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine. Neuroscience Letters 10: 299-304.
57. Molgó, J., Lemeignan, M. y Lechat, P. (1977). Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. J. Pharmac. exp. Ther. 203: 253-262.
58. Gray E. G. y Whittaker V. P. (1962). The isolation of nerve endings from brain: An electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. J. Anat. 96: 431-435.
59. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., y Randall, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
60. Izumi, K., Igisu, H. y Fukuda, T. (1975) Effects of edetate on seizure suppressing actions of taurine and GABA, Brain. Res. 88: 576-597.
61. Locke, F. S. (1894): Notiz uber den Einfluss physiologischer Kochsalzlosung auf die elektrische Erregbarkeit von Muskel und Nerv. Zentrabl. Physiol. 8: 166-167.
62. Katz, B. and Miledi, R. (1967a): The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. Proc. R. Soc. B. 167: 23-38.
63. Miledi, R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. Proc. R. Soc. B. 183: 421-425.
64. Cotman, W. C., Hycok, J. W. y White, W. F. (1976). Stimulus-secretion coupling processes in brain: analysis of noradrenaline and gamma-aminobutyric acid release. J. Physiol., 254:475-505.
65. Holz, R. U. (1975). The release of dopamine from synaptosomes from rat striatum by the ionophores X-537 A and A 23187. Biochem.biophys.Acta 375: 138-152.
66. Thesleff, S. (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. Neuroscience 5: 1413-1419.
67. Blaustein, M.P. (1975): Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. J. Physiol. 247: 617-655.
68. Blaustein, M.P. and Ector, A.C. (1975). Barbiturate inhibition of calcium uptake by depolarized nerve terminals in vitro. Mol.Pharmacol 11: 369-378.
69. Blaustein, M.P., y Coldring, J.M. (1975): Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. J. Physiol. 247: 589-615.

70. Lundh, H. (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Brain. Res. 153: 307-318.
71. Harris, E. J., (1978). The importance of CO₂ for Ca²⁺ uptake by some mitochondria. Nature 274.