

2. Ej. No. 39



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

UNION DE ³H-GABA A MEMBRANAS AISLADAS
DEL OIDO INTERNO DE POLLO.

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

MARIA TERESA GONZALEZ VIVEROS



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.

I N D I C E

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	32
DISCUSION.....	46
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS.....	50

R E S U M E N

La porción vestibular del oído interno de los vertebrados es una de las principales fuentes de información sensorial que utiliza el Sistema Nervioso Central para mantener el equilibrio. La información es detectada en el vestíbulo por células pilosas sensoriales (células mecanorreceptoras) y enviadas al SNC a través de fibras aferentes que las inervan. A su vez, las células sensoriales reciben información central mediante conexiones eferentes.

Innumerables evidencias indican que esta transmisión es de naturaleza química y la identidad de los neurotransmisores es sujeto de controversia en la actualidad; sin embargo el neurotransmisor aferente parece ser el ácido γ -aminobutírico.

Meza y colaboradores en 1981 han demostrado que existe un mecanismo de transporte del alta afinidad el GABA que pudiera funcionar "in vivo" como mecanismo inactivador del GABA y posteriormente demostraron que ocurre la síntesis de GABA en el tejido vestibular aislado (Meza y colaboradores, 1982).

Para afirmar lo anterior, se decidió demostrar la presencia de un receptor a GABA, que reuniera las características de un receptor de tipo postsináptico.

Se demostró que en membranas totales aisladas del tejido vestibular del pollo el ^3H -GABA unido era desplazado tanto por GABA 1 mM, como por bicuculina 1 mM que es un antagonista espe-

cífico del receptor postsináptico de este aminoácido en el SNC de vertebrados.

Una vez demostrada la presencia del receptor, se determinó - su constante de afinidad (K_d), encontrándose que esta era de la - misma magnitud y características que la encontrada en otras prepa raciones membranales obtenidas de Sistema Nervioso

Por tanto, nuestras observaciones parecen indicar la presen- cia de un receptor postsináptico a GABA, lo cual apoya la partici- pación de este aminoácido como neurotransmisor en el vestíbulo -- del pollo.

ABREVIACIONES UTILIZADAS

GABA: ácido gamma-aminobutírico

SNC: sistema nervioso central

mM: milimolar

Kd: constante de disociación

B_{máx}: unión máxima

GAD: glutamato descarboxilasa

NCS: solubilizador de tejido

I N T R O D U C C I O N

La audición es de entre los sentidos especiales del hombre, - el segundo en importancia, cediendo el primer lugar sólo al sentido de la visión.

El aparato auditivo tiene la función estatoacústica y consta de tres partes, a saber:

- a).- El oído externo que recibe las ondas sonoras que causan la vibración resonante de la membrana timpánica.
- b).- El oído medio, donde las ondas son transformadas en vibraciones mecánicas y transmitidas.
- c).- El oído interno, donde las vibraciones estimulan los receptores y sufren la transducción a impulsos nerviosos específicos que llegaran al Sistema Nervioso Central por la vía - del nervio acústico. El oído interno tiene también estructuras vestibulares que son áltamente especializadas para el sentido del equilibrio.

Estructura General.

El oído externo comprende la oreja, el meato acústico externo y la membrana del tímpano. (Figura # 1) Las vibraciones se - - transmiten a través de la cavidad del oído medio por una serie de tres huesecillos: el mortillo que se fija a la membrana del tímpano y se articula con el yunque que, a su vez, se une al estribo -- por medio de una articulación. La base del estribo ocupa la ven-

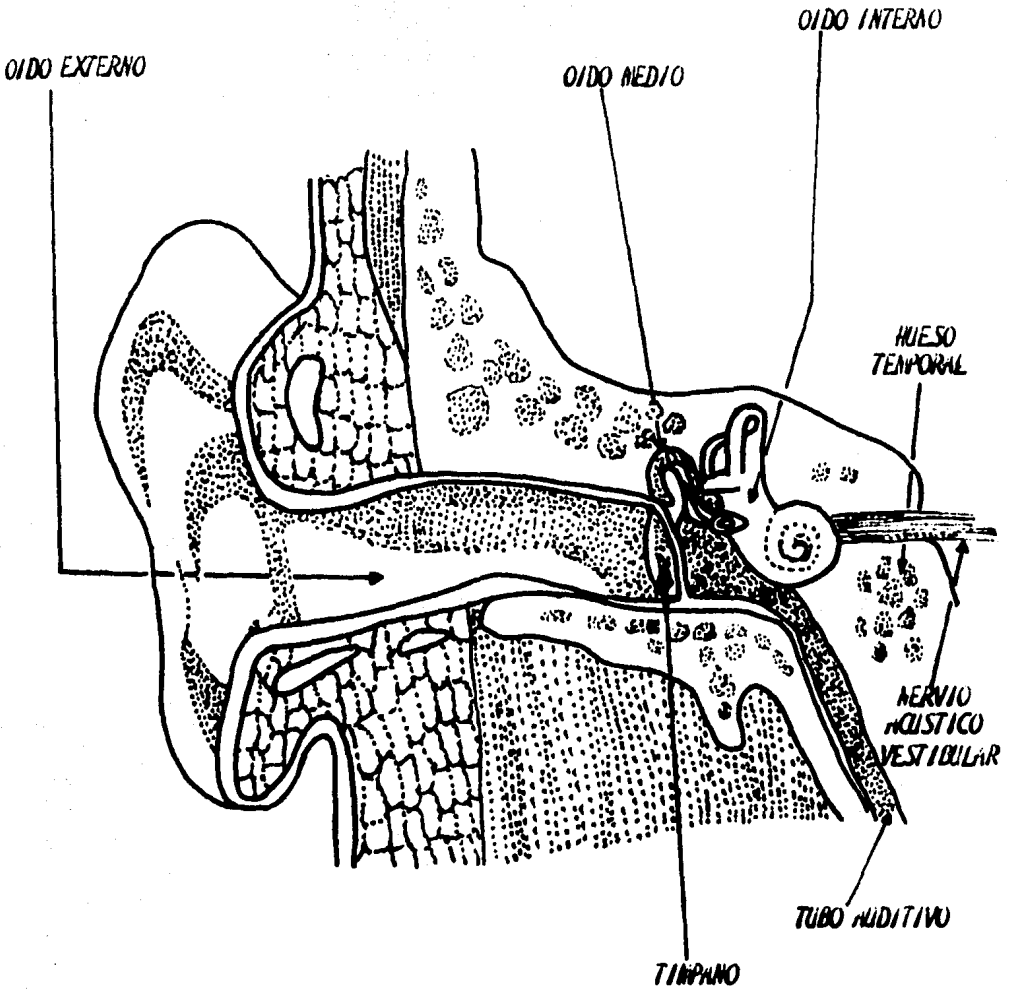


FIGURA # 1.

Representación esquemática que demuestra las relaciones de los oídos externo, medio e interno.

tana del vestíbulo en la pared medial del oído medio y cavidad timpánica, y se fija al borde de la ventana por medio de un anillo de tejido conectivo llamado ligamento anular del estribo. -- (Junqueira y Carneiro, 1976).

Debido a que los huesecillos funcionan como una palanca, cuyo brazo más largo está adherido a la membrana timpánica, y la base del estribo es considerablemente más chica que la membrana timpánica, la fuerza vibradora del estribo es aproximadamente -- diez veces mayor que la de la membrana timpánica.

El oído interno, también llamado laberinto, es una estructura compleja formada por una serie de sacos membranosos llenos de líquido que se encuentran alojados dentro de las cavidades en la porción petrosa del hueso temporal (Figura # 2a).

Al conjunto de cavidades y canales limitados por el tejido óseo se le conoce con el nombre de laberinto óseo. Dentro de éste se encuentra el laberinto membranoso que es una serie de estructuras membranosas que ocupan parcialmente las cavidades óseas, siguiendo por lo común su forma.

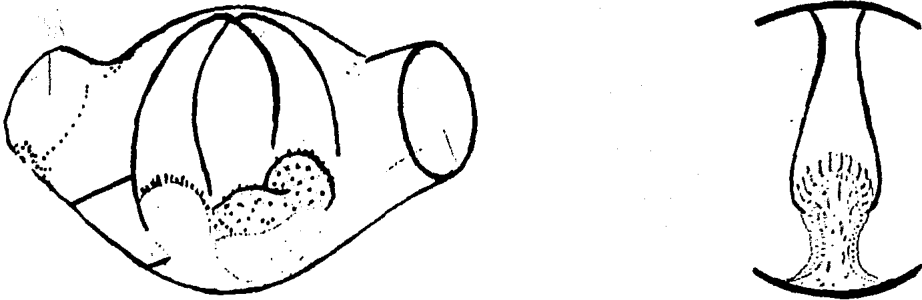
A pesar de que en algunos sitios se adhiere a la pared ósea, el laberinto membranoso generalmente se presenta separado del -- hueso.

El laberinto óseo está constituido por una cavidad central de forma irregular que comprende el vestíbulo, donde de un lado desembocan los canales semicirculares y de otro la cóclea. El -



FIGURA # 2.

En la figura se observa de manera esquemática la estructura del oído interno. Los canales semicirculares presentan dilataciones denominadas ampollas (a,b,c). Las regiones oscuras constituyen el epitelio sensorial que se encuentra constituido por las células de tipo I y II.



Dilatación del canal semicircular, la ampolla, representada en su totalidad (izquierda) y en sección trnasversal (derecha). -- Los pelos sensorios anclados en una superficie en forma de cresta, la cual se proyecta en una masa gelatinosa denominada cúpula. La flexión de los pelos sensorios estimula la transmisión de impulsos por las células nerviosas.

vestíbulo contiene dos estructuras distintas, el sáculo y el utrículo. En el utrículo desembocan los canales semicirculares.

Cada uno de estos canales presentan una dilatación llamada ampolla (Figura # 2b) en una de sus extremidades.

El sáculo se encuentra también dentro del vestíbulo y está unido al utrículo y a la cóclea por estrechos canales.

Las máculas en el sáculo y el utrículo, y las crestas ampollares, en las ampollas de los canales semicirculares, constituyen pequeñas regiones (2 a 3 mm) de epitelio engrosado y diferenciado en epitelio sensorial.

En la cóclea existe igualmente este tipo de tejido constituyendo el órgano de Corti.

El epitelio sensorial está formado básicamente por dos tipos celulares: las células de sostén y las receptoras.

Las células receptoras presentan dos tipos de células: las células pilosas de tipo I tienen forma de botella con la base redonda y la porción del cuello angosto en tanto que las células del tipo II tienen una forma más esbelta y uniforme (Figura # 3).

De 40 a 80 pelos sensorios, también llamados estereocilios, se proyectan desde la parte apical de cada célula junto con un solo cilio verdadero ó cinocilio. (Barr, 1975).

Los cilios están encajados en una masa material gelatinoso celular llamada cúpula, que en el caso de la mácula del sáculo

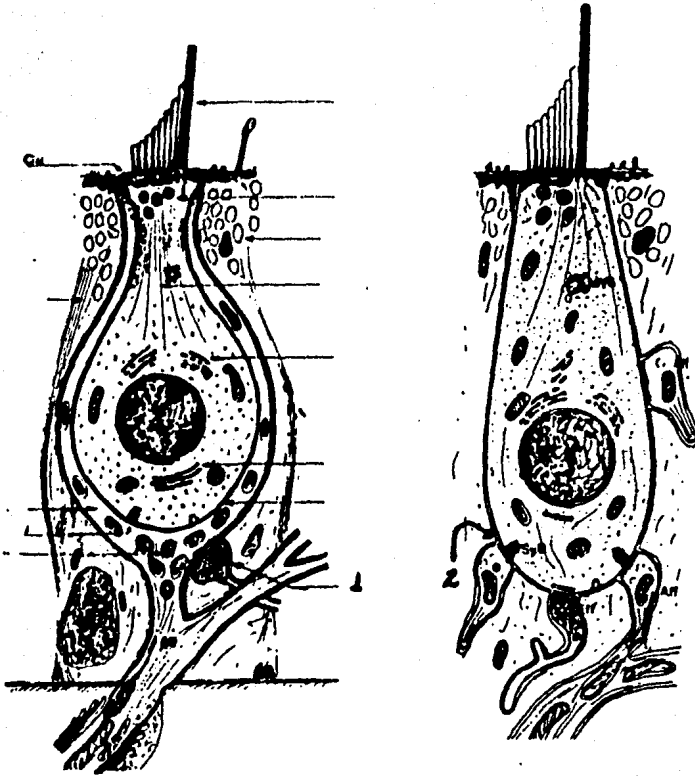


FIGURA # 3.

Representación esquemática de las células que constituyen la parte sensitiva del epitelio del oído interno.

Las células tipo I (izquierda) presentan forma de botella con la base redonda y la porción del cuello angosta; las células tipo - II (derecha) tienen una forma más esbelta y uniforme.

Mostrando en el No. 1 una sinapsis eferente y en el No. 2 una sinapsis aferente la cual se ve amplificada en la Figura # 4.

lo y del utrículo contienen cristales de carbonato de calcio (otolitos) y proteínas.

Estas células son receptoras al movimiento y en su porción basal se presentan sinapsis de tipo aferente (Figura # 3 y 4) que transmiten la información al Sistema Nervioso Central y están moduladas por sinapsis eferentes procedentes de centros superiores.

Existen evidencias de tipo fisiológico y morfológicos que demuestran que la transmisión tanto aferente como eferente se lleva a cabo por un mediador químico, pero se desconoce su identidad.

La naturaleza química del neurotransmisor aferente es controvertida; sin embargo, muchos datos señalan al GABA como el compuesto activo.

Meza y colaboradores, 1981, han observado que hay un mecanismo de transporte para GABA de alta afinidad que pudieran funcionar "in vivo" como mecanismo inactivador del GABA, y demostraron la actividad de la descarboxilasa glutámica (GAD), la enzima que sintetiza al GABA, en homogeneizados de crestas vestibulares de pollo (Meza y colaboradores, 1982), por lo que se decidió demostrar la existencia de un receptor a este aminoácido, que mostrara las características para representar a un receptor de tipo postsináptico en las membranas aisladas de las crestas vestibulares del pollo.

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) como neurotransmisor.

Aunque sintetizado desde 1883, (Cooper y colaboradores, 1978)

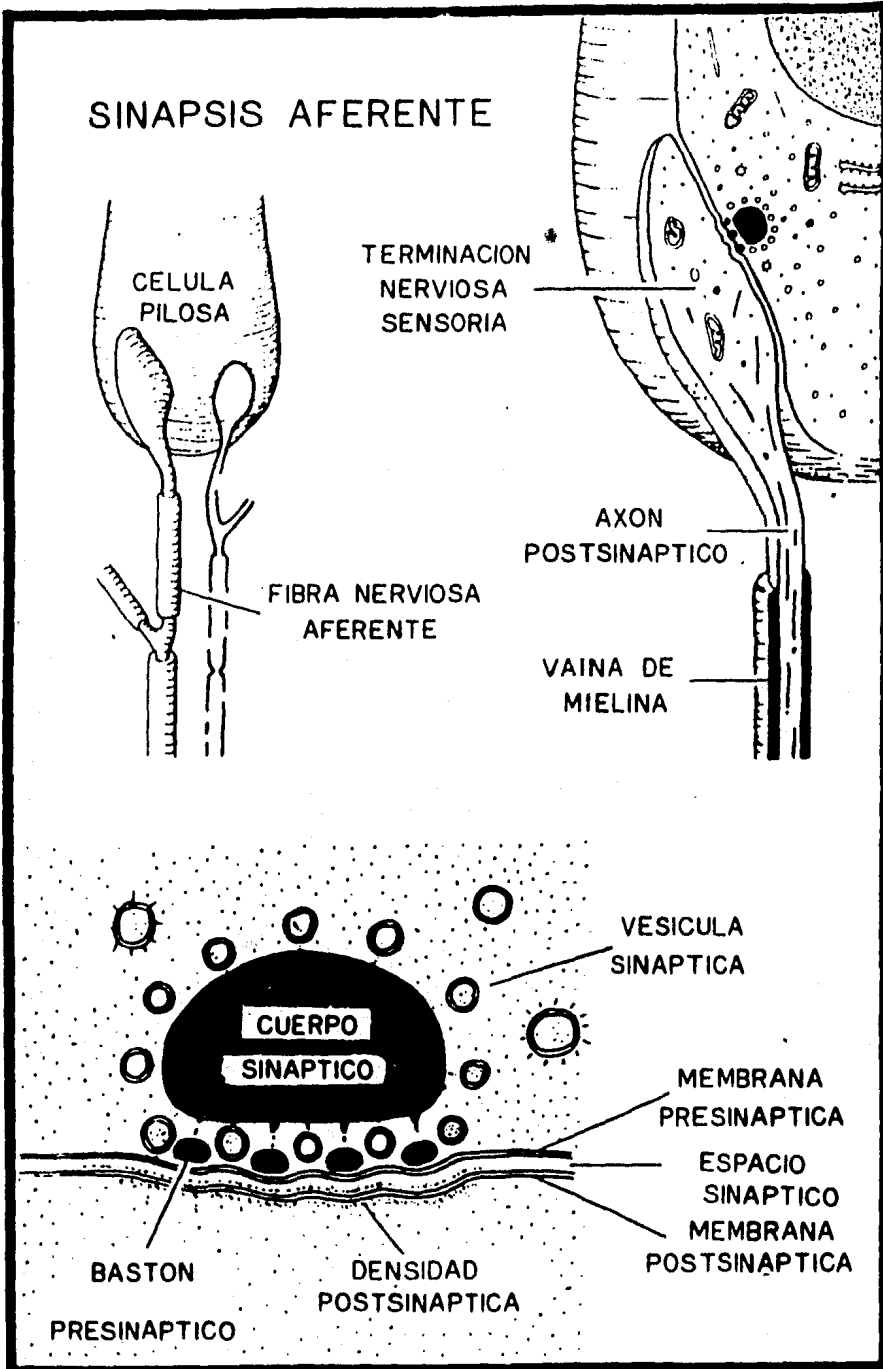


FIGURA # 4.

Se cree por diversas evidencias que el GABA es el neurotransmisor responsable de transmitir la información al Sistema Nervioso Central por medio de sinapsis aferente, la cual se encuentra representada en forma esquemática en la figura.

el GABA fué considerado por muchos años como producto de microorganismos y plantas, y fué hasta en 1950 que se le identificó como constituyente normal en el SNC de los mamíferos estando ausente prácticamente en todos los demás tejidos (Roberts y Franhel, 1950; Awapara y colaboradores, 1950).

Existen evidencias obtenidas de los invertebrados para asignar al GABA la función de transmisor en las terminales nerviosas inhibitoras en los receptores de los crustáceos (Cooper y colaboradores, 1978).

Las evidencias para considerar al GABA como neurotransmisor se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a).- El GABA aplicado localmente mimetiza los efectos de la estimulación de los nervios inhibitorios en las uniones neuromusculares de los crustáceos, al igual que en otras sinapsis de los mismos (Cooper y colaboradores, 1978).
- b).- El GABA exógeno y la sustancia transmisora inhibitora endógena cuando entran en contacto con la membrana postsináptica a los sitios que contienen receptores provocan que esta membrana se vuelva más permeable al ión cloro. Este aumento en la permeabilidad al cloro puede ser bloqueado en ambos casos por la picrotoxina y la bicuculina, potentes bloqueadores de los receptores del GABA (Krnjević, 1974; Curry y colaboradores, 1971 a y b). Un modelo de su organización en la membrana se ve en la Figura # 5.

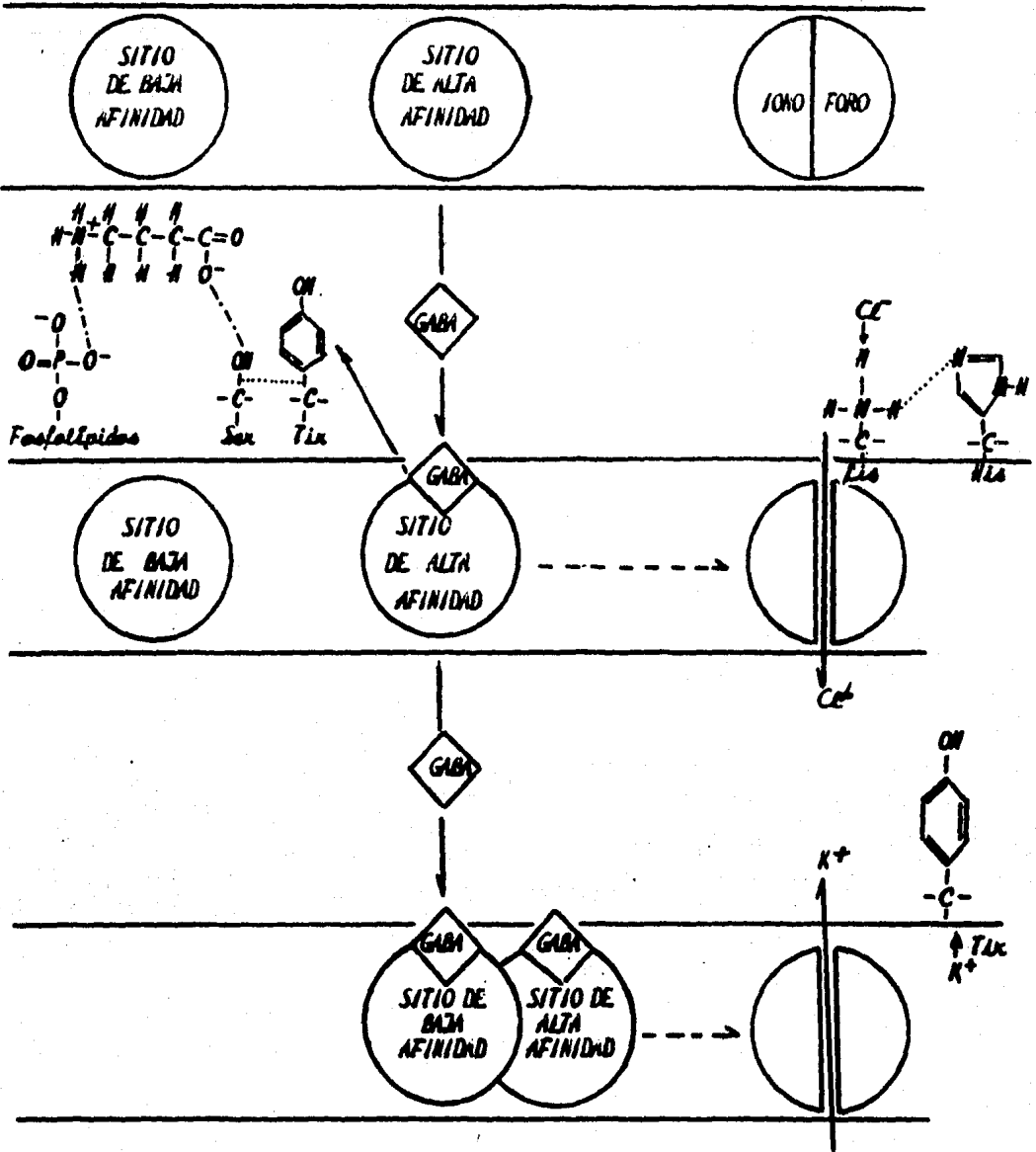


FIGURA # 5.

Modelo esquemático del posible mecanismo de acción del GABA sobre el receptor, acoplado a la apertura de canales de Cl⁻ y de K⁺. Las fórmulas representan los grupos funcionales de las moléculas que participan tanto en la unión como en el intercambio iónico, y están ubicadas en la membrana. (Derivado de Enna y Snyder, 1977; Y de Omura y ed. 1979).

- c).- Probado en experimentos electrofisiológicos (Krnjević, 1974), el GABA parece ser el compuesto inhibitor más potente extraído del sistema nervioso de la langosta.
- d).- Las enzimas necesarias para la formación y destrucción del GABA se encuentran en las terminales nerviosas y en el cuerpo neuronal (Salgonicoff y DeRobertis, 1965).
- e).- El GABA es captado en forma activa en las terminaciones pre-sinápticas por un mecanismo dependiente de sodio (Sano y Roberts, 1961; Kuriyama y colaboradores, 1968; Iversen y Johnston, 1971; Beart y Johnston, 1973).

Uno de los requisitos que se piden a una sustancia que es -- candidato para actuar como neurotransmisor es que, en el sistema en el que se postula existan receptores de tipo postsináptico.

El concepto de receptor fué introducido por Langley en 1905-- basándose en sus estudios de agonistas y antagonistas de drogas y hormonas.

Curtis en 1969 aportó una evidencia fisiológica de la presencia de receptores a aminoácidos.

Los receptores parecen ser un complejo multimérico, de naturaleza lipoproteíca ó bien una proteína lípido-dependiente (Enna y colaboradores, 1975 a; Enna y Snyder, 1977 b; Peck, 1980), que reside en las membranas postsinápticas y que exhibe las siguientes propiedades:

- La unión específica está caracterizada por una alta afini-

dad y baja capacidad por lo que es saturable.

- Los receptores tienen capacidad de reconocimiento y asociación con un aminoácido específico.
- El complejo receptor-ligando se puede disociar en forma natural.

Un modelo representativo del funcionamiento de un receptor se presenta en la Figura # 6.

Para poder estudiar estos receptores, se ha desarrollado una técnica que permite el estudio de la interacción fisicoquímica entre un ligando marcado radiactivamente y el receptor presente en las membranas procedentes de fracciones subcelulares, aisladas previamente.

Los marcadores radiactivos, deben tener una alta radiactividad con el objeto de poder detectar estructuras receptoras que se encuentren en baja concentración en las membranas.

Existe un cierto número de criterios que es necesario satisfacer para poder establecer que las mediciones del ligando empleado reflejan una verdadera interacción transmisor-receptor:

- 1.- La interacción debe presentar especificidad estructural y es térica similar a la del transmisor original, sus análogos y sus antagonistas.
- 2.- El ligando marcado que se use como detector en la membrana, debe presentar una actividad biológica equivalente a la del-

compuesto transmisor para que el intercambio de este análogo por el transmisor sea posible en los sitios receptores.

- 3.- Esta interacción debe mostrar saturabilidad en un rango que resulte significativo si se le relaciona con las concentraciones del compuesto que provocan una reacción en el sistema biológico.
- 4.- La interacción debe ser de alta afinidad a concentraciones fisiológicamente activas del ligando.
- 5.- La interacción debe ser reversible, para que la presencia en el medio, del transmisor o su agonista pueda producir un desplazamiento del ligando marcado unido al receptor. (López-Comé, 1981).

El estudio de las propiedades cinéticas de las interacciones ligando-receptor se hace difícil debido a que en general, el número de receptores en las membranas es bajo y la interacción es de alta afinidad y rápido recambio, por lo que la mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo en el estado de equilibrio de la reacción (asociación-disociación).

Debido a las características que presenta esta interacción se puede justificar el uso de antagonistas de los compuestos que se desea estudiar, ya que con frecuencia tienen una afinidad mayor por el receptor que el compuesto mismo.

La unión "in vitro" de ^3H -GABA a las membranas sinápticas es reconocida como una expresión de la interacción entre el GABA

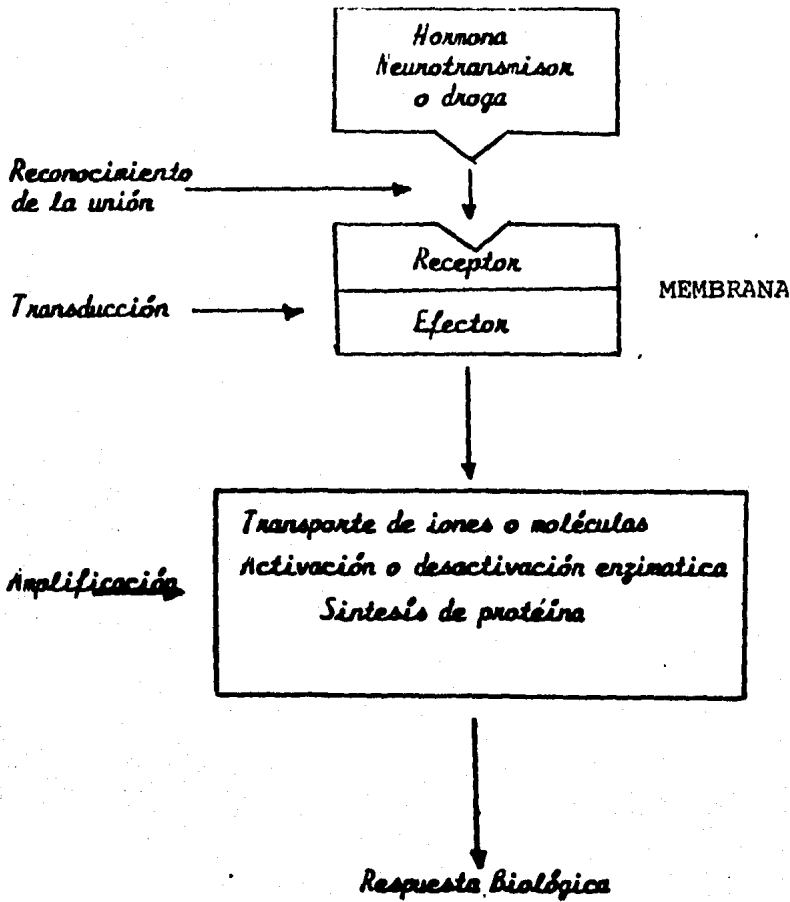


FIGURA # 6.

Modelo esquemático de la interacción ligando-receptor.

y los sitios receptores en el SNC, (Zukin y colaboradores, 1974; Enna y Snyder, 1975).

Un modelo del posible mecanismo de la unión del GABA a los sitios del receptor se muestra en la figura # 6.

Estas interacciones con receptores locales postsinápticos-

implican:

- Uniones independientes del ión sodio, (Peck y colaboradores, 1973; Enna y Snyder, 1975 a). Interacciones del ^3H -GABA con otros sitios en la membrana, principalmente transporte local, parecen ser independientes de sodio y muestran más de las propiedades sugeridas en los mecanismos de captación.
- Solo se observa esta unión en tejido congelado-descongelado (Zukin y colaboradores, 1974); esto se podría explicar con un cambio conformacional originado por la congelación y descongelación lo cual exhibe sitios de unión ocultos. (Greenlee y colaboradores, 1978).
- Esta unión se ve inhibida en presencia de bicuculina, el cual es un antagonista de la acción del GABA; este alcaloide derivado de la ftalida isoquinolina es un antagonista reversible, competitivo y tiene estereoespecificidad selectiva con el isomero (+) bicuculina el cual tiene una configuración de 1S, 9R, además en una parte de su molécula presenta analogía estructural con el GABA (Figura # 7). (Curtis y colaboradores, 1970 y 1971b; Peck y colaboradores, 1976).
- El tratamiento con Tritón X-100 incrementa la unión de ^3H -GABA a los sitios del receptor casi al doble; esto podría deberse a que ocurre una deslipidación y desproteini-

zación que promueve los sitios de unión (Enna y Snyder, -- 1977b; Larsen y Johnston, 1978).

- Repetidos lavados al tejido eliminan la presencia de un inhibidor endógeno de la unión (Greenlee y colaboradores, -- 1978).

Se ha comprobado que existe una correlación entre la distribución regional de los sitios de unión al receptor y la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima sintetizante del GABA (Enna y colaboradores, 1975b y 1976b) también se ha estudiado el curso de su evolución filogenética (Mann y Enna, 1980) observándose una mayor sensibilidad a la bicuculina en especies más evolucionadas.

La unión de ^3H -GABA con características que indican sitios del receptor postsináptico se ha estudiado principalmente en el cerebro de varias especies de mamíferos (Enna y Snyder, 1975b) en el cerebelo (Olsen y colaboradores, 1978), en la médula espinal (Curtis y Crawford, 1969), en la retina (Enna y Snyder, 1976) y en los órganos periféricos como el obiducto (Erdoz Lapis, 1982).

Por todos estos antecedentes, en el presente estudio se examinaron las características del ^3H -GABA unido a una preparación membranaral cruda de crestas vestibulares del oído interno de pollo, como un criterio de apoyo para postular al GABA como neurotransmisor en el vestíbulo del pollo.

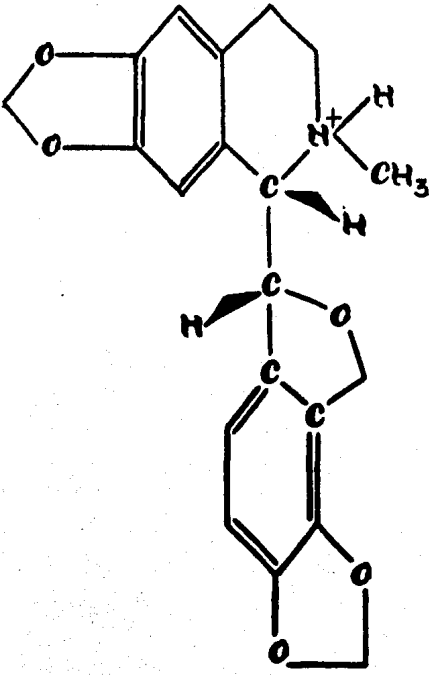
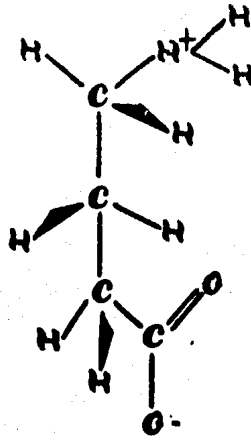
*Bicuculina**Gaba*

FIGURA # 7.

Representación esquemática de la analogía estructural del isomero (+) de la Bicuculina con el GABA.

Las uniones se realizaron en condiciones tales que parece implicar una interacción con receptores locales postsinápticos y - estas uniones son comparadas con las que presenta el ^3H -GABA en fracciones crudas membranales y sinaptosomales del cerebro de ratón en donde, por muchas técnicas se ha demostrado la presencia de un receptor de tipo postsináptico a GABA.

Los requisitos necesarios para considerar que el sitio de unión es el receptor postsináptico son:

- a).- Que la unión solo se detecte en el tejido congelado.
- b).- Que la unión sea saturable.
- c).- Ser desplazable específicamente por la propia sustancia ó,
- d).- Ser desplazable por un antagonista específico.
- e).- La unión receptor-ligando sea independiente de sodio.

M A T E R I A L Y M E T O D O S**- Animales utilizados:**

- a).- Pollitos rojos Rhode Island de un día de nacidos de la granja Armour Hatchery (México).
- b).- Ratones Albinos adultos de 25-30 g. de peso, de la cepa local, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, UNAM. Estos fueron usados como control.

- Reactivos empleados:

Buffer Krebs-ringer-tris. pH 7.4

NaCl _____	118.5 mM
KCl _____	4.75 mM
CaCl ₂ _____	1.77 mM
MgSO ₄ _____	1.18 mM
KH ₂ PO ₄ _____	1.20 mM
Glucosa _____	5.60 mM
Tris-citrato _____	25.0 mM

En los experimentos realizados en ausencia de sodio, se utilizó cloruro de colina en la misma concentración (118 mM), en sustitución del NaCl.

El ³H-GABA (actividad específica 30-40 Ci/nMol) fué obtenido de New England Corp.

La (+) Bicuculina obtenida de Sigma Chemical Co., se empleó a una concentración de 1 mM; disolviéndose en 20 ml. de HCl

al 0.01 N y ajustando el pH a 5.5 con NaOH. Se utilizó calentamiento para favorecer la disolución.

El GABA frío (no radioactivo) obtenido de Sigma Chemical -- Co., se empleó a una concentración de 1 mM.

La sacarosa obtenida de Merck, con una pureza del 90%, se empleó a una concentración del 0.32 M.

La sacarosa obtenida de Merck, con una pureza del 90%, se empleó a una concentración del 0.32 M.

Tritón X-100 (Octyl fenoxi polietoxietanol) al 0.05% (v/v) - en agua.

Líquido cintilador para el conteo de la radioactividad.

"Tritosol" (para preparar 1000 ml. según Friche. 1975).

PPO (2,5-difeniloxazol) _____	3 g.
Tritón X-100 _____	257 ml.
Etilen glicol _____	37 ml.
Etanol absoluto _____	106 ml.
Xilol _____	600 ml.

Considerando que los sitios de unión corresponden a un receptor de tipo postsináptico los experimentos realizados se hicieron en:

- En tejido congelado
- En concentraciones crecientes de ^3H -GABA
- Exceso de GABA no radiactivo

- Presencia del (+) isomero de la bicuculina
- Presencia y ausencia de sodio.

Utilizando para su estudio las técnicas descritas por Enna- y Snyder en 1975 (con algunas modificaciones).

Preparación de la fracción membranal cruda
de crestas vestibulares

Se sacrificaron 30 pollitos de un día de nacidos, se extrajeron las crestas por medio de una disección al microscopio y el tejido resultante, (aproximadamente 100 mg) se homogenizó perfectamente en 10 ml. de agua tridestilada, el homogenizado que se obtuvo se dispersó con un sonicador (Ultrasonic Power Unit) durante 5 segundos, después se congeló a 0°C por 24 horas, se descongeló a temperatura ambiente y se sonicó por 10 minutos (15 segundos sonicar y 5 segundos descansó), después nuevamente se congeló a 0°C por 24 horas, se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 32,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento constituido por membranas totales se guardó en congelación por un lapso mínimo de 45 días, transcurrido este tiempo las membranas se utilizaron para medir la unión de GABA al receptor.

Preparaciones control

a).- Membranas totales del cerebro de ratón.

Se emplearon 2 ratones que se sacrificaron por fractura cer

vical y se decapitaron. Inmediatamente se removió la corteza cerebral y se homogeneizó en 10 ml. de agua tridestilada, se soni-caron durante 30 segundos, y se guardaron en congelación durante 24 horas a 0°C, se descongelaron a temperatura ambiente y se so-nicó durante 10 minutos (15 segundos sonicar y 5 segundos descanos), nuevamente se congeló por 24 horas a 0°C; se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 32,000 rpm durante - 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento que se en-cuentra constituido por membranas totales del cerebro de ratón,- se guardó en congelación por un lapso mínimo de 45 días, después de este tiempo se determinó la unión al receptor.

b).- Fracción sinaptosomal cruda del cerebro de ratón.

Se utilizaron 6 ratones, se sacrificaron por fractura cervi-cal y fueron inmediatamente decapitados, se removió rápidamente el cerebro el cual se homogeneizó en 15 volúmenes de sacarosa -- fría 0.32 M, y se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se centrifugó a 11,500 rpm por 20 minu-tos, se decantó y el sedimento que contiene mitocondrias, lisomas y sinaptosomas (terminaciones nerviosas), se homogeneizaron en el volumen original con agua.

Se conserva el homogenizado a 4°C por 15 minutos, se sónica por 30 segundos, se centrifugó a 7,600 rpm durante 20 minutos, - con esto se obtuvo un sobrenadante y dos sedimentos de diferente peso, con una pipeta Pasteur se retiró cuidadosamente el sedimen

to menos pesado (fracción membranal sinaptosomal) el cual se -- centrifugó a 28,000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se - descartó y el sedimento se resuspende nuevamente en agua, en el volumen original, se centrifugó a 28,000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se conservó en refrigeración por lo menos durante 18 horas.

Determinación de la unión al receptor

Para el ensayo de la unión al receptor, se emplearon las -- membranas previamente tratadas, se descongelaron a temperatura - ambiente, se homogeneizaron perfectamente en el buffer Krebs-rin- ger-tris a pH 7.4, se adicionó Tritón X-100 al 0.05% (v/v) y se - incubaron en agitación a 37°C durante 30 minutos; como uno de -- requisitos para considerar que los sitios de unión corresponden - a un receptor postsináptico es su independencia del ión sodio, - las incubaciones se realizaron en presencia y ausencia de este - ión; se centrifugó a 32,000 rpm durante 15 minutos, se eliminó - el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces más para elimi- - nar el exceso de detergente, agregando buffer Krebs-ringer-tris - y centrifugando repetidamente.

Después de los lavados, se resuspendió en el mismo buffer - en un volumen tal que se tenga de 0.028 a 0.035 de proteína por - ción, (0.014 a 0.0175 por mililitro).

La reacción se lleva a cabo de la siguiente manera:

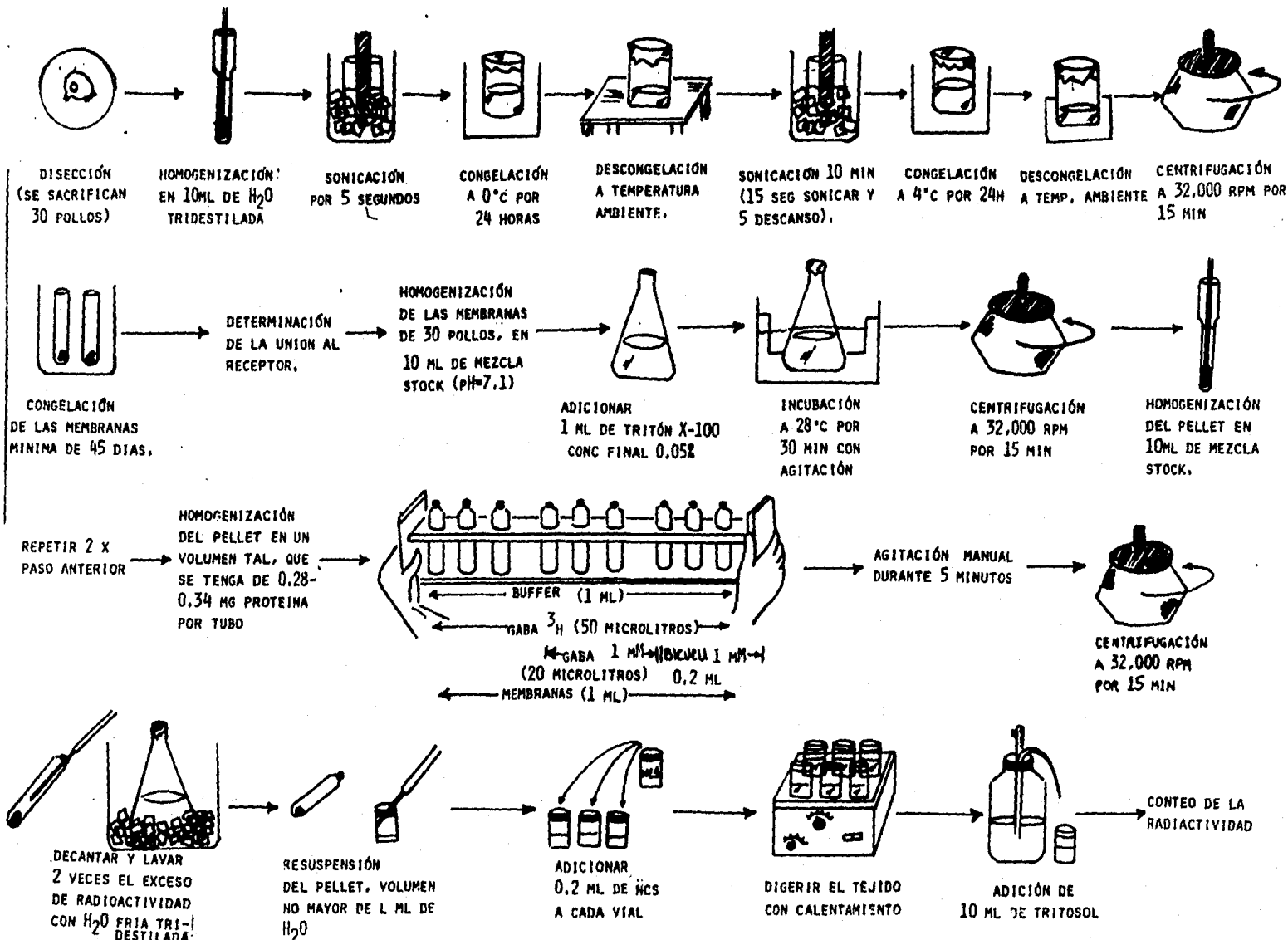
orden de adición ↓

Tubos de policarbonato	1-2-3	4-5-6	7-8-9
Buffer Krebs-ringer-tris	1 ml.	1 ml.	0.8 ml.
^3H -GABA	50 μl .	50 μl .	50 μl .
GABA 1 mM	-----	20 μl .	-----
Bicuculina 0.1 mM	-----	-----	0.2 ml.
Membranas	1 ml.	1 ml.	1 ml.

Una vez que se ha añadido la suspensión de membranas se inició la reacción al equilibrio, que se alcanzó después de 5 minutos de agitación manual a temperatura ambiente, después de la -- cual, la reacción se detuvo por centrifugación a 32,000 rpm por 15 minutos. Se eliminó rápidamente el sobrenadante y el exceso de radioactividad en el sedimento se eliminó con 5 ml de agua -- tridestilada fría.

Posteriormente el tejido se digirió con 0.2 ml de NCS y un ligero calentamiento. A cada frasquito se le agregaron 15 ml. -- de tritosol para conteo de centelleo se guardaron las muestras -- en las oscuridad, y se realizó el conteo de la radioactividad en un contador de centelleo líquido Pachard Tricarb, hasta valores -- constantes.

La eficiencia de conteo es del 40% se determinó utilizando un estandar externo; un diagrama que indica todo el procedimiento de manejo e incubación se muestra en la Figura # 8.



Para determinar la constante de afinidad, se siguió el mismo procedimiento indicado arriba, pero en presencia de concentraciones crecientes de GABA desde 0.2 hasta 93.0 mM.

Determinación de Proteína

El contenido protéico fue determinado por el método de Lowry y colaboradores (1951).

Se utilizó albumina sérica bovina como estandar.

Nomenclatura

En la nomenclatura de los estudios de unión, no referiremos en los siguientes términos:

"Unión total"

Es la radiactividad unida en ausencia de GABA 1 mM (no-marcado radiactivamente)

"Unión no específica"

Es la radiactividad unida en presencia de un exceso de GABA 1 mM.

"Unión específica"

Es la diferencia entre la unión total y la no específica.

Cálculos

Los cálculos se hicieron de la siguiente manera:

Para obtener la unión de ^3H -GABA en pmoles/mg de proteína.

Se tiene una concentración de ^3H -GABA de 0.03 mM en 1000 ml, 0.003 molar en 1 ml.

0.003 molas ----- 1 ml.

X ----- 0.05 ml.

X = 0.000165 nmolas en 2 -
ml. de la mezcla de --
reacción.

Para obtener las desintegraciones por minuto DPM partimos -
de la definición:

1 μ Ci ----- 2.22×10^6 DPM

0.55 μ Ci ----- X'

X' = 1.22×10^6 DPM

(0.55 μ Ci es lo que se pone en la mezcla de reacción).

1.22 10^6 ----- 0.000165 nmolas

X'' ----- 1 nmolas

X' = 7.39×10^9 DPM en una nmola

por lo que en una pico mola

tendremos 73900 DPM.

Se tiene pues 73900 DPM/pmolas de ^3H -GABA

Para obtener las DPM de las cuentas por minuto CPM, la efi-
ciencia del sistema es de 40.0 %.

CPM ----- 40.0 %

X''' ----- 100.0 %

X''' = DPM de las CPM.

Las pmolas de ^3H -GABA que se unen se obtienen de la siguien-
te manera:

$$\frac{\text{DPM de las CPM}}{73900 \text{ DPM}} = \text{pmolas}$$

Y esto se divide entre los mg. de proteína en 1 ml., es decir lo que se pone del homogenado en la reacción.

$$\frac{\text{pmolas}}{\text{mg de proteína}} = \text{pmolas/mg de proteína}$$

R E S U L T A D O S

Ya que uno de los criterios más importantes para considerar el sitio de unión como el receptor postsináptico es que éste pueda detectarse en tejido congelado (Zukin y colaboradores, 1974)- se exploró la influencia que tenía el tiempo de congelamiento sobre la unión de ^3H -GABA en presencia de GABA 1 mM y de un antagonista específico como lo es la bicuculina (Curtis y colaboradores, 1970 y 1971 b).

La unión específica de ^3H -GABA se expresó en dpm/mg de proteína (Tabla 1).

Se observa que en tejido congelado durante cinco semanas no se observó el desplazamiento en presencia de GABA 1 mM o de bicuculina 1 mM; después de la sexta semana de congelamiento aumentan considerablemente las dpm/mg de proteína y se aprecian fácilmente los desplazamientos por GABA 1 mM y por bicuculina/mM.

De acuerdo con estos resultados, todos los experimentos siguientes se realizaron con membranas que tenían de 6 a 7 semanas de congelación y en presencia de GABA 1 mM ó de bicuculina también 1 mM.

La unión de GABA al receptor postsináptico se caracteriza por ser independiente del ión sodio (Peck y colaboradores, 1973; Enna y Snyder, 1975 a) por lo que realizamos experimentos tendientes a dilucidar los efectos del sodio en la unión de ^3H -GABA a membranas del oído interno. Para esto se midieron los despla

mientos de ^3H -GABA en presencia de GABA 1 mM y de bicuculina 1 mM en ausencia y presencia de sodio. (Figura # 9).

Cuando los datos se expresaron en forma porcentual se observó que había un desplazamiento por GABA 1 mM del 86.5% y por bicuculina 1 mM del 56.18%; en ausencia de sodio se obtuvo un desplazamiento por GABA 1 mM del 91.5% y por bicuculina del 54.0%.

Ya que se sabe que la unión de ^3H -GABA a membranas de cerebro de ratón tiene las características de un receptor postsináptico se utilizaron dos controles el primero consiste en una preparación membranal de cerebro completo de ratón y la segunda es una fracción sinaptosomal cruda de cerebro de ratón.

Los desplazamientos de ratón fueron: por GABA 1 mM del 84.66% y por bicuculina 1 mM del 40.7% y en ausencia de este ión fueron de 96.7% y de 41.5% respectivamente.

Por lo tanto, no parece existir una influencia del ión sodio sobre la unión de ^3H -GABA a membranas, tanto en las membranas del oído del pollo como en los controles.

Cuando se expresó la unión específica de ^3H -GABA en membranas del oído interno y en los dos controles utilizados (Figura # 10). Como unidades absolutas, se encontró que para las membranas del oído del pollo se obtenían 1.12 pmolas/mg de proteína y para las membranas totales del cerebro de ratón y de la fracción sinaptosomal cruda esta unión era de 1.07 y 3.5 pmola/mg de proteína respectivamente, en presencia de sodio. En ausencia de es

te ión se obtuvieron en el oído del pollo 1.05 y en las membranas tales del cerebro de ratón fué de 1.0 pmolas/mg de proteína. Aunque las membranas de la fracción sináptosomal, no se realizaron experimentos en ausencia de sodio, expresados en forma absoluta, tampoco se observa diferencia con experimentos realizados en ausencia de sodio en las otras preparaciones.

Con el fin de determinar la influencia de la concentración de proteína sobre la unión de GABA al receptor, esta se determinó en presencia de diferentes concentraciones de proteína conservando constante la concentración de ^3H -GABA.

En la tabla II se observa que a mayor cantidad de proteína, aumentan las dpm pero la unión específica de ^3H -GABA expresado en pmolas/mg de proteína disminuyen.

Al tener las características óptimas de medición de la unión de ^3H -GABA a su receptor en los experimentos anteriormente mencionados, quedaba por demostrar el criterio que a nuestro juicio era el más importante para asignar el papel de un receptor postsináptico a todas estas observaciones; este requisito consiste en demostrar que este receptor es saturable cuando se mide a concentraciones crecientes del ligando. Los resultados que se obtuvieron para demostrar se presentan en la Figura # 11.

Como puede verse, cuando se graficaron la unión específica - del ^3H -GABA expresado en pmolas/mg de proteína contra las concentraciones de ^3H -GABA usada, se observa una típica curva de saturación, como ha sido descrita para las interacciones entre un recep-

tor y su ligando, graficando estos mismos resultados por el método de Scatchard y realizando los cálculos con ayuda de una computadora PDP 11/34 se puede observar en la Figura # 12 que existe una linealidad entre los puntos encontrados lo que indica un solo tipo de receptor con una constante de afinidad (K_d) de 19.4 y una unión máxima ($B_{máx}$) de 5.8 pmolas/mg de proteína. Esta figura fué trazada con un graficador 7225B PLOTTER HEWLETT PACKARD - acoplado a la computadora.

Variación de la unión de ^3H -Gaba a membranas de oído interno de pollo con respecto al tiempo de congelación.

<i>Tiempo de congelación</i>	<i>dpm's/proteína</i>	<i>Gaba 1mM % desp.</i>	<i>Bicuc. 0.1mM % desp.</i>
<i>2 Semana</i>	<i>33.6</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>3 Semana</i>	<i>42.9</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>4 Semana</i>	<i>45.7</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>5 Semana</i>	<i>62.2</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>6 Semana</i>	<i>7112.42</i>	<i>82.76</i>	<i>54.4</i>
<i>7 Semana</i>	<i>4689.72</i>	<i>86.46</i>	<i>51.7</i>

% de desplazamiento de ^3H -Gaba unido en presencia de: Gaba 1mM (a) y de Bicuculina 1mM (b)

Con sodio
Sin sodio

oído interno de pollo

cerebro de ratón

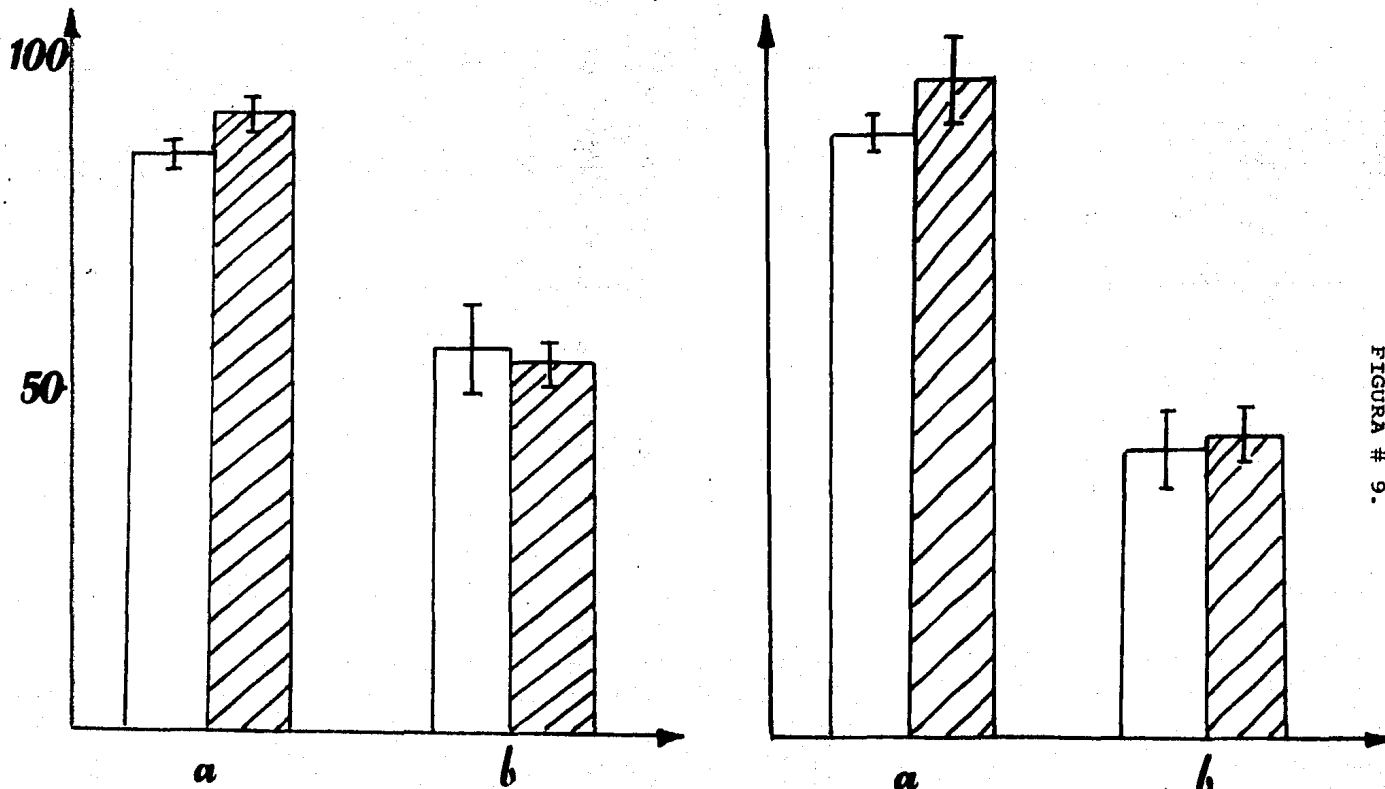


FIGURA # 9.

Unión específica de ^3H -Gaba
en ausencia y presencia de Na

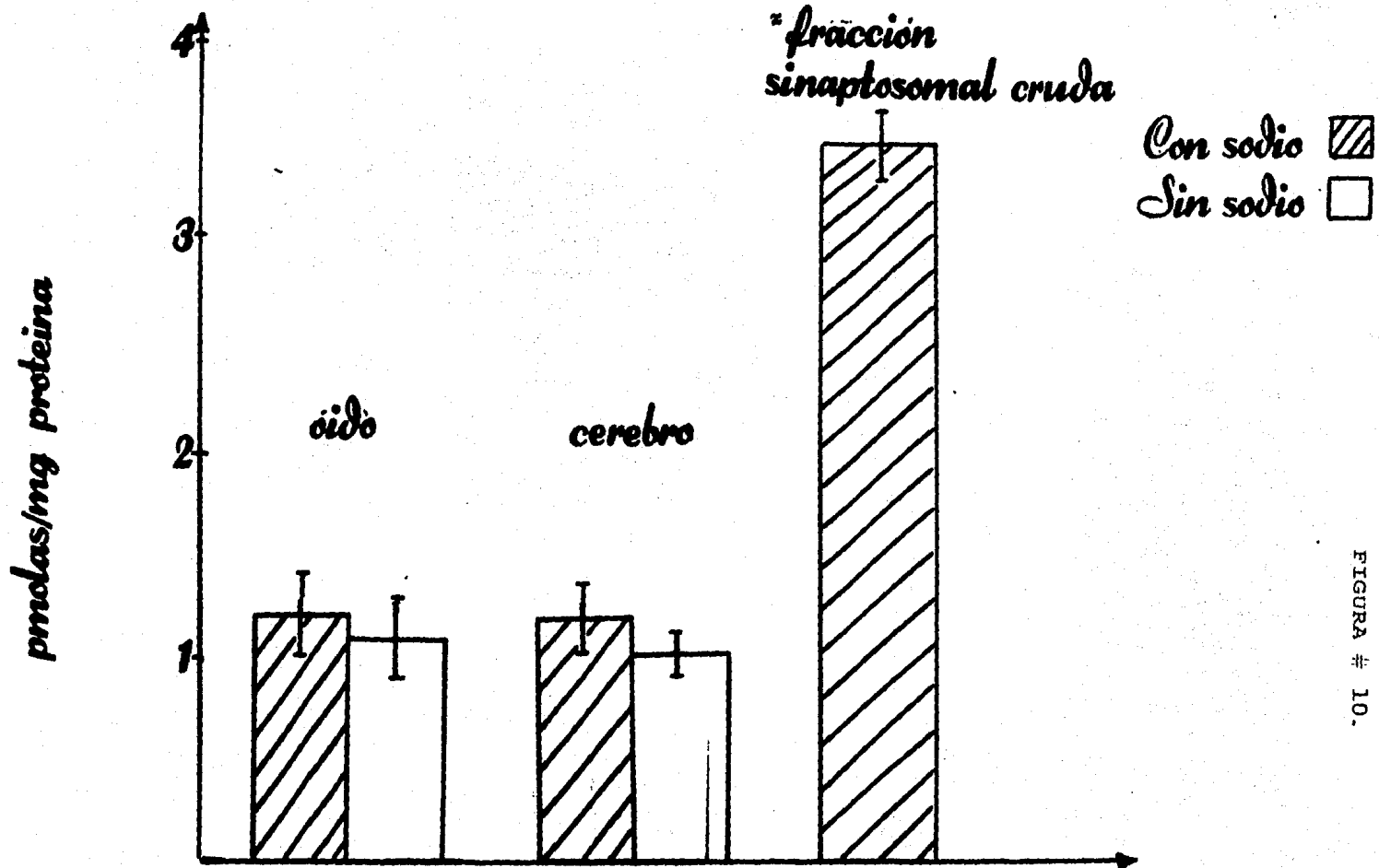


FIGURA # 10.

*Efecto de la concentración de proteína
sobre el pegado de ³H-Gaba a membranas
del oído interno de pollo.*

<i>Concentración mg de proteína</i>	<i>dpm's</i>	<i>pmolas mg prot.</i>
<i>0.071</i>	<i>5724.68</i>	<i>0.17</i>
<i>0.032</i>	<i>4989.37</i>	<i>0.53</i>
<i>0.022</i>	<i>4633.52</i>	<i>1.88</i>

TABLA II

Curva de Saturación

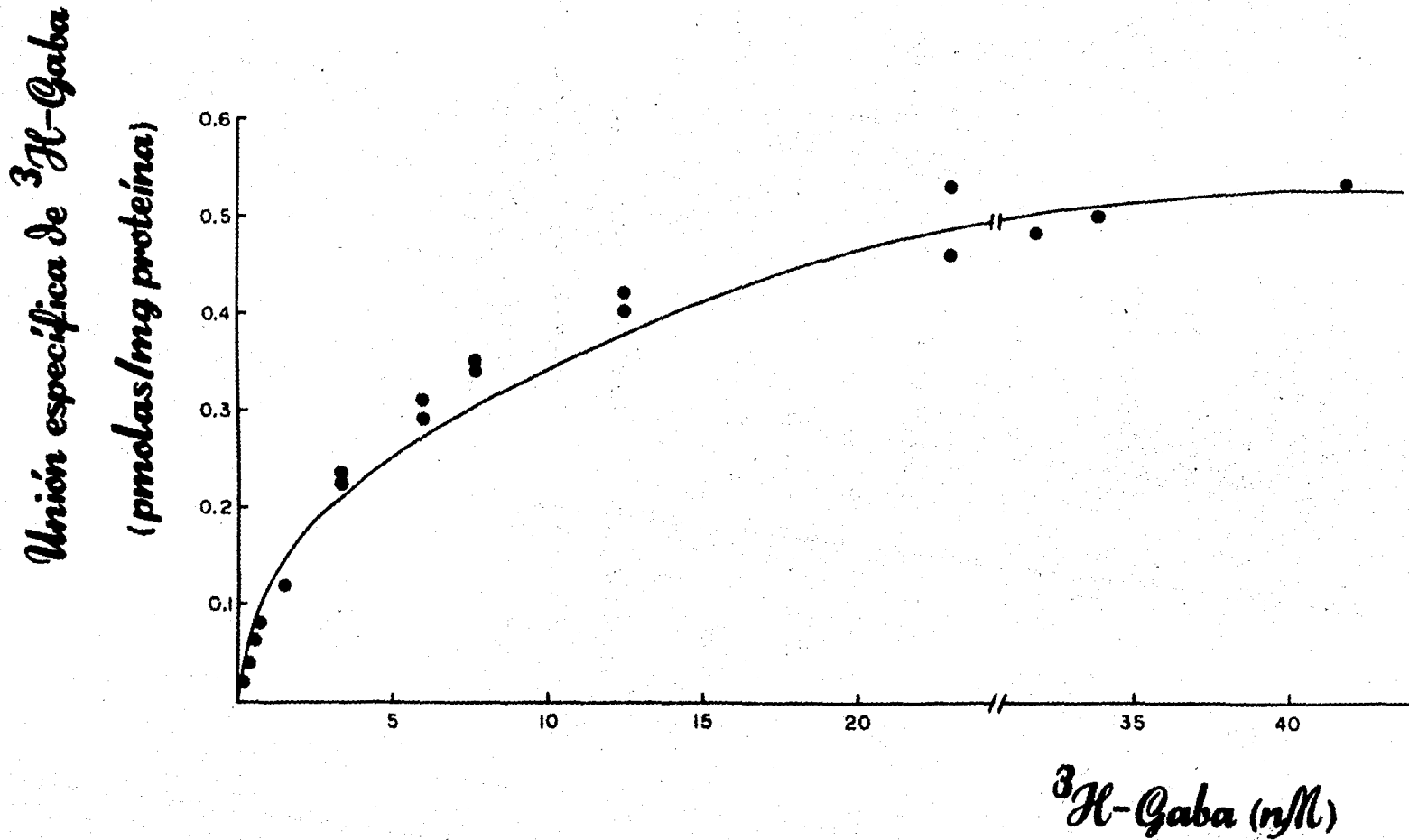


FIGURA # 11.

Unido/Libre pmolas mg prot./mg

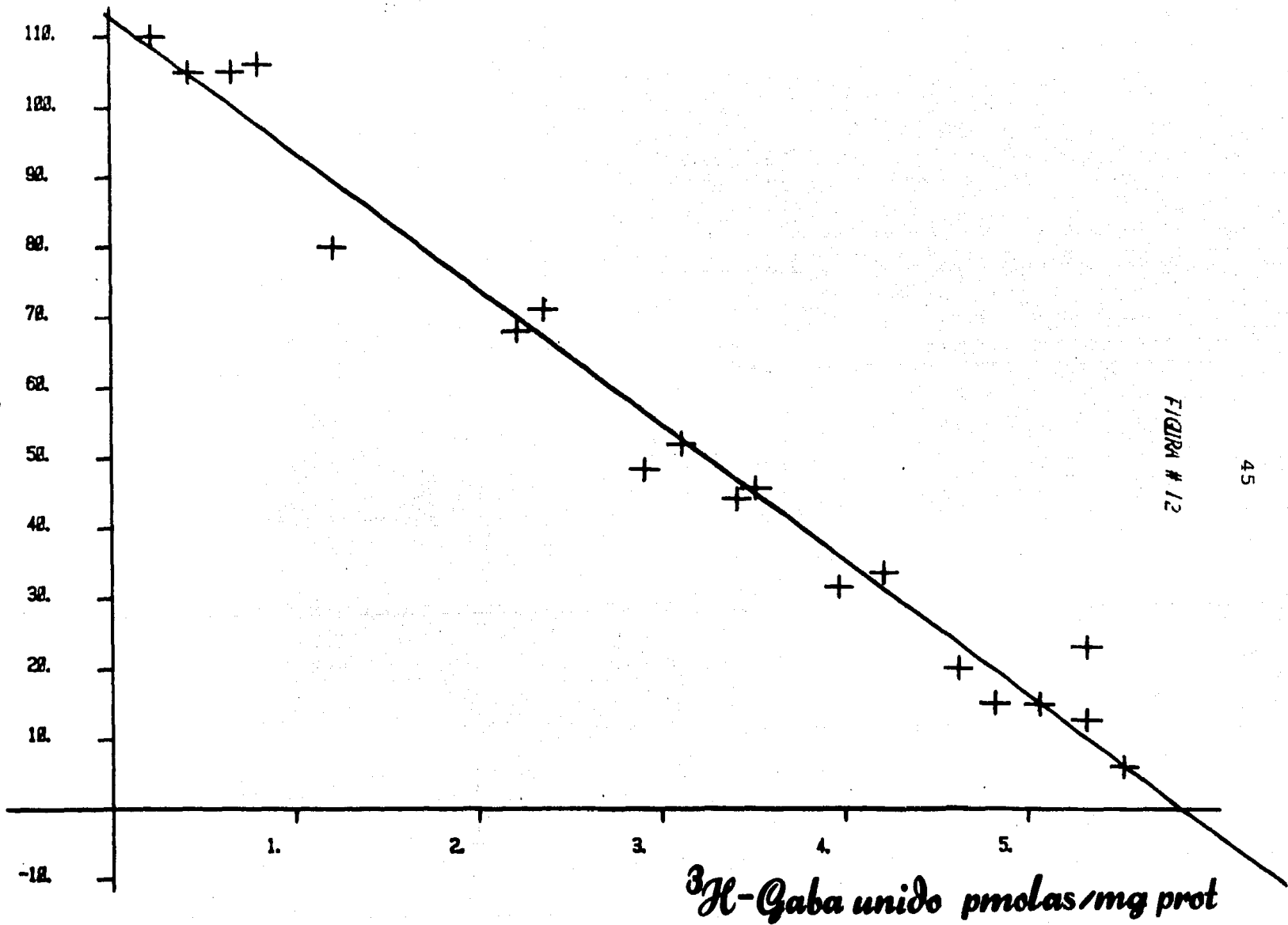


FIGURA # 12

D I S C U S I O N

La unión de 3H-GABA a los sitios del receptor solo ocurre con membranas congeladas (Zukin y colaboradores 1974, esto se corrobora con los datos obtenidos en la tabla 1 en donde se observa que durante las primeras cinco semanas no hay desplazamiento de 3H-GABA en presencia de GABA 1 M o de Bicuculina 1 mM.

A juzgar por esto puede decirse que lo que estamos observando corresponde a una "captación" de GABA el cual ha sido definido como un sistema de transporte de alta afinidad (Defeudis y colaboradores 1975; Meza y colaboradores, 1981), después de la sexta semana de congelamiento se observa desplazamiento del 3H-GABA por GABA 1 mM y por Bicuculina 1 mM esto podría explicarse a que durante este tiempo se exponen más sitios en la membrana - conteniendo al receptor (Greenle y colaboradores, 1978).

La unión de 3H-GABA a membrana mostró especificidad ya que fue desplazada por el GABA no radioactivo (Enna y Snyder, 1975 y por un antagonista específico como es la bicuculina (Curtis y colaboradores, 1970; Curtis y colaboradores, 1971).

La unión de 3H-GABA a los sitios del receptor se caracteriza por ser independiente de sodio (Peck y colaboradores, 1973; Enna y Snyder, 1975;) este criterio se satisface en la unión de 3H-GABA a membranas del oído interno de pollo observando los re-

sultado de la figura # 9, en donde puede verse que el ión sodio no tiene influencia sobre la unión de 3H-GABA a membranas.

La unión específica de 3H-GABA a membranas cuando se expresa en forma absoluta es muy parecida a la observada en los controles utilizados en este trabajo; además, se encuentra dentro de los rangos reportados en otras preparaciones membranales de tejido nervioso, que se encuentran constituidas por terminaciones nerviosas de las cuales el 20% son gabaérgicas.

Analizándose la influencia de la concentración de proteína en la unión de 3H-GABA a membranas se observa que a mayores concentraciones de proteína disminuye la unión específica de 3H-GABA, esto podría deberse a un aumento de un inhibidor endógeno de la unión del 3H-GABA, que bien podría ser el propio GABA el cual disminuye cuando se usan concentraciones de proteína.

La unión de 3H-GABA a membranas del oído interno de pollo -- mostró saturabilidad lo cual es un requisito indispensable para probar la presencia de un receptor (Enna y Snyder, 1975, Cooper y colaboradores, 1978).

El análisis de la curva de Saturación por el método de Scatchard nos revela la presencia de una sola población de receptores; la K_d y la $B_{máx}$ se encuentran dentro de los valores reportados en otras preparaciones de tejido nervioso en donde se sabe que existe un receptor de tipo postsináptico a GABA (Enna y Snyder, 1975, Mann y Enna, 1980).

CONCLUSIONES

- La interacción del 3H-GABA a posibles receptores postsinápticos en las membranas del oído interno del pollo se incrementan por tratamiento de congelamiento y descongelamiento.
- La unión de 3H-GABA a una preparación membranal cruda de crestas vestibulares del oído interno de pollo posee un alto grado de especificidad ya que estas uniones fueron desplazadas por un exceso del propio GABA y bicuculina, un antagonista específico de la acción inhibitoria del GABA en el SNC.
- La unión de 3H-GABA las membranas obtenidas del oído interno del pollo parece implicar uniones a receptores locales los cuales son independientes de sodio.
- El proceso de unión de 3H-GABA a una preparación membranal del oído interno del pollo se ve influido favorablemente a concentraciones bajas de proteína; estas uniones son saturables cuando se miden a concentraciones crecientes del ligando. Además, la constante de afinidad (K_d) y la unión máxima ($B_{máx}$) son similares a las mostradas para una interacción con un receptor de tipo postsináptico en otras preparaciones membranales obtenidas de diversas regiones del SNC de vertebrados.
- El proceso de unión de 3H-GABA a membranas obtenidas de las crestas vestibulares del oído interno del pollo parece corresponder-

a un tipo de interacción que involucran un receptor de tipo postsináptico como ha sido descrito para aminoácidos neurotransmisores - en tejido nervioso.

R E F E R E N C I A S

- Awapara, J., Landau, A.J., Fuerts, R. y Seale, B. 1950. Free -aminobutyric acid in brain, J. Biol. Cheml 187: 55-63.
- Barr, M.L., 1975. El Sistema Nervioso Humano. Harla, S.A. Mé- xico, 373 pp.
- Beaumont, K., Chilton, W.S., Yamamura, H.I., and Enna, S.J., - 1978. Muscimol binding in rat brain: association mith - synaptic GABA receptors. Brain Res, 148: 153-162.
- Beart, P.M., and Johnston, G.A.R., 1973. GABA uptake in rat - brain slices inhibition by GABA analogues and by various drugs. J. Neurochem, 20:319-342.
- Browner, M., Ferkany, J.W., and Enna, S.J., 1981. Biochemical identification of pharmacologically and functionally dis- tint GABA receptors in nat brain. J. of Neurosci, I:514- 518.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., and Roth, R.H., 1978. The Biochemi- cal of Neupharmacology. Oxford University Press, New - - York. 327 pp.
- Coyle, J.T., and Enna, S.J., 1976. Neurochemical aspects of -- the antogenesis of gabanergic newrons in the rat brain.- Brain Res. III: 119-133.
- Curtis, D.R., and Cramford, J.M., 1969, Central synaptic trans- mission microelectrophoretic studies. Ann. Rev. Pharma- col, 9: 209-240.
- Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., and Johnston, G.A.R., - 1970. GABA bicuculline and central inhibition. Nature - (London) 226: 1222-1224.
- Curtis, D.R., Duggan, A.W., Johnston, G.A.R., and Mc Lennan, H., 1971 a. Antagonism between bicuculline and GABA in the - cat brain. Brain Res, 33:57-73.
- Curtis, D.R., Duggan, A.W., and Johnston, G.A.R., 1971b. Bicu- culline an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat. Brain Res, 32: 69-96.
- Chweh, A.Y., and Leslie, S.W., 1983. Enhancement by sulfatide-

of Na-independent ^3H -GABA binding in mouse brain. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 112:827-832.

- DeFeudis, F.V., Balfagon, G., Sagarra, M.K., Madtes, P., Jomoza, E., and Camacho, G.J., 1975. Action of N-metyl-bicuculline on the binding of γ -aminobutyric acid to synaptosomal fractions of rat cerebral cortex. *Exp. Neurology*, 49: 497-505.
- Dreifuss, J.J., and Mattheims, E.K., 1972. Antagonism between γ -strychnine and glycine, and bicuculline and GABA, in the ventromedial hypothalamus. *Brain Res*, 45:599-603.
- Enna, S.J., and Snyder, S.H., 1975 a. Properties of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. *Brain Res*, 100: 81-97.
- Enna, S.J., Kuhar, J.M., and Snyder, H.S., 1975b. Regional distribution of postsynaptic receptor binding for γ -aminobutyric acid (GABA) in monkey brain. *Brain Res*, 93:168-174.
- Enna, S.J. Henry, I., Yamamura, and Snyder, S.H., 1976a. Development of muscarinic cholinergic and GABA receptor binding in chick embryo brain. *Brain Res*, 101: 177-183.
- Enna, S.J., and Snyder, S.H., 1976b. Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. *Brain Res*, 115: 174-179.
- Enna, S.J., Collins, J.P., and Snyder, S.H., 1977a. Stereospecificity and structure-activity requirements of GABA receptor binding in rat brain. *Brain Res*, 124:185-190.
- Enna, S.J., and Snyder, S.H., 1977b. Influences of ions, enzymes, and detergents on ^3H -aminobutyric acid receptor binding in synaptic membranes of rat brain. *Mol. Pharmacol*, 13: 442-453.
- Erdo, S.L. and Lapis, E., 1982. Presence of GABA receptors in rat oviduct. *Neurosci, Lett*, 33: 275-279.
- Frich, V., 1975. Iritosol: A new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal. Biochem.* 63: 555-558.
- Greenlee, D.V., Van Ness, P.C., and Olsen, R.W., 1978. Endogenous inhibitor of GABA binding in mammalian brain. *Life Sciences*, 22: 1653-1662.
- Iversen L.L., and Johnston, G.A.R., 1971. GABA uptake in rat cen

tral nervous system: Comparison of uptake in slices and homogenates and the effects of some inhibitors. *J. Neurochem*, 18: 1939-1950.

- Jordan, C.C., Matus, A. I., Piotrowski, W., and Wilkinson, D., - 1981. Binding of ^3H -aminobutyric acid and H-Muscimol in purified rat brain synaptic plasma membranes and the effects of bicuculline. *J. Neurochem*, 12: 52-58.
- Junqueira, L.C., y Carneiro, J., 1976. *Histología Básica*. Salvat Editorial 426-435 pp.
- Kuriyama, K., Roberts, E., and Vos, J., 1968. Some characteristics of binding of γ -aminobutyric acid and acetylcholine to a synaptic vesicle fraction, from mouse. *Brain Res*, 9: 231-252.
- Arnjevic, K., 1974. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Phys. Rev.* 54: 418-540.
- Langley, 1905. Referencia obtenida del Cooper y colaboradores, - 1978. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York.
- Larse, P.K., and Johnston, G.A.R., 1978. Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds. *J. of Neurochem.* - 30: 1377-1382.
- López-Colomé, A.M., and Pasantes-Morales, H., 1979. Taurine interactions with retinal membranes. *J. of Neurochem*, 46: - 1047-1052.
- López-Colomé, A.M., 1981. Estudios de interacción de la taurina con membranas del sistema nervioso central. *Temas Selectos de Fisiología Celular*. 287-301.pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., - 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem*, 193:265-275.
- Mann, E., and Enna, S.J., 1980. Phylogenetic distribution of bicuculline sensitive γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding. *Brain Res*, 184: 367-373.
- Meza, G., Hernández, C., and Ruiz, M., 1981. ^3H -GABA uptake in isolated vestibullary cristae of chick inner ear. *Soc. Neuroci. Abstr.* 7: 147.

- Meza, G., Cárabez, A., and Ruiz, M., 1982. GABA synthesis in - vestibulatory tissue of chick inner ear. Brain Res, 241: - 157-161.
- Mohler, H., and Okada, T., 1977. Properties of γ -aminobutyric acid receptor binding with (+) ^3H -Bicuculline methiodide - rat cerebellum. Mol. Pharmacol. 14: 256-265.
- Olsen, R.W., and Mikoshiba, K., 1978. Localization of gamma- - aminobutyric acid receptor binding in the mammalian cere bellum: high levels in granule layer and depletion in -- agranular cerebella of mutant mice. J. of Neurochem. 30: 1633-1636.
- Oomura, Y., Maruhaski, J., Shimizu, N., and Kato, M., 1979. - GABA receptors and ionic channels in Onchidium Neuron. - Brain Res, Bull. 4: 178-180.
- Peck, E.J., Scheffer, J.M., and Clark, J.A., 1973. γ -aminobutyric acid bicuculline, and post-synaptic binding sites. -- Bioch. and Bioph. Res. Comm. 52: 394-400.
- Peck, E.J., 1980. Receptors for amino acids. Ann. Rev. Phys. - 42: 615-627.
- Roberts, E. y Frankel, S., 1950. γ -aminobutyric acid in brain.- Its formation from glutamic acid. J. Biol. Chem. 187: 85 98.
- Sano, K., and Roberts, E., 1961. Binding of γ -aminobutyric acid by brain preparations. Biochem. and Bioph. Res. Comm. 4: 358-361.
- Sano, K., and Roberts, E., 1962. Binding of γ -aminobutyric acid by mouse brain preparations. Bioch. Pharmacol. 12: 489-- 502.
- Salgonicoff, L., and DeRobertis, E., 1965. Subcellular distribution of the enzymes of glutamic acid, glutamine and- -aminobutyric acid cycloamin rat brain. J. Neurochem. 12: 287-309.
- Strasberg, P., and Elliot, K.A., 1967. Further studies on the- binding of biochemistry. Canadian J. of Biochem. 45: - - 1795-1807.
- Takeuchi, A., and Onodera, K., 1971. Effect of Bicuculline on- the GABA receptor of the Crayfish neuromuscular junction. Nature New Biol. 236: 55-56.

- Zukin, S.R., Young, A.B., and Snyder, S.H., 1974. Gamma-amino butyric acid binding to receptor sites in the rat central Nervous System Proc. 71: 4802-4807.