

Lej. 118

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"TRANSPORTE DE CALCIO IONICO EN LA MEMBRANA
SINAPTOSOMAL: INTERACCIONES CON INHIBIDORES"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA:

EZEQUIEL MORALES SANDOVAL

MEXICO, D. F., 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	pag
I: INTRODUCCION	
1.- Aspectos generales de la neurotransmisión	1
2.- Calcio y transmisión nerviosa	
a.- El calcio y la liberación de neurotransmisores	7
b.- Regulación del calcio en la terminal nerviosa	10
3.- Las drogas como herramientas para estudiar los fenómenos de la neurotransmisión	12
a.- Drogas que afectan movimientos de calcio en membranas biológicas	14
4.- El sinaptosoma como modelo de presinapsis del SNC	16
5.- Antecedentes: efectos sobre la transmisión sináptica de varios compuestos	
a.- Rojo de rutenio	19
b.- Lantano (La^{3+})	21
6.- Objetivos	
II: MATERIALES Y METODOS	
1.- Preparación de sinaptosomas	28
2.- Unión y desplazamiento del RRu	29
3.- Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	31
III: RESULTADOS	
1.- Unión del RRu y su desplazamiento por el La^{3+} y la 4-AP	33
2.- Captación de calcio por los sinaptosomas	34
IV: DISCUSION Y CONCLUSIONES	
1.- Unión y desplazamiento del RRu por el La^{3+} y la 4-AP	37

2.- Inhibición del transporte de calcio por el La^{3+}	39
3.- Inhibición del transporte de calcio por el RRu	39
4.- Efecto de la 4-AP sobre la captación de calcio	40

V: BIBLIOGRAFIA

43

I: INTRODUCCION

1.- Aspectos generales de la neurotransmisión

Los sistemas biológicos se diferencian de cualquiera otro por su enorme complejidad, y dentro de estos sistemas, el tejido nervioso ocupa un lugar especial, pues recibe estímulos tanto externos como internos a los organismos, y procesa una cantidad extraordinariamente alta de información.

Las células encargadas de procesar la información en el sistema nervioso, son las neuronas, por lo cual se revisarán aquí, las características que hacen distintivas a éstas células de otros tipos conocidos.

Por su diversidad morfológica, no existe una neurona típica, ya que adoptan formas estrelladas, piramidales, etc. De igual manera, su tamaño es muy variable, pudiendo ser relativamente grandes como las células de Purkinje del cerebelo, de hasta 80 μ de diámetro, o bien tener tamaño pequeño, como las neuronas granulares de la corteza cerebral. Sin embargo, se puede tomar como esquema general de las neuronas, la presencia de un soma con numerosas ramificaciones o dendritas, y un axón, que es una prolongación celular generalmente larga y con bifurcaciones terminales. La neurona generalmente recibe la información de otra u otras neuronas por las dendritas, y el soma se encarga de integrar dicha información, integración

que puede resultar en la producción de una señal. Las señales producidas por el soma son conducidas por el axón hasta las ramificaciones terminales, donde a su vez se establece comunicación con otras neuronas.

La información que manejan las neuronas es de naturaleza electroquímica, eléctrica en cuanto concierne a la conducción de señales en la neurona misma, y química en su comunicación con otras neuronas. Normalmente las neuronas tienen en su membrana celular una diferencia de potencial de entre -55 y -100 mV, con el interior negativo; a ésta diferencia de potencial se le llama potencial de membrana. El potencial de membrana es originado por las concentraciones iónicas que existen en el interior y exterior de la célula nerviosa, principalmente de iones sodio y potasio, así como aniones protéicos.

En el estado de reposo, el potencial de membrana tiene valores que se aproximan al potencial de equilibrio electroquímico de las concentraciones de potasio. Sin embargo, el potencial de membrana no es siempre constante, ya que, cuando un estímulo de suficiente intensidad incide sobre las neuronas, se producen cambios en la permeabilidad a los iones, inicialmente a Na^+ . En el estado de reposo, las concentraciones de Na^+ son mayores en el exterior que en el interior de la neurona, por tanto, al aumentar la permeabilidad a causa del estímulo

lo, tiende a entrar, llevando consigo cargas positivas que invierten la polaridad del potencial de membrana a un valor positivo. El nuevo valor del potencial de membrana está cercano al potencial de equilibrio electroquímico de las concentraciones externa e interna del Na^+ , que en el axón gigante del calamar corresponde a unos 50 mV.

La inversión de polaridad del potencial de membrana es momentánea, y se restituye a su valor negativo con la salida de iones potasio. A la fase de entrada de sodio se le conoce como fase de despolarización, y a la recuperación por la salida de potasio se le llama fase de repolarización. Estos eventos ocurren en un lapso de tiempo del orden de milisegundos, se propagan a lo largo del axón siempre con la misma intensidad si el estímulo alcanzó un cierto umbral, y en conjunto se conoce como potencial de acción. Los estímulos subumbrales también producen propagación, pero ésta decrece rápidamente con la distancia, y se les conoce como potenciales locales.

Las propiedades eléctricas de la membrana explican cómo se conduce el impulso nervioso hasta el final del axón, pero no cómo dicho impulso se transmite a otras neuronas. Para esto, es necesario revisar el concepto anatómico y funcional de la sinapsis química.

Por mucho tiempo se pensó que las neuronas tenían una continuidad anatómica entre sí, y que formaban redes a manera

de un sincicio, pero a partir de finales del siglo XIX, sobre todo por los trabajos de Santiago Ramón y Cajal, se comenzó a impulsar el concepto de que la continuidad entre las neuronas no es anatómica sino fisiológica.

Las neuronas están separadas por espacios extracelulares, y ésta discontinuidad hace necesario que la neurona utilice mensajeros químicos para establecer comunicación con otras células nerviosas. La comunicación entre las neuronas se realiza en zonas especiales de contacto denominadas sinapsis; una neurona puede hacer sinapsis con otra, sobre cualquiera de sus estructuras, así, puede haber sinapsis axo-somáticas, axo-dendríticas, axo-axónicas, etc.

Morfológicamente, es posible determinar la dirección del flujo de información en la sinapsis, debido principalmente a la asimetría que presenta en su ultraestructura. La terminal axónica o presináptica, presenta en cortes, pequeñas vesículas de apariencia circular, de centro claro o denso a las tinciones de la microscopía electrónica. Es también frecuente encontrar un engrosamiento presináptico en forma de red hexagonal, que se identifica como la zona activa donde es liberado el mensajero.

Las membranas de una y otra neurona están separadas por un espacio de aproximadamente 200 Å, llamado espacio sináp-

tico o hendidura sináptica (esquema 1, página 12). El espacio sináptico es de dimensiones variables, y en la sinapsis neuromuscular de vertebrados puede alcanzar hasta 500 Å, lo que hace que los registros electrofisiológicos tengan un retardo en la respuesta de la postsinapsis, debido al tiempo que ocupa el mensajero en cruzar ése espacio.

Cuando la despolarización llega a la presinapsis, ocurren eventos que originan la liberación de moléculas mensajeras a la hendidura sináptica. El primer evento, es un aumento en la permeabilidad al calcio, el cual se encuentra mucho más concentrado en el exterior que en el interior, aproximadamente 2mM contra 0.5 μ M, y que, ante el aumento de permeabilidad, entra a la terminal nerviosa.

La entrada del calcio a la presinapsis, resulta en el disparo de un mecanismo cuya naturaleza es todavía desconocida, que libera al mensajero químico. Las moléculas mensajeras, conocidas genericamente como neurotransmisores, después de cruzar la hendidura sináptica, interaccionan con receptores específicos de la membrana postsináptica, con lo cual el mensaje puede ser transducido por la neurona receptora.

La acción del neurotransmisor puede ser un efecto directo sobre la permeabilidad a algún ión, a lo cual se ha dado en llamar efecto ionotrópico; la acetilcolina y el ácido gama-aminobutírico (GABA), son neurotransmisores que actúan

por este mecanismo. Otros neurotransmisores tienen efectos mediados por segundos mensajeros como el nucleótido adenosín mono fosfato cíclico (AMPC), hablándose entonces de un efecto metabotrópico; la dopamina es un ejemplo de estos neurotransmisores.

En general, se habla de neurotransmisores excitadores cuando el efecto que producen sobre la neurona es de una despolarización por entrada de Na^+ , e inhibidores cuando el resultado es de una hiperpolarización por entrada de Cl^- .

Es importante aclarar que, dependiendo del receptor postsináptico, un neurotransmisor puede funcionar como excitador o inhibidor. Por ejemplo, la acetilcolina, que es excitador en el músculo esquelético, se comporta en el músculo cardíaco como inhibidor. Otro ejemplo es el GABA, inhibidor en la mayor parte del sistema nervioso central de vertebrados, es excitador en algunos sitios, como en las células del ganglio de la raíz dorsal (De Groat, 1972), y en células en cultivo del ganglio cervical superior (Obata, 1974).

Dependiendo del neurotransmisor que se trate, la presinapsis y/o la postsinapsis poseen sistemas de recaptura del transmisor por transporte activo, o de su degradación enzimática; estos mecanismos permiten eliminar al mensajero de la hendidura sináptica, una vez que éste ejerció su efecto en

la postsinapsis.

2.- Calcio y transmisión nerviosa

a.- El calcio y la liberación de neurotransmisores

El calcio está relacionado con numerosos procesos biológicos como son los de secreción, diferenciación celular, motilidad de organismos unicelulares, etc. (Rubin, 1974).

En el tejido muscular, el calcio participa de manera determinante en la contracción de éste, tanto en músculo liso como en estriado.

Como se dijo en la sección anterior, la entrada de calcio a la terminal nerviosa antecede a la liberación del transmisor, siendo éste un fenómeno generalizado para todos los compuestos neuroactivos (Rubin, 1974).

El calcio puede liberar neurotransmisor de una sinapsis independientemente de la forma en que se consiga un aumento en su concentración interna, ya que la aplicación iontoforética de calcio en la presinapsis del axón gigante del calamar, produce un aumento en la liberación del transmisor (Miledi, 1973); o también por el Ca^{2+} proveniente de fuentes intracelulares como la mitocondria (Alnaes y Rahamimoff, 1975). Llinás y Nicholson (1975), utilizando a la proteína acuarina, como indicadora de calcio, demostraron en la sinapsis gigante

del calamar, que el calcio intraterminal aumenta su concentración al despolarizarse la membrana, de manera coincidente con la liberación del transmisor, y que esta liberación se anula cuando el potencial de membrana se sitúa cerca del potencial de equilibrio electroquímico del calcio, es decir, cuando se suprime el flujo del catión. A la idea de que el aumento en la concentración del calcio intraterminal dispara el mecanismo de liberación de transmisores, se le ha llamado "hipótesis del calcio" (Katz y Miledi, 1967), y ha recibido fuerte apoyo experimental.

En la sinapsis gigante del calamar, es posible medir con precisión el retardo que ocurre entre la entrada de calcio y la respuesta que se produce en la postsinapsis; éste retardo es muy pequeño, de aproximadamente 200 useg. (Llinás et al, 1976). El mencionado retardo da idea de que el mecanismo liberador, cualquiera que sea, se localiza cerca del sitio de entrada del calcio, pues en el lapso de tiempo mencionado, el Ca^{2+} apenas alcanzaría a difundir unos cientos de angstroms (Llinás y Steinberg, 1977). Hay evidencias de que los sitios de entrada del calcio son abundantes en la vecindad de la presinapsis (Pumplin et al, 1981), dando apoyo a la idea de que el flujo de calcio ocurre cerca del sitio de liberación del transmisor.

En la sinapsis neuromuscular, a bajas concentraciones de calcio extracelular, la liberación de transmisor sigue una cinética sigmoidal, indicando un posible efecto cooperativo del ión (Dodge y Rahamimoff, 1967). Bajo despolarización por altas concentraciones de K^+ externo, la liberación es también dependiente del calcio extracelular, y esta liberación se produce aún bloqueando la entrada de Na^+ , confirmando que la liberación es producida solo por la entrada de calcio (Blaustein y colaboradores, 1972).

Cuando se habla de sitios de entrada y salida de calcio, es preferible hablar de canales para éste ión, ya que se considera que las estructuras encargadas del transporte del calcio son moléculas protéicas situadas en la membrana celular, y de organelos como la mitocondria. Se han hecho medidas de conductancia para un solo canal de calcio en el miotúbulo de rata, estimando que a concentraciones fisiológicas de potasio, éste canal se abre por un tiempo de unos 100 ps, y que la frecuencia de apertura está gobernada por el potencial de membrana y el calcio externo; al parecer con altas concentraciones de calcio interno, el canal está siempre abierto (Pallotta et al, 1981).

b.- Regulación del calcio en la terminal nerviosa

De la hipótesis del calcio, se desprende que en la terminal nerviosa, después de liberar al transmisor, la concentración de calcio aumenta, y por tanto, para que se pueda liberar transmisor nuevamente, es necesario regresar a un estado basal en la concentración de calcio.

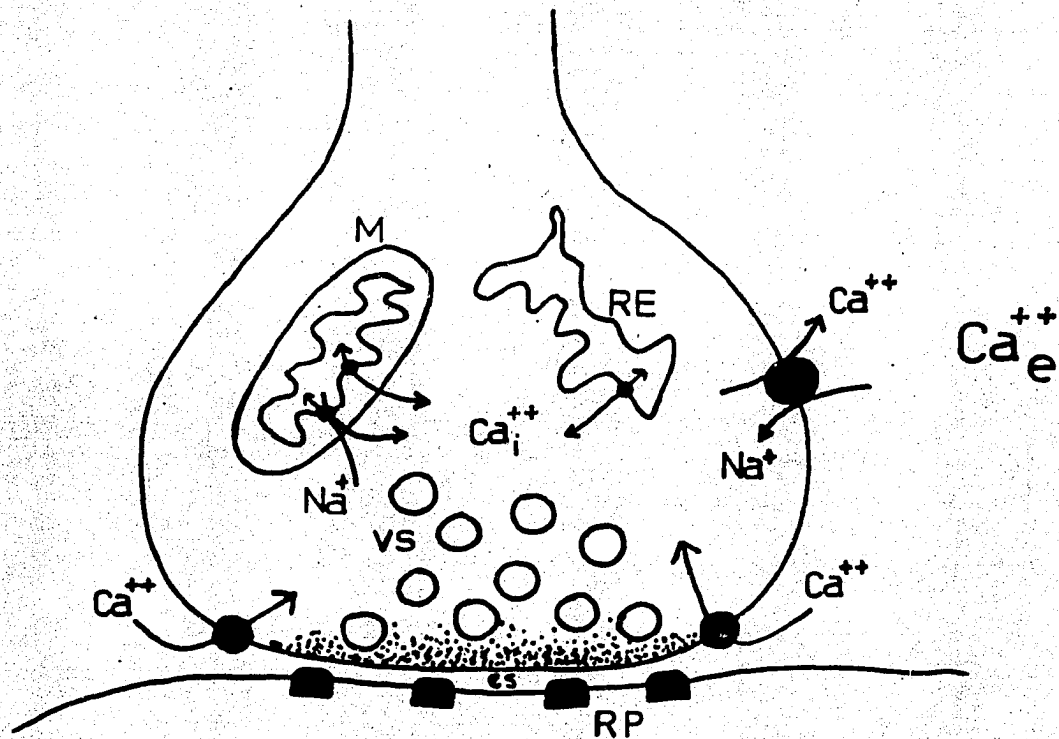
La remoción del calcio libre en la terminal nerviosa implica la presencia de sistemas de amortiguamiento que permitan a la terminal ser estimulada continuamente, y responder a la estimulación sin acumular calcio de manera excesiva. Se tienen evidencias de que la salida de calcio de la terminal nerviosa es un proceso lento, que se realiza a través de un intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ en la membrana de dicha terminal, lo cual mantiene estable el sistema a largo plazo (Blaustein y Oborn, 1975). Son necesarios sin embargo, mecanismos de remoción de mayor rapidez, ya que el evento de la transmisión sináptica dura apenas unos 2 milisegundos. Se han propuesto mecanismos intracelulares de regulación del Ca^{2+} , como son el de la mitocondria, el retículo endoplásmico, y el de algunas proteínas que captan calcio (Blaustein et al, 1980), sistemas que parecen también funcionar en otros sitios, como en las fibras musculares cardíacas (Winquist et al, 1981).

Los estudios de captación de calcio en mitocondrias, in-

dican que este organelo puede almacenar grandes cantidades de calcio, con un mecanismo dependiente de energía, que puede ser inhibido por rojo de rutenio (RRu). El calcio mitocondrial puede ser liberado por un sistema de intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, que no es afectado por RRu (Crompton et al, 1978).

Con base en sus características, la mitocondria ha sido propuesta como reguladora principal del calcio en el interior de la terminal nerviosa (Scott et al, 1980). Sin embargo, en comparación con otros sistemas extramitocondriales, el sistema de captación de calcio de la mitocondria exhibe una menor afinidad, aunque es de gran capacidad, si se compara con el retículo endoplásmico que, por el contrario, es de gran afinidad, pero de poca capacidad. De acuerdo a lo anterior, el mecanismo de amortiguamiento del calcio en condiciones fisiológicas, sería mantenido por los sistemas de alta afinidad y baja capacidad, ya que lo que se necesita es una inactivación rápida, mientras que la mitocondria funcionaría como un almacén de gran capacidad. Por último, la salida neta de calcio se realizaría por el sistema de intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ de la membrana celular.

El siguiente esquema representa los sitios probables de regulación del calcio en el interior de la terminal nerviosa, así como la morfología general de la sinapsis.



Esquema 1: Sitios probables de regulación del calcio en la terminal nerviosa. M: mitocondria; RE: retículo endoplásmico; Ca_e⁺⁺: calcio externo; Ca_i⁺⁺: calcio interno; vs: vesículas sinápticas; es: espacio sináptico; RP: receptores postsinápticos. Modificado de Blaustein et al, 1980.

3).- Las drogas como herramientas para estudiar los fenómenos de la neurotransmisión.

El uso de drogas con efectos de alta especificidad ha sido extraordinariamente útil en los estudios de las propiedades de la neurona. Los principales fenómenos iónicos que

ocurren durante la propagación del potencial de acción, fueron demostrados primero por Hodgkin y Huxley (1952). Posteriormente, con el descubrimiento de drogas como la tetrodoxina (TTX) y el tetraetil amonio (TEA), se han estudiado los mismos fenómenos, dando un importante enfoque molecular, acerca de la permeabilidad de los canales iónicos, ya que la TTX y el TEA son drogas que bloquean selectivamente canales de sodio y de potasio respectivamente (Moore et al, 1967; Armstrong y Hille, 1972).

Es común encontrar que más de una droga tenga efectos sobre un mismo canal, así, el canal de Na^+ que es bloqueado por la TTX, puede ser abierto por veratridina; el canal de K^+ puede ser bloqueado por el TEA y por la 4-aminopiridina.

Para la zona de la sinapsis, se conocen varias drogas que afectan a la pre o a la postsinapsis, de modo que, prácticamente cualquier nivel funcional de esta zona puede ser modificado por algún compuesto, por lo menos en ciertas sinapsis. Así, en la sinapsis neuromuscular de vertebrados, que usa como transmisor a la acetilcolina, es posible modificar la síntesis del transmisor con derivados de la estiril piridina, o bloquear los receptores postsinápticos con curarina; también es posible evitar la degradación del transmisor después que ha sido liberado, usando eserina, un inhibidor de

la acetilcolinesterasa, etc. (Cooper, Bloom y Roth, 1977).

Las estructuras intrasinápticas también responden ante drogas de acción selectiva; se sabe por ejemplo, que las vesículas sinápticas en las terminales del sistema nervioso simpático almacenan norepinefrina, y que drogas como la reserpina y la tetrabenacina interfieren con el almacenamiento del compuesto neuroactivo. De lo anteriormente dicho se puede concluir que el uso de drogas de acción selectiva, puede servir como una herramienta experimental que amplifique los fenómenos fisiológicos de las neuronas, lo que resulta en un mejor conocimiento de las propiedades de éste tipo celular.

a).- Drogas que afectan movimientos de calcio en membranas biológicas.

Como se dijo con anterioridad, el calcio tiene efectos fisiológicos diversos, por lo cual es importante contar con la herramienta farmacológica que permita estudiar a este catión, en relación con los fenómenos en que interviene.

A este respecto, existen drogas que bloquean el transporte de calcio en las membranas biológicas; otras drogas, por el contrario, aumentan la permeabilidad al ión. Ambos tipos de drogas son elementos que permiten hacer disecciones

farmacológicas sobre las corrientes de calcio en una preparación biológica. Compuestos como el verapamil, el metoxiverapamil y la nifedipina (Van Nueten y Vanhoutte, 1981), o el rojo de rutenio (Luthra y Olson, 1977; Vasington et al, 1972; Watson et al, 1971), son eficaces bloqueadores de los movimientos de calcio en diferentes preparaciones biológicas.

Los canales de calcio pueden ser bloqueados también por iones mono, di o trivalentes, como es el caso de los iones H^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} y La^{3+} , además de ser afectados por inhibidores metabólicos como el dinitrofenol y el cianuro (Naylor y Grinwald, 1981; Weiss, 1974).

Otros compuestos actúan independientemente de que haya o no canales en la membrana para el calcio, facilitando el transporte del catión. Por ejemplo, los ionóforos A-23187 y X-537 A, los cuales se intercalan en la bicapa lipídica y dejan pasar cationes divalentes a favor del gradiente de concentración; aunque transportan varios cationes divalentes, son generalmente usados como ionóforos de calcio.

En los estudios de calcio y neurotransmisión, es frecuente también el uso de agentes quelantes de iones divalentes, como son el etilen-diamino-tetra acético (EDTA), y el etilenglicol tetra acético (EGTA), agentes que hacen el efecto de retirar el calcio del medio fisiológico usado, siendo posi-

ble incluso invertir el gradiente de concentraciones del calcio, normalmente mayor en el exterior celular.

4.- El sinaptosoma como modelo de presinapsis del SNC

Se ha mencionado con anterioridad que muchas de las propiedades de las neuronas, y de la forma en que establecen comunicación entre sí, se conocen de estudios realizados en neuronas de invertebrados, o bien, sobre preparaciones de sinapsis neuromusculares del sistema nervioso periférico de vertebrados. En ambos casos, se tiene la ventaja de poder insertar micropipetas en la pre y postsinapsis, por su tamaño relativamente grande, lo que permite obtener registros electrofisiológicos de gran precisión.

En el caso del sistema nervioso central (SNC), la situación es muy diferente, pues las terminales son muy pequeñas, de aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ de diámetro, para permitir insertar una micropipeta. Se han ideado técnicas que intentan resolver el problema de medir eventos sinápticos en el sistema nervioso central, como son las rebanadas de regiones del cerebro y médula espinal, o los cultivos de tejidos. Sin embargo, en las preparaciones antes mencionadas, se tiene la desventaja de que la mayor parte del volumen del tejido, es de origen no sináptico.

Lo anterior hace que muchas veces los efectos específicos de la sinapsis sean enmascarados por el tejido restante, en gran parte porque, a pesar de la especificidad de las drogas, hay efectos colaterales, y porque los neurotransmisores participan en otras vías metabólicas, además de su función como mensajeros.

Una preparación especialmente útil para el estudio del sistema nervioso central, han resultado ser las terminales nerviosas aisladas denominadas sinaptosomas. Estas estructuras neuronales fueron aisladas primeramente por De Robertis y colaboradores (1962), y por Gray y Whittaker (1962). Los sinaptosomas se forman cuando se hace una dispersión mecánica de tejido nervioso en un medio isotónico, de manera que las terminales nerviosas, generalmente de forma bulbosa, se separan del axón, resellándose en el sitio de ruptura, y quedando como vesículas con sus organelos intraterminales como las mitocondrias, vesículas sinápticas etc., intactos.

Es frecuente encontrar que la dispersión mecánica no es suficiente para separar la membrana postsináptica que se encuentra opuesta a la zona activa, pues la unión sináptica está flanqueada por fuertes uniones del tipo desmosoma que impiden su separación.

Fisiologicamente, los sinaptosomas conservan propieda-

des metabólicas por periodos de tiempo relativamente largos, consumiendo oxígeno en una relación lineal con el tiempo, aún por horas después de haber sido aislados, lo cual es un buen índice de estabilidad metabólica (Bradford, 1968).

Como cabría esperar, los sinaptosomas conservan intactos los mecanismos de captura y liberación de transmisores. En una preparación de sinaptosomas de cerebro completo, y en general de cualquier región del sistema nervioso central, hay una heterogeneidad de terminales, en cuanto a los transmisores que originalmente liberaban, pero, por conservarse intactos los mecanismos de captura y liberación, es posible aprovechar ésta propiedad en estudios de liberación de transmisores. Así, cuando se agrega un transmisor a una preparación de sinaptosomas, sólo las terminales que lo liberaban originalmente, serán las que lo capturen y, con un estímulo adecuado, lo liberen (Fonnum et al, 1981).

Se ha demostrado que los sinaptosomas presentan algunas características con respecto a la utilización del calcio, como son la acumulación, distribución intraterminal y eliminación del sinaptosoma (Blaustein y Oborn, 1975; Blaustein; Scott et al, 1980; Wonnacott et al, 1978).

En resumen, los sinaptosomas son una preparación de terminales nerviosas que pueden ser aisladas por técnicas bio-

químicas hasta un alto grado de pureza, donde se pueden estudiar las propiedades de la sinapsis del sistema nervioso central, aún a niveles intrasinaptosomales, pues es posible aislar elementos tales como las vesículas sinápticas (Whittaker et al, 1964).

5.- Antecedentes: Efectos sobre la transmisión sináptica de varios compuestos

En el inciso a de la sección 3, se describieron brevemente algunas drogas que, de una u otra manera, interfieren con el transporte de calcio; en esta sección se abundará en los datos sobre tres drogas que tienen valor experimental en el estudio del calcio en relación con la neurotransmisión: el rojo de rutenio, el lantano y la 4-aminopiridina.

a.- Rojo de rutenio (RRu): El RRu es un colorante inorgánico de naturaleza catiónica, y de fórmula $Ru_2(OH)_2Cl_4 \cdot 7NH_3 \cdot 3H_2O$. El RRu se une a las glicoproteínas de las membranas celulares, por lo que es usado comunmente en microscopía electrónica para observar membranas biológicas.

El RRu tiene efectos farmacológicos interesantes; en mitocondrias es un inhibidor del transporte de calcio, sin afectar la respiración ni la transferencia de energía; aunque

a elevadas concentraciones sí inhibe la respiración (Vasington et al, 1972). En mitocondrias de riñón e hígado, el RRu, promueve la salida de calcio, mientras que en mitocondrias de otros órganos, como el cerebro, la médula suprarrenal y glándulas parótidas no muestra el efecto anterior (Crompton et al, 1978). Luthra y Olson (1977), encontraron que el RRu impide tanto la captura como la salida de calcio de las mitocondrias, en ambos procesos donde hay una dependencia de energía. En una preparación distinta, en heritrocitos, el RRu es también capaz de inhibir a la ATPasa de calcio (Watson et al, 1971).

El RRu, al igual que otros inhibidores que afectan el transporte de calcio, inhiben la liberación de neurotransmisores en varios tipos de preparaciones biológicas.

En la sinapsis neuromuscular de rana, Alnaes y Rahami-moff (1975), encontraron que el RRu tiene el efecto principal de bloquear la liberación de transmisor estimulada por despolarización, y en ocasiones se observa que reduce la sensibilidad de los receptores postsinápticos y aumenta la liberación espontánea. Otros investigadores han encontrado que el RRu no tiene otros efectos, a excepción de los presinápticos; Person y Kuhn (1979), confirmaron un bloqueo de la liberación de transmisor, tanto en condiciones de despo-

larización como espontáneamente.

También en apoyo de un efecto puramente presináptico, y en una preparación de sinapsis del ganglio bucal de Aplysia californica, Baux y colaboradores (1979), aplicaron acetilcolina iontoforéticamente, en presencia de RRu para bloquear la transmisión nerviosa, encontrando que la respuesta post-sináptica se realiza normalmente.

La inhibición de la liberación de transmisores ha sido observada en sinaptosomas, aplicando RRu (Tapia y Meza-Ruíz, 1977). El RRu se une a membranas de sinaptosomas con mayor afinidad, en condiciones en que no se incluyen iones en el medio de incubación, como en el caso del medio de sacarosa-Tris, (Tapia y Arias, 1981).

El RRu inyectado intraperitonealmente a ratones y gatos, produce parálisis flácida; si el colorante es administrado intracranealmente, entonces produce convulsiones. Ambos efectos se deben también a modificaciones de mecanismos dependientes de calcio, ya que las dosis elevadas de CaCl_2 reducen los efectos del colorante, mientras que los agentes quelantes de calcio como el EDTA, administrados de la misma forma que el RRu, tienen efectos parecidos a los de éste (Tapia et al, 1976).

b.- Lantano (La^{3+}): El lantano es un catión trivalente,

de número atómico 57, que junto con las demás tierras raras, grupo químico al que pertenece, ha tenido interés por los efectos biológicos que presenta. Ya desde comienzos del siglo actual, se conoce que el La^{3+} es capaz de reducir de reducir las contracciones en el músculo cardiaco y esquelético de la rana (Bowen, 1972).

Posteriormente, Lettvin y colaboradores (1964), dieron un gran impulso al uso experimental del lantano al mostrar que éste tiene un radio iónico similar al del calcio; el calcio tiene 2.8 Å, y el La^{3+} 3.1 Å, además de presentar otras propiedades parecidas a las del calcio, como es el efecto estabilizador de membrana (Takata et al, 1966). El La^{3+} sin embargo, no sustituye al calcio en sus funciones fisiológicas.

La alta afinidad del La^{3+} por sitios de la membrana por donde se transporta calcio, unión que al parecer es irreversible (Weiss, 1974), hace que éste ión sea un eficiente bloqueador de corrientes de calcio, como se ha demostrado por los experimentos de van Breemen y De Weer (1970), en el axón gigante del calamar, donde el La^{3+} inhibe hasta un 87% la salida de ^{45}Ca previamente inyectado a la preparación.

En mitocondrias aisladas, y a concentraciones micromolares, el La^{3+} inhibe la captura de calcio, aunque al parecer con una especificidad relativa, ya que si la preparación

es expuesta primero al La^{3+} , el calcio no desplaza a éste de su sitio, pero si la preparación se expone primero al calcio, el La^{3+} aún es capaz de unirse a la membrana, sin desplazar al calcio. Lo anterior demuestra que en mitocondrias el La^{3+} tiene una afinidad por sitios de transporte de calcio, pero también por otros que no son específicos para dicho catión (Lehninger y Carafoli, 1971).

En la sinapsis neuromuscular de la rana, el lantano tiene un efecto dual sobre la liberación del transmisor, ya que inhibe la liberación producida por despolarización, pero en estado de reposo, aumenta la liberación espontánea, medida como un aumento de los potenciales postsinápticos miniatura (De Bassio et al, 1971; Heuser y Miledi, 1971; Miledi et al, 1980). En sinaptosomas, predomina principalmente su efecto inhibitor sobre la liberación de transmisor producida por despolarización, y sólo se observa un pequeño efecto estimulador sobre la liberación espontánea (Osborne y Bradford, 1975; Tapia y Arias, 1981).

El lantano inyectado intraperitonealmente a ratones, contrariamente a lo que cabría esperar de un agente bloqueador del calcio, no produce mayores efectos. Sin embargo, si se inyecta RRu después del La^{3+} , la parálisis flácida que produce el colorante por sí solo, no se presenta (Tapia, 1982),

aunque el lantano no es capaz de antagonizar el efecto del colorante, si es administrado después de éste.

c.- 4-aminopiridina (4-AP): La 4-AP y otras aminopiridinas han sido empleadas como drogas de interés experimental, por sus efectos sobre el sistema nervioso. Ya se mencionó que la 4-AP bloquea los canales de K^+ , con lo cual se prolonga considerablemente la despolarización en axones (Molgó et al, 1977); la 4-AP tiene además la propiedad de facilitar la liberación de transmisores, aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud.

Molgó y colaboradores (1977), demostraron en la placa neuromuscular de la rana, que la 4-AP no afecta la postsinapsis, ya que no modifica el potencial de membrana, ni la amplitud de los potenciales miniatura, ni los receptores al transmisor. Su acción parece ser puramente presináptica, lo cual constituye una ventaja experimental.

En estado de reposo, en la placa motora de la rana, la 4-AP aumenta la frecuencia de los potenciales miniatura (Durant y Marshall, 1978), aunque esto no es observado en la placa neuromuscular de mamíferos (Lundh, 1978).

El efecto facilitador de la 4-AP sobre la liberación de transmisores se observa también en el sistema nervioso cen-

tral. En la médula espinal de la rana (Galindo y Rudomín, 1978), y en rebanadas de hipocampo de rata (Buckle y Haas, 1982), la 4-AP aumenta la liberación de transmisores excitadores e inhibidores, medidos por registros electrofisiológicos. En sinaptosomas, la 4-AP produce un aumento de la liberación espontánea, sin modificar la liberación estimulada por despolarización (Tapia y Sitges, 1982).

La estimulación producida por la 4-AP sobre la liberación de transmisores, es dependiente de la concentración extracelular de calcio, por lo que se ha propuesto que ésta droga podría aumentar la salida de neurotransmisor, incrementando el flujo de calcio a la terminal nerviosa (Lundh y Thesleff, 1977; Thesleff, 1980), lo cual podría ser consecuencia del efecto inhibitor de la 4-AP sobre los canales de K^+ .

Según lo anterior, al bloquearse los canales de potasio, el tiempo de despolarización se alarga, ya que la repolarización es lenta, lo cual hace que los canales de calcio sensibles a voltaje se mantengan abiertos por más tiempo, lo que resulta en una mayor salida de transmisor.

La 4-AP restituye la transmisión sináptica bloqueada por d-tubocurarina en la placa motora de rata (Kim et al, 1980), y revierte la parálisis producida por la toxina botulínica en ratas (Lundh, Leander y Thesleff, 1977). Administrada por

por vía intraperitoneal y en dosis pequeñas, de menos de 53 $\mu\text{mol/kg}$, no tiene efectos, pero a dosis mayores que la mencionada, produce convulsiones. Las dosis menores son capaces sin embargo, de antagonizar la parálisis flácida producida por el RRu (Tapia, 1982).

6.- Objetivos

Como se ha descrito en la sección anterior, tanto el RRu como la 4-AP y el lantano, tienen efectos fisiológicos, tanto in vitro como in vivo, debido aparentemente a modificaciones del transporte de calcio, hecho fundamental en lo que se refiere a la liberación de los neurotransmisores. En este trabajo nos propusimos estudiar algunos de los posibles mecanismos de la acción antagónica de la 4-AP y del lantano, sobre el efecto del RRu, así como la acción de la 4-AP sobre los movimientos de calcio.

El modelo experimental escogido fue el de la preparación de terminales nerviosas aisladas o sinaptosomas. Específicamente, los objetivos de éste trabajo fueron:

- 1.- Determinar si la 4-AP y el lantano pueden antagonizar los efectos del RRu, por un mecanismo basado en su afinidad por sitios de transporte de calcio en la membrana del sinaptosoma.

2.- Determinar si la 4-AP tiene una acción directa sobre el transporte de calcio, probablemente aumentando la permeabilidad de la membrana del sinaptosoma al ión, por sí sola o en presencia de RRu.

3.- Relacionar los resultados de los puntos anteriores con los efectos in vitro e in vivo que éstas drogas tienen sobre la transmisión nerviosa.

II: MATERIALES Y METODOS

1.- Preparación de sinaptosomas

En todos los experimentos se utilizó una preparación de sinaptosomas de cerebro de ratón de los que se eliminó el cerebelo, de animales con un peso de entre 25 y 30 gr. La preparación de sinaptosomas fué aislada según la técnica de Hajós (1975), con algunas modificaciones, la cual se describe a continuación:

a.- Se homogenizan 4 cerebros, que equivale aproximadamente a 1.2 gr de tejido, en 12 ml de sacarosa 0.32 M, empleando un mazo de teflón y homogenizador de vidrio. Este homogenado se centrifuga a 1,500 x g, durante 10 minutos.

b.- El sobrenadante que se obtiene se centrifuga a 11,000 x g, durante 20 minutos.

c.- El sedimento de la operación anterior se resuspende en 4.5 ml de sacarosa 0.32 M, y se coloca esta resuspensión con cuidado sobre 20 ml de sacarosa 0.8 M contenida en un tubo de centrifuga; éste gradiente se centrifuga a 9,000 x g, por 25 minutos.

d.- De la centrifugación anterior, se obtienen 2 bandas y un botón de sedimento. La banda superior, en la interfase de sacarosa 0.32 y 0.8 M corresponde a mielina; la segunda banda, que ocupa la mayor parte de la sacarosa 0.8 M es la

fracción de los sinaptosomas. El sedimento contiene principalmente mitocondrias.

La fracción sinaptosomal se recupera del resto, y se diluye con 3 volúmenes de sacarosa 0.32 M. para recuperar la isotonicidad.

e.- La fracción sinaptosomal así diluída, se centrifuga a 18,000 x g, durante 15 minutos, para concentrar los sinaptosomas en un sedimento, que finalmente se resuspende en un medio iónico apropiado, en un volumen final de 3 ml por cada 4 cerebros procesados.

Los experimentos realizados con la fracción sinaptosomal así obtenida, comprenden dos grupos. En el primer grupo, se estudió la unión del RRu a las membranas de sinaptosomas, y su desplazamiento por el La^{3+} y la 4-AP; el segundo grupo comprende experimentos de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por los sinaptosomas, y el efecto del RRu, la 4-AP y el La^{3+} sobre esta captación.

2.- Unión y desplazamiento del RRu

Para estos experimentos, se aislaron sinaptosomas como se describió anteriormente, y se determinó la unión del RRu de la siguiente manera: en tubos de centrifuga de 2.0 ml de capacidad, se colocaron 0.2 ml de tejido que contenía de 0.3

a 0.6 mg de proteína, y se agregaron 1.3 ml de una solución de RRu 10 o 20 μM ; 15 y 30 nmolas de RRu respectivamente, en el volumen final de 1.5 ml.

Se empleó un medio de incubación libre de iones denominado sacarosa-Tris, de pH 7.4, y un medio iónico Krebs-Tris, pH 7.4, conteniendo en concentraciones mM lo siguiente: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl_2 como se indica en las tablas de resultados, Tris(hidroximetil)aminometano 25 y glucosa 5.6. El pH se ajustó a 7.4 con HCl concentrado.

La mezcla de tejido y RRu se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, al término de los cuales se centrifugó a 20,800 x g, por 10 minutos. El sobrenadante de ésta operación fué separado y su absorbancia medida en un espectofotómetro, a 540 nm, absorbancia máxima del RRu.

En los experimentos para determinar el desplazamiento del RRu unido, el sedimento de sinaptosomas después del procedimiento descrito, fué resuspendido en soluciones que contenían La^{3+} o 4-AP en concentraciones de 100 μM y 0.2 μM respectivamente. El tejido resuspendido se recentrifugó a 20,800 x g, durante 10 minutos, y se midió la absorbancia del nuevo sobrenadante, también a 540 nm.

Cada condición experimental fué hecha por duplicado, con un control que contenía medio de resuspensión sin droga alguna.

En cada ensayo se hizo una curva patrón con las soluciones de RRu empleadas, para determinar por diferencia de absorbancia, la cantidad de colorante unido a los sinaptosomas en el primer sobrenadante, y la cantidad que fue desplazada en las condiciones experimentales y control del segundo sobrenadante.

3.- Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Una vez obtenidos los sinaptosomas, en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad se colocaron 0.2 ml de tejido, preincubándose con agitación constante a 37 °C durante 10 minutos. El medio de preincubación fue similar al medio Krebs-Tris empleado en los experimentos de unión de RRu, pero sin fosfatos ni calcio. Después del periodo de preincubación, se agregaron 0.2 ml de un medio radioactivo, que contenía 1 μCi de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, y una concentración de calcio radioactivo apropiada para tener una concentración final de 0.2 o 2 mM, según se indica en las gráficas de resultados; para las condiciones de despolarización, se usó KCl 47 mM en los medios de incubación, reduciéndose el NaCl a 73 mM.

Se dejó captar la marca por tiempos que variaron entre 5 y 120 segundos, y la captación se detuvo por dilución del medio de captación con 4.5 ml de medio sin radioactividad, que

contenía 2 mM de calcio y filtrando inmediatamente con presión negativa sobre filtros Millipore de 0.65 μm de poro, los cuales se lavaron dos veces más, con 4.5 ml de medio sin marca radioactiva.

La radioactividad de los filtros, con el tejido que contenía la marca captada, se midió en un contador de centelleo líquido, después de agregar 5 ml de Tritosol como líquido de centelleo (Fricke, 1975). Como los filtros, a pesar del lavado retienen cierta cantidad de radioactividad por sí mismos, antes de cada ensayo se sumergieron en CaCl_2 10 mM para reducir ésta captación del filtro; además, en cada ensayo se incluyeron filtros en los que se hizo pasar una solución radioactiva pero sin tejido. Las lecturas de estos filtros fueron restadas a las obtenidas con tejido. En cada ensayo se midió también la radioactividad de una alícuota de 20 μl de los medios de captación usados, como una medida directa de la radioactividad real de cada experimento, ya que la vida media del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ es relativamente corta.

La proteína de la preparación se midió por el método de Lowry (1957).

III: RESULTADOS

1.- Unión del RRu y su desplazamiento por el La^{3+} y la 4-AP

Como se observa en la tabla I, en un medio de incubación sin iones, casi la totalidad del RRu presente en el medio, se une a las membranas de sinaptosomas, alcanzando un 95.6% con 10 μM de RRu, y un 73.6% con 20 μM del colorante. Aunque la unión del colorante es muy rápida, aquí se utilizó un tiempo de incubación grande, para asegurar un máximo de unión.

El desplazamiento del RRu por el La^{3+} 100 μM , es muy pequeño en estas condiciones, apenas de 6.5 y 7.1% de lo que se unió, sin embargo, es de 3 a 4 veces mayor que el desplazamiento por el medio sin La^{3+} del control.

En la tabla II, se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizó un medio de incubación con iones, observándose una importante reducción en el porcentaje de unión en comparación con el medio sin iones, y una pequeña diferencia entre un medio con calcio y otro sin él, siendo de 31.9% vs 26.1% con RRu 10 μM , y 24.8% vs 19.5% para RRu 20 μM . El desplazamiento del RRu en estos ensayos fue del 15.3% en el medio con calcio, y del 13.4% en un medio sin calcio, ambos porcentajes expresados como el promedio experimental, restando el promedio control, para la concentración 10 μM de RRu.

Tabla I: Desplazamiento de RRu por La^{3+} en sinaptosomas, en un medio de Sacarosa-Tris (pH 7.4).

RRu 10 μM				RRu 20 μM		
% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)			% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)	
	CONTROL	La^{3+} 100 μM			CONTROL	La^{3+} 100 μM
95.6 \pm 1.3	2.0 \pm 1.2	6.5 \pm 0.5		73.6 \pm 2.0	1.6 \pm 0.5	7.1 \pm 1.5

Los sinaptosomas fueron incubados con 10 o 20 μM de RRu, sedimentados por centrifugación, y el sobrenadante medido a 540 nm. El sedimento fué, resuspendido en un medio con o sin La^{3+} 100 μM , y el RRu desplazado se midió del sobrenadante, después de una segunda centrifugación. Promedio de 4 experimentos \pm E.S.

Tabla I: Desplazamiento de RRu por La^{3+} en sinaptosomas, en un medio de Sacarosa-Tris (pH 7.4).

RRu 10 μM			RRu 20 μM		
% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)		% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)	
	CONTROL	La^{3+} 100 μM		CONTROL	La^{3+} 100 μM
95.6 \pm 1.3	2.0 \pm 1.2	6.5 \pm 0.5	73.6 \pm 2.0	1.6 \pm 0.5	7.1 \pm 1.5

Los sinaptosomas fueron incubados con 10 o 20 μM de RRu, sedimentados por centrifugación, y el sobrenadante medido a 540 nm. El sedimento fué, resuspendido en un medio con o sin La^{3+} 100 μM , y el RRu desplazado se midió del sobrenadante, después de una segunda centrifugación. Promedio de 4 experimentos \pm E.S.

Tabla II: Desplazamiento de RRu por La^{3+} en sinaptosomas, en un medio Krebs-Tris (pH 7.4).

	RRu 10 μM			RRu 20 μM		
	% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)		% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)	
		CONTROL	La^{3+} 100 μM		CONTROL	La^{3+} 100 μM
Ca^{2+}	26.1 \pm 3.3	30.2 \pm 6.5	45.5 \pm 6.7	19.5 \pm 1.0	20.2 \pm 3.0	37.9 \pm 3.1
Sin Ca^{2+}	31.9 \pm 4.0	27.6 \pm 8.1	41.0 \pm 3.4	24.8 \pm 2.3	17.1 \pm 2.6	32.8 \pm 7.6

Los sinaptosomas fueron incubados con 10 o 20 μM de RRu, sedimentados por centrifugación, y el sobrenadante medido a 540 nm. El sedimento fué resuspendido en un medio con o sin La^{3+} 100 μM , y el RRu desplazado se midió del sobrenadante, después de una segunda centrifugación. Promedio de 9 experimentos \pm E.S.

Para 20 μM , el La^{3+} desplazó 17.5% en el medio con calcio, más que los controles. En estos últimos, el desplazamiento fue también mayor en presencia que en ausencia de iones (tablas I y II).

Los ensayos con la misma metodología, pero empleando a la 4-AP como droga desplazadora del RRu, se resumen en la tabla III. Los resultados aquí obtenidos muestran que la 4-AP no es capaz de desplazar al RRu; más aún, con 4-AP los valores de desplazamiento tendieron a ser menores que los controles, resultando 22.8% vs 24.8% en el medio con calcio, y 18.7% vs 21.4% en un medio sin calcio, para una concentración 10 μM de RRu; para RRu 20 μM resultó 18.6% vs 21.0% en un medio con calcio, y 18.6% vs 22.1% en un medio sin calcio.

2.- Captación de calcio por los sinaptosomas

La captación de calcio fue inhibida de forma notoria por el RRu, como se observa en la gráfica 1, pero sólo se afecta la captura estimulada por despolarización, mientras que en condiciones basales no hubo diferencias con el control. El efecto inhibitor se muestra mejor si se grafica sólo la captación bajo despolarización a la que se ha restado la captación basal, como se muestra en la gráfica 2. De esta manera, se obtienen valores de inhibición de 89% a los 30 segundos, tiempo

Tabla III : Desplazamiento de RRu por 4-AP en sinaptosomas, en un medio Krebs-Tris (pH 7.4).

	RRu 10 μ M			RRu 20 μ M		
	% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)		% UNIDO	% DESPLAZADO (unido=100)	
		CONTROL	4-AP 0.2 mM		CONTROL	4-AP 0.2 mM
Ca ²⁺	28.6 \pm 1.8	24.8 \pm 2.4	22.8 \pm 1.6	20.4 \pm 1.2	21.0 \pm 2.3	18.6 \pm 2.0
Sin Ca ²⁺	30.0 \pm 2.0	21.4 \pm 2.9	18.7 \pm 1.2	20.5 \pm 1.4	22.1 \pm 4.6	18.6 \pm 2.6

Los sinaptosomas fueron incubados con 10 o 20 μ M de RRu, sedimentados por centrifugación, y el sobrenadante medido a 540 nm. El sedimento fué resuspendido en un medio con o sin 4-AP .2 mM, y el RRu desplazado se midió del sobrenadante, después de una segunda centrifugación. Promedio de 7 experimentos \pm E.S.

de la primera medición, y de 72% y 71% a los 60 y 120 segundos respectivamente. Como se ve, la inhibición es muy alta en los primeros segundos de la captación, que corresponde con la pendiente más alta en la condición sin RRu.

Con los tiempos de captación similares a los de las gráficas 1 y 2, en la gráfica 3 se muestra el efecto inhibitor del lantano, donde la inhibición es notoria también en condiciones de despolarización, aunque menor en comparación con la inhibición que produce el RRu. Restando los valores basales, de manera similar a la gráfica 2, se tiene una inhibición que decrece rápidamente de un 70% a los 30 segundos, a 61% y 37% en 60 y 120 segundos respectivamente (gráfica 4).

El efecto de la 4-AP sobre la captación de calcio se estudió con una concentración de calcio de 0.2 mM, con los resultados que se observan en las gráficas 5 y 6, para varios tiempos de captación. La gráfica 5 muestra una rápida captación de los primeros segundos, y después de esto, tiende a ser menor, mientras que las mediciones basales resultaron más estables a lo largo de los tres tiempos usados. En ningún caso, ni en condiciones basales, ni bajo despolarización se observó efecto alguno de la 4-AP sobre la captación de calcio.

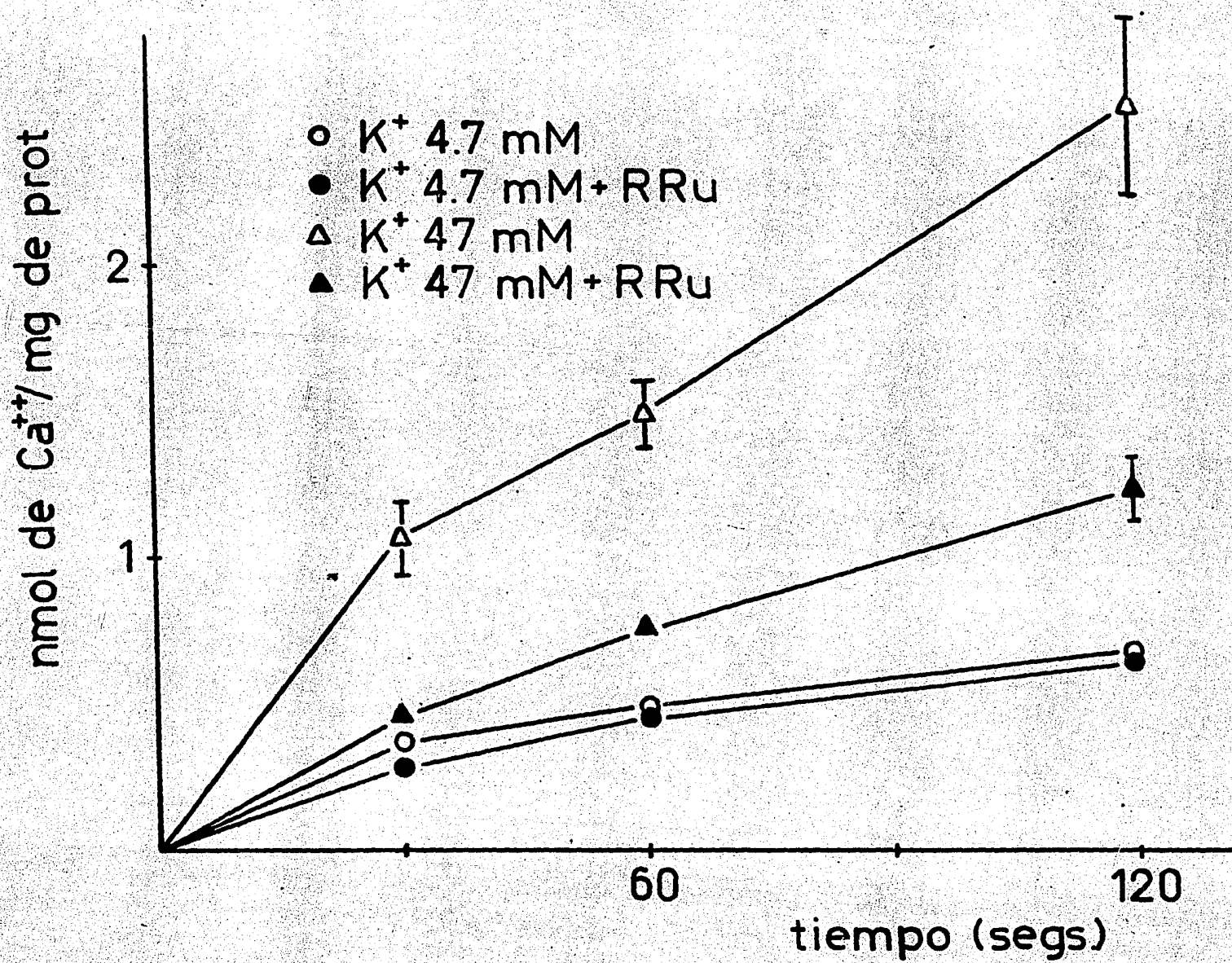
La falta de efecto de la 4-AP se confirmó utilizando una concentración de calcio más parecida a la fisiológica, de 2 mM

como se muestra en la gráfica 7, sin encontrar diferencias significativas entre las condiciones control y con 4-AP 0.2 mM. En la gráfica 8, están los resultados obtenidos de los experimentos en que se estudió el efecto de la 4-AP sobre la captación de calcio en una preparación de sinaptosomas bloqueada con RRu. La 4-AP no fue capaz de revertir el efecto inhibitor del RRu bajo estimulación por despolarización, en concentración 0.2 mM, ni tampoco cuando la concentración de la droga se aumentó hasta 1 mM, con la misma concentración de RRu; esto último se muestra en la gráfica 9.

GRAFICA 1: Inhibición de la captación de calcio por RRU en sinaptosomas.

Ensayos realizados con medios de incubación, Krebs-Tris, pH 7.4, sin fosfatos, y Ca^{2+} 2 mM. El RRU se adicionó durante el periodo de preincubación, para una concentración de 10 μM . Resultados promedio de 7 experimentos, \pm E.S. Donde no se muestra E.S., es porque resultó muy pequeño, y se prefirió representar sólo el punto -- promedio. La anterior indicación se siguió para las demás gráficas.

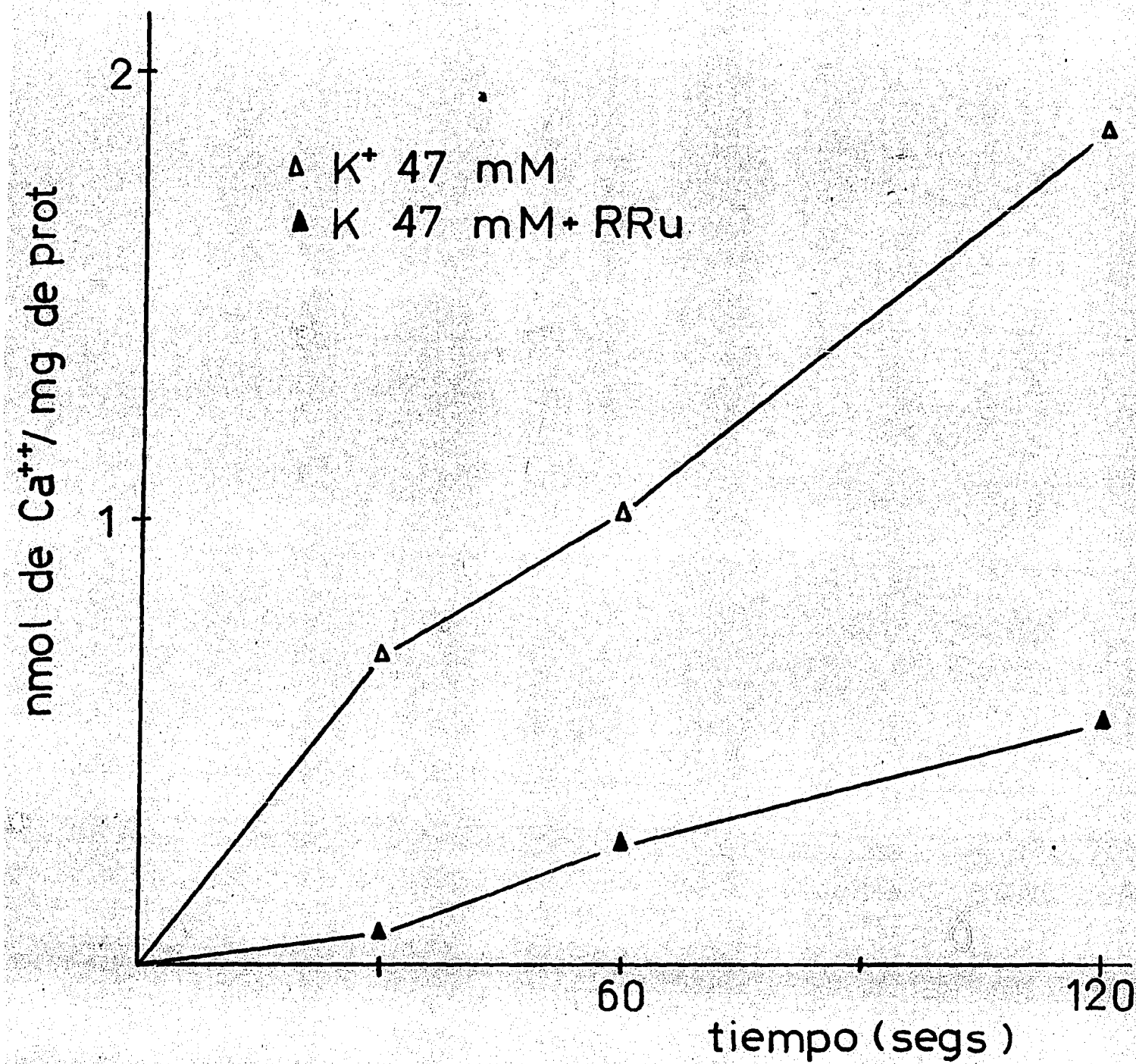
GRAFICA 1



GRAFICA 2: Inhibición neta en la captación de calcio por RRu, en sinaptosomas

Gráfica resultante de restar la captación basal de la gráfica 1, para representar la captación neta, en condiciones de despolarización, en presencia de RRu 10 μM . Medios de incubación: Krebs-Tris, pH 7.4, sin fosfatos, y Ca^{2+} 2 mM. Resultados promedio de 7 experimentos, \pm E.S.

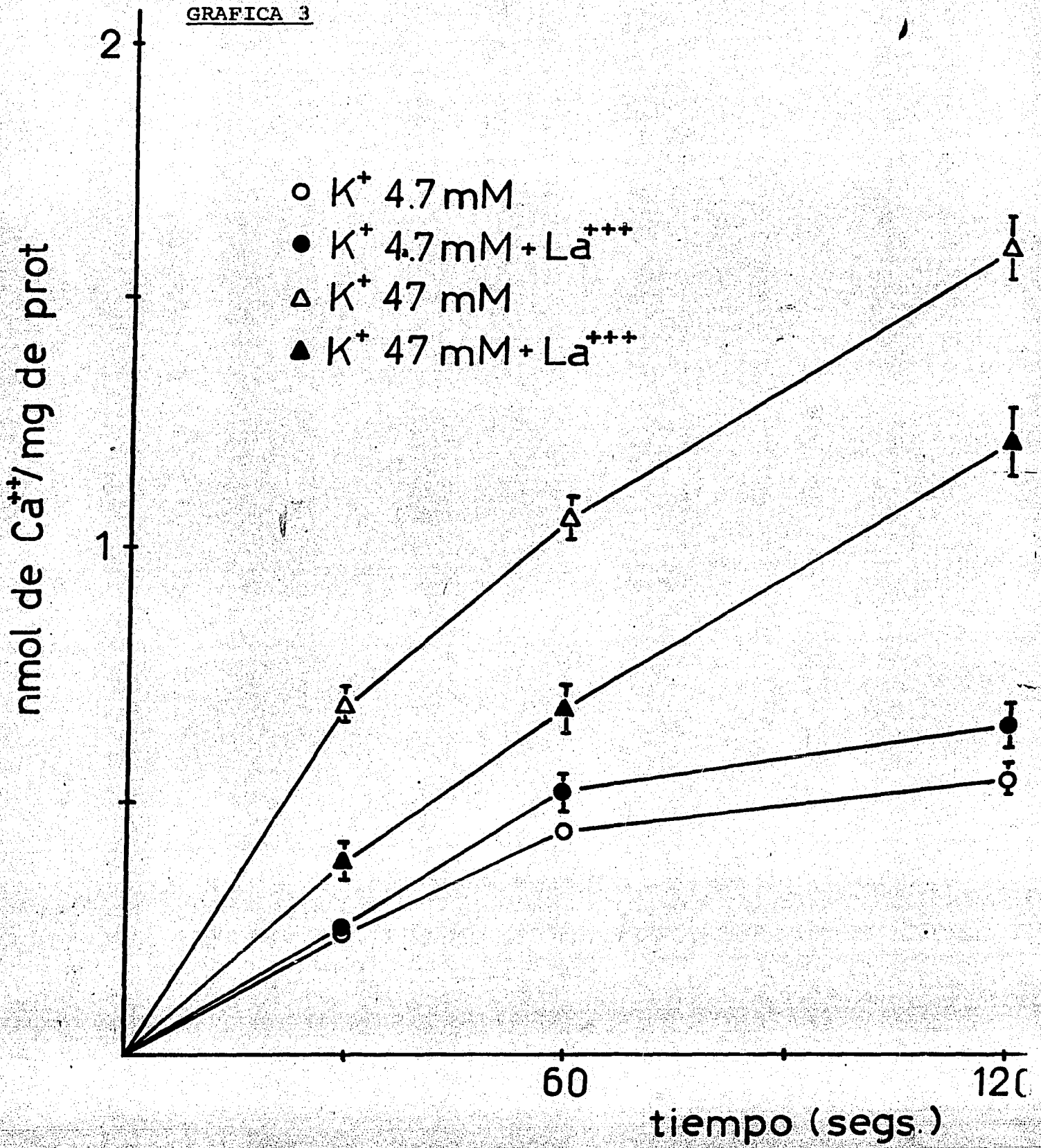
GRAFICA 2



GRAFICA 3: Inhibición de la captura de calcio
en sinaptosomas, producida por La³⁺.

El La³⁺ se agregó durante el periodo de preincubación de 10 minutos, para una concentración de 100 μ M. Se usaron medios de incubación Krebs-Tris, pH 7.4, sin fosfatos, y Ca²⁺ 2 mM de concentración final. Resultados promedio de 6 experimentos, \pm E.S.

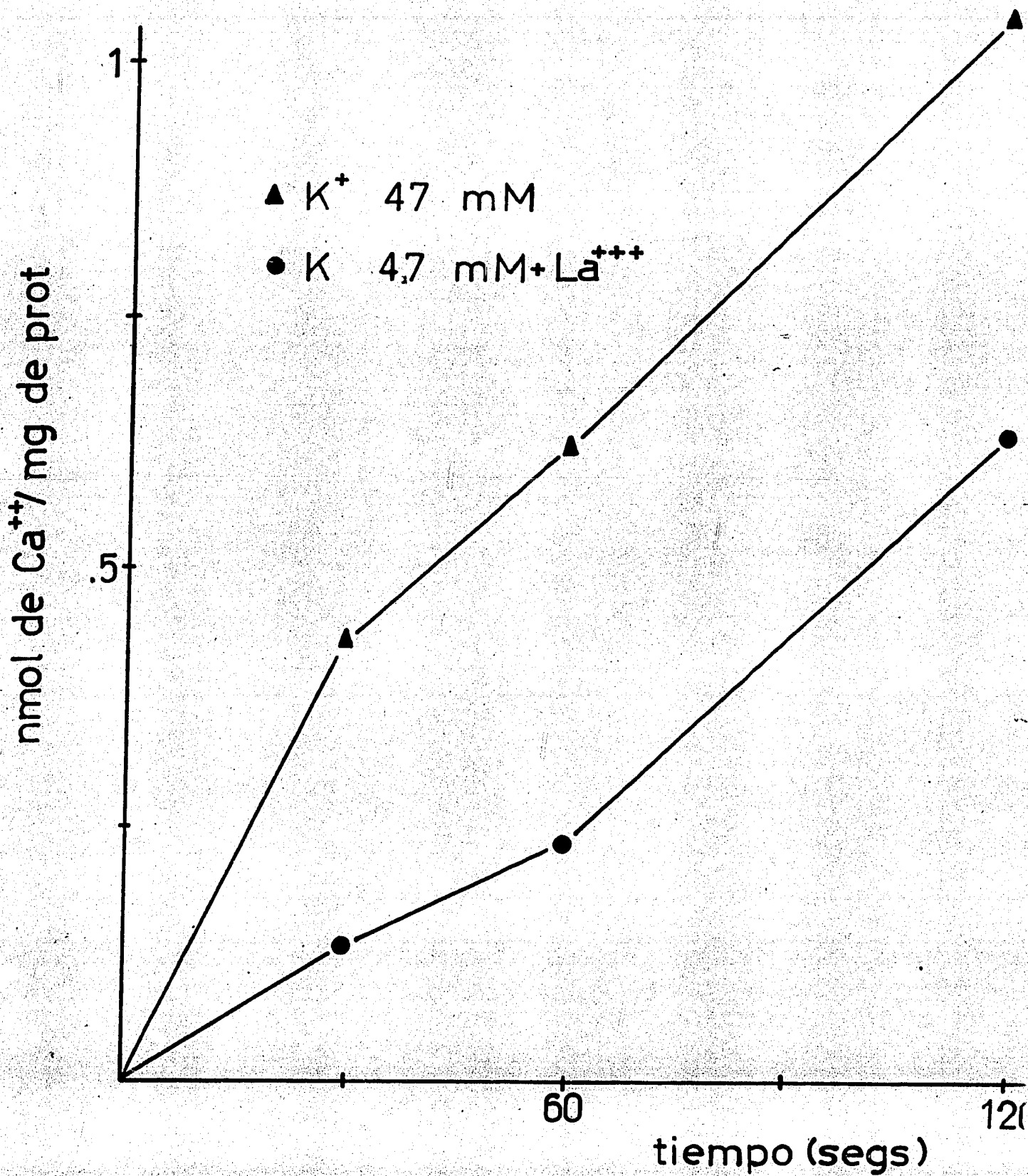
GRAFICA 3



GRAFICA 4: Inhibición de la captación de calcio por La^{3+} en sinaptosomas.

Gráfica resultante de restar los valores de la captación basal (K^+ 4.7 mM) de la gráfica 3, para mostrar la inhibición neta de la captación de calcio en condiciones de despolarización por alto potasio. Condiciones de captación como las de la gráfica 3. Resultados promedio de 7 experimentos, \pm E.S.

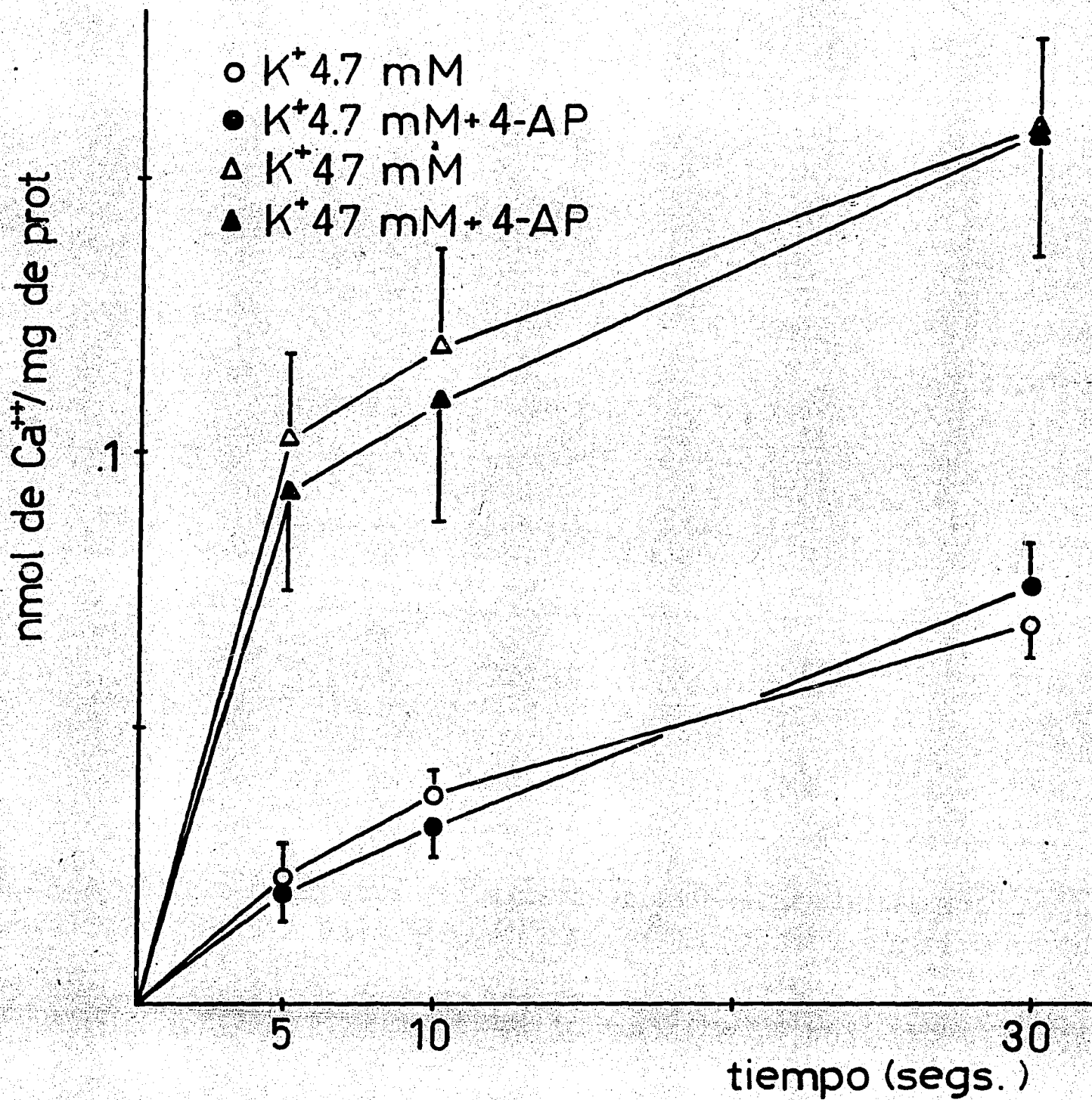
GRAFICA 4



GRAFICA 5: Efecto de la 4AP sobre la captación
de calcio en sinaptosomas.

Captación de calcio en presencia de 4-AP
0.2 mM, agregada después del periodo de prein-
cubación, con el medio radioactivo. Se usaron
medios Krebs-Tris, pH 7.4 sin fosfatos, y
 Ca^{2+} 0.2 mM de concentración final. Resulta-
dos promedio de 8 experimentos, \pm E.S.

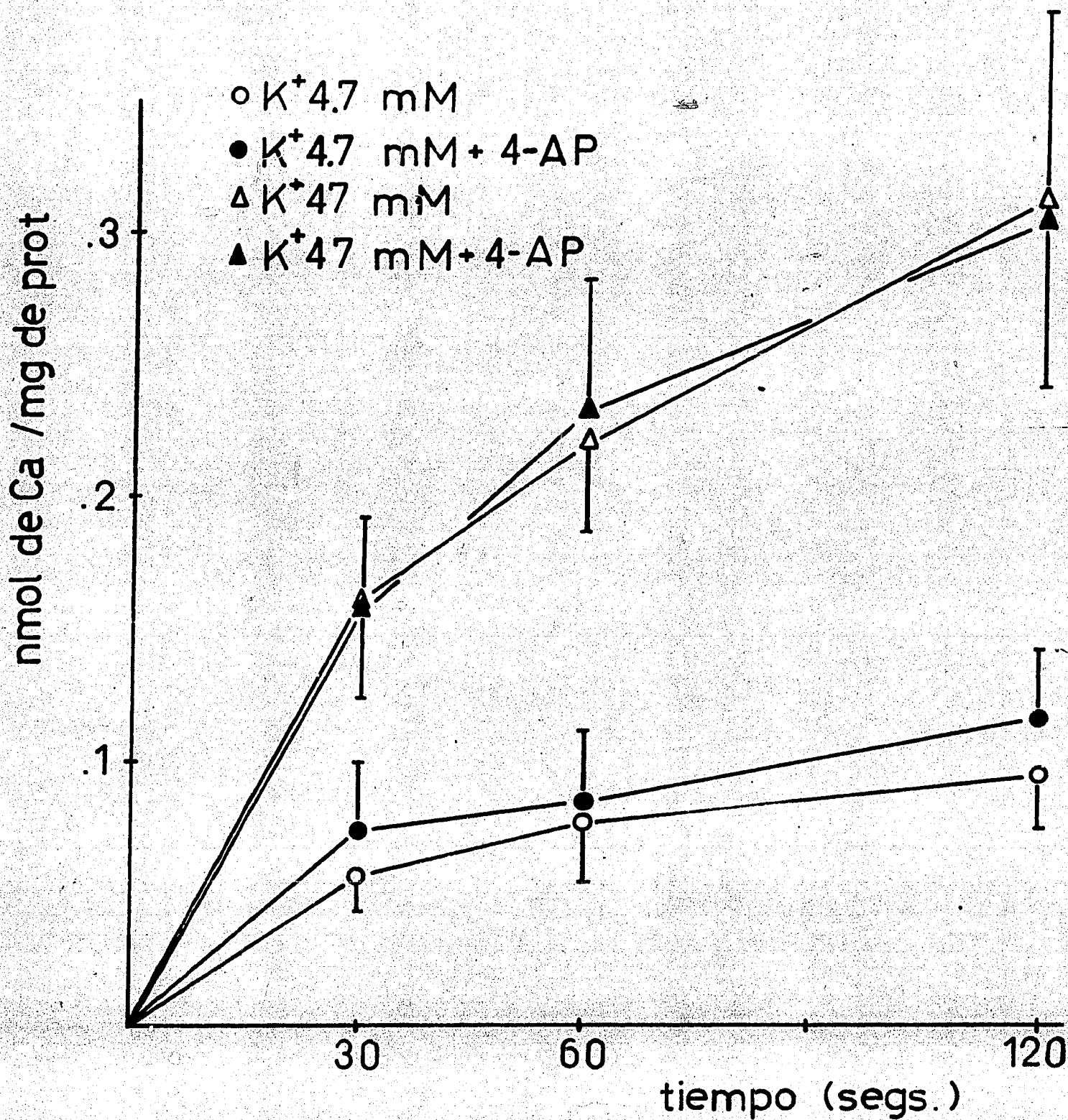
GRAFICA 5



GRAFICA 6: Efecto de la 4-AP sobre la captura de calcio en sinaptosomas.

Captura de calcio por sinaptosomas, en presencia de 4-AP 0.2 mM, agregada con el medio radioactivo después de una preincubación de 10 minutos; se utilizaron aquí tiempos de captación mayores a los de la gráfica 5, con medios de incubación y concentración de calcio similares. Resultados promedio de 5 experimentos, \pm E.S.

GRAFICA 6



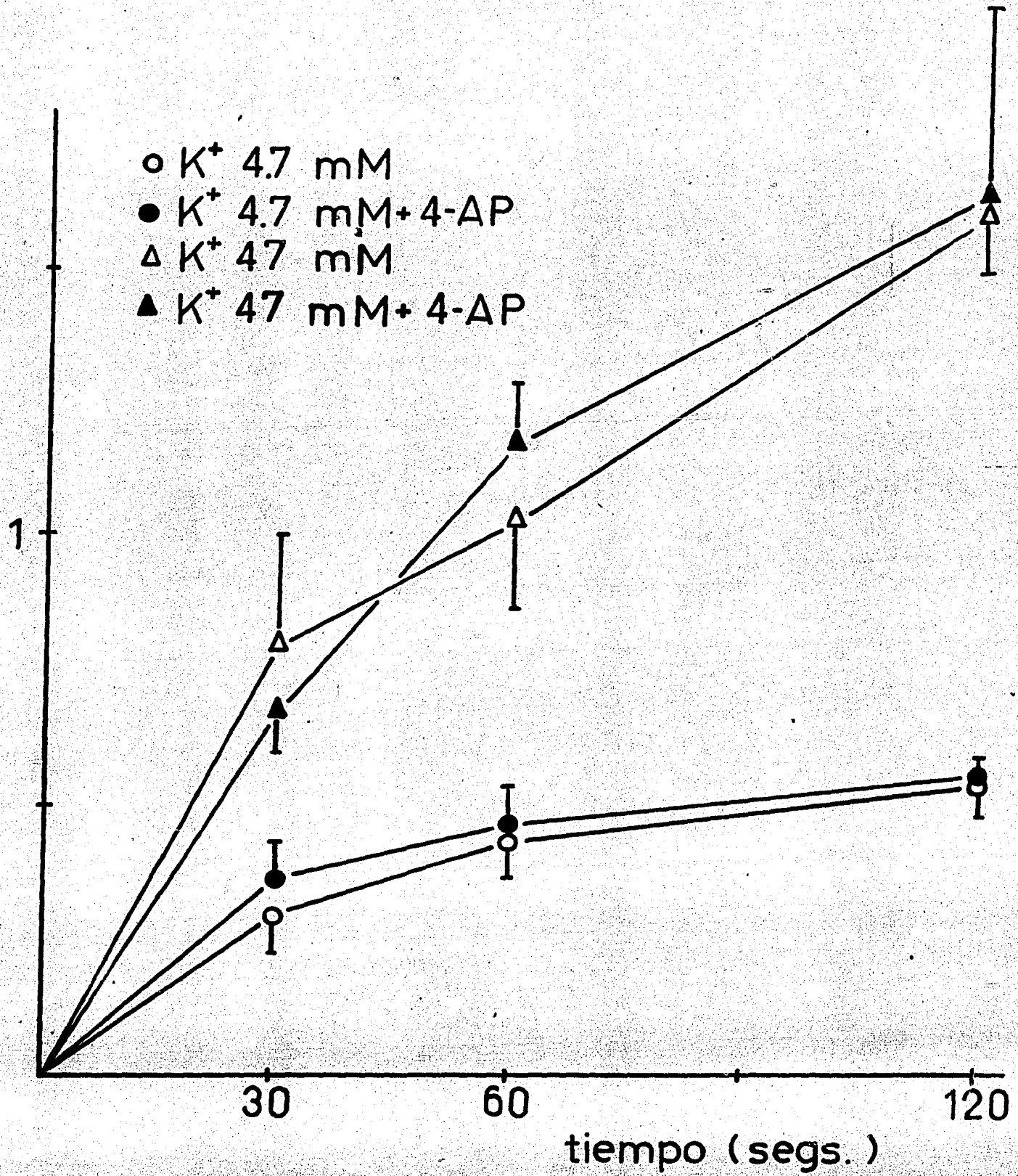
GRAFICA 7: Efecto de la 4-AP sobre la captura de calcio en sinaptosomas.

Captación de calcio por sinaptosomas, en presencia de 4-AP 0.2 mM, agregada con el medio radioactivo. Las condiciones experimentales son similares a las de la gráfica 6, excepto que se utilizó Ca^{2+} 2 mM en los medios de incubación. Resultados promedio de 4 experimentos, \pm E.S.

GRAFICA 7

nmol de Ca^{++} /mg de prot

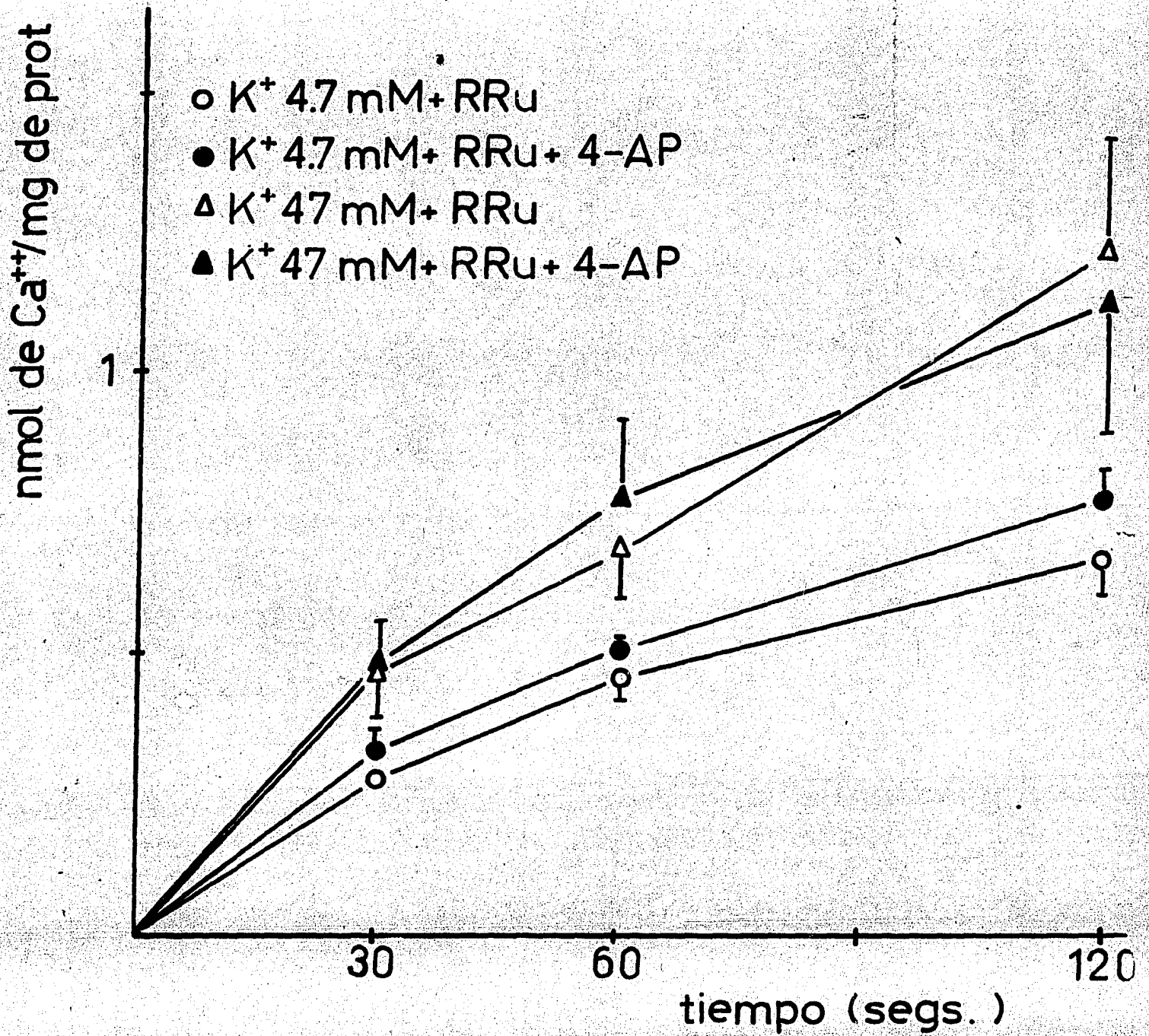
- K^+ 4.7 mM
- K^+ 4.7 mM + 4-AP
- △ K^+ 47 mM
- ▲ K^+ 47 mM + 4-AP



GRAFICA 8: Efecto de la 4-AP sobre la captación de calcio en una preparación sinaptosomal bloqueada con RRu.

Captación de calcio en presencia de 4-AP 0.2 mM, agregada con el medio radioactivo, después de 10 minutos de preincubación. El RRu se agregó durante la preincubación, para una concentración 10 μ M. Medios de incubación: Krebs-Tris, pH 7.4, sin fosfatos, y Ca^{2+} 2 mM de concentración final. Resultados promedio de 7 experimentos, \pm E.S.

GRAFICA 8

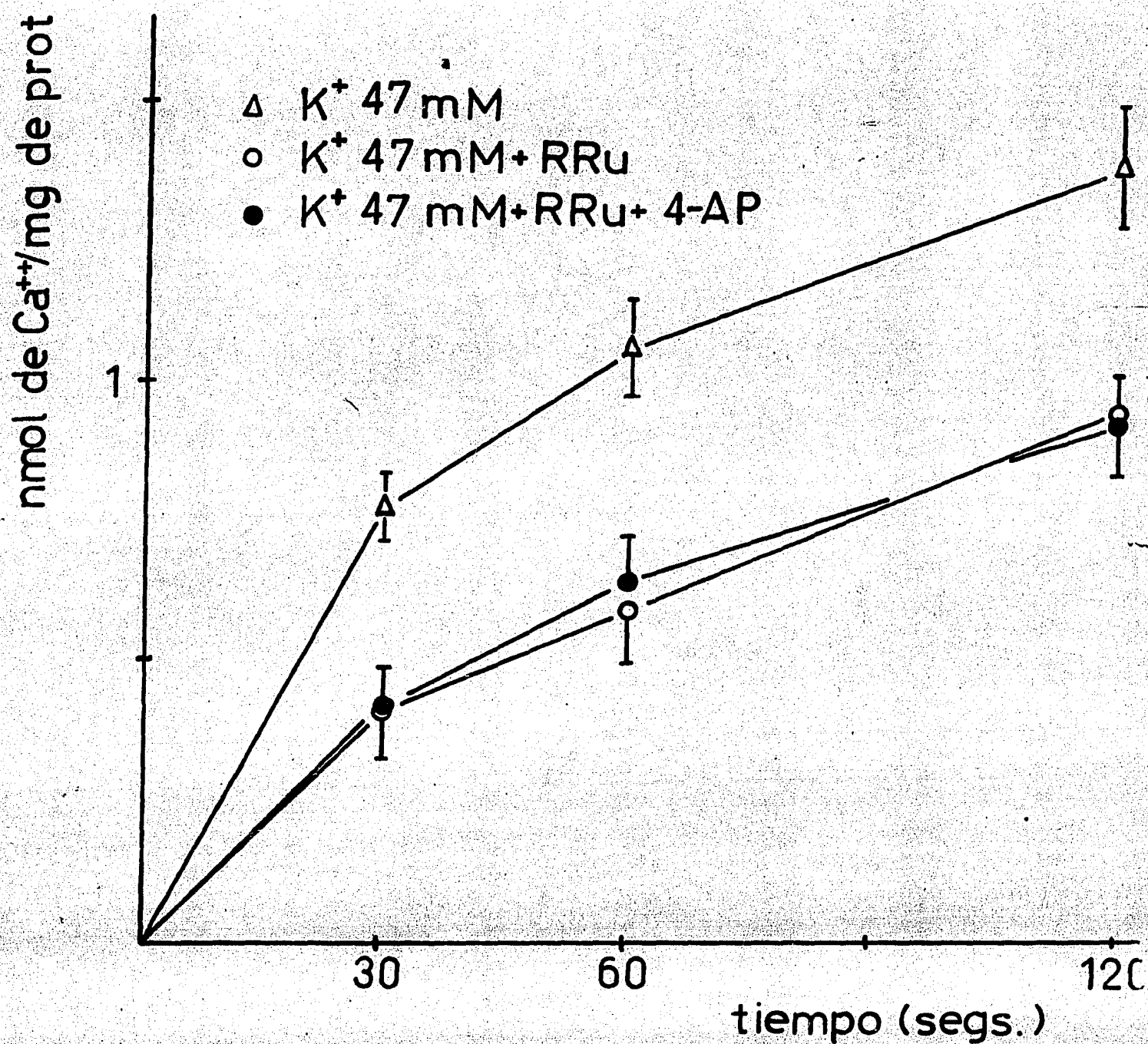


a

**GRAFICA 9: Efecto de la 4-AP sobre la captación
de calcio en una preparación sináptica
bloqueada con RRu.**

Condiciones experimentales similares a las de la gráfica 8, excepto que la concentración de 4-AP fue de 1 mM. Resultados promedio de 5 experimentos, \pm E.S.

GRAFICA 9



IV: DISCUSION Y CONCLUSIONES

1.- Unión y desplazamiento del RRu por el La^{3+} y la 4-AP

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar si la 4-AP y el La^{3+} desplazan al RRu unido a la membrana del sinaptosoma, para explicar de esta manera el efecto antagónico de la 4-AP sobre la parálisis flácida producida por el RRu in vivo, así como la prevención de dicho efecto del RRu por el La^{3+} , cuando éste último es administrado antes que el colorante (Tapia, 1982).

El RRu y el La^{3+} , ambos inhibidores del transporte de calcio, parecen unirse a un sitio común en la membrana del sinaptosoma, ya que el La^{3+} es capaz de desplazar al RRu unido con anterioridad. Dicho desplazamiento se observa mejor en un medio de incubación con iones que en uno sin éstos, lo cual sugiere que en presencia de cationes, hay una cierta competencia por la unión del RRu. Esto se confirma por el hecho de que, en un medio iónico, la unión del RRu es considerablemente menor (Tabla II), (Tapia y Arias, 1981).

Otras observaciones demuestran la afinidad del La^{3+} por sitios a los que se une el RRu, como son el hecho de que, in vitro, el La^{3+} preincubado con anterioridad, reduce la unión del colorante (Tapia y Arias, 1981), además de que in vivo, el La^{3+} inyectado antes que el RRu impide la aparición de la

parálisis flácida, pero no la revierte cuando es administrado después del colorante (Tapia, 1982).

Estos datos sugieren que, aunque el La^{3+} muestra que puede desplazar al RRu in vitro, esto no sucede in vivo; sin embargo, si parece haber un bloqueo de la unión del RRu por el La^{3+} inyectado previamente. A este respecto, es interesante el hecho de que el La^{3+} por sí mismo no produce parálisis flácida a pesar de que, como el RRu, inhibe la liberación de transmisores dependiente de calcio. Esto puede explicarse por el efecto dual del La^{3+} que ha sido descrito en preparaciones neuromusculares. Heuser y Miledi (1971), demostraron que el La^{3+} aumenta varios órdenes de magnitud la liberación espontánea de acetilcolina, mientras que inhibe la liberación producida por estimulación. Es razonable concluir que el primero de estos efectos es suficiente para hacer menos observable al segundo, en las condiciones experimentales in vivo, en los que no es afectada la actividad motora del animal.

A diferencia del La^{3+} , la 4-AP, droga que facilita la liberación espontánea de transmisores en sinaptosomas, en forma dependiente de calcio (Tapia y Sitges, 1982), no parece combinarse sobre el sitio de la membrana al que se une el RRu, ya que no lo desplaza en absoluto. Este hallazgo indica que el efecto antagonista de la 4-AP sobre la parálisis flá-

cida inducida por el RRu, no se debe a un desplazamiento del colorante unido a la membrana presináptica.

Dado que en los efectos de las drogas anteriormente mencionadas parece estar involucrado el calcio, se estudió si éstas modificaban la captación de Ca^{2+} por los sinaptosomas.

2.- Inhibición del transporte de calcio por el La^{3+}

Como se dijo anteriormente, el La^{3+} tiene un efecto dual sobre la liberación de transmisores, ya que por una parte inhibe la liberación estimulada por despolarización, y por otro aumenta la liberación espontánea en la placa neuromuscular (De Bassio et al, 1971; Heuser y Miledi, 1971). Con los resultados de captación de calcio en sinaptosomas aquí presentados, se explica la inhibición bajo despolarización, en vista de la inhibición que el La^{3+} produce sobre la captura de calcio cuando se despolariza la preparación con altas concentraciones de K^+ . Es posible que la estimulación de la liberación espontánea se deba a un desplazamiento de calcio endógeno unido a la membrana, hacia el citoplasma (Heuser y Miledi, 1971), aunque este fenómeno no es observado con claridad en sinaptosomas (Tapia y Arias, 1981).

3.- Inhibición del transporte de calcio por el RRu

El efecto que el RRu tiene in vivo, es atribuido a un bloqueo del transporte de calcio en la sinapsis neuromuscular o del sistema nervioso central (Tapia et al, 1976), ya que, tanto en placa muscular (Person y Kuhn, 1979), como en sinaptosomas (Tapia y Meza-Ruiz, 1977; Meza-Ruiz y Tapia, 1978), el RRu ha mostrado un claro efecto inhibitor de la liberación dependiente de calcio de los transmisores. En los resultados que aquí se presentan, se observa que el RRu inhibe la captación de calcio sólo bajo despolarización, por lo que es posible que sólo sean bloqueados los canales de calcio sensibles a voltaje. Si éste fuera el caso, dichos canales parecerían estar involucrados en el mantenimiento del tono muscular, pues de otro modo no podría explicarse la parálisis flácida producida por el colorante, ya que este no tiene efectos postsinápticos significativos (Person y Kuhn, 1979). Nuevamente, es difícil la correlación de los datos in vitro e in vivo, aunque parece ineludible la conclusión de que los efectos del RRu involucran a los mecanismos de liberación dependientes de calcio, a nivel de las terminales sinápticas.

4.- Efecto de la 4-AP sobre la captación de calcio

El efecto facilitador de la 4-AP sobre la liberación de los transmisores, se ha planteado como la consecuencia de un

mecanismo que consiste en aumentar el flujo de calcio a la terminal nerviosa (Lundh et al, 1977; Lundh y Thesleff, 1977; Molgó et al, 1977). Esto significaría que, in vivo, la 4-AP antagoniza al RRu aumentando el flujo de calcio, anulando así la inhibición de la liberación producida por el colorante. Los resultados obtenidos en la preparación sinaptosomal (gráficas 5, 6 y 7), muestran que la 4-AP no modifica por sí sola la entrada de calcio, ni en condiciones basales ni bajo despolarización. Esta carencia de efecto no se debe a problemas de metodología, pues los controles muestran siempre que, con despolarización por potasio, la captación es estimulada de manera semejante a los datos obtenidos por otros laboratorios (Nachshen y Blaustein, 1980).

El antagonismo sobre el efecto paralizante del RRu que ejerce la 4-AP, no se puede explicar por una reversión del bloqueo de la entrada de calcio que produce el colorante, pues aún con una concentración alta de 4-AP, no se encontró esta reversión (gráficas 8 y 9). En congruencia con estos resultados, la 4-AP tampoco revierte la inhibición de la liberación de GABA producida por RRu, aunque el colorante si es capaz de inhibir la liberación estimulada por 4-AP (Tapia, Sitges y Morales, enviado para publicación).

El efecto de la 4-AP sobre la liberación dependiente de

calcio en sinaptosomas, no se puede explicar por un aumento en la captación de calcio, lo cual sugiere que la 4-AP no está excitando la membrana del sinaptosoma. Sin embargo, en preparaciones como la del axón gigante del calamar, las aminopiridinas tienen un efecto despolarizante (Yeh et al, 1976; Kirsh y Narahashi, 1978), y en músculo esquelético de pollo inducen contracciones por un mecanismo que es inhibido por la TTX (Marshall et al, 1979), indicando así un probable efecto sobre la excitabilidad de la membrana. En sinaptosomas sin embargo, este efecto no se reproduce, ya que la 4-AP induce liberación de transmisores aún en presencia de la TTX, o en ausencia de sodio (Tapia, Sitges y Morales, enviado para publicación), descartándose por tanto un efecto excitador.

En conclusión, la 4-AP induce liberación de transmisores por un mecanismo que no es un efecto despolarizante, ni un aumento en la entrada de calcio a la terminal nerviosa.

Como sin embargo, la 4-AP actúa por un mecanismo dependiente de calcio (Tapia y Sitges, 1982), se propone que la droga puede facilitar el mecanismo de acoplamiento entre la unión del calcio extracelular a la membrana de la terminal nerviosa, con la consiguiente liberación de transmisor (Vizi et al, 1977), siendo esta facilitación efectiva aún a concentraciones bajas de calcio extracelular, o en presencia de inhibidores del transporte de calcio.

V: BIBLIOGRAFIA

- Alnaes, E. and Rahamimof, R., On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals, J. Physiol. (Lond.), 248 (1975):285-306
- Armstrong, C. M. and Hille, B., The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels in nerve membranes, J. Gen. Physiol., 59 (1972):388-400
- Baux, G., Simonneau, M. and Tauc, L., Transmitter release: ruthenium red used to demonstrate a possible role of sialic acid containing substrates, J. Physiol., 291 (1979):161-178
- Blaustein, M. P., Johnson, E. M. and Needleman, P., Calcium-dependent norepinephrine release from presynaptic nerve endings in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A., 69 (1972):2237-2240
- Blaustein, M. P., Effects of potassium, veratridine, and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro, J. Physiol. (Lond.), 247 (1975):617-655
- Blaustein, M. P. and Oborn, C. J., The influence of sodium on calcium fluxes in pinched off nerve terminals in vitro, J. Physiol. (Lond.), 247 (1975):657-686
- Blaustein, M. P., Mc. Graw, C. F., Somlyo, A. V. and Schweitzer E. S., How is the cytoplasmic calcium concentration contro-

lled in nerve terminals?, J. Physiol. (Paris), 76 (1980):
459-470

Bowen, J. M., Effects of rare earths and yttrium on striated
muscle and the neuromuscular junction, Can. J. Physiol.
Pharmacol., 50 (1972):603-611

Bradford, H. F., (1975), Isolated nerve terminals as an in
vitro preparation for the study of dynamic aspects of
transmitter metabolism and release, en: Handbook of Psycho-
pharmacology, (Iversen, L., Iversen, S. y Snyder, S. eds),
Vol 1, Plenum Press, New York, (1975), 191-252 pp

Buckle, P. J. and Haas, H. L., Enhancement of synaptic trans-
mission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the
rat, J. Physiol., 326 (1982):109-122

Cooper, J., Bloom, F. y Roth, R., Las bases bioquímicas de la
Neurofarmacología, Editorial El Manual Moderno, México,
D. F. (1977), 63-76 pp

Crompton, M., Moser, R., Lüdi, H. and Carafoli, E., The interre-
lations between the transport of sodium and calcium in mito-
chondria of various mammalian tissues, Eur. J. Biochem.
(1978):25-31

De Bassio, W. A., Schnitzler, R. M. and Parsons, R. L., Influen-
ce of lanthanum on transmitter release at the neuromuscular
junction, J. Neurobiol., 2 (1971):263-278

- De Groat, W. C., GABA-depolarization of a ganglion: antagonism by picrotoxin and bicuculine, Brain Research, 38 (1972):429-432
- De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodriguez de Lores Arnaiz, G. and Salganicoff, L., Cholinergic and non-Cholinergic nerve endings in rat brain, J. Neurochem., 9 (1962): 23-35
- Dodge, F. A. and Rahamimoff, R., Cooperative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction, J. Physiol., 193 (1967):419-432
- Durant, W. N. and Marshall, I. G., The effects of 3,4-diaminopyridine on spontaneous and evoked transmitter release at the frog neuromuscular junction, J. Physiol., 280 (1978): 21 P
- Fonnum, F., Malthe-Sorensen, D., Kvale, I., Soreide, A., Skrede, K. y Walaas, I., 1981, Glutamergic neurons: Localization and release of the transmitter, en: Regulatory mechanism of synaptic transmission, (R. Tapia y Cotman, C. eds.) Plenum Press, New York (1981):59-70
- Fricke, U., Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100, Analyt. Biochem., 63 (1975):555-558
- Galindo, J. and Rudomín, P., Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine, Neuroscience Letters, 10 (1978):299-304

- Gray, E. G., and Whittaker, V. P., The isolation of nerve endings from brain, J. Anat., 96 (1962):79-88
- Hajós, F., An improved method for preparation of synaptosomal fractions in high purity, Brain Research, 93 (1975):485-489
- Heuser, J. and Miledi, R., Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junction, Proc. R. Soc. B., 179 (1971):247-260
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of giant axon of Loligo, J. Physiol., 116 (1952):449-472
- Katz, B. and Miledi, R., The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses, Proc. R. Soc. B., 167 (1967):23-38
- Kim, Y. I., Goldner, M. M. and Saunders, D. B., Facilitatory effects of 4-aminopyridine on normal neuromuscular transmission, Muscle and Nerve, 3 (1980):105-111
- Kirsh, G. E. and Narahashi, T., 3,4-diaminopyridine: a potent new potassium channel blocker, Biophys. J., 22 (1978):507-512
- Lehninger, A. L. and Carafoli, E., The interaction of La^{3+} with mitochondria in relation to respiration-coupled Ca^{2+} transport, Arch. Biochem. Biophys., 143 (1971):506-515

- Lettvin, J. Y., Pickard, W. F., Mc Culloch, W. S. and Pitts, W.,
A theory of passive ion flux through axon membranes, Nature,
202 (1964):1338-1339
- Lowry, H. O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.,
Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol.
Chem., 193 (1951):265-275
- Lundh, H., Leander, S. and Thesleff, S., Antagonism of the pa-
ralysis produced by botulinum toxin in the rat, J. Neuro-
biol., 32 (1977):29-43
- Lundh, H. and Thesleff, S., The mode of action of 4-aminopyridine
and guanidine on transmitter release from motor nerve ter-
minals, Eur. J. Pharmacol., 42 (1977):411-412
- Lundh, H., Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmi-
ssion, Brain Research, 153 (1978):307-318
- Luthra, R. and Olson, M., The inhibition of calcium uptake and
release by rat liver mitochondria by ruthenium red, FEBS
Letters, 81 (1977):142-146
- Llinás, R. and Nicholson, C., Calcium role in depolarization-
secretion coupling: An aequorin study in squid giant synapse
Proc. Nat. Acad. Sci., 72 (1975):187-190
- Llinás, R., Steinberg, I. Z. and Walton, K., Presynaptic calcium
currents and their relation to synaptic transmission: Vol-
tage clamp study in giant synapse and theoretical model for

the calcium gate, Proc. Nat. Acad. Sci., 73 (1976):2918-2922

Llinás, R. and Steinberg, I. Z., The place of a calcium hypothesis in synaptic transmission, en: Neurosciences Res. Prog. Bull., Vol. 15 (1977):565-574

Marshall, I. G., Lambert, J. J. and Durant, N. N., Inhibition of aminopyridine-induced contractile activity in skeletal muscle by tetrodotoxin and by magnesium, Eur. J. Pharmacol., 54 (1979):9-14

Meza-Ruiz, G. and Tapia, R., ³H GABA in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red, Brain Research, 154 (1978):163-166

Miledi, R., Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals, Proc. R. Soc. B., 183 (1973):421-425

Miledi, R., Molenaar, P. C. and Polak, R. L., The effect of lanthanum ions on acetylcholine in frog muscle, J. Physiol., 309 (1980):199-214

Molgó, J., Lemeignan, M. and Lechat, P., Effects of 4-aminopyridine at the neuromuscular junction, J. Pharmacol. Exp. Ther., 203 (1977):653-663

Moore, J. W., Blaustein, M. P., Anderson, N. C. and Narahashi, T., Comparison of tetrodotoxin and procaine in internally perfused squid giant axons, J. Gen. Physiol., 50 (1967):1401-1411

- Nachshen, D. A. and Blaustein, M. P., Some properties of potassium-stimulated calcium influx in presynaptic nerve endings, J. Gen. Physiol., 76 (1980):709-727
- Nayler, W. G. and Grinwald, P., Calcium entry blockers and myocardial function, Federation Proc., 40 (1981):2855-2861
- Obata, K., Transmitter sensitivities of some nerve and muscle cells in culture, Brain Research, 73 (1974):71-88
- Osborne, R. H. and Bradford, H. F., The influence of sodium, potassium and lanthanum on amino acid release from spinal-medullary synaptosomes, J. Neurochem., 25 (1975): 35-41
- Pallotta, B. S., Magleby, K. L. and Marrett, J. N., Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^+ currents in rat muscle cell culture, Nature, 293 (1981):471-474
- Person, R. J. and Kuhn, J. A., Depression of spontaneous ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at neuromuscular junction, Brain Res. Bull., 4 (1979):669-674
- Pumplin, D. W., Reese, T. S. and Llinás, R., Are the membrane particles the calcium channels?, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78 (1981):7210-7213
- Rubin, R. P., Calcium and the secretory process, Plenum Press, New York, (1974).
- Scott, I. D., Akerman, K. E. and Nicholls, D. G., Calcium-ion

transport by intact synaptosomes, Biochem. J. 192 (1980):
873-880

Takata, M., Pickard, W. F., Lettvin, J. Y. and Moore, J. W.,
Ionic conductance changes in lobster axon membrane when
lanthanum is substituted for calcium, J. Gen. Physiol.,
50 (1966):461-471

Tapia, R., Meza-Ruíz, G., Durán, L. and Drucker-Colín, R. R.,
Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red
depending on route of administration, Brain Research, 116
(1976):101-109

Tapia, R. and Meza-Ruíz, G., Inhibition by ruthenium red of the
calcium-dependent release of ^3H GABA in synaptosomal frac-
tions, Brain Research, 126 (1977):160-166

Tapia, R. and Arias, C., Calcium transport and the release of
neurotransmitters: effects of drugs in vivo and in vitro,
en: Regulatory Mechanism of Synaptic Transmission, (Tapia,
R. and Cotman, C. W. eds.), Plenum Publishing Corporation,
USA (1981):169-186

Tapia, R., Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in
mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum, Neuroscien-
ces Letters, 30 (1982):73-77

Tapia, R. and Sitges, M., Effect of 4-aminopyridine on transmitter
release in synaptosomes, Brain Research, 250 (1982):291-299

- Thesleff, S., Aminopyridines and synaptic transmission, Neuroscience, 5 (1980):1413-1419
- Van Breemen, C. and De Weer, P., Lanthanum inhibition of ^{45}Ca efflux from the squid giant axon, Nature, 226 (1970):760-761
- Van Nueten, J. M. and Vanhoutte, P. M., Calcium blockers and vascular smooth muscle heterogeneity, Federation Proc., 40 (1981):2862-2865
- Vasington, F. D., Gazzoti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E., The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria, Biochem. Biophys. Acta (Amst.), 256 (1972):43-54
- Watson, E. L., Vicenzi, F. F. and Davis, P. W., Ca^{2+} -activated membrane ATPase activity: Selective inhibition by ruthenium red, Biochim. Biophys. Acta, 249 (1971):606-610
- Weiss, G. B., Cellular pharmacology of lanthanum, Ann. Rev. Pharmacol., 14 (1974):343-354
- Whittaker, V. P., Michaelson, I. A. and Kirkland, R. J. A., The separation of synaptic vesicles from nerve ending particles, Biochem. J., 90 (1964):293-303
- Winqvist, R. J., Webb, R. C. and Bohr, D., Calcium antagonism is no rose, Federation Proc., 40 (1981):2852-2854
- Wonnacott, S., Marchbanks, R. M. and Fiol, C., Ca^{2+} uptake by synaptosomes and its effect on the inhibition of acetyl-

choline release by botulinum toxin, J. Neurochem., 30
(1978):1127-1134

Yeh, J. Z., Oxford, C. H., Wu, C. H. and Narahashi, T., In-
teractions of aminopyridines with potassium channels of
squid axon membranes, Biophys. J., 16 (1976):77-81
