

413
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACION DEL Na^+ EN LA LIBERACION
DE TRANSMISORES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE LUIS CHAVEZ JUAREZ

MEXICO, D. F.,

1987



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 está 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 .

INTRODUCCION	1
DOPAMINA Y NOREPINEFRINA EN EL SNC. 16	
GABA Y Ac GLUTAMICO	18
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y METODOS	29
RESULTADOS	34
DISCUCION	47
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58

1.1 INTRODUCCION.

La base fundamental del funcionamiento del sistema nervioso esta dado por la comunicaci3n que se establece entre - las diferentes c3lulas que lo forman. Existe una gran complejidad de funciones dentro del sistema nervioso comparado con los otros tejidos del organismo. Esto ha sido el resultado de los procesos evolutivos que han dotado a las neuronas de la posibilidad de comunicarse entre ellas y con otras c3lulas (Agranoff, 1975).

Los conjuntos intercomunicados de neuronas establecen redes tridimensionales que estan relacionados con los eventos fisiol3gicos de corto y de largo plazo. Algunos eventos de largo plazo pueden derivarse del paso de se1ales neuronales que se acoplan a procesos que permiten que alg3n aspecto de la informaci3n transmitida sea almacenada en lo que se -- conoce como memoria, que dentro de los procesos evolutivos - es uno de los puntos culminantes de la evoluci3n del sistema nervioso. Para llegar a comprender estos procesos es necesario conocer como se comunican las neuronas, y cuales son los fen3menos qu3micos y aspectos morfol3gicos relacionados con dicha comunicaci3n (Agranoff 1967, Eccles 1964).

1.2. SINAPSIS

Una neurona es una c3lula altamente especializada, que esta constituida por un soma o cuerpo neuronal con una serie

de proyecciones que se ramifican y establecen contacto con otras células. Las prolongaciones celulares que se observan son los axones y las dendritas, dependiendo de la dirección en que se transmitan las señales eléctricas. Las dendritas son especializaciones que reciben las señales, en tanto que los axones forman la vía de salida de información de las neuronas. El axón de una neurona puede establecer contactos -- sinápticos con el soma, axón o dendritas de otras neuronas -- (Kandel 1977). Esta interacción se lleva a cabo a través de la sinápsis, constituida por una serie de especializaciones estructurales de la terminal axónica y de la membrana de la célula con la que hace contacto. La porción correspondiente al axón se considera presináptica e informadora, mientras que la parte que recibe la información se denomina membrana-receptora postsináptica.

La estructura de la sinápsis depende del tipo de mecanismo que utilicen para la transferencia de señales, que puede ser químico o eléctrico. En las sinapsis eléctricas las señales eléctricas que viajan a través de la membrana presináptica pasan directamente a la membrana receptora por simple conducción. En este caso la distancia entre ambas membranas es de 20 a 50 Å.

En el caso de las sinapsis químicas se requiere una serie de traducciones de la información a diferentes "lenguajes": una señal eléctrica en la membrana presináptica es -- traducida a una señal química, que una vez liberada al espa--

cio sináptico interacciona con receptores químicos específicos en la membrana postsináptica y regenera la señal eléctrica transmitida (Play, S.L. 1958, Gray E.G. 1959). La capacidad de las sinapsis químicas para liberar un mensajero químico o transmisor, provee una transmisión unidireccional -- de la información, así como también en las sinapsis eléctricas, en los circuitos neuronales(Agranoff 1975, Eccles 1964, Papas y Waxman 1972).

En la región presináptica se encuentran todos los elementos para la transferencia de señales eléctricas de mensajes químicos. Esta región constituye el botón sináptico, el cual contiene: mitocondrias, vesículas sinápticas y un engrosamiento de lamembrana celular que se restringe a la zona -- de contacto con la membrana postsináptica, la cual se encuentra también engrosada. En estas sinapsis las membranas pre- y postsináptica están separadas por una distancia aproximada de 200 A. (Eccles 1964, Kandel 1977).

1.3 TRANSMISION SINAPTICA.

El origen de la teoría química de la transmisión nerviosa puede remontarse a 1948 cuando Du Bois Raymond postuló que una sustancia excitatoria podría ser la causante de la -- contracción muscular.

Posteriormente en 1904, T.R.Elliot descubrió que la -- adrenalina mimetizaba la acción de los nervios simpáticos, --

además esta sustancia podría ser secretada por las terminales nerviosas de los nervios simpáticos y actuar como un transmisor en la glándula adrenal. Poco después, Otto Loewi demostró que al perfundir un corazón de rana y estimular el nervio vago eléctricamente, el latido del corazón disminuía o se detenía y que el líquido que bañaba a este órgano, inducía una inhibición del latido de otro corazón sin estimular éste. Con esto concluyó que en dicha preparación el estímulo nervioso inducía la liberación de una sustancia inhibidora. Sin embargo, no fue sino hasta los experimentos de Dale en 1924, cuando se dió el paso decisivo para que la teoría química de la transmisión nerviosa se aceptara. Estos experimentos mostraron que cada vez que se estimulaba el nervio vago podía inducirse la liberación de una sustancia química llamada acetilcolina. De esta manera surge la teoría de la transmisión nerviosa mediada por sustancias químicas (Sandoval, - Lara 1983; Kandel 1978).

Actualmente se considera que la corriente eléctrica viaja a través del axón y alcanza la terminal sináptica desencadenando una serie de modificaciones químicas específicas que conducen a la transferencia de esta información a través de un mediador químico, el cual atraviesa el espacio intersináptico e interacciona con la membrana postsináptica (Kandel 1978). Esta serie de eventos suceden de la siguiente manera:

Previamente a la llegada del estímulo eléctrico a la terminal nerviosa, la membrana sináptica posee un potencial de reposo dado por la distribución selectiva de los iones K^+ , Na^+ y Cl^- . En el reposo, el K^+ se encuentra muy concentrado en el interior de la célula, mientras que el Na^+ y el Cl^- están más concentrados en el exterior.

Cuando llega un estímulo a la terminal ocurre un cambio en la polaridad de la membrana, debido a una modificación de la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ . Los cuales se acumulan en el interior de la célula. Esto trae como resultado la pérdida de cargas positivas, producidas por una salida de iones K^+ , lo que produce una recuperación del potencial original. El cambio transitorio de potencial activa los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje permitiendo el paso de estos iones a través de la membrana presináptica. Dentro del botón sináptico, por medio de un mecanismo que probablemente involucre proteínas como la calmodulina, los iones Ca^{++} son los responsables de disparar los mecanismos de liberación del transmisor químico ya sea directamente desde pozas citoplasmáticas como en el caso del GABA y del ácido glutámico, o a través de exocitosis vesículas sinápticas que se encuentran en la terminal nerviosa. Una vez que el estímulo ha cesado, la polaridad de la membrana se restablece, los canales de Ca^+ sensibles a voltaje se cierran y el transmisor deja de ser liberado (Kandel 1978; Agranoff --

1967; Llinas 1976).

Después de liberado el transmisor éste atraviesa el espacio sináptico e interacciona con un receptor sináptico específico localizado en la membrana postsináptica, lo que origina una alteración en la permeabilidad iónica de esta membrana. Los movimientos iónicos, ya sea de Na^+ o Cl^- y K^+ , así originados traen como consecuencia la regeneración de la señal eléctrica en la neurona postsináptica (Hammerschlay y Roberts 1972).

Se considera que la terminal sináptica cuenta con una maquinaria bioquímica completa para el manejo del transmisor. Se ha postulado que existen varias pozas metabólicas para el neurotransmisor: Una poza metabólica probablemente ligada al sistema de síntesis de transmisor que es accesible a la liberación y otra de difícil acceso a la liberación pero relacionada bioquímicamente con dicha poza. Existe también un sistema responsable del tamaño de la fracción de transmisor que va a liberarse como respuesta a cada estímulo. Esta maquinaria incluye además un sistema de remoción del transmisor, que actúa cuando el transmisor ha dejado de interactuar con el receptor postsináptico (Kandel 1978; Agranoff 1967).

1.4 NEUROTRANSMISORES

Actualmente se han observado al menos 30 diferentes -- sustancias que han sido propuestas como posibles moduladores

o transmisores en el SNC. Se ha observado que, por lo general, éstas son de bajo peso molecular, como algunos aminoácidos entre los que destacan el ácido gamma amino butírico - (GABA), la glicina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la taurina; algunas aminas como la dopamina (Da), la norepinefrina (Ne), la epinefrina, la serotonina, y otras moléculas como la acetilcolina. También se ha postulado un grupo de péptidos que incluye a la sustancia P, las encefalinas, la neurotensina y la somatostatina entre otros. Estos últimos que podrían además estar participando en la regulación de la transmisión sináptica. Integrando probablemente, subsistemas de retroalimentación en las diferentes porciones del sistema nervioso (Sandoval y Lara 1983).

Aun no ha sido posible aclarar con exactitud el papel funcional de las moléculas transmisoras en el mantenimiento de la excitabilidad neuronal, así como sus consecuencias sobre el procesamiento de información en el sistema nervioso. Las sinápsis se han clasificado como excitadores e inhibidoras dependiendo de el incremento o disminución de la probabilidad de disparo de la célula postsináptica a través de cambios en la permeabilidad de la membrana a ciertos iones.

Se ha observado también que la interacción de algunos mediadores químicos como las catecolaminas y la adenosina, a través de sus receptores postsinápticos, inducen un incremento en la actividad de las enzimas responsables de la sín-

tesis de nucleótidos cíclicos como el AMP cíclico, que participan en la fosforilación de ciertas proteínas membranales, las cuales se ha postulado que podrían participar en la regulación de la permeabilidad a ciertos iones. Esto llevo a -- Eccles y McGeer, en 1979 a una clasificación de los mediadores químicos, considerando los diferentes mecanismos de -- acción postsinápticos. A los mediadores que pueden conducir a un breve cambio en la conductancia a los iones específicos, se les denomina ionotrópicos e incluyen a la acetilcolina y a los aminoácidos. En la transmisión metabotrópica, el -- transmisor actua indirectamente, disparando una reacción o -- una serie de reacciones químicas en la membrana postsináptica, en asociación con nucleótidos cíclicos como el AMP cíclico y el GMP cíclico, como en el caso de las catecolaminas en general (Eccles y McGeer 1979).

1.5. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE NEUROTRANSMISORES.

Un factor primordial para el estudio de las sustancias que pudieran ser consideradas como transmisores en las células nerviosas es el de la identidad. Desde el descubrimiento de la acetilcolina, se ha intentado adjudicar parámetros para el estudio de los mediadores químicos involucrados en la comunicación neuronal. No fue sino hasta 1966 cuando -- R. Werman formalizó los criterios para la identificación de sustancias neuroactivas en el sistema nervioso.

Actualmente se aceptan seis criterios básicos, los cuales se toman en cuenta para que una sustancia pueda ser considerada como neurotransmisor:

a).- Presencia del compuesto. El candidato a transmisor debe estar presente en la neurona que lo libera y necesita encontrarse potencialmente accesible para su utilización. A partir del concepto de compartimentalización del metabolismo, se ha sugerido la coexistencia de varias pozas de un mismo metabolito con estrecha, ninguna o muy poca relación. -- Cada una de ellas puede contar con precursores específicos y enzimas características para la síntesis del metabolito. -- De esta manera se ha podido explicar la presencia de aminoácidos con papel de mediadores en la transmisión que pueden localizarse en una poza específica accesible para la liberación, e independiente de la poza relacionada con el metabolismo intermedio (Cooper y Bloom 1974; Dahlstrom y Fuxe -- 1965).

b).- Presencia de enzimas. Este criterio consiste en la necesidad de la presencia de la maquinaria enzimática del neurotransmisor en la neurona que lo utiliza como tal. En cuanto a la localización celular de dichas enzimas se han -- hecho 2 proposiciones. Por una parte, se ha sugerido que es necesario la localización sináptica de las enzimas de síntesis del transmisor. Por otro lado, se piensa que sólo sería necesario contar con una poza metabólica sináptica del trans

misor accesible para la liberación, independientemente de -- que la síntesis del mediador se realice en el botón sináptico o de que este sea transportado desde el sitio de síntesis en el soma neuronal a través del axoplasma. Así la concentración del mediador se mantendría por medio de un sistema de reacumulación del mediador (Rosenberg y Lovenberg 1980; Slotkin 1978). En relación a esto, se ha descrito un mecanismo de regulación para la síntesis de Ne, el cuál permite mantener una concentración constante en la terminal nerviosa que consiste básicamente en el efecto inhibitor reversible que tiene la Ne sobre la enzima que cataliza la reacción limitante en la síntesis del propio transmisor. Así, cuando la utilización de Ne es baja la concentración de Ne en la terminal presináptica es elevada y la velocidad de formación del transmisor es lenta, por lo tanto la concentración del transmisor permanece constante. Por otro lado, un aumento en la actividad neuronal produce un rápido vaciado o utilización del transmisor lo que origina que la enzima responsable de su síntesis se desinhiba y la concentración sináptica del transmisor sea rápidamente reestablecida (Moore y Bloom-1979).

c).- Inactivación del compuesto. Debe existir un sistema efectivo y rápido para eliminar el transmisor liberado, una vez efectuada su acción sináptica.

Se ha demostrado que además de mecanismos enzimáticos,

existen sistemas de acumulación de alta afinidad para las -- sustancias neuroactivas presentes en el líquido extracelular. Estos sistemas se han descrito tanto en neuronas como en células gliales (Hamberger 1976; Inversen 1970).

d).- Identidad de acción fisiológica. El compuesto -- propuesto deberá inducir en la célula postsináptica el mismo efecto que el producido por el transmisor natural liberado -- por la terminal presináptica, en la célula. Es decir, deberá modificar la conductancia iónica de la membrana de manera similar y a través de los mismos mecanismos que el transmi-- sor endógeno.

De esta manera, el criterio de identidad se relaciona -- con la presenciade receptores postsinápticos que se han estu -- diado actualmente desde un punto de vista fisiológico y far -- macológico (Lindstrom, J. M. 1978; Bennet, A. P. 1978).

e).- Liberación del transmisor. Durante la estimula -- ción de la terminal sináptica, la sustancia postulada como -- transmisora, deberá ser detectada en el fluido extracelular -- de la región de la sinápsis activada.

En la actualidad se ha hecho énfasis en que los proce -- sos de secreción y liberación de compuestos en muchos tipos -- de tejidos glandulares y terminales nerviosas requieren de -- calcio en el medio externo (Rubin 1970), o de compartimien -- tos intracelulares (Sandoval 1980); esta dependencia de --

Ca⁺⁺, es un evento crucial en el concepto de acoplamiento -- estímulo-secreción que se ha desarrollado como una analogía del fenómeno de acoplamiento estímulo-contracción en el tejido muscular, el cual requiere la presencia de Ca⁺⁺ (Douglas-1968, Poisner y Hava 1970). Estudios realizados in vivo demuestran que la liberación de posibles transmisores es inhibida por antagonistas de Ca⁺⁺ como el Mg⁺⁺ (Hubbard 1961). - Así mismo, agentes que impiden el flujo de Ca⁺⁺ a la terminal sináptica como el verapamil y el rojo de rutenio, disminuyen la liberación del transmisor, tanto en condiciones de estimulación fisiológica como en preparaciones in vitro (Levy 1974).

Existen diversas metodologías utilizadas para producir estimulación neuronal, sin embargo las más comúnmente empleadas y que podrían simular con mas exactitud la estimulación fisiológica en el SNC son:

1).- La estimulación eléctrica de rebanadas, y preparaciones sinaptosomales colocados en soportes o zonas discretas del cerebro a través de electrodos implantados in-vivo - (Baldessarini 1966; Foster 1980; Matusi 1975). Con este tipo de estímulo se ha demostrado la liberación dependiente -- de Ca⁺⁺ de Ne previamente acumulada en rebanadas de cerebro (Baldessarini 1966), así como de GABA, glutamato, acetilcolina y serotonina de terminales nerviosas aisladas (Foster 1980). Este tipo de estímulos sin embargo promueve en mu - -

chos la secreción de algunos transmisores aminoácidos de manera independiente de Ca^{++} (Redburn 1976).

2).- Otro de los métodos de estimulación utilizados en preparaciones sinaptosomales y rebanadas de tejido es la inducción de la despolarización por exposición a agentes químicos, tales como concentraciones altas de K^+ , veratridina, ouabaina, y quinidina, medios libres de K^+ (Redburn 1976; Hopking 1971). Actualmente se considera que el mecanismo de acción de la veratridina es el que más cercanamente simula el estímulo fisiológico, ya que permite la apertura selectiva de canales de Na^+ sensibles a voltaje, los que son activados durante la despolarización fisiológica (Redburn 1976).

Al considerar que los canales de Na^+ sensibles a voltaje solo se localizan en las neuronas, el estímulo despolarizante producido por veratrina presupone un estímulo altamente específico para la membrana neuronal. Otros agentes despolarizantes, poseen mecanismos de acción menos específicos como la ouabaina que inhibe la bomba Na^+ y K^+ , y de esta manera acumula Na^+ en la terminal, o las concentraciones elevadas de K^+ que modifican el potencial electroquímico del K^+ . Sin embargo, el uso de concentraciones despolarizantes de K^+ in vitro para mimetizar el potencial de acción está muy difundido (Foster 1980; Hopkini 1971). Así, se ha demostrado que concentraciones de K^+ de 40 a 100 mM producen un aumento de la liberación de GABA dependiente de Ca^{++} (Nadier 1976) y Ne previamente acumulada en rebanadas de corteza

cerebral de rata, (Redburn 1976; Srinivasan 1964).

También se ha establecido con detalle en estudios *in vitro*, la relación que existe entre la concentración de Ca^{++} extracelular y la liberación del transmisor. Se ha observado que para Ne, Da, GABA, glutámico y aspártico la liberación sigue una cinética de saturación que alcanza su máxima velocidad a 2 mM (Srinivasan 1964).

Por otra parte también se ha descrito la participación de las células gliales en la liberación de transmisores aminoácidos después de despolarizar las células mediante concentraciones altas de K^+ extracelular (Skyova 1981), o por estimulación eléctrica (Gardner 1981; Iversen 1973), junto con otros sitios no sinápticos como el soma neuronal (Sandoval 1981). De esta forma se ha sugerido que el GABA liberado por una despolarización de la glia ejerce un efecto modulador sobre las células circunvecinas (Schoy 1974; Bowery 1972). Una característica distintiva de la liberación de células gliales es que esta no requiere de Ca^{++} (Sandoval 1980).

e).- Identidad de acción farmacológica: Agentes que interactúan con factores sinápticos fisiológicos, deben interaccionar de la misma forma que el transmisor propuesto.

Desde el punto de vista fisiológico, este criterio señala que el candidato a transmisor produce los mismos efec--

tos que el transmisor natural cuando el primero se aplica --
fontoforéticamente.

I).- Es posible destacar que este criterio señala básicamente la presencia de receptores postsinápticos específicos para los diferentes transmisores.

II).- Actualmente se considera que el receptor es una proteína integral (Slotking 1978), que posee un sitio activo, semejante al de una enzima, que une la sustancia ligando, esto es el transmisor. Cuando el receptor es ocupado por su ligando, induce un cambio conformacional de una proteína que puede estar regulando un canal iónico en la membrana (Changeous 1976), una ciclasa unida a un nucleótido (Orly 1976), o algún otro sistema de amplificación de señales que puede ser o no parte integral de la molécula receptor.

III).- Uno de los receptores que ha sido mejor caracterizado tanto bioquímicamente como fisiológicamente es el receptor a la acetil colina en el órgano eléctrico de TORPEDO-CALIFORNICA (Raftery 1976), y en la placa neuromuscular de vertebrados (Miledi 1971), donde la densidad de receptores es muy alta.

IV).- El estudio bioquímico de los receptores en SNC se ha fundamentado básicamente en la interacción del transmisor con su receptor en preparaciones membranales sinápticas aisladas. Mediante este tipo de técnicas se han podido con

cer los factores que determinan la unión del transmisor con su receptor correspondiente. La capacidad de unión que muestran los transmisores a las membranas sinápticas aisladas es de alta afinidad y puede ser reconocida como postsináptica - y distinguida de la unión del transmisor al sistema de transporte presináptico, ya que este último requiere de la presencia de Na^+ en el medio de incubación (Fagg 1979), mientras que la unión al receptor postsináptico es independiente de Na^+ (Bennet (1978). Actualmente se han identificado con esta metodología receptores postsinápticos de algunos neurotransmisores (Kuhar 1978), como los del GABA y la glicina en SNC de mamíferos (Enna 1976, Young 1974).

1.6. Modelos utilizados en el estudio de la identificación de neurotransmisores. Para la aplicación de los criterios antes mencionados se han utilizado animales completos o preparaciones in vitro.

Entre las técnicas in vivo se encuentra la superfusión de áreas específicas del SNC, en los animales mantenidos bajo anestesia, o a través de la implantación de cánulas en forma crónica que permiten la superfusión en el animal -- despierto y con libertad de movimiento (Ashkenozi 1973). -- Los modelos in vivo son poco utilizados, ya que la implantación de cánulas en el cerebro daña las células adyacentes, -- lo cual no permite conocer con certeza el estado funcional -- del área de superfusión.

En los estudios *in vitro* se pueden utilizar rebanadas de zonas restringidas de cerebro completo, o de diferentes áreas del sistema nervioso (López-Colomé 1978); sin embargo en esta preparación existe una ambigüedad, ya que existe una heterogeneidad de la población de terminales sinápticas. -- Una de las preparaciones más utilizadas como modelo para el estudio *in vitro* de la transmisión sináptica es la de terminales sinápticas aisladas también conocidas como sinaptosomas. Este tipo de preparación conserva la mayoría las características citoquímicas, fisiológicas y bioquímicas de la terminal íntegra (Feria-Velasco 1976). Sin embargo, uno de los problemas que plantea esta preparación es la contaminación en diferentes grados con otros elementos subcelulares, tanto de origen neuronal como glial. En algunos casos dicha contaminación puede llegar a alcanzar un 15% del total de sus constituyentes (Pérez de la Mora 1973).

2.- DOPAMINA Y NOEPINEFRINA EN EL SISTEMA NERVIOSO

De todos los transmisores en el SNC, la Da ha sido uno de los más ampliamente explorados, debido a que este neurotransmisor está muy relacionado con patologías neurológicas, psiquiátricas y endocrinológicas.

La investigación de la dopamina como neurotransmisor comienza a partir de los años 50s con el descubrimiento de la disminución de la Da en los ganglios basales de los pacientes muertos por la enfermedad de Parkinson (Ehringer 1960); así como del tratamiento clínico de esta enfermedad mediante la administración de precursores dopaminérgicos (Birkmayer - 1962). Consecuentemente a esto, se inició el estudio y exploración de la síntesis, metabolismo, almacenamiento, liberación, recaptura y distribución de las vías dopaminérgicas en el cerebro.

A partir de 1972 comienza la investigación en torno a los receptores dopaminérgicos los cuales parecen estar relacionados con la esquizofrenia, ya que se ha visto que las drogas empleadas para controlar esta enfermedad tienen una estrecha relación con estos receptores. También se descubrió que la estimulación de las neuronas por dopamina influye en los niveles de la enzima adenilato ciclasa (Kebabian 1972); posteriormente se descubrió que esta enzima actúa como mediador entre el neurotransmisor y sus efectos -

postsinápticos a largo plazo.

Se ha demostrado que la Ne cumple los criterios básicos postulados para calificar a los transmisores, en algunas áreas del SNC. Se han logrado avances importantes en este punto en parte, gracias a los métodos histoquímicos de localización de transmisores (Berger, 1976); también se ha logrado detectar que los metabolitos de la Ne disminuyen después de la activación de la liberación. Se ha observado que la estimulación neuronal con Ne aplicada iontoforéticamente es antagonizada por fenotiacinas, por cobalto o litio; así como por prostaglandinas y los antagonistas beta-adrenérgicos. Además de las evidencias a favor del papel de la Ne como transmisor en el SNC, se ha sugerido que esta podría también tener un papel como modulador, ya que se ha observado que el cortex auditivo de los simios, ardillas y en el cerebelo de ratas, la Ne incrementa la conductancia iónica, aumentando la duración de inhibidores noradrenérgicos o la velocidad de esta acción por períodos considerables (Falk 1962).

2.1- DISTRIBUCION DE Da y Ne EN EL SNC.

La Ne y la Da se encuentran en un número importante de sinápsis en el SNC. Estas aminas pueden ser sintetizadas localmente en los cuerpos celulares, en axones y varicosidades de las neuronas aminérgicas.

De acuerdo a estimaciones hechas en las neuronas adrenérgicas periféricas, la concentración de los transmisores en la terminal varicosa es muy grande, aproximadamente 10,000 ug/g, o en la terminal axónica 100 a 150 ug/g (Norberg y Habberger 1964).

Con el desarrollo de las técnicas de tinción selectiva, se ha podido obtener abundante información sobre la distribución anatómica de los distintos transmisores.

Con estas técnicas se ha logrado determinar que los transmisores no tienen una distribución difusa por todo el tejido cerebral, sino que se localizan en centros discretos, así como en vías concretas.

La distribución cerebral de transmisores más conocida es la de las monoaminas, Ne y Da, y serotonina, debido en parte a la particularidad de reaccionar con formaldehído o con ácido glioxálico, dando productos de fluorescencia verde o amarilla. A través de esta técnica, se ha puesto de manifiesto que muchas de las células del cerebro que contienen Ne, se encuentran concentradas en un pequeño grupo de neuronas del tallo cerebral denominado Locus Coeruleus; los axones de estas neuronas están altamente ramificados y alcanzan diversas regiones como el Hipotálamo, Cerebelo y el Encefalo Anterior.

La Da es uno de los transmisores más ampliamente distribuidos en el reino animal, se le encuentra en los inver-

tebrados, en los núcleos basales de vertebrados inferiores, así como en hipotálamo y retina. En los mamíferos la distribución de la Da es diferente a la de Ne, y constituye más -- del 50% del contenido catecolaminérgico del SNC, estando ampliamente concentrado en el Cuerpo Estriado y en el Septum -- del Nucleus Acumbens (Holzbaur 1979); también se le ha encontrado en tejidos periféricos donde probablemente funcione -- como neurotransmisor (Lackovic 1982).

La distribución por rangos de concentración en las diferentes áreas del cerebro, de mayor a menor grado es: ganglios basales y Nucleus Acumbens > Hipotálamo > Amígdala > Septum > Mesencéfalo > Médula > Cortex > Tálamo > Hipocampo (Brownstein 1974). Sin embargo, algunos núcleos pobres en regiones dopaminérgicas, presentan altos niveles de Da. El contenido más alto se ha localizado en la -- región Caudo-Putamen, en el Tubérculo Olfatorio, Nucleus -- Acumbens, en el orden de 85-100 ug/g proteína (Bertha Kalifon 1984).

2.2.- BIOSINTESIS DE Da y Ne EN EL SNC.

Debido a que la Da no atravieza la barrera hematoencefálica, esta es sintetizada por completo en las terminales -- dopaminérgicas a través de una serie de reacciones químicas; comenzando a partir de la formación del aminoácido tirosina, mediante una hidroxilación catalizada por la enzima fenila--

lanina hidroxilasa, que es específica en la orientación para el anillo fenilo. Una vez formado el aminoácido tirosina, éste fluye en el torrente sanguíneo dirigiéndose a sus sitios de reacción, pudiéndose encontrar en los melanocitos, donde es responsable de la formación de los pigmentos de melanina. Otra ruta del metabolismo de la tirosina, es la formación de catecolaminas como la Da, Ne y epinefrina; todas las enzimas necesarias para la síntesis de las catecolaminas, se encuentran dentro de las terminales nerviosas. A la llegada de la tirosina a la terminal nerviosa, ésta sufre una hidroxilación por la presencia de la tirosina hidroxilasa, formando dihidroxifenilalanina (L-DOPA); a través de la descarboxilación de la L-DOPA por la enzima dopa descarboxilasa, se forma el transmisor Da (Besson 1973 y Murring - 1976).

Los niveles de Da en las terminales nerviosas pueden ser regulados, bien durante la síntesis por la concentración del precursor, por inducción o represión de la enzima tirosina hidroxilasa, o por inhibición de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa que cataliza la descarboxilación de la L-DOPA: esto ha sido observado en tejido periféricos y en el SNC. Basándose en los estudios realizados durante la actividad neuronal, cuando se ha disparado por largos períodos, se ha observado que los grados de síntesis de la tirosina hidroxilasa y la Da hidroxilasa se incrementan; por los que-

se han postulado dos sero mecanismos a nivel de la terminal nerviosa. El primero que dice que la tirosina hidroxilasa es un factor limitante; los procesos de síntesis están moderadamente inhibidos por los productos terminales cuando han sido almacenadas cantidades suficientes. El exceso del transmisor inhibe la futura actividad de esta enzima por competencia con el sitio que une al cofactor pteridina. Cuando el transmisor es liberado, los niveles libres decaen resultando en una desinhibición de la enzima. Segundo, cuando una depolarización llega a la terminal, la tirosina hidroxilasa -- sufre una activación tal que presenta una alta afinidad por el cofactor pteridina y comienza a ser menos sensible al producto final de inhibición. La modificación de esta molécula podría dar como resultado una fosforilación reversible o influjo de Ca^{++} (Joseph T. Coyle).

La Ne es el metabolito subsiguiente a la Da en el metabolismo de la tirosina. Durante sus síntesis presenta dos tipos de regulaciones: a).- la regulación rápida, en la cual la enzima Da beta hidroxilasa, que se encuentra dentro de las vesículas en la terminal sináptica, cataliza la última etapa de la síntesis de Ne, y está controlada por la tirosina hidroxilasa que cataliza la primera etapa. Esta enzima se localiza extraventricularmente siendo dependiente de oxígeno, además tienen un absoluto requerimiento por reducir el cofactor pteridina, estando sujeto a una inhibición de retroalimentación por los productos intermedios de la síntesis

de Ne, por la Ne en sí y por los metabolitos de ésta. El incremento rápido de la síntesis de la tirosina hidroxilasa, - está sujeta a mecanismos regulatorios lentos. Durante las - manipulaciones que producen inducción de la Da beta hidroxilasa en las neuronas noradrenérgicas periféricas y centrales, también causa inducción de la tirosina hidroxilasa, esto se ha podido observar en los incrementos de la actividad enzimática de los ganglios periféricos y en las neuronas centrales, al mismo tiempo que para la Da beta hidroxilasa pero - mucho más grande, debido probablemente a que la remoción de la enzima del cuerpo celular es por transporte axoplásmico, - siendo éste muy lento (Leroy 1982).

2.3- FARMACOLOGIA DE Da y Ne EN EL SNC.

Desde el descubrimiento de los neurolépticos utilizados en los pacientes esquizofrénicos hasta la fecha, se han descubierto numerosos compuestos, los cuales han servido - - además para el estudio de las catecoláminas en el SNC. Por lo general, estas drogas modifican el metabolismo, así como el patrón de descarga de las neuronas catecolaminérgicas. -- La acción de estos compuestos puede llevarse a cabo específicamente en diferentes niveles del metabolismo de las catecolaminas. De esta forma se han descrito drogas que son capaces de inhibir la síntesis de catecolaminas, como la alfa-metil p-tirosina, alfapropil dopacetoamida, p-clorofenilala-

nina y la alfa metil tirosina (Costa 1966). Otros agentes químicos son capaces de inducir la desaparición de las catecolaminas de su sitio de almacén; el más ampliamente utilizado es la Reserpina, la cual tiene un efecto sedante que disminuye después de 24 a 48 horas de su aplicación; también -- se ha podido observar que la reserpina inhibe la captación de la Da a las vesículas sinápticas, bloqueando además las etapas finales de la síntesis de Ne. Por tal motivo la concentración endógena de Ne no se restablece sino después de 48 hr. de su aplicación (Haggendal 1963, 1964). También -- ha sido posible determinar que una de las sustancias activas de la Reserpina el Serpasil, puede funcionar como desacoplante de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de corazón (Weinbach 1983). Los alcaloides Rauwolfia, que incluyen la Rascimonia, Raunescina y la Reconescina, exhiben acciones de vacío similares (Shore 1962). Otros agentes que son muy similares a la Reserpina son las Benzoquinolinas, de las cuales la tetrabenzina es la más conocida (Pletscher 1962). -- Estos agentes son menos potentes, de corta duración, pero -- son más selectivos para las catecolaminas que los alcaloides antes descritos. Algunas sustancias imposibilitan la actividad catecolaminérgica, impidiendo la recaptura de las catecolaminas; por ejemplo la p-oh-anfetamina, la p-tiramina, la Feniletilamina, la Octopamina, etc. Estas sustancias permiten un aumento en los niveles catecolaminérgicos de el espacio sináptico dando como resultado que la sensibilidad del -

receptor sea alterada (Raitieri 1976). Por otra parte, las catecolaminas que se encuentran en estado libre son transportadas a la mitocondria y metabolizadas por la monoaminoxidasa (MAO), esta enzima puede ser inhibida por drogas como la - - Ipromiazida, Nialamida, Harmalina y la Pargilina; esta última droga junto con la Reserpina han sido ampliamente utilizadas como un modelo para el estudio de los procesos de liberación de catecolaminas, ya que proveen una marcada acumulación tanto de Da como de Ne en el citoplasma de las terminales nerviosas catecolaminérgicas (Carlson 1966; Glowinski - y Baldessarini 1966; Inversen 1967).

METABOLISMO DE ACIDO GLUTAMICO Y GABA.

El ácido glutámico cumple con varias funciones en el metabolismo del tejido nervioso:

El ácido glutámico no es transportado de la sangre hacia el tejido nervioso en cantidades apreciables, por lo que debe ser sintetizado en el tejido neural. El precursor - - principal en la síntesis de ácido glutámico es la glucosa; - el flujo de ácido glutámico a partir de ^{14}C -glucosa, varía de 30-80 % (Balazs y Halsam, 1965; Shank y Campbell, 1983), - por lo que el ácido glutámico es un metabolito importante - - en el metabolismo de la glucosa en el tejido nervioso.

El ácido glutámico ha sido postulado como precursor - -

del GABA (Baxter, 1970; Tapia y Gonzalez, 1978) aunque algo del GABA puede ser sintetizado a partir de putresina (Seiler y Eichentopf, 1975). La enzima que sintetiza el GABA a partir de glutamato es la glutamato descarboxilasa (GAD) (Tapia, 1973). Por estudios de inmunocitoquímica se ha visto que es esta enzima se encuentra fundamentalmente, si no exclusivamente en las neuronas GABAérgicas (Barber 1978).

La concentración de ácido glutámico en el tejido nervioso es de 8 a 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$, lo que contribuye con 2 a 5 % de la osmolaridad total intracelular. Si tomamos en cuenta que la carga negativa de las proteínas esta dada por el radical-carboxilo de los ácidos glutámico y aspártico, su contribución a la carga aniónica intracelular debe ser aún mayor - - (Shank y cambell (1983). Se ha propuesto que el metabolismo del ácido glutámico se encuentra compartamentalizado en al menos dos pozas que corresponden a dos modalidades del ciclo de Krebs, y posiblemente en dos tipos celulares en el tejido nervioso, por lo que se ha propuesto que tanto el ácido glutámico como el GABA se encuentran almacenados en pozas citoplasmáticas accesibles para su liberación (Vanderberg 1976; Tapia 1980).

OBJETIVOS:

Conocer los requerimientos de Na^+ externo para la liberación de neurotransmisores localizados en distintas pozas de almacenamiento, particularmente vesiculados sinápticos o citoplasmáticos, así como estudiar mediante manipulación farmacológica, los cambios en la dependencia iónica para la liberación de transmisores cuya poza de almacenamiento vesicular se transforma en una poza citoplasmática.

MATERIAL.

Todos los compuestos utilizados son de grado reactivo. Los compuestos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo), fueron ácido ascórbico, dimetil sulfóxido, mone--
nensina, octahidrato de ouabafina, pargilina, quinidina, tri--
ton x-100. Los discos de filtros Millipore de 25 mm de - -
diámetro tipo P 040 fueron adquiridos en los laboratorios -
Bio-Rad (Richmond, Ca). La dopamina 3,4-; 8 3H (n) con ac--
tividad específica de 31.6 Ci*mmol-1, el ácido glutámico --
con actividad específica de 40 mCi*mmol-1, el ácido gama --
amino butirico (2,3-3H(N)) con actividad específica de 33 -
Ci*mmol-1, y el clorhidrato de norepinefrina (7-3H (N)) con
actividad específica de 10.9 Cnmol-1, se obtuvieron de New-
England Nuclear. Las ratas que se utilizaron en todos los-
experimentos fueron de la cepa Sprague-Dawley, adultas de -
entre 200 y 250 g. de peso aproximadamente.

MÉTODOS.

El tratamiento para los animales reserpinizados fue -
de 8 mg. de reserpina por kilo de peso en un volumen de - -
0.8 ml de dimetil sulfóxido intraperitoneal de 18 a 24 h --
antes del sacrificio. A los animales control solo se les -
administró dimetil sulfóxido siguiendo el mismo procedimien--
to para los reserpinizados. Las ratas utilizadas fueron --
sacrificadas por decapitación. Inmediatamente después, se-

procedió a extraer el núcleo caudado.

Obtención de la Fracción P2.

El tejido se homogeneizó en sacarosa 0.23 y se obtuvo la fracción sinaptosomal cruda por centrifugación inicial - de 1200 x g por 10 min, el sobrenadante resultante fue centrifugado a 17000 x g por 10 min. La pastilla obtenida en esta última centrifugación sera referida como fracción p2 - o fracción sinaptosomal.

Experimentos de liberación.

La fracción p2 fue resuspendida en un amortiguador -- Krebs-bicarbonato con una composición milimolar de NaCl, - 115; KCl, 3; CaCl₂, 2; NaHPO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; NaHCO₃, - 25; glucosa, 10; mantenido a un pH de 7.4 burbujeando con - una mezcla de 5% de CO₂, 95% de O₂.

A las alícuotas de la fracción sinaptosomal (15 a 20- mg/ml), se les añadió 0.1 mM de ácido aminooxacético o 1mM- de ácido ascórbico y 0.1 mM de ácido aminooxacético o 1mM- de ácido ascórbico y 0.1 mM de pargilina para la captación- de 3H ácido glutámico, o 3H GABA y 3H norepinefrina, respec- tivamente. En seguida de una preincubación de 3 min a 37 - C se añadieron alícuotas de los neurotransmisores marcados- y se les incubó por 10 min más. Para el estudio de los va- lores basales y de liberación estimulada, se tomaron alícuo- tas de 1 ml y se depositaron en unidades de filtración Mi--

lipore (ver figura).

El medio fue extraído por succión y se lavo la muestra 6 veces con 2 ml de amortiguador Krebs-bicarbonato libre de Ca^{++} que contenía 2 mM de EGTA. La duración de cada lavado fue de 20 segundos y cada lavado fue seguido por la aplicación de vacío durante 20 segundos, inmediatamente después se aplicó la estimulación con un medio Krebs-bicarbonato conteniendo K^+ 56mM (modificando isosmóticamente la concentración de Na^+ por K^+) en presencia o en ausencia de 2 mM de Ca^{++} , veratrina a una concentración de 60 mg/ml en presencia o ausencia de 2 mM de Ca^{++} , ouabaína 4 mM sin Ca^{++} , quinidina 1.4 mg/ml y monensina a concentraciones de 0.1, 1.0, 5.0, y 10 μ M (Sandoval 1980 y 1985).

Posteriormente, se colectaron los filtrados y se les agregó 10 ml de tritosol para cuantificar la radioactividad liberada, así como la radioactividad retenida en el filtro para hacer los cálculos correspondientes. La determinación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Lowry y col 1951.

La monensina así como la ouabaína fueron disueltas en una solución al 0.05 % de etanol.

Expresión de los resultados

Liberación de los diferentes transmisores

$$\text{índice en \% de liberación} = \frac{\text{dpm en el filtrado de cada pulso}}{\text{dpm del filtro} + \text{dpm totales en el tejido}}$$

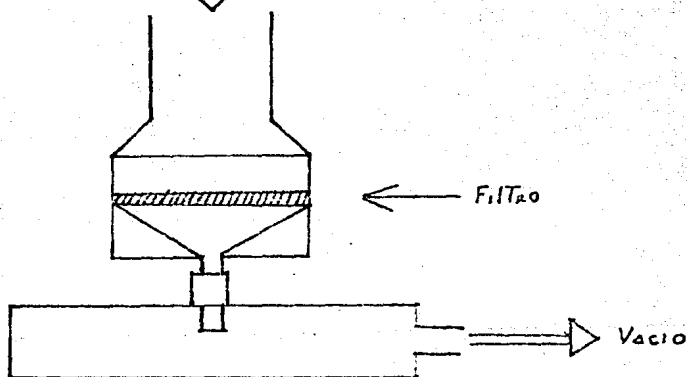
DIAGRAMA

EXPERIMENTOS DE LIBERACION.

La fracción P2 se resuspende
en Ringer-Krebs pH7.4 con CO₂-O₂ (5%-95%)

Incubacion a 37 °C de la Proteina

ALICUOTAS DE 1ml



6 lavados con 2ml del Ringer-Krebs

3 estimulaciones con las diferentes sustancias

FILTROS + LITONIO de CENTELLEO

o. FILTROS + LITONIO de CENTELLEO

ESPECTROMETRO

RESULTADOS.

Como es sabido, el alcaloide veratrina despolariza -- las terminales nerviosas por apertura de los canales a so-- dio sensibles a voltaje, provocando la acumulación de Na^+ en las terminales nerviosas (Ulbricht 1969., Otha et al 1973 Blaustein y Goldring 1975). Otro método empleado es la uti-- lización de ionóforos selectivos como al monensina, que - - transporta selectivamente Na^+ a través de la membrana.

Liberación de Da.

En la figura 1 se muestra el efecto de 3 pulsos de -- veratrina (60 mg/ml) sobre la liberación de Da de la frac-- ción sinaptosomal, tanto de animales tratados como reserpi-- na como de animales control. En la gráfica de la izquierda correspondiente al grupo control, se conserva que durante - el primer pulso de veratrina se da un incremento del 200% - sobre la línea basal de liberación, prosiguiendo este aumen-- to hasta terminar con un 400% sobre la línea basal de libe-- ración en el tercer pulso. Cuando se añadió 2mM de Ca^{++} en presencia de veratrina, se observó un incremento del 600%,- el cual disminuyó durante los siguientes pulsos hasta fina-- lizar en un 500% sobre la línea basal de liberación.

En la gráfica de la derecha (animales reserpinizados), se observa durante el primer pulso de veratrina un incremen-- to del 200 %, durante el segundo pulso un incremento del --

400% disminuyendo en el tercer pulso hasta un 360% sobre la línea basal de liberación.

La depolarización producida, por veratrina con 2mM de Ca^{++} muestra un aumento del 560%, manteniéndose durante el segundo pulso y disminuyendo en el tercer pulso a un 400% sobre la línea basal de liberación.

El ionóforo específico para el Na^+ , monensina, también fue empleado como agente despolarizante. En la gráfica izquierda de la figura 1 se muestra el efecto de diferentes concentraciones del ionóforo sobre la liberación de Da. A una concentración de 0.1 mM se observa un incremento del 50% sobre la línea basal de liberación únicamente hasta el tercer pulso. Cuando se aumenta la concentración a 1 y 5 mM de monensina se observa un incremento marcado en la liberación de hasta 12 veces la liberación basal en el tercer pulso de 5mM de monensina. Una concentración mayor del ionóforo (10mM) tiene un efecto similar. En la gráfica de la derecha, se muestran los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de monensina. En el caso de las concentraciones 0.1 y 1.0 fue similar que en el control, excepto que a 5mM, en el tercer pulso es de 10 veces la línea basal de liberación.

En muchas preparaciones de tejido nervioso, la estimulación para la liberación de transmisores se induce median-

te concentraciones altas de K^+ en ausencia de calcio externo. Además se ha postulado que la estimulación con concentraciones altas de potasio provoca un incremento en la entrada de Na^+ en preparaciones sinaptosomales (Sandoval - - 1980). También se ha observado que inhibiendo la ATPasa Na^+-K^+ con ouabaina se induce un incremento en la concentración interna de Na^+ , dando como resultado la liberación de transmisores. En la figura 2, se observan los incrementos producidos por la estimulación con concentraciones altas -- de K^+ (56mM). En la preparación control (izquierda), en -- ausencia de Ca^{++} , el incremento se mantiene en un 130% en -- los primeros pulsos, disminuyendo en el tercer pulso a un -- 40% sobre la línea basal de liberación. Cuando se le añadió 2mM de Ca^{++} , la línea basal se incremento en un 130%, -- con 56mM de K^+ y de 2mM de Ca^{++} el incremento fue de un -- 630%, disminuyendo en los siguientes pulsos para terminar en un 160/ sobre la línea basal de liberación. Cuando se dieron pulsos con ouabaina ($4 \times 10^{-4}M$) no hubo modificación alguna. En la gráfica de la derecha se muestran los resultados de los animales reserpinizados. La estimulación por K^+ -- 56mM fue de un 300% disminuyendo hasta un 100% sobre la línea basal en el tercer pulso. Cuando se añadió 2 mM de -- Ca^{++} , el incremento fue de un 66% sobre la línea basal, -- estimulando 56mM de K^+ y 2mM de Ca^{++} el incremento fue del -- 360% sobre la línea basal de liberación. Cuando se estimuló con ouabaina, solamente se observó un incremento del -- 60/ sobre la línea basal de liberación hasta el tercer pul-

so. En presencia del ionóforo monensina, únicamente hubo un incremento del 100% durante el segundo pulso a una concentración de 0.1mM sobre la línea basal de liberación. Concentraciones más altas del ionóforo incrementaron 350% la liberación en el tercer pulso y 9.5 veces la línea basal, a una concentración de 1.0 y 5mM respectivamente.

En la gráfica de la derecha de la figura 3 se observa que en animales reserpinizados la liberación por veratrina fue de 100, 350 y 275% durante el primero, segundo y tercer pulso, respectivamente. Cuando se añadió 2mM de Ca^{++} junto con veratrina, la liberación de Ne fue de 425% en el primer pulso, de 600% en el segundo pulso y de 450 en el tercero. El porcentaje de liberación con monensina 0.1uM fue del 50%, con una concentración de 1.0uM se incremento desde el primer pulso, culminando en un 200% en el tercer pulso; con 5mM el máximo incremento fue del 700% en el tercer pulso.

En la figura 4 se muestran los resultados del efecto del K^+ alto, quinidina y gramicidina sobre la liberación de Ne. La gramicidina, se ha observado induce el transporte K^+ , Na^+ y otros cationes monovalentes a través de las membranas de mitocondrias, eritrocitos y sinaptosomas (Lenhinger-1984). Balser y Anderson (1969) han reportado que el alcaloide quinidina provoca contracturas en muchas preparaciones aun si estas se encuentran en medios libres de Ca^{++} , han propuesto que este alcaloide induce el movimiento de --

Ca⁺⁺ desde compartimentos intracelulares.

Cuando se estimuló con K⁺ se observó que, en la preparación control la estimulación durante el primer pulso de K⁺ fue de 40%, disminuyendo en los siguientes pulsos hasta un 20% en el tercer pulso. Al añadir 2mM de Ca⁺⁺ la estimulación llegó hasta un 450% en el primer pulso y terminó en un 100% en el tercer pulso.

La estimulación con quinidina (2mM), induce un incremento de 150% durante el primer pulso, un 215% durante el segundo pulso, culminando con un 250% durante el tercer pulso.

En la gráfica de la de la derecha se muestra que en la preparación reserpinizada, la estimulación por potasio alto durante el primer pulso fue de 112%, disminuyendo hasta un 95% sobre la línea basal en el tercer pulso. Cuando se dieron estimulaciones con potasio alto y calcio, se observó un 95% sobre la línea basal en el tercer pulso. La estimulación con gramicidina produjo un incremento de 85% durante el segundo pulso un 85%, disminuyendo a 75% sobre la línea basal en el tercer pulso.

Liberación de GABA

La figura 5 muestra la liberación de GABA inducida por monensina y valinomicina. La gráfica de la izquierda

muestra la liberación inducida por diferentes concentraciones de monensina. Con una concentración de 0.1 mM no hubo modificación aparente en la liberación, mientras que con -- 1.0 mM se incrementó la liberación de GABA en un 330% en el primer pulso 170% en el segundo, disminuyendo a 240% sobre la línea basal en el tercer pulso. En la gráfica de la derecha la presencia de valinomicina (1.0uM) un ionóforo selectivo para K+, no modificó prácticamente la liberación de GABA.

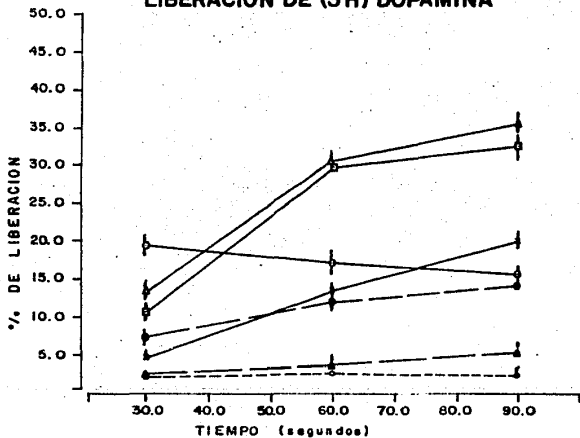
Liberación de Acido Glutámico.

En la gráfica de la izquierda de la figura 6, se observa el efecto de diferentes concentraciones del ionóforo monensina y la ausencia de sodio en el medio. En presencia de Na+ con 0.1mM no hubo modificación en la liberación del transmisor, con 1.0 mM durante el primer pulso se incrementó en un 100%, en el segundo pulso fue de 450%, disminuyendo en el tercer pulso a 275% sobre la línea basal de liberación; con 5mM en el primer pulso se incremento en 250%, en el segundo pulso 500% y disminuyó a un 400% en el tercer -- pulso. Estimulando con monensina en un medio sin sodio la liberación disminuyó un 50% durante los 3 pulsos con respecto a la línea basal.

En la gráfica de la derecha de la figura 7 se observa la liberación inducida por el ionóforo valinomicina(1.0uM).

Durante el primer pulso el incremento fue del 50%, en el --
segundo pulso fue del 75%, mientras que en el tercer pulso--
fue del 78% sobre la línea basal de liberación.

LIBERACION DE (3H) DOPAMINA



LIBERACION DE (3H) DOPAMINA (RESERPINIZADOS)

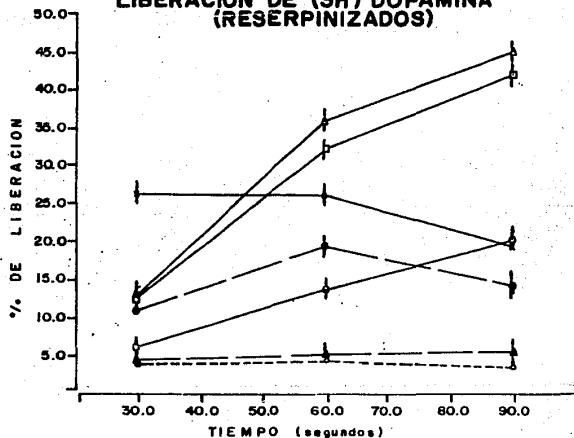


FIG 1. Efecto de la monensina y veratrina sobre la liberación de (3H)Da, de sinaptosomas de animales pretratados con reserpina, derecha y de animales control izquierda. La fracción sinaptosomal fue lavada durante 30 s. 6 veces con Ringer Krebs-Bicarbonato Ph 7.4, que contenía 1mM de EGTA. Después las fracciones recibieron 3 pulsos de por 30 s. con los dif. estímulos. Los resultados están expresados como el índice en el % de liberación. Las concentraciones de monensina fueron (μM): 0.1, 1.0, 5.0, 10.0; la veratrina fue de 60 μg/ml con 2mM de Ca⁺⁺ en ausencia. La línea punteada muestra el efecto basal de liberación. Los resultados representan 4-6 experimentos.

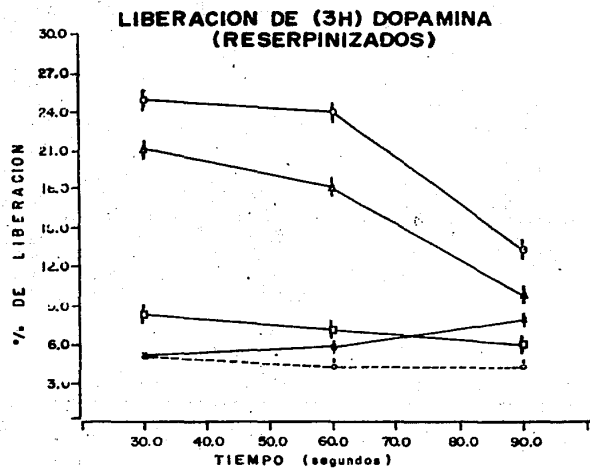
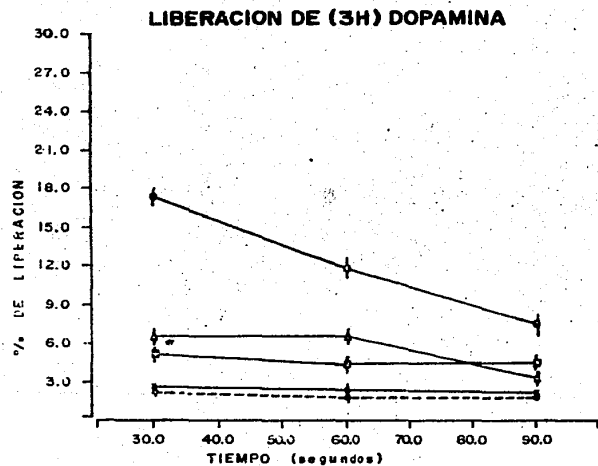


Figura 2. Efecto del K^+ y ouabaina sobre la liberación de (3H)Da de sinaptosomas. Las fracciones fueron tratadas como en la figura 1. Las concentraciones fueron K^+ 56mM con 2mM de Ca^{++} y en ausencia Δ , ouabaina $4 \times 10^{-4}M$. La línea basal de liberación con líneas punteadas y con 2mM de Ca^{++} . Estos resultados representan 6-8 experimentos.

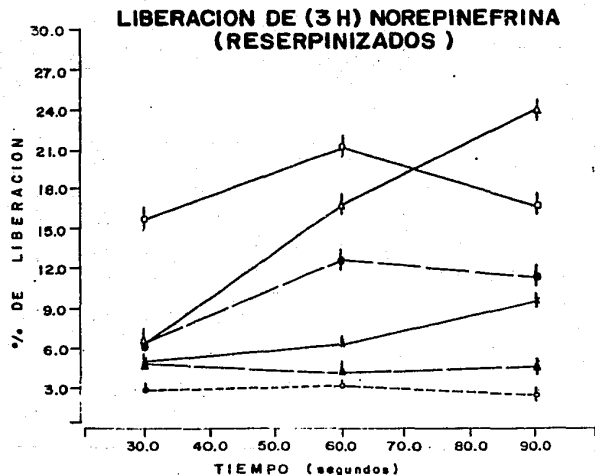
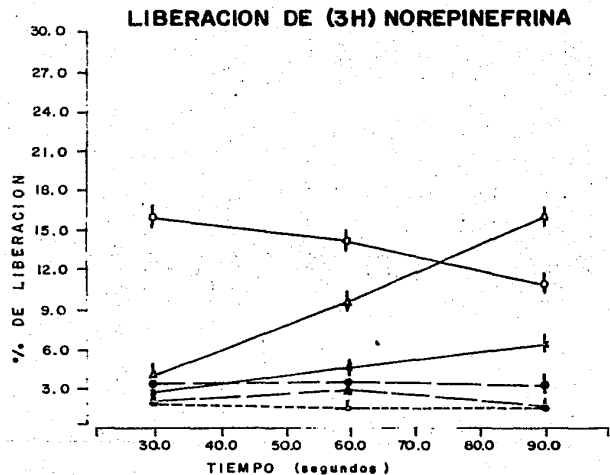


Figura 3. Efecto de la monensina y veratrina sobre la liberación de (3H)Ne. Las fracciones fueron tratadas como en la figura 1. Las concentraciones de monensina (μM) fueron, 0.1, 1.0, 5.0; veratrina 50 $\mu\text{g/ml}$ con 2mM de Ca^{+2} , y en ausencia. La línea basal de liberación con línea punteada. Los resultados representan 4-6 experimentos.

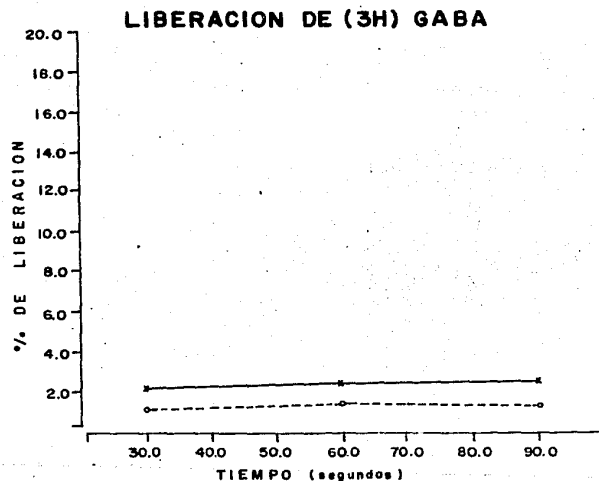
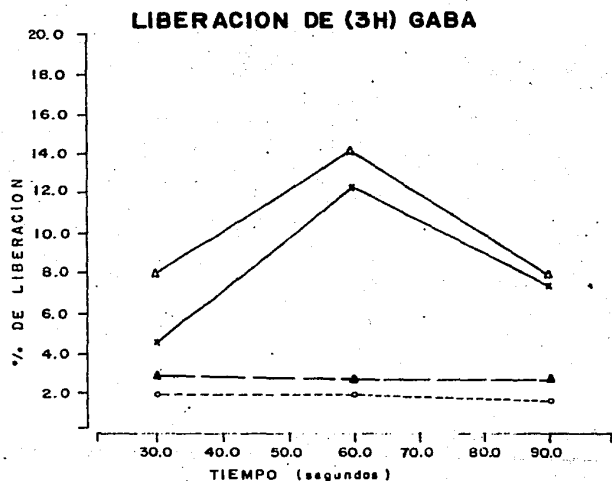


Figura 5. Efecto de monensina y valinomocina sobre la liberación de (3H)GABA de sinaptosomas. La preparación fue tratada como en la figura 1. Pero sin reserpina. En la izquierda se muestra el efecto de distintas concentraciones de monensina. 0.1 μM (▲), 1.0 μM (×), 5.0 μM (△) en la derecha se observa el efecto de la valinomocina 1.0 μM (×). La línea basal se muestra con la línea Punteada. Los resultados representan 4-6 experimentos.

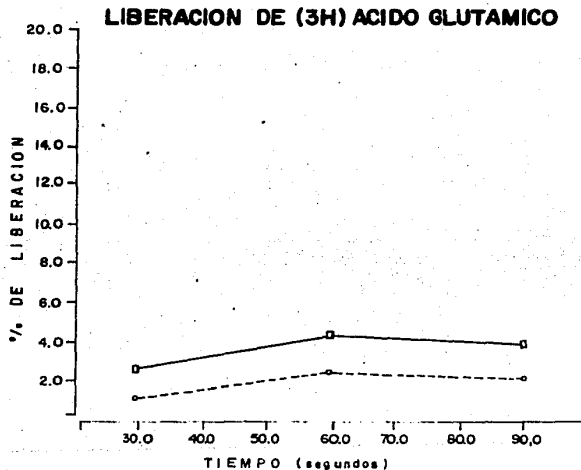
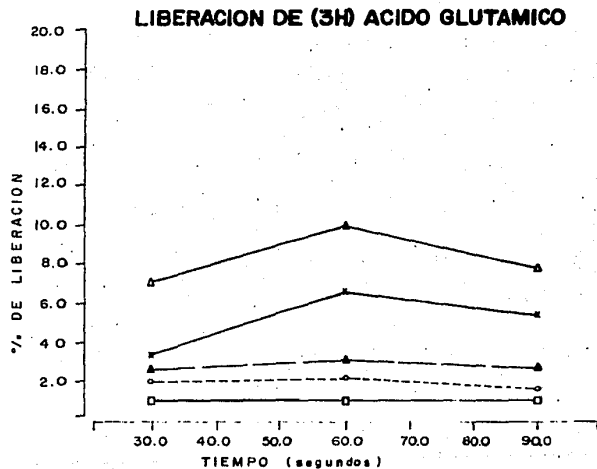


Figura 5. Efecto de la monensina y la valinomicina sobre la liberación de (3H) Acido Glutámico de sinaptosomas. En la izquierda se muestra el efecto de monensina $0.14 \mu\text{M}$ y $0.04 \mu\text{M}$ las mismas concentraciones de monensina pero en ausencia de NaCl, el cual fue sustituido en forma equimolar por tria HCl. En la derecha se observa el efecto de la valinomicina $1.0 \mu\text{M}$. La línea basal de liberación se muestra en línea punteada. Los resultados expresan 4-6 experimentos.

DISCUSION:

Los sinaptosomas del núcleo caudado de rata se han -- empleado como un modelo para estudiar los mecanismos de liberación de transmisores (Sandoval 1975). Hasta el momento muchos de los estudios se han dirigido principalmente a observar los efectos de la entrada de calcio a la célula a -- través de los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje, lo cual trae como consecuencia el disparo del acoplamiento estímulo-secreción en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se ha -- considerado que el evento crítico para la liberación de -- transmisores es el incremento de Ca^{++} en el citosol de las células excitables se Ha sugerido, que este movimiento podría darse, además del exterior desde los reservorios intracelulares y de esta manera desencadenar los procesos secretorios de las células excitables. Para el estudio de los -- procesos de liberación de transmisores se han empleado concentraciones despolarizantes de K^+ en medios libres de -- Ca^{++} , que se sabe estimulan la liberación de GABA, Ac Glutamico y Norepinetrina en fracciones sinaptosomales y rebanadas de cerebro (Raitieri 1975., Madler 1976., Sandoval -- 1978).

Aunque se ha discutido acerca de la especificidad de la estimulación por K^+ (Vargas y Orrego 1977), se ha visto que las catecolaminas al igual que el GABA se acumulan en -- terminales nerviosas de donde son liberados, mas que de con

taminación glial (Sandoval 1977.,Vargas 1977). En cuanto a la relevancia fisiológica de la estimulación en la liberación por concentraciones altas de K^+ , se ha observado un incremento en el eflujos de K^+ , a una razón de $ipmol/cm^2$ por impulso en la concentración externa de K^+ de entre 7.5-10mMol durante la actividad de las motoneuronas de la médula espinal de rana (Grafe 1982), aunque se ha sugerido que estos aumentos en la concentración de K^+ externo deberían ser reducidos por acción de las células gliales (Coles 1979). Se han observado también aumentos en la concentración extracelular de K^+ hasta de 40 mM, esto debido probablemente a una modificación del espacio extracelular (H.D.-Lux 1986). Estos aumentos en la concentración de K^+ probablemente llevan a una subsiguiente despolarización de la membrana, la cual trae consigo una apertura de canales a Na^+ , con la consecuente entrada y acumulación de este ion lo que daría origen, a una movilización del Ca^{++} de pozas intracelulares.

También se han empleado, las propiedades despolarizantes de alcaloides como la ouabaina, gramicidina, veratrina, quinidina, que mimetizan los efectos despolarizantes durante los potenciales de acción, aunque dependientes de Ca^{++} externo. Se Ha reportado que todos estos tratamientos incrementan el Na^+ interno, estimulando la liberación de GABA de terminales nerviosas (Sandoval 1978). Además, se -

ha examinado la liberación de GABA y dopamina, inducida por el ionóforo de sodio monensina (Sandoval 1985), así como -- también la acción de este ionóforo sobre la liberación de -- transmisores en las uniones neuromusculares (Meiri y Erul-- kar 1981).

Actualmente, se postula que tanto la Da como la Ne, - se almacenan en las vesículas sinápticas y que de aquí son liberadas durante la estimulación fisiológica (Colowinski - 1975. y Baldessarini 1975):

Se sabe que la reserpina es un inhibidor de la acumulación de catecolaminas en las vesículas sinápticas in vivo, de tal manera que en el animal reserpinizado hay una desaparición total de catecolaminas en las en las vesículas sinápticas (Baldesserani 1975., Stajrne 1964., Glowinski 1966.). En el caso de las neuronas dopaminérgicas, la reserpina disminuye la acumulación de dopamina en las vesículas, mientras que en el caso de las noradrenérgicas la Ne también -- disminuye pero por un bloqueo en la acumulación de dopamina, que es el sustrato de la síntesis de norepinefrina que se -- lleva a cabo dentro de las vesículas sinápticas. En estas condiciones, se forma un sitio de almacen artificial en el citoplasma antes de que la catecolamina tenga acceso a la -- mitocondria, donde se lleva a cabo su degradación (Glowinski 1966). Sin embargo si esta actividad catabólica es inhibida mediante pargilina, el almacen en el citoplasma es de

larga duración. Así es posible tener un modelo específico de un mismo transmisor en una poza vesicular o citoplásmatica.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se desprende que, la liberación de transmisores es estimulada por una elevación de las concentraciones de sodio interno en terminales sinápticas purificadas. Dicho fenómeno es general ya que tanto los aminoácidos transmisores como el GABA, y el ácido glutámico, o las catecolaminas como la Da y Ne son liberadas de terminales sinápticas por un incremento en el Na^+ intracelular.

Desde el reporte de Hodking y Horowicz en 1959 en donde se muestra la influencia del K^+ en el potencial de membrana, se ha observado que el potencial de membrana se despolariza conforme aumenta la concentración de K^+ externo. Algunos estudios han mostrado que el alto K^+ no sólo es un estímulo para la liberación de sustancias transmisoras, sino también es capaz de liberar sustancias solubles intraneuronales (Wakade y Kirpekar 1974, Vargas et al 1977), así como aminoácidos presentes en las células gliales de la médula espinal de gato, como el GABA y el ácido glutámico (Minchin e Iversen 1974).

En el presente trabajo se observó, que la liberación de Da es más sensible a la acción del alto potasio en las preparaciones sinápticas no tratadas previamente con --

reserpina, como ya se había observado para el GABA en la mismas condiciones (Sandoval 1980), sin embargo la liberación de Ne fue muy pobre, muy similar a lo reportado en otras -- condiciones de liberación, como la superfusión de rebanadas. (Vargas y Orrego 1976). Bajo estas condiciones, sin embargo la presencia de Ca^{++} en el medio, aumenta considerablemente la liberación de Ne y en menor grado la de Da. En la preparación pretratada con reserpina, la estimulación con K^+ - alto, resulto en una liberación considerable tanto para Ne- como Da, aunque esta última ligeramente mayor ya que se incremento en aproximadamente 200% con respecto al incremento dado para la liberación de Ne. La presencia de Ca^{++} no modificó sensiblemente la liberación de Da o de Na.

De esta manera el tratamiento con reserpina, que incrementa las pozas citoplasmáticas tanto de Da como de Ne - abatio completamente la dependencia de Ca^{++} de una manera - similar para ambos transmisores. Estas diferencias de sensibilidad a la estimulación por K^+ en presencia de Ca^{++} podría deberse a los diferentes requerimientos iónicos de las pozas citoplasmáticas y vesiculares de los transmisores. -- En condiciones fisiológicas Ne esta contenida en las vesículas, ya que ese es su sitio tanato de síntesis como de almacenamiento (Potter 1962). En cambio la Da, tiene un sitio de almacén transitorio en el citoplasma, ya que aquí se sintetiza, pero se almacena en las vesículas. Esta diferencia puede manifestarse en cuanto a su sensibilidad a la estimu-

lación por K^+ en presencia que Ca^{++} podría deberse a los -- diferentes requerimientos iónicos de las pozas citoplasmáticas y vesiculares de los transmisores. En condiciones fisiológicas. Ne esta contenida en las vesículas, ya que esas su sitio tanato de síntesis como de almacenamiento (Potter 1962). En cambio la Da, tiene un sitio de almacen - - transitorio en el citoplasma, ya que aquí se sintetiza, pero se almacena en las vesículas. Esta diferencia puede manifestarse en cuanto a su sensibilidad a la estimulación en presencia de Ca^{++} , que aparentemente es un requisito indispensable para la liberación estimulada por K^+ y Ca^{++} tanto para Ne como para 5HT (Beas 1984). Así bajo estas condiciones la ne que es vesicular depende en mayor grado de Ca^{++} - que la Da que podría poseer un comportamiento citoplasmático.

Se ha mostrado que el glicosídico ouabaina induce un incremento en la concentración interna de Na^+ como resultado de la inhibición de la ATPasa Na^+-K^+ (Hodquino 1985, - Esquerro 1980., Anuis 1981), Locual conduce a un incremento en la liberación de GABA de preparaciones sinaptosomales de cerebro (Sandoval 1980) y de catecolaminas de glándula - - adrenal de gato (García y García, 1981., Mosauel 1984). - - En nuestros experimentos, solo se observó un incremento claro de la liberación de Da en el tercer pulso de estimulación en la preparación de animales tratados con reserpina.-

Estos resultados nos muestran que la preparación reserpini-
zada es más sensible a los cambios en los flujos iónicos. -
Sin embargo, esta falta de aumento en la liberación de Da -
bien puede ser debida a que la concentración de ouabaina no
fue la adecuada, o bien que el tiempo transcurrido entre la
estimulación y el tiempo de liberación es muy corto, ya que
se ha observado que el tiempo de inhibición de la ATPasa --
es de 30-40 min. en la glándula adrenal de gato (García y -
García 1981).

Anderson en 1972 y Balser en 1969 reportaron que el -
alcaloide quiniodina provoca contracciones en preparaciones
de músculo en medios libres de Ca^{++} , por lo que han propues-
to que la quinidina induce la liberación de Ca^{++} desde com-
partimentos intracelulares. También se ha propuesto que el
 Ca^{++} mitocondrial debería ser el sistema afectado, ya que -
se ha observado la salida de $^{45}Ca^{++}$ desde preparaciones mito-
condriales de cerebro, así como de preparaciones mitocon- -
driales de músculo por estimulación con quinidina. La esti-
mulación con este alcaloide en nuestra preparación, mostro
un incremento considerable desde el primer pulso en ambas -
preparaciones, siendo más claro durante el tercer pulso en-
la preparación no pretratada con reserpina. Estos resulta-
dos concuerdan con los anteriormente mencionados, en donde
se observa una clara dependencia de Ca^{++} para la exocitosis
de Ne. La semejanza entre los resultados con reserpina y -
control podría deberse a que la concentración del alcaloide

pudo haber sido muy alta, con la consecuente saturación del sistema afectado por este tipo de estímulos.

La gramicidina D es un ionóforo que permite indiscriminadamente el paso de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana, y se ha observado que induce un pequeño incremento en la liberación de GABA (Sandoval 1980).

En condiciones similares en el presente trabajo, se observo que tiene un efecto estimulante en la liberación de Ne; el cual se incrementa un 100% en las preparaciones pretratadas con respina. Este incremento probablemente se debe a el aumento en la sensibilidad al Na^+ que presenta la preparación pretratada con reserpina.

Es conocido que el tratamiento con veratrina de fracciones sinaptosomales provoca un aumento considerable en la liberación de GABA en ausencia de Ca^{++} en el medio (Sandoval 1980). En nuestras condiciones se observó que la veratrina en ausencia de Ca^{++} no tiene efecto sobre la liberación de Ne, en cambio la Da se vio incrementada considerablemente en todos los pulsos. Cuando se añadió 2mM de Ca^{++} se incremento la liberación sensiblemente tanto para Da como para Ne, aunque esta última presentó una sensibilidad ligeramente superior al Ca^{++} . En la preparación pretratada con reserpina, se observó un incremento en la liberación para ambos neurotransmisores, pero considerablemente mayor para Da.

Otro de los modelos empleados para incrementar la entrada de Na^+ , es el empleo del ionóforo monensina, este se ha mostrado que incrementa la acumulación interna de Na^+ , dando un aumento en el número de mepps (potenciales excitatorios en miniatura probablemente por movimiento del Ca^{++} interno Hialina Meiri. D. Erulkar 1981). En nuestros resultados se observó una dependencia a la concentración del ionóforo, encontrándose un mayor efecto sobre la liberación de Da que para los demás neurotransmisores. Esta dependencia nos muestra claramente las distintas sensibilidades que presentan los diferentes transmisores a la entrada de Na^+ a la terminal, en el caso de los postulados como vesiculados la liberación depende del tiempo, en cambio los nos vesiculados como el ácido glutámico y el GABA muestran una saturación en el tiempo que decrece en el tercer pulso. Esto nos habla de los distintos sistemas de almacen para los diferentes transmisores que deben estar siendo regulados en el citoplasma en el caso de la Da, GABA y ácido glutámico. Así mismo se ha observado que un inhibidor de la calmodulina la trifluoperazina, inhibe totalmente la liberación de GABA en tanto que no toda la liberación de Da, esto nos muestra además la diferente dependencia de Ca^{++} en estos sistemas de liberación. Además se observa que en ausencia de Na^+ no se lleva a cabo la liberación estimulada por monensina. Lo que nos demuestra que no es un efecto del ionóforo por si mismo sino que es efecto de la entrada de

También la presencia de un ionóforo selectivo para K^+ tiene una influencia muy baja o nula sobre la liberación de GABA y ácido glutámico. Esto es por que el K^+ no tiene efecto directo sobre la estimulación de la liberación.

CONCLUSIONES.

1) A Partir de los resultados obtenidos en el Presente trabajo se llegó a los siguientes resultados:

- a) La entrada de Na^+ muy Probablemente conduce a una liberación de Ca^{++} de almacenes citoplasmáticos, Probablemente mitocondrias. Este incremento de Ca^{++} sería el responsable de la liberación del transmisor.
- b) La liberación de transmisores inducida por el incremento en la concentración interna de Na^+ en ausencia de Ca^{++} externo Puede ser un mecanismo general que se Presenta Para todos los transmisores.
- c) Un Posible sitio Para la regulación de la transmisión nerviosa estaría representado por el lugar de almacen del transmisor, esto es si se encuentra almacenado en vesículas o en Pozas citoplasmáticas.

Agranoff, B.M. Agents that block memory. En The neurosciences, a Study Program. G. Quarton, T. Melnechuk y F.O. (EDS). The Rockefeller University, New York, pp. 756-764 (1967)

Ashkenozi, R., Holman, R.B. Release of transmitters into the perfused third cerebral ventricle of the cat. J. Physiol (Lond) 1973. 195-209.

Anuis D., Garcia A.G. Correlation between catecholamine from bovine isolated chromafin cells and 3H ouabain binding to Plasma membrans. Br. J. Pharmac. 72, 1983, 31-40

Baldesserini, R.J. y Kopin, I.J. Tritiated Norepinefrine: Release from slices by electrical stimulation. Science (N.Y.), 152. 1966. 1630-1631.

Bennett, J.P. Neurotransmitter receptor binding: methods in binding studies. Raven Press, new York, 1978.

Besson, M.J. Cheransky, A. In vivo continuous estimation of 3H Da synthesis and release in the cat caudate nucleus: Effects of -MPT and of transection of nigrostriatal pathway Arch. Pharmacol. 278. 1973. 101-105

Blaustein, M.P. y Goldring, J.M. Membrane Potentials in Pinchet off Presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent Probe: Evidence that synaptosomes have Potassium diffusion Potentials. J. Physiol. (Lond)., 247. 1975. 589-615

Bowery, N.G. y Brown, D.A. GABA uptake by symphatetic ganglia. Nature New Biol., 236. 1972. 89-91

Carlsson, A., Pharmacological depletion of catecholamine stores., *Pharmacol Rev.* 18, 1966, 541-549

Cooper, J.R. & Bloom, F.E. [Biochemistry of the central nervous system. In: The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York, 1974, 43-64

Costa, E. & Neff, H.H. Isotopic and non isotopic measurements of the rate of catecholamine biosynthesis in: *Biochemistry and Pharmacology of the basal Ganglia*. Raven Press, New York 1966, 145-155

Coles, J. & Tsoupolous, M., Potassium activity in photoreceptors, glial cells and extracellular space during photostimulation. *J. Physiol* London, 298, 1979, 525-549

Colowinski, J., Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from chromaffine and other cells., *Brit. J. Pharmacol.*, 34, 1968, 451-474

Crow, J., The coincidence of schizophrenia *Phisicol Med* 1976

Chanseus, J.P. & Benedetti, L., Some structural properties of the cholinergic receptor protein in its membrane environment relevant to its fuction as a pharmacological receptor., *Cold Spring Symp. Quant. Biol.*, 48, 1983, 211-230

Douglas, W.W., Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from chromaffine and other cells., *Brit. J. Pharmacol.*, 34, 1968, 451-474

Dahlstrom, A. & Fuxe, K. Evidence for The existence of monoamine neurons in the central nervous system. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron system. *Acta Physiol. Scand* 64 1965. 1-36

Eccles, J.C. The Physiology of synapsis. Springer Verlag Inc. Berlin. 1964

Eccles, J.C. & McGuire, P.L. Ionotropic and Metabotropic neurotransmission. *Trend in Neurosciences* Feb 1979.

Enna, S.J. & Snyder, S.H. A simple, sensitive radio receptor assay for endogenous GABA in brain tissue. *J. Neurochem.* 270. 1976. 221-224

Esquerro, E. Garcia, A.G. Hernandez, M. Catecholamine secretory response to calcium reintroduction in the perfused cat adrenal treated with ouabain. *Biochem Pharm* 29. 2669-2673

Eugene C. Weinbach, Jonathan. C., Reserpine as an Uncoupler of oxidative Phosphorylation and the relevance to its Psychoactive Properties. *Biochem Pharm.* 32(8) 1983. 1371-1377

Faas, G.E. & Lane, J.O. The uptake and release of putative amino acid neurotransmitter. *Neurosci.* 21. 1979. 1015-1036

Feria Velazco, A. Sanchez de la Pena, S. Labeling of electrical surface changes at synaptosome membrane. *Electron cytochemical and Biochemical study. Brain Research.* 112. 1976. 214-220

Foster, A.C. & Roberts, P.J., Endogenous amino acid release from rat cerebellum in vitro. *J. Neurochem.* 35. 1980. 517-519

- Gardner, A.R., Posibles roles of vertebrate neuroglia in Potassium dynamics, spreading depression and migraine. *J. Exp. Biol.*, 95, 1981, 111-127
- Glowinski, J., Baldessarini, R.J., Metabolism of norepinephrine in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 18, 1966, 1201-1238
- Grafe, P., Rimpel, J., Changes of intracellular sodium and potassium ions in frog spinal motoneurons induced by repetitive synaptic stimulation. *Neuroscience*, 7, 1982, 3213-3220
- Gray, E.J., Axo-Somatic and Axo-Dendritic Synapses of the cerebral cortex: An Electron microscope study. *J. Anat. Lond.*, 93, 1959, 420-433
- Haggendal, J., & Lingsuits, M., Behaviour and monoamine levels during long term administration of reserpine to rabbits. *Acta Physiol Scand.*, 57, 1963, 431-436
- Halina, M., Eruikar, S.D., Tilly, L., Rahaminoff, R., The action of the sodium ionophore, monensin, on the transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Brain Research*, 204, 1981, 204-208
- Hammerslag, R., & Roberts, E., Overview of chemical transmission. In *Basic Neurochemistry*, Siegel, G.D., Wayne Albus, R., & Agranoff, B.W., Little Brown and Co Boston 1972, 167-179
- Hamberger, A., & Nyström, A., Amino acid transport phenomena in the nervous system. Levi, G., Battistin, L., & Laitha, A., Plenum Pub. Co., New York 1978, 221-236

Hopkins, J. & Neal, J.M., Effect of electrical stimulation and high potassium concentrations on the efflux of ^{14}C glycine from slices of spinal cord., *Brit. J. Pharmacol.*, 1971, 215-223

Hubard, J.I., The effect of calcium and magnesium on the transmitter from mammalian motor endings., *J. Physiol.*, 159, 1961, 507-517

Hubbard, J.L., Mechanism of transmitter release., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 21, 1980, 33-124

Iversen, L.L., The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves., Cambridge Press., England, 1967

Iversen, L.L., & Kelly, J.S., Role of amino acids and peptides in synaptic transmission., 62, 1973, 56-70

Iversen, L.L., Neuronal uptake process for amines and acids. In: *Advances in biochemical psychopharmacology*, Costa, E. & Giacobini, E., vol 2, Raven Press, New York, 1970, 109-120

Kandel, E.R., *Cellular Basis of Behaviour: An introduction to behavioral neurobiology*, W.H. Freeman Co., San Francisco 1977, chap 11-13

Kandel, E.R., A cell-biological approach to learning grass lecture monograph I, Society for Neurosciences, Bethesda, Ma, 1978

Katz, B. & Miledi, R., On the timing of calcium action during neurovascular transmission., *J Physiol.*, 189, 1967, 533-544

Katz, E. & Miledi, R., Does the motor nerve impulse evoke "non-quantal" transmitter release, *Proc. R. Soc. Lond.* 1981, 131-137

Keibian, J.W. "Advances in Cyclic Nucleotide Research", Greenband P., & Robinson G.W., Raven Press, New York vol 8, 1973.

Keynes, R.D. & Ritchie, J.M., The movements of labeled ions in mammalian non myelinated nerve fibres, *J. Physiol. Lond.* 179, 1965, 33-367

Kirpekar, S., Prat, J., & Makade, R., Modification of evoked release of noradrenaline from perfused Ca^{++} & Mg^{++} by various ions and agents., *J. Physiol. Lond.* 1972, 601-615

Kuhar, M.J., Neurotransmitter receptor binding: Histochemical localization of neurotransmitter receptors. Raven Press, New York, 1978

Levy, W.B., Haycock, J.M. & Cotman, C.W., Effect of polyvalent cations on stimulus coupled secretion of ^{14}C aminobutyric acid from isolated brain synaptosomes., *Molec. Pharm.* 10, 1974, 438-449

Lindstrom, J.M. Biochemical studies of receptors. Solubilization, Purification, characterization, and studies with antibodies
En: Neurotransmitter receptor binding. Yamamura, H. I. Enna, S. J. & Kuhar, M. J. Raven Press New York 1978

- Llinas, R., Steinberg, I. Z., Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission voltage clamp study in squid giant synapse and theoretical model for the calcium gate., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 873, 1976, 2918-2922
- Lopez-Colome, R. M., Tapia, R., Salceda, Y., Pasantez, M., K⁺-stimulated release of labeled GABA, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system., *Neurosci.* 3, 1978, 1069-1074
- Masaru, S., & Nishimura, S., Operation of internal Na⁺-dependent Ca²⁺ influx mechanism associated with catecholamines secretion in the adrenal chromaffine cells., *Japanese J. of Physiology*, 34, 1984, 19-39
- Matusi, S., & Yamamoto, C., Release of radioactive glutamic acid from thin sections of Guinea-pig olfactory cortex in vitro., *J. Neurochem.*, 24, 1975, 245-250
- Miledi, R., Transmitter release induced by injection of calcium ions in to nerve terminals., *Proc. R. Soc. B.*, 183, 1973, 421-425
- Miledi, R., Molinoff, P., Isolation of the cholinergic receptor protein of torpedo electric tissue., *Nature, Lond.*, 229, 1971, 554-557
- Minchin, M. C. M., & Iversen, L. C., Release of ³H GABA from glial cells in rat dorsal root ganglia., *J. Neurochem.*, 23, 1974, 533-540
- Moon, R. Y., & Bloom, F. E., Central catecholamine neuron system: Anatomy and Physiology of the Norepinephrine and epinephrine systems., *Ann. Rev. Neurosci.*, 1979, 113-168

Nadler, J.V., Vaza, K.H., Cotman, C.W., Aspartated and Glutamated as Possible transmitter of excitatorie hippocampal afferents., *Nature, Lond.*, 260, 538-540

Norberg, K.R. y Hamberger, B., The sympatetic neuron., *Acta. Phhyziol. Scand.*, 63, 1964, 238-245

Orly, J., Scham, J., Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenilate cyclase from another cell fusion., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73, 1976, 4410-4471

PaPas, G.D. y Waxman s.G. Synaptic fine structure-morphological correlates of chemical and electronic transmision En: G.D. PaPas and D.P. PurPura (eds) Structure and function of synapses. Rain Press, New York, 1972.

Palay, S.L. The morphology of synapses in the central nervous system. *Exp. Cell. Res. Supl.* 5, 1958, 275-293

Perez de la Mora, M., Feria Velazco, A. y Tapia, R. Pyridoxal Phosphate and S glutamate decarboxilase in subcelular Particles of mouse brain and their relationship to convulsions., *J. Neurochem.*, 20, 1973, 1575-1578

Fletcher, A., Brossi, A. y Gray, A., Benzoquinolizine derivates a new class of monoamine decreasing drugs with Psychotropic axtion., *Int. Rev. Neurobiol.*, 6, 1962, 275-303

Raftery, M.A., Nadler, R.L. Characterization of TORPEDO CALIFORNICA acetyl choline receptor: its subunit composition and ligand binding Properties., *Cold Sprin Harbor Symp. Quant. Biol.*, 40, 1976, 193-202

- Raitieri, M., Bertollini, R., Effects of Phenylethylamine derivatives on the release of biogenic amines from synaptosomes., *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 1976, 121-124
- Rubin, R.P., The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones., *Pharma. Rev.*, 22, 1970, 389-428
- Redburn, D., A. Shelton, D., Calcium-Dependent release of exogenously loaded GABA butyrate from synaptosomes, time course of stimulation by Potassium, veratrine and the calcium ionophore α 23187 *J. Neurochem* 26, 297-303
- Sandoval, M.E., Studies on the relationship between Ca^{++} efflux from mitochondria and the release of amino acid neurotransmitter. *Brain Res.* 175, 1979.
- Sandoval, M.E., Sodium dependent efflux of 3H GABA from synaptosomes probably related to mitochondrial calcium mobilization., *J. Neurochem* 35(9)1980, 915-921
- Sandoval, M.E., On the role of mitochondria in neurotransmitter release from regulatory mechanism of synaptic transmission ed. R. Tapia y C. W. Cotaman, Plenum Publishing Co, 1981
- Sandoval, M.E., Aquino, G. Chavez, J.L. Sodium dependent transmitter release from synaptosomes. *Neuroscience Letters*, 56, 1985, 271-277
- Shore, P., Release of serotonin and catecholamine by drugs., *J. Pharmac. Rev.* 1962, 531-550
- Skyova, E., K^{+} changes in the extracellular space of the spinal cord and their

Slotkin, T.A. Rat Brain Synaptic vesicles: uptake specificities of 3H norepinephrine and 3H serotonin in preparations from whole brain and brain regions. *J. Neurochem.* 31, 1978, 961-968

Srinivasan, V., Neal, M.J., The effect of electrical stimulation on the K⁺ concentration on the efflux of 3H GABA from brain slices. *J. Neurochem.*, 16, 1964, 1235-1244

Stairne, L., Studies on catecholamine uptake storage and release mechanism transmitter from mammalian motor nerve endings. *Acta Phys. Scand.* 62, 228, 1964, 1-9

Ulbricht, W., The effect of veratridine on excitable membranes of nerves and muscles. *Ergeb. Phys.*, 61, 1969, 18-71

Vargas, O. de Lorenzo, M.C. y Orrego, F., Potassium induced release of 3H noradrenaline from normal and reserpinized rat brain cortex slices. Differences in Ca⁺⁺-dep. and in sensitivity to K⁺. *J. Neurochem.*, 28, 1977, 165-170

Wakade, A.R. y Kirpekar, S.M., Release of 3H NE from reserpine-pretreated Guinea Pig vas deferens and seminal vesicle. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 190, 1974, 451-458

Young, A.B., Interactions of benzodiazepines with central nervous system glycine receptors: Possible mechanism of action. *Proc Nat Acad Sci.* 71, 1974, 2246-2250