

73
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"MECANISMO DE ACCION CONVULSIVANTE DEL
ROJO DE RUTENIO EN LA RATA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA:

GUILLERMINA SILVIA GARCIA UGALDE

MEXICO, D. F. , OCTUBRE 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.

INDICE

	pag
I: INTRODUCCION	
1.- Comunicación celular	1
2.- La sinapsis como sitio de comunicación neuronal	4
3.- Aspectos generales de la transmisión sináptica química	6
4.- Aspectos bioquímicos y farmacológicos de la transmisión sináptica GABAérgica	10
5.- El calcio en la transmisión nerviosa	14
6.- Importancia de las drogas en el estudio de la transmisión nerviosa	16
7.- Efectos del rojo de rutenio sobre la transmisión sináptica	18
II: ANTECEDENTES	20
III: OBJETIVO	23
IV: MATERIALES Y METODOS	
1.- Tratamiento de los animales	
2.- Preparación de los sinaptosomas	24
3.- Liberación de [³ H]-GABA	25
4.- Microensayo de la GAD	27

V: RESULTADOS

- 1.- Alteraciones en la actividad motora de la rata provocadas por el RRu 29
- 2.- Efecto del RRu sobre la actividad de la GAD en regiones cerebrales 30
- 3.- Efecto del RRu sobre la liberación de [3 H]-GABA a partir de sinaptosomas de diferentes regiones cerebrales 31

VI: DISCUSION Y CONCLUSIONES

- 1.- Efecto del rojo de rutenio sobre la conducta motora 41
- 2.- Efecto del rojo de rutenio sobre la GAD 44
- 3.- Efecto del rojo de rutenio sobre la liberación de [3 H]-GABA 45

VII: REFERENCIAS

48

I: INTRODUCCION

1.- Comunicación celular

La capacidad de comunicarse es un carácter distintivo y fundamental de las células vivientes. Tal comunicación entre las células es de importancia vital, ya que se requiere para regular su desarrollo y organización en tejidos, para controlar su crecimiento y división y para coordinar sus diversas actividades, todo lo cual resulta finalmente en la conservación de la integridad funcional de los organismos.

Existen diferentes mecanismos en los seres vivos por medio de los cuales se lleva a cabo la transferencia de información célula a célula. Entre estos mecanismos de comunicación se han caracterizado dos grandes clases: los de tipo metabólico y los nerviosos. En los primeros, el mensaje pasa de una célula a otra mediante moléculas que modifican numerosos procesos químicos involucrados en la reproducción, desarrollo y mantenimiento de las células. Tales moléculas mensajeras de información metabólica son las hormonas, secretadas por las glándulas endócrinas.

Por otro lado, la información nerviosa se encuentra contenida en mensajeros químicos que se localizan en las neuronas, células responsables del funcionamiento propiamente dicho del sistema nervioso, ya que intervienen en la generación, integración, conducción y transmisión del impulso nervioso.

A continuación se revisarán las características más relevantes de las células nerviosas y que a la vez las diferencian de otros tipos celulares.

Las neuronas, a diferencia de otros tipos celulares

conocidos, no se dividen después del período embrionario y permanecen en interfase durante el resto de la vida del organismo. En este tiempo, estas células pueden experimentar cambios en el volumen y en la cantidad y complejidad de sus prolongaciones y contactos funcionales denominados sinapsis. Ello es de gran importancia porque las células nerviosas, además de conducir y transmitir impulsos nerviosos son capaces de almacenar información instintiva y adquirida, como la de los reflejos condicionados y memoria, funciones que pueden ser realizada con mayor eficacia por un sistema de estructuras permanente, como es el caso del sistema nervioso central.

Asimismo, es relevante mencionar la diversidad que caracteriza a estas células, ya que, según su localización dentro del sistema nervioso central, tanto el tamaño como la forma de las neuronas de vertebrados es muy variable. De hecho, puede decirse que no existen dos neuronas iguales en cuanto a forma, aunque en general, es posible agruparlas en unas pocas categorías amplias; así, podemos observar neuronas que adoptan formas estrelladas, piramidales, fusiformes, en canasta, etc.

Por otro lado, la mayoría de las neuronas comparten ciertas características estructurales que hacen posible distinguir tres regiones celulares: el cuerpo celular o soma, las dendritas y el axón.

El cuerpo o soma contiene el núcleo de la neurona y la maquinaria bioquímica para la síntesis de enzimas y otras moléculas esenciales para la vida de la célula. Del soma parten numerosos procesos celulares, las dendritas, que son delicadas expansiones que tienden a ramificarse repetidamente y forman un

arbusto alrededor del cuerpo de la célula.

Las neuronas se caracterizan también por la presencia de un axón, que es una prolongación celular generalmente larga que difiere de las dendritas tanto por su estructura como por las propiedades de su membrana externa. La mayoría de los axones son más largos que las dendritas y presentan un modelo de ramificación distinto: mientras las ramificaciones de las dendritas tienden a agruparse cerca del cuerpo celular, las ramas de los axones tienden a nacer al final de la fibra, allí donde el axón se comunica con otras neuronas, con los músculos o las glándulas.

La neurona generalmente recibe la información aferente o señal de entrada, de otra u otras neuronas por las dendritas, y el soma se encarga de integrar dicha información, integración que puede resultar en la producción de una señal. Las señales producidas por el soma son conducidas por el axón hasta las ramificaciones terminales, donde a su vez se establece comunicación con otras neuronas.

La información que manejan las neuronas es de naturaleza electroquímica, eléctrica en cuanto concierne a la conducción de señales en la neurona misma, y química en su comunicación con otras neuronas. Esto se refiere a que las células nerviosas son capaces de generar señales eléctricas en respuesta a estímulos físicos o químicos que son conducidas a lo largo de sus axones, y transmiten finalmente la información a otras neuronas por medio de una estructura altamente especializada, la sinapsis.

Ya que la sinapsis es el sitio en donde el impulso nervioso pasa de una terminal nerviosa a otra neurona o al músculo, es

necesario revisar el concepto anatómico y funcional de este sitio de comunicación neuronal.

2.- La sinapsis como sitio de comunicación neuronal

Los conocimientos iniciales acerca de la sinapsis o contactos sinápticos provienen de los hallazgos realizados a fines del siglo XIX y comienzos del actual sobre la organización morfológica y fisiológica del sistema nervioso.

Además, fue principalmente por la teoría neuronal, sostenida especialmente por Santiago Ramón y Cajal, que pudo entenderse cómo las células nerviosas individuales pueden asociarse en circuitos para transmitir señales célula-célula, esto es, comunicarse. Esta teoría se basa en el supuesto de que la interacción funcional de las células nerviosas ocurría por medio de contigüidades o contactos funcionales, pero sin existir continuidad anatómica.

De este modo en la actualidad se reconoce que, las regiones sinápticas constituyen zonas especializadas de contacto entre dos neuronas o entre una neurona y un elemento no neuronal como el músculo. Conforme a ello, la sinapsis engloba todas las regiones anatómicamente diferenciadas y funcionalmente especializadas para la transmisión de excitaciones e inhibiciones de un elemento neuronal al siguiente.

La sinapsis como sitio anatómico de contacto entre una neurona y otra posee una organización bien definida: incluye una región presináptica, la cual transmite una señal a la región postsináptica en la neurona receptora.

De este modo, de acuerdo con las relaciones que establecen las terminales nerviosas presinápticas con los componentes postsinápticos, una neurona puede hacer sinapsis con otra sobre cualquiera de sus estructuras; así, puede haber sinapsis axo-somáticas, axo-dendríticas, axo-axónicas, etc.

Asimismo, tanto morfológica como fisiológicamente se han caracterizado dos tipos generales de sinapsis: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas.

En las sinapsis eléctricas la transmisión de la señal de la región presináptica a la postsináptica tiene lugar mediante un flujo de corriente iónica de una neurona a la siguiente.

En este tipo de sinapsis, el flujo de corriente eléctrica se lleva a cabo a través de contactos membranales directos entre los elementos pre y postsinápticos, en los que el flujo iónico de una neurona a la siguiente ocurre con relativa facilidad, debido a la continuidad citoplásmica que se establece entre las dos células y en consecuencia a la poca resistencia que se opone al paso de corriente eléctrica en estas zonas de contacto. Este hecho se ha correlacionado con la presencia de uniones membranales comunicantes (gap junction), que son propias de las sinapsis eléctricas, en las que los poros intercelulares que ocurren en ellas, se caracterizan por presentar una muy baja resistencia al paso de corriente eléctrica entre las dos neuronas adyacentes.

Además, estas uniones membranales son capaces de operar rápidamente, con poco o ningún retardo sináptico, y proveen un medio por el cual puede llevarse a cabo la sincronización de poblaciones neuronales. A través de estas uniones puede generarse un flujo iónico en ambas direcciones o alternativamente pueden

ofrecer una mayor resistencia al flujo de corriente en una dirección que en otra, proceso conocido como rectificación.

Asimismo, cabe mencionar que el número de sinapsis eléctricas es muy reducido en comparación con el de las sinapsis químicas, especialmente en vertebrados superiores, y por el contrario es una forma común de conexión interneuronal en invertebrados y en vertebrados inferiores.

A diferencia de las sinapsis eléctricas, en las sinapsis químicas tiene lugar un mecanismo de transducción, mediante el cual las señales eléctricas se convierten en señales químicas y éstas nuevamente en señales eléctricas. Este tipo de sinapsis es el sitio predominante de comunicación tanto en neuronas del sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico de mamíferos. Además es la que se encuentra con mayor frecuencia en los organismos vertebrados, así como en muchos invertebrados, y por consiguiente, la que regula en mayor grado las actividades fisiológicas del sistema nervioso, su alteración puede traer como consecuencia trastornos neuroquímicos que finalmente se ven reflejados en alteraciones conductuales en los organismos.

3.- Aspectos generales de la transmisión sináptica química

Al igual que en las sinapsis eléctricas, en las sinapsis químicas también existe una aposición de membranas pre y postsinápticas. Sin embargo, en las sinapsis químicas las membranas de una neurona y otra están separadas por un espacio sináptico 5 a 10 veces mayor, que en las sinapsis eléctricas, de aproximadamente 20 nm. Además, las membranas pre y postsinápticas

están morfológicamente especializadas. Esto se ha determinado con base en observaciones por microscopía electrónica, en las que se ha hecho evidente la presencia de material citoplásmico denso asociado a la membrana presináptica, el cual se ha caracterizado como "proyecciones densas" de forma piramidal y se ha denominado como zona activa, que participa en la liberación del transmisor. En la membrana postsináptica se ha descrito un engrosamiento postsináptico que, al igual que en la presinápsis corresponde a material citoplásmico denso.

También, en la zona cercana a la aposición membranal las terminales presinápticas contienen en su citoplasma numerosas mitocondrias y una colección de vesículas, llamadas vesículas sinápticas. De un modo general estas vesículas se han subdividido en dos grupos: aquellas de tipo agranular, cuyo interior es transparente a los electrones, y las vesículas granulares o de centro denso en las que la región central es opaca a los electrones. Estas vesículas se encuentran distribuidas en toda la terminal presináptica, aunque es frecuente observar que se agrupan en la cercanía de las regiones especializadas de la membrana presináptica, que como anteriormente se mencionó se les denomina zonas activas.

Una vez descritas las características estructurales de las sinapsis químicas que las diferencian de otros tipos de interacciones celulares, se procederá a detallar como se efectúa el proceso de transmisión sináptica química.

Como se dijo anteriormente, las neuronas están separadas por espacios extracelulares entre los elementos pre y postsinápticos, esta discontinuidad hace necesario que la neurona utilice

mensajeros químicos para establecer comunicación con otras células nerviosas (Iversen, 1979). Por ésto, cuando la despolarización llega a la presinápsis ocurren eventos que originan la liberación de moléculas mensajeras hacia la hendidura sináptica. El primer evento es un aumento en la permeabilidad al calcio, el cual como se encuentra mucho más concentrado en el exterior que en el interior, aproximadamente 2.5 mM contra 0.5 μ M respectivamente, entra a la terminal nerviosa.

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

La acción del neurotransmisor puede ser un efecto directo sobre la permeabilidad a algún ión, a lo cual se ha dado en llamar efecto ionotrópico; la acetilcolina y el ácido γ -aminobutírico (GABA), son neurotransmisores que actúan por este mecanismo. Otros neurotransmisores tienen efectos mediados por segundos mensajeros como el nucleótido adenosín monofosfato cíclico (AMPC), y se dice que ejercen un efecto metabotrópico; la dopamina es un ejemplo de estos neurotransmisores.

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

Esto último se debe a que en las sinapsis inhibitoras son activados canales de Cl^- por acción del neurotransmisor, que provocan como consecuencia de esto un incremento neto de cargas negativas en el interior de la membrana ya que el Cl^- tiende a moverse de acuerdo a su gradiente de concentraciones; la concentración extracelular de Cl^- es de 150 mM, mientras que la intracelular es de 10 mM.

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

Cabe mencionar que las acciones sinápticas inhibitorias son de gran importancia, ya que pueden ejercer un poderoso control regulatorio sobre la actividad neuronal. En el sistema nervioso de mamíferos, como en muchos invertebrados, ciertos aminoácidos, como el GABA y la glicina, se encuentran entre las moléculas responsables de esta función de neurotransmisores inhibitorios.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibidor en el cerebro de vertebrados y el responsable del control de la excitabilidad cerebral, por lo cual se revisarán tanto los aspectos bioquímicos como los farmacológicos relacionados con este transmisor.

4.- Aspectos bioquímicos y farmacológicos de la transmisión sináptica GABAérgica

Como ya se dijo, la inhibición postsináptica debida a la hiperpolarización resultante de la interacción de neurotransmisores inhibidores con su receptor, es uno de los mecanismos fundamentales de la regulación de la actividad neuronal.

De este modo, mediante estudios farmacológicos, se ha llegado a establecer una relación entre la aparición de estados de hiperexcitabilidad, caracterizados por convulsiones de tipo epiléptico, y una alteración en los procesos de síntesis y liberación de GABA o de su interacción con el receptor postsináptico. Así, por ejemplo, cuando se inhibe la actividad de la enzima responsable de la síntesis de GABA, la descarboxilasa glutámica (GAD), se desencadenan estados convulsivos. Tales efectos son producidos por ciertas drogas que inactivan a la GAD, como las hidrazidas (tiosemicarbazida y semicarbazida), que son capaces de atrapar el grupo carbonilo del fosfato de piridoxal (PLP). El fosfato de piridoxal funciona como coenzima de la GAD y por ello es determinante de su actividad, de modo que el resultado del atrapamiento del PLP es una inhibición de la enzima y por consiguiente una interrupción de la síntesis de GABA (Tapia y Awapara, 1969).

La disminución en la actividad de la GAD puede provocarse también por la glutamil hidrazona que inhibe a la cinasa del piridoxal, enzima responsable de la síntesis del fosfato de piridoxal; por drogas como la metoxipiridoxina, que actúan por antagonismo con el PLP; o por efectos directos sobre la apoenzima,

como en el caso del ácido mercaptopropiónico o la alilglicina (Cooper et al, 1982).

Asimismo, la inhibición de la liberación de GABA, por ejemplo con la toxina tetánica (Curtis, 1973) o el rojo de rutenio (Tapia, 1985), también desencadena estados convulsivos.

Por otro lado, cuando se bloquea la interacción del GABA con su receptor postsináptico, por acción de drogas tales como la bicuculina o picrotoxina que son antagonistas del receptor, la actividad motora paroxística también se hace evidente (Levi, 1984).

Por todo lo antes mencionado, se ha postulado que un mecanismo de producción de convulsiones es la deficiencia en la eficacia de los sistemas inhibidores GABAérgicos y como consecuencia de esto, la deficiencia en la inhibición de neuronas motoras (Tapia, 1983).

Es importante aclarar que las convulsiones son la consecuencia de una situación en la que la actividad excitatoria excede la capacidad del tejido nervioso para modular la actividad, ya que los transmisores excitadores e inhibidores constantemente interactúan sobre la membrana neuronal y participan conjuntamente en el procesamiento de la información en el sistema nervioso. De aquí que la desinhibición sea uno de los mecanismos de pérdida de control de la función del sistema nervioso.

Por ejemplo, las neuronas piramidales de la corteza cerebral y del hipocampo se encuentran prácticamente cubiertas de terminales de neuronas GABAérgicas, de tal modo que si disminuye el número o la eficacia de estas terminales inhibitoras las

neuronas piramidales descargan de manera paroxística al desinhibirse. Estos dos fenómenos de inhibición y desinhibición probablemente desempeñan un papel primordial en el procesamiento de información en la corteza cerebral, el hipocampo y otras estructuras.

Para considerar el papel de las neuronas GABAérgicas en la epilepsia cortical focal, fue necesario determinar inicialmente si las neuronas GABAérgicas disminuyen en número o si sus relaciones con otras neuronas, o entre ellas, están alteradas morfológicamente. Los estudios inmunocitoquímicos de la corteza sensitiva y motora de monos epilépticos, con anticuerpos contra la GAD, permitieron correlacionar la actividad epiléptica con el número de terminales GABAérgicas (Ribak et al, 1979). En estos estudios se observó una reducción altamente significativa en el número de terminales positivas a la GAD, en los sitios epileptogénicos.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que una pérdida relativamente selectiva de las neuronas inhibitoras GABAérgicas, pudiera ser responsable de la susceptibilidad a la actividad paroxística observada en el foco epileptogénico.

Por otro lado, los estudios bioquímicos en la corteza de monos epilépticos, revelaron una correlación entre la frecuencia de las convulsiones, la pérdida de los receptores GABAérgicos, y la disminución de la actividad de la GAD (Bakay y Harris, 1981).

Todas las observaciones precedentes apoyan el concepto de que la destrucción de las interneuronas GABAérgicas pudiera ser una de las alteraciones cerebrales que predisponen a las convulsiones, tanto en la epilepsia focal como en la epilepsia

generalizada desencadenada por drogas capaces de alterar la ruta metabólica del GABA (Roberts, 1986).

De entre todas las regiones cerebrales, el hipocampo es la más susceptible de producir epilepsia, lo cual se debe a que la actividad de sus neuronas GABAérgicas, células en cesta, células horizontales y neuronas de axones cortos, es fundamental para mantener el funcionamiento normal de esta estructura. Por estudios inmunocitoquímicos se ha demostrado que las terminales GABAérgicas que forman sinapsis axo-somáticas sobre las células piramidales corresponden a las células en cesta, que son interneuronas inhibitoras intrínsecas. A su vez las células en cesta reciben numerosas terminales GABAérgicas, lo que hace pensar en la importancia de la desinhibición en el procesamiento de la información nerviosa (Kevin, 1986).

Numerosos hallazgos experimentales son compatibles con la idea de que varios tipos de descargas epilépticas tienen su origen en el hipocampo, cuando disminuye la eficacia de las neuronas GABAérgicas. Por ejemplo, el aumento de la actividad de las neuronas piramidales y la producción de la actividad epileptiforme por la acción de las encefalinas, parece deberse a la depresión de la descarga de las neuronas inhibitoras. Es decir a un proceso de desinhibición (Lee et al, 1980; Nichol et al, 1980).

Asimismo, la sustancia nigra es otra estructura que participa activamente en la expresión de alteraciones motoras tales como las convulsiones. En esta región se ha observado que la elevación del contenido de GABA en la zona reticulata, por medio de drogas que bloquean a la transaminasa del GABA, que es

la enzima que degrada al GABA, o por microinyección de drogas agonistas a este neurotransmisor, como el muscimol, reduce la susceptibilidad a numerosos tipos de convulsiones generalizadas inducidas experimentalmente, como las producidas por electrochoque o por bicuculina. Las eferencias GABAérgicas de la pars reticulata de la sustancia nigra, que incluyen a las proyecciones nigrotalámicas, nigrotectales y nigrotegmentales son probablemente responsables de influenciar la propagación de trastornos motores paroxísticos (Gale, 1986).

5.- El calcio en la transmisión nerviosa

La importancia del calcio en los procesos biológicos ha sido ampliamente reconocida. Aunque los líquidos fisiológicos no son tan ricos en calcio como en Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , en términos de concentraciones, la concentración extracelular de Ca^{2+} es de 2 mM y menor de 1 μM dentro de la célula, es un catión fundamental en el funcionamiento celular en general y en particular en el sistema nervioso.

Así, se ha descrito la participación del calcio como regulador intracelular en procesos fundamentales de las células, tales como: motilidad celular; división y diferenciación celular; regulación de los sistemas enzimáticos; regulación de la polimerización de proteínas contráctiles; secreción en general, etc. (Rubin, 1974).

Como se dijo en la sección anterior, en el tejido nervioso el calcio participa de manera determinante en la liberación de neurotransmisores, este es un fenómeno generalizado para todos

los compuestos neuroactivos (Dingledine y Somjen, 1981; Blaustein et al, 1972; Olsen et al, 1977; Waller y Richter, 1980).

El calcio puede liberar transmisor de una sinapsis independientemente de la forma en que se consiga un aumento en su concentración interna. Así, la aplicación iontoforética de calcio en la presinapsis del axón gigante de calamar (Miledi, 1973) o el calcio que puede provenir de fuentes intracelulares como mitocondrias (Alnaes y Rahamimoff, 1975) produce un aumento en la liberación del transmisor. Llinás y Nicholson (1975), utilizaron a la proteína acuarina como indicador de calcio y demostraron en la sinapsis gigante de calamar que el calcio intraterminal aumenta su concentración al despolarizarse la membrana, de manera coincidente con la liberación del transmisor, y que esta liberación se anula cuando el potencial de membrana se sitúa cerca del potencial de equilibrio electroquímico del calcio, es decir, cuando se suprime el flujo del catión.

A la idea de que el aumento en la concentración del calcio libre intraterminal dispara el mecanismo de liberación del transmisor, se le ha llamado "hipótesis del calcio" (Katz y Miledi, 1967).

En la sinapsis gigante del calamar es posible medir con precisión el retardo que ocurre entre la entrada de calcio y la respuesta que se produce en la postsinapsis; este retardo es muy pequeño, de aproximadamente 200 μ seg (Llinás et al, 1976). El retardo mencionado da idea de que el mecanismo liberador, cualquiera que sea, se localiza cerca del sitio de entrada del calcio. Hay evidencias de que los sitios de entrada de calcio son abundantes en la vecindad de la presinapsis (Fumplin et al,

1981), lo que apoya la idea de que el flujo de calcio ocurre cerca del sitio de liberación del transmisor.

Cuando se trata de sitios de entrada y salida de calcio, es preferible hablar de canales para éste ión, ya que se considera que las estructuras encargadas del transporte del calcio son moléculas protéicas situadas en la membrana celular.

6.- Importancia de las drogas en el estudio de la transmisión nerviosa

El empleo de drogas con efectos específicos ha sido de gran utilidad para comprender los mecanismos básicos de la transmisión nerviosa.

A este respecto cabe mencionar que, para la zona de la sinapsis se destacan algunas drogas que ejercen una acción selectiva ya sea sobre la terminal pre o la postsináptica. De este modo, prácticamente cualquier evento funcional que se lleva a cabo en este sitio de contacto neuronal puede ser modificado por algún fármaco, por lo menos en ciertas sinapsis.

Así por ejemplo en las sinapsis inhibitorias de vertebrados, que usan como neurotransmisor generalmente al GABA, es posible alterar la síntesis del transmisor con agentes capaces de bloquear la actividad de la GAD, como fue citado anteriormente, o bloquear los receptores postsinápticos con agentes antagonistas del GABA, tales como la bicuculina o la picrotoxina. También es posible evitar la degradación del transmisor después de que es liberado, con el ácido aminooxiacético, un inhibidor de la transaminasa del GABA, o bloquear su captura por las células nerviosas con drogas tales como el ácido nipecótico (Cooper, et

al, 1982). (Esquema 1).

Por todo lo dicho se puede concluir que el uso de drogas con una acción específica es de gran valor, ya que representan una herramienta experimental que permite el entendimiento de los eventos fisiológicos que se están llevando a cabo en los sistemas neuronales, y a la vez representan el medio por el que pueden llegar a conocerse las consecuencias que resultan de la alteración de algún evento relacionado con la neurotransmisión.

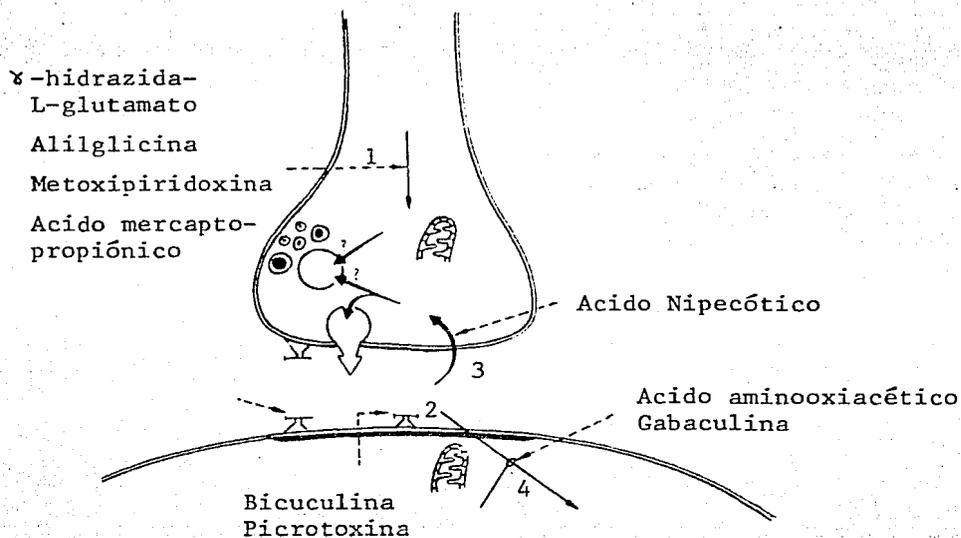
Asimismo, en el caso del calcio, que es un catión con un amplio espectro de acción en los sistemas biológicos, se cuenta con herramientas farmacológicas que permiten estudiar su papel en los diferentes eventos en los que participa. A este respecto, existen drogas que bloquean el transporte de calcio a través de membranas biológicas, y otras que, por el contrario, aumentan la permeabilidad al ión. De este modo pueden llegar a comprenderse los movimientos de calcio en una preparación biológica.

De entre estos compuestos, el verapamil, la nifedipina o el rojo de rutenio son bloqueadores eficaces de los movimientos de calcio en diferentes preparaciones biológicas (Schramm, 1986).

Los canales de calcio pueden también ser bloqueados por ciertos cationes polivalentes, tales como: Mg^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , etc. (Nachshen, 1984).

Otros compuestos facilitan el transporte de calcio. Entre tales, se encuentra el ionóforo A23187, que es capaz de acarrear al calcio a través de la bicapa lipídica al formar un complejo ionóforo-ión que es soluble en lípidos (Schramm, 1986).

Sinapsis GABAérgica



Esquema 1. Representación esquemática de una neurona GABAérgica en que se indican los sitios de acción posibles de algunas drogas. 1: síntesis enzimática; 2: interacción con receptores postsinápticos; 3: recaptura; 4: metabolismo. Cooper et al, 1982

7.- Efectos del rojo de rutenio sobre la transmisión sináptica

En la sección anterior se mencionaron algunas drogas que, de una u otra manera, interfieren con el transporte de calcio; en esta sección se hará especial énfasis en los efectos del rojo de rutenio, que tienen valor experimental en el estudio del calcio en relación con la neurotransmisión y que constituyen un antecedente fundamental del trabajo experimental de esta tesis.

El rojo de rutenio (RRu), es un colorante inorgánico de naturaleza catiónica, de fórmula $Ru_2(OH)_2Cl_4 \cdot 7NH_3 \cdot 3H_2O$. El RRu se une a las glicoproteínas de las membranas celulares, por lo que ha sido usado en microscopía electrónica para observar membranas biológicas (Luft, 1971 a y b).

Este colorante tiene efectos farmacológicos interesantes; en mitocondrias fue originalmente descrito como un inhibidor específico del transporte de calcio, sin afectar la respiración ni la transferencia de energía, aunque a concentraciones elevadas sí inhibe la respiración (Vasington et al, 1972; Reed y Bygrave, 1974. Luthra y Olson (1977), encontraron que el RRu impide tanto la captura como la salida de calcio de las mitocondrias, procesos donde hay una dependencia de energía. En una preparación distinta, la membrana del eritrocito, el RRu es también capaz de inhibir a la ATPasa de calcio, de una manera dependiente de su concentración, sin provocar algún efecto significativo sobre la ATPasa $Na^+ - K^+$ o Mg^{2+} (Watson et al, 1971). También inhibe fuertemente la unión del calcio y la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en sarcolema aislado (Madeira y Antunes-Madeira, 1974). Asimismo, en membranas sinaptosomales el RRu es capaz de inhibir

la unión del calcio. Los sitios de alta afinidad para el colorante parecen corresponder a los sitios de unión para el calcio (Kamino et al, 1976). Además, el RRu inhibe la captación de Ca^{2+} estimulada por despolarización, en sinaptosomas (Tapia et al, 1985).

El RRu, al igual que otros inhibidores que afectan el transporte de calcio, inhibe la liberación de neurotransmisores en varios tipos de preparaciones biológicas. En la sinapsis neuromuscular de la rana, Rahamimoff y Alnaes (1973), encontraron que el RRu actúa principalmente sobre terminales nerviosas presinápticas, en donde decrece la liberación cuántica del transmisor al bloquear el transporte de calcio. Por otro lado, Person y Kuhn (1979) confirmaron el efecto bloqueador del RRu sobre la liberación de acetilcolina, tanto en condiciones de despolarización como espontáneamente.

También en apoyo de un efecto puramente presináptico y en una preparación de sinapsis del ganglio bucal de *Aplysia californica*, Baux y colaboradores (1979), aplicaron acetilcolina iontoforéticamente, en presencia de RRu para bloquear la transmisión nerviosa y encontraron que la respuesta postsináptica no se altera.

Igualmente, la inhibición de la liberación de transmisores por el RRu ha sido observada en terminales nerviosas del tejido cerebral (Tapia y Meza-Ruiz, 1977).

II: ANTECEDENTES

Además de los experimentos in vitro que sugieren al RRu como un catión que es capaz de inhibir la liberación de transmisores, al interactuar con los sitios de unión al calcio, hay otros estudios que han sido realizados in vivo que apoyan tales aseveraciones (Tapia, 1985).

En estos estudios, la administración intraperitoneal (ip) del RRu en ratones desencadenó una parálisis flácida completa, y por el contrario, la administración intracisternal de este compuesto indujo convulsiones tónico-clónicas generalizadas, con extensiones de cabeza y pérdida del reflejo de enderezamiento. Ambos efectos se debieron también a la alteración de algún mecanismo dependiente de calcio, ya que tanto el efecto paralizante del RRu como las convulsiones tónico-clónicas generalizadas, fueron prevenidas por la inyección de CaCl_2 , mientras que los agentes quelantes del Ca^{2+} tales como el EDTA, administrados de la misma forma que el RRu, tuvieron efectos parecidos a los de éste (Tapia et al, 1976).

En gatos, la administración ip (8 mg/Kg) de RRu también desencadenó una marcada parálisis flácida y su inyección en el ventrículo lateral o el hipocampo (8 a 100 μg), por medio de una cánula insertada permanentemente, produjo asimismo convulsiones generalizadas (Tapia et al, 1976).

En otros estudios fue posible probar el efecto presináptico in vivo del RRu sobre la liberación de neurotransmisores, por medio de la inyección (ip) de 4-aminopiridina o guanidina a ratones que se encontraban en estado de parálisis flácida

completa, por la administración del colorante. Ambas drogas facilitan la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular (Lundh, 1978; Lundh y Thesleff, 1977) y fueron capaces de antagonizar el efecto paralizante del RRu (Tapia, 1982). Por consiguiente, la parálisis inducida por el RRu se atribuyó a una deficiencia en la transmisión neuromuscular, debido a la inhibición de la liberación de acetilcolina dependiente de calcio.

Debido a que el GABA es el neurotransmisor inhibitor más abundante en el cerebro y que parece ser el responsable del control de la excitabilidad cerebral, como fue mencionado anteriormente, se propuso que las convulsiones inducidas por el RRu se deben a un decremento en la liberación de GABA dependiente de calcio. Esta hipótesis fue apoyada por la observación de la inhibición en la liberación de este neurotransmisor, en terminales nerviosas aisladas denominadas sinaptosomas, del cerebro completo de ratones que se encontraban en estado convulsivo como consecuencia de la administración intracisternal del RRu (Meza-Ruiz y Tapia, 1978).

Un hecho importante que es necesario hacer notar es que la administración ip de RRu parece tener un efecto bifásico en la rata, a diferencia de sus efectos en el ratón y el gato, ya que en esta especie el RRu es capaz de inducir tanto parálisis flácida generalizada así como convulsiones tónico-clónicas (Feria-Velasco et al, 1982). Esto sugiere un efecto diferencial del RRu en la rata, con respecto a otras especies de mamíferos, según la ruta de administración usada, probablemente debido a diferencias en la barrera hematoencefálica. En la rata el

colorante si penetra al sistema nervioso central (Arauz-Contreras y Feria-Velasco, 1982) mientras que en el ratón y el gato el efecto es unicamente periférico (Tapia et al, 1976).

III: OBJETIVO

Los antecedentes revisados en la sección anterior indican que el rojo de rutenio es un bloqueador potente de la unión y el transporte de calcio en terminales nerviosas, que como consecuencia inhibe la liberación de neurotransmisores. Estos efectos del RRu son aparentes in vivo, ya que el colorante produce parálisis y/o convulsiones que se pueden explicar por mecanismos presinápticos. Sobre la base de estos datos, en el presente trabajo nos propusimos caracterizar el mecanismo de acción convulsivante de la administración (ip) del RRu en la rata. El diseño experimental de este trabajo parece ser un buen modelo para evaluar las alteraciones neuroquímicas ocasionadas por el RRu, ya que, a diferencia de la administración intracraneal, el efecto es generalizado y es posible comparar algunos parámetros neuroquímicos en diferentes regiones cerebrales a distintos tiempos después del tratamiento.

Para tal efecto, tomamos en cuenta los datos revisados sobre la participación de la transmisión inhibitoria GABAérgica en las alteraciones epileptogénicas, y estudiamos la actividad de la GAD y la liberación de este mediador, tanto espontánea como estimulada por despolarización, en sinaptosomas de hipocampo y mesencéfalo, por ser estructuras que han sido reconocidas como altamente epileptogénicas, así como en estriado, debido a que es el principal componente del sistema motor extrapiramidal, que junto con la corteza cerebral, que también fue estudiada, participa en la regulación del control motor.

IV: MATERIALES Y METODOS

1.- Tratamiento de los animales

Se usaron ratas macho Wistar, de 190 a 210g de peso. El RRU se disolvió en agua bidestilada y fue inyectado en la cavidad peritoneal de los animales, sin anestesia previa, en las siguientes dosis: 2.2, 4.4, 6.6 y 8.8 mg/Kg de peso, para caracterizar los efectos desencadenados por esta droga y determinar la dosis convulsivante del RRU. Los animales del grupo control fueron inyectados por la misma ruta de administración con un volumen igual de agua bidestilada.

2.- Preparación de los sinaptosomas

En todos los experimentos de liberación de GABA se utilizó una preparación de sinaptosomas de hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal del cerebro de la rata que fueron aislados según la técnica de Löscher y colaboradores (1985), la cual se describe a continuación:

Las ratas fueron decapitadas después de 4 y 6 horas de la inyección del RRU y en el momento de la convulsión tónico-clónica generalizada. Una vez extraído el cerebro se procedió a hacer la disección bilateral del hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal, sobre una superficie fría, de acuerdo a la técnica establecida por Heffner, et al (1980) en la que la disección de cada estructura se realiza a partir de rebanadas coronales del cerebro de la rata.

Las diferentes regiones de cada cerebro, se homogenizan en 1 ml de sacarosa 0.32 M, ajustada a pH 7 con tris, con un mazo de

teflón en un homogenizador de vidrio. Para aislar la fracción primaria los homogenizados se centrifugan a 1,000 g por 10 min en un rotor SM 34 de una centrifuga Sorvall RC-5B, y de este modo se separa el sedimento nuclear crudo que contiene núcleos, eritrocitos y células no rotas, y el sobrenadante que contiene el citoplasma, los sinaptosomas, mitocondrias, microsomas y la mielina.

El sobrenadante se coloca sobre 1 ml de sacarosa 1.2 M y se centrifuga en un rotor 50 Ti de ángulo fijo a 220 000 g (50, 000 rpm), a una $\omega^2 t$ de 1.6×10^{10} rad /seg, en una centrifuga Beckman L 8-55, usando aceleración lenta. El sedimento que se forma en el fondo del tubo que contiene las mitocondrias se desecha, mientras que la interfase en el límite superior de la sacarosa 1.2 M donde se encuentran los sinaptosomas, la mielina y algunos microsomas, se colecta cuidadosamente y se diluye con sacarosa 0.32 M hasta un volumen final de 2 ml. La suspensión diluida se coloca sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M y se centrifuga obtenido en el fondo del tubo corresponde a la fracción sinaptosomal, mientras que la mielina queda retenida en la interfase y los microsomas permanecen dispersos en la suspensión.

3.- Liberación de [3 H]-GABA

La liberación de GABA a partir de una fracción sinaptosomal fue estudiada por una técnica de superfusión. La fracción sinaptosomal de cada región se resuspende en 0.5 ml de medio Ringer-Krebs oxigenado, de la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaH_2PO_4 1.2, KCl 4.7, MgSO_4 1.2, CaCl_2 2.5, glucosa 5.6,

Tris-HCl 25, pH 7.4 y ácido aminooxiacético 10^{-4} M. Una vez resuspendidos los sinaptosomas, se preincubaban por 10 min en un baño de agitación a 37 °C. Al término de este período se agregan 25 μ l de una solución de [3 H]-GABA, (0.45 μ Ci, para dar una concentración final de 1.25 μ M), y la incubación se continua por 10 min para la captura del compuesto. Posteriormente, el volumen total de incubación se coloca en una cámara cuya base perforada esta cubierta por un filtro Millipore con un poro de diámetro de 0.65 μ m. Los sinaptosomas se depositan sobre los filtros y se lavan por perfusión con el medio Ringer-Krebs con ayuda de una bomba peristáltica, a un flujo de 1.5 ml/min por 7 min. Una vez que los filtros son lavados, el flujo de la bomba se ajusta a 0.5 ml/min y las fracciones se colectan cada minuto. Después de 5 min de liberación espontánea, el medio de perfusión es sustituido por el medio Ringer-Krebs que contiene una concentración despolarizante de KCl (47 mM) y en el que el NaCl se ha disminuido proporcionalmente, para mantener constante la presión osmótica. La liberación de radioactividad en cada fracción de 1 min así como la contenida en el filtro al final de la perfusión, es colectada en viales que contienen 5 ml de tritosol (Fricke, 1975) y contada por espectrometría de centelleo líquido. Los resultados se expresan como porciento de la radioactividad liberada por minuto con respecto a la radioactividad total tomada por el tejido.

La liberación de GABA se llevó a cabo mediante un dispositivo que permite estudiarla simultáneamente en 4 cámaras de perfusión (Raiteri et al, 1974), por lo que fue posible comparar en paralelo la liberación de sinaptosomas de ratas

control y tratadas.

4.- Microensayo de la GAD

Preparación del tejido:

Después de 6 horas de la inyección del RRU los animales fueron decapitados y una vez extraído el cerebro de la rata, se disecaron bilateralmente la sustancia nigra, mesencéfalo, hipocampo, estriado y corteza frontal, como se describió anteriormente. Cada región fue homogenizada en 1 ml de agua bidestilada fría, a excepción de la sustancia nigra que fue homogenizada en 0.25 ml, con un mazo de teflón en un homogenizador de vidrio, se conservó siempre la suspensión del tejido en frío.

Ensayo de la GAD:

La actividad de la GAD fue ensayada al medir la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ formado a partir del ácido glutámico-L-[1- ^{14}C].

La actividad enzimática se inició al colocar una alícuota de 25 μl de la suspensión del tejido de cada región cerebral en el tubo de reacción que contenía: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.4 con ditioneitol (DTT) 1.13 mM, piridoxal 5-fosfato 0.5mM, glutamato 10 mM, previamente ajustado a pH 6.4 con NaOH y 1-[$^{14}\text{CO}_2$]-Glutamato (0.05 μCi). Inmediatamente después de la adición del tejido, el tubo de reacción se conecta por medio de una manguera de plástico a un segundo tubo que contiene 50 μl de hidróxido de hiamina 1M en metanol. La reacción se deja proceder durante 20 min a 37 °C en el baño de agitación, al termino de los cuales se inyectan 50 μl de ácido sulfúrico 1N en el tubo de

reacción. El ácido inhibe la actividad de la GAD y también induce la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ que será atrapado por la hiamina.

Después de un período de 1 hora, el tubo que contiene la hiamina + $^{14}\text{CO}_2$ es separado y colocado en un vial que lleva 10 ml de tolueno que contiene 50 mg de 2,5 difeniloxazole (PPO) y 1 mg de 1,4-bis-2(5-feniloxazolyl) benceno (Dimetil PQPOP), finalmente la radioactividad es contada por espectrometría de centelleo.

Para determinar el contenido de proteína en cada región cerebral se siguió el método de Lowry y colaboradores (1951), usando albúmina bovina como estandar.

V: RESULTADOS

1.- Alteraciones en la actividad motora de la rata provocadas por el RRu

Como fue mencionado en la metodología, el RRu fue inyectado en la cavidad peritoneal de la rata en las siguientes dosis: 2.2, 4.4, 6.6 y 8.8 mg/Kg de peso, para caracterizar las alteraciones en la conducta motora de los animales tratados y de este modo determinar la dosis convulsivante.

Ninguno de los animales inyectados con agua bidestilada mostraron cambios anormales en la actividad motora, en relación con aquellos que recibieron RRu, en los que todos presentaron alteraciones en dicha conducta.

La administración del RRu a una dosis de 2.2 mg/Kg de peso, desencadenó conductas estereotipadas que se caracterizaron por la ocurrencia de sacudidas de cabeza frecuentes, acompañadas por el acicalamiento de cabeza y extremidades posteriores.

A una dosis de 6.6 y 8.8 mg/Kg, el colorante produjo fuertes trastornos caracterizados por la pérdida de la coordinación motora, que finalizaron con la muerte de los animales pocos minutos después de que la droga fue administrada (Tabla 1). Con una dosis de 4.4 mg/Kg se observaron varios tipos de alteraciones motoras, después de un período de latencia en el que los animales mostraron una actividad motora normal, con respecto de los controles; dicho período de latencia fue seguido por un estado de inactividad motora (estado de quietud) que se manifestó aproximadamente 10 min después de la inyección del RRu. Posteriormente, el período preconvulsivo se denotó por la

pérdida del movimiento de las extremidades, que llevó a un estado de parálisis flácida en el que los animales perdieron completamente el reflejo de enderezamiento. Subsecuentemente, la recuperación del tono muscular, aproximadamente 3 horas después de la inyección del colorante, antecedió al período convulsivo en el que las convulsiones tónico-clónicas generalizadas, acompañadas por la pérdida del reflejo de enderezamiento, se hicieron evidentes en general, 6 horas después de que el RRu fue inyectado en la cavidad peritoneal de la rata.

En todos los animales observados el patrón conductual fué constante, pero hubo variación en cuanto al tiempo de aparición de cada uno de los trastornos motores registrados, por ésto, las convulsiones tónico-clónicas fueron observadas en 8 de 17 animales en un lapso de 6 horas después de la administración del colorante. De este modo, ya que las convulsiones tónico-clónicas generalizadas sólo se indujeron después de periodos más o menos prolongados, cuando el RRu se administró sistémicamente a una dosis de 4.4 mg/Kg de peso, esta dosis se empleó en todos los experimentos neuroquímicos.

2.- Efecto del RRu sobre la actividad de la GAD en regiones cerebrales

La actividad de la GAD fue cuantificada en la sustancia nigra, mesencéfalo, hipocampo, estriado y corteza frontal del cerebro de ratas que presentaron convulsiones tónico-clónicas generalizadas en el momento del sacrificio, 6 horas después de la inyección del RRu.

En la tabla 2 se muestra la actividad de la GAD, en las diferentes regiones del cerebro de ratas tratadas con 4.4 mg/Kg, de RRu (ip) , así como en los controles respectivos. La variación regional en la actividad de la GAD se hizo evidente en el cerebro de la rata, ya que en el caso de la sustancia nigra la actividad enzimática fué aproximadamente 5 a 6 veces mayor que en las otras regiones estudiadas, tales como hipocampo, estriado y corteza frontal. El mesencéfalo también presentó una actividad de la GAD elevada, lo cual se debe a que en esta estructura se encuentra contenida la sustancia nigra.

En los animales tratados, no hubo efecto alguno del RRu sobre la actividad de la enzima en ninguna de las regiones cerebrales que fueron estudiadas, ya que no se encontraron diferencias significativas al comparar estos resultados con los obtenidos del grupo control.

3.- Efecto del RRu sobre la liberación de [3 H]-GABA a partir de sinaptosomas de diferentes regiones cerebrales

La liberación de [3 H]-GABA a partir de terminales nerviosas aisladas es decir sinaptosomas, fue cuantificada en hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal del cerebro de las ratas que recibieron una inyección de RRu; la liberación de este neurotransmisor se estimuló con medios que contenían una concentración despolarizante de K^+ (47 mM), como fué señalado en la metodología.

En las ratas tratadas con una dosis convulsivante de RRu (4.4 mg/Kg, ip), la evaluación de la liberación de este

neurotransmisor se hizo después de 4 horas de la inyección del colorante, así como después de 6 horas de la administración de la droga, momento en el que los animales presentaron convulsiones tónico-clónicas cuando fueron sacrificados; también la liberación de GABA fué cuantificada cuando las convulsiones tónico-clónicas generalizadas se presentaron espontáneamente. En todos los casos, se contó con un grupo control que recibió una inyección ip de agua bidestilada, llevándose a cabo en paralelo la cuantificación de la liberación de GABA entre ambos grupos.

En las figuras 1A a 1D se muestra la liberación de [3 H]-GABA a partir de sinaptosomas de hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal del cerebro de la rata, obtenidos después de 4 horas de la inyección del RRU, cuando los animales se encontraban recuperando el tono muscular después de la parálisis flácida, en el periodo preconvulsivo.

El efecto del RRU sobre la liberación de [3 H]-GABA, en sinaptosomas de hipocampo del cerebro de ratas tratadas con este agente convulsivante, se presenta en la figura 1A. Durante los primeros minutos de superfusión la tasa de liberación de GABA, se estabilizó en un valor constante o basal correspondiente a las fracciones liberadas al cabo de los 5 primeros minutos representados en esta gráfica. Posteriormente, la estimulación con una concentración despolarizante de K^+ , produjo un incremento progresivo en el porcentaje de radioactividad liberada, hasta alcanzar un valor máximo en el minuto 11 de la superfusión. Una vez alcanzada la liberación máxima, la salida de este aminoácido tiende a decaer lentamente, por lo que el tiempo de superfusión en todos los experimentos aquí presentados se limitó a la

obtención de 16 fracciones en total.

En la figura 1A, se hace evidente que el RRu no disminuyó la liberación de GABA, ya que en ninguno de los puntos representados hubo diferencias significativas, entre los obtenidos del grupo control con respecto de los tratados.

En la figura 1B, se representa la liberación de [3 H]-GABA a partir de sinaptosomas de mesencéfalo del cerebro de las ratas tratadas con RRu. En éste caso la liberación máxima evocada por el K^+ , se registró entre los minutos 10 y 11 de la superfusión, sin que hubiera ningún efecto provocado por el RRu sobre la liberación de este neurotransmisor. Este mismo efecto lo podemos observar graficado en la figura 1C, que corresponde a la liberación de [3 H]-GABA en sinaptosomas de estriado del cerebro de la rata.

En la figura 1D, se encuentra representada la liberación de [3 H]-GABA a partir de sinaptosomas de corteza frontal, en donde se hace aparente un aumento en la liberación del mediador, dependiente de Ca^{2+} y estimulada por K^+ en los animales tratados con RRu; en esta figura, al igual que en las anteriores, se hace evidente el punto de liberación máxima en ambos grupos experimentales, entre los minutos 10 y 11.

La cuantificación de la liberación de [3 H]-GABA después de 6 horas de la inyección del RRu, se presenta en las figuras 2A a 2D. En todas estas figuras, también se hace evidente un período caracterizado por la presencia de la liberación espontánea del neurotransmisor en cuestión, seguido por el aumento en su salida, después de añadir el medio que contenía una concentración despolarizante de K^+ , hasta alcanzar un punto máximo alrededor de

los minutos 9 a 11 de la superfusión.

En ninguno de estos experimentos se encontró algún efecto inhibitorio significativo, provocado por el RRu, sobre la liberación de [3 H]-GABA, en las diferentes regiones en donde fue evaluado este proceso.

En las figuras 2A y 2B correspondientes a hipocampo y mesencéfalo, se identificó nuevamente una tendencia a un incremento en la liberación de [3 H]-GABA en las terminales nerviosas de los animales que estuvieron bajo la acción de la droga, sin embargo en ninguna de estas regiones se llegó a la significancia.

También en la figura 2C, se hace aparente el aumento en la liberación del neurotransmisor inhibitor, sin embargo, en este caso cabe resaltar que el incremento en la salida del mediador también se observa en condiciones basales y no únicamente a nivel de la liberación estimulada por el K^+ como se había denotado en las figuras 1D, 2A y 2B. En este caso al igual que en las figuras 2A y 2B no se llegó a encontrar diferencia significativa alguna.

Para determinar el mecanismo de acción neuroquímico del RRu, que probablemente se veía reflejado en la alteración de la conducta motora desencadenada por este compuesto, un parámetro importante que también tenía que ser cuantificado era la liberación de GABA, en el momento en el que las convulsiones tónico-clónicas generalizadas se manifestaban en los animales tratados.

Estos resultados se muestran en las figuras 3A a 3D, en las que el RRu no alteró, en ninguna de las regiones cerebrales que

fueron analizadas, la liberación de este neurotransmisor, a partir de terminales nerviosas aisladas.

Tabla 1. Efecto del Rojo de Rutenio, dependiente de la dosis, sobre la conducta motora de la rata. Los animales tratados fueron observados a partir del momento de la administración (ip) de la droga. Los tiempos son el promedio, en minutos \pm el error estandar del período transcurrido entre la inyección del colorante y la conducta descrita.

D O S I S

2.2 mg/Kg

4.4 mg/Kg

6.6 mg/Kg

8.8 mg/Kg

O B S E R V A C I O N E S

Los animales permanecieron en estado de quietud y presentaron únicamente frecuentes sacudidas de cabeza y acicalamiento.

(n=7)

Se caracterizaron tres estados conductuales:

I: Período de latencia

1) Actividad motora normal

2) Estado de quietud (10 min)

II: Período preconvulsivo

1) Inicialmente hubo pérdida del movimiento de las extremidades posteriores, seguido de una dificultad en el movimiento de las extremidades anteriores

2) Parálisis flácida generalizada (31.3 ± 2.5)

3) Recuperación del tono muscular (198 ± 17.7)

4) Pérdida del reflejo de enderezamiento (278 ± 18.04)

III: Período convulsivo

Se denotó por la presencia de convulsiones tónico clónicas generalizadas

(368.3 ± 15.31)

(las presentaron 8/17 animales)

A esta dosis la secuencia de alteraciones fue la siguiente:

-Estado de quietud

-Fuertes contracciones diafragmáticas (11.6 ± 1.2)

-Contracciones corporales generalizadas (14.5 ± 1.5)

-Flacidéz generalizada (17.6 ± 2.62)

-Muerte (entre 20 y 25 min) (n=3)

Bajo esta dosis los trastornos motores fueron los siguientes:

-Sacudidas generalizadas

-Contracciones diafragmáticas fuertes

-Brincos

-Pérdida del reflejo de enderezamiento

-Muerte (entre 5 y 10 min)

(n=3)

Tabla 2. Efecto del RRu sobre la actividad de la GAD en regiones del cerebro de la rata. Los animales tratados fueron inyectados con RRu (4.4 mg/Kg, ip) 6 horas antes del sacrificio. Los resultados son promedios con el error estandar de cada dato obtenido de un total de 10 ratas por grupo y expresados en nmolas de CO_2 /mg de proteína/20min.

CORTEZA FRONTAL	ESTRIADO	HIPOCAMPO	MESENCEFALO	SUSTANCIA NIGRA
CONTROLES				
5.12 + 0.31	5.42 + 0.43	4.23 + 0.27	8.28 + 0.61	27.47 + 4.12
TRATADAS				
5.24 + 0.25	5.51 + 0.32	4.74 + 0.41	8.36 + 0.44	25.57 + 3.96

Tabla 2. Actividad de la descarboxilasa glutámica en varias regiones del cerebro de ratas tratadas con RRu (4.4mg/Kg)

Fig. 1. Efecto del RRU sobre la liberación de [3 H]-GABA estimulada por K^+ (47 mM) de sinaptosomas de hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal del cerebro de ratas tratadas con RRU (4.4 mg/Kg, ip), después de 4 horas de la inyección del colorante. Los puntos representados son el promedio de entre 7 y 11 experimentos por grupo. Las diferencias entre el grupo control y el tratado se estimaron mediante la prueba "t" de Student, siendo no significativas en A, B y C, mientras que los asteriscos en la figura D marcan los puntos en los que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Las barras hacia arriba o hacia abajo de la figura D representan el error estandar de los datos obtenidos cada minuto, en tanto que en las gráficas A, B y C no se señalan para claridad de las mismas.

Fig 1 . Liberación de (^3H)-GABA en diferentes regiones del cerebro de ratas tratadas con RRu

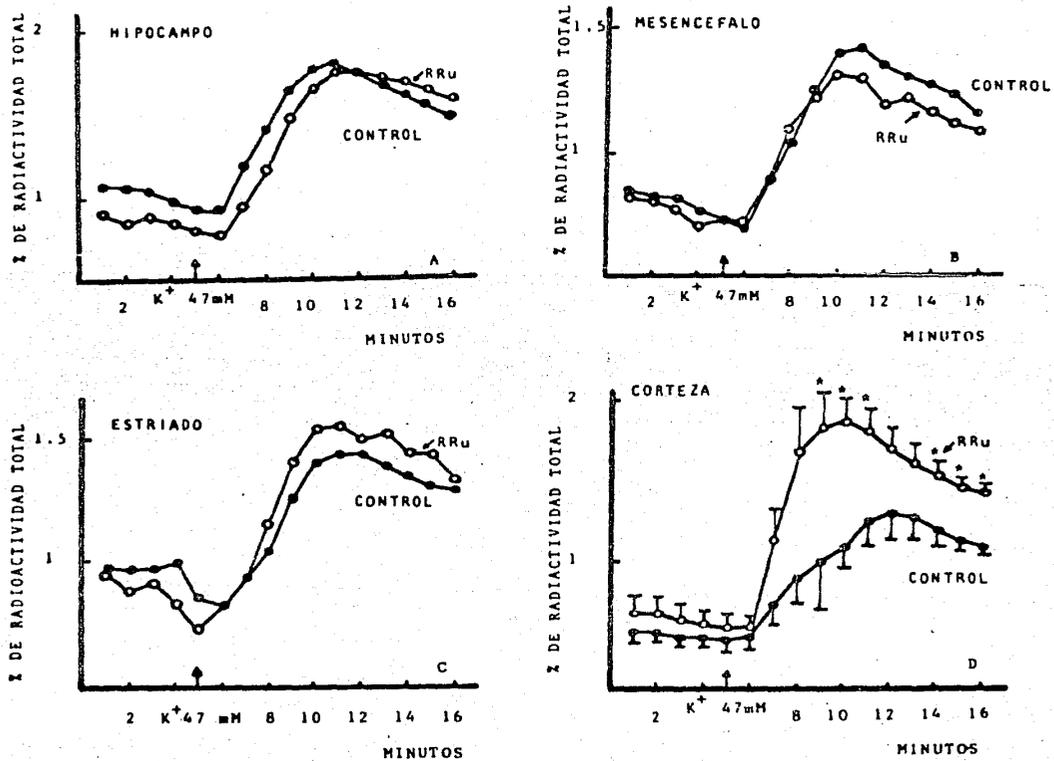


Fig.2. Efecto del RRu sobre la liberación de [³H]-GABA estimulada por K⁺ (47 mM) en sinaptosomas de hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal del cerebro de ratas que presentaron convulsiones tónico-clónicas en el momento del sacrificio, 6 horas después de la inyección del RRu. Los puntos representados son el promedio de entre 6 y 7 experimentos por grupo. Las diferencias entre ambos grupos experimentales se estimaron mediante la prueba "t" de Student, resultaron ser no significativas. Las barras hacia arriba o hacia abajo de cada punto en las figuras A, B y C corresponden a los errores estandar del valor promedio de cada dato; en la gráfica D no se señalan los errores estandar para claridad de la misma.

Fig. 2. Liberación de (^3H)-GABA en diferentes regiones del cerebro de ratas tratadas con RRu

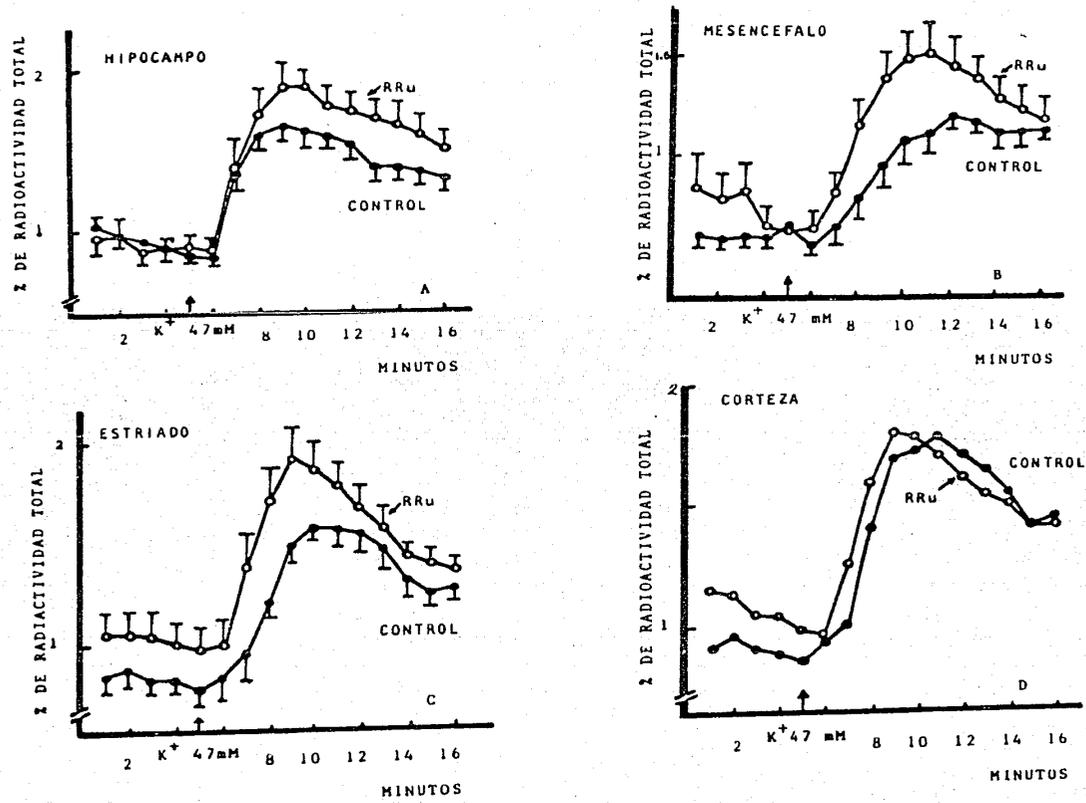
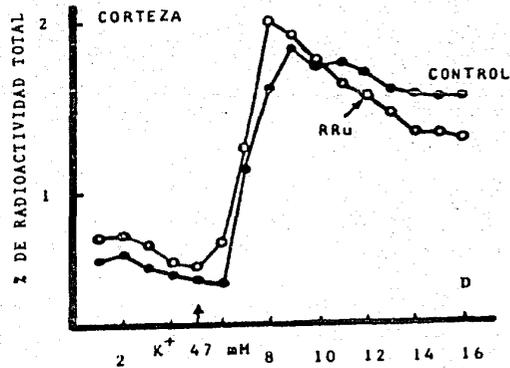
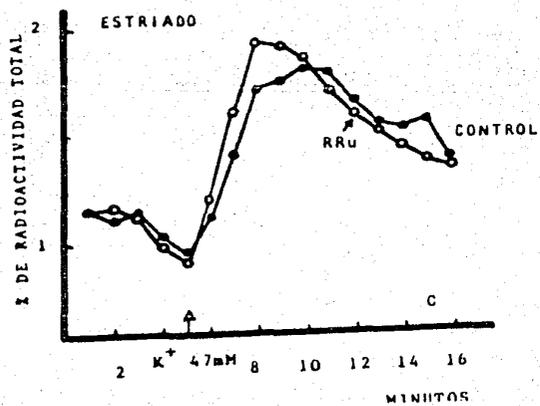
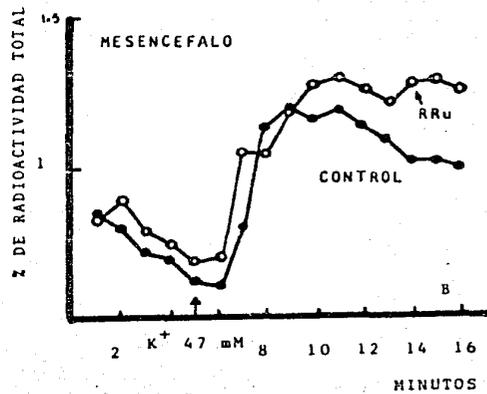
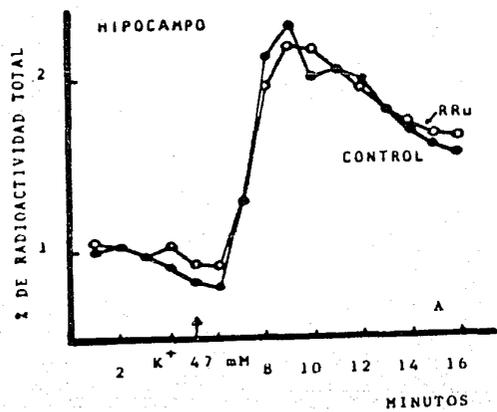


Fig. 3. Efecto del RRu sobre la liberación de [3 H]-GABA estimulada por K^+ (47 mM), en sinaptosomas de hipocampo, mesencéfalo, estriado y corteza frontal del cerebro de ratas tratadas con RRu (4.4 mg/Kg, ip), durante la convulsión tónico-clónica generalizada. Los puntos representados son el promedio de entre 5 y 6 experimentos por grupo. Las diferencias encontradas por la prueba "t" de Student no fueron significativas. Con objeto de no quitar claridad a estas gráficas los errores estándar no se presentan.

Fig. 3 . Liberación de (3 H)-GABA a partir de sinaptosomas de diferentes regiones del cerebro de ratas tratadas con RRu



VI: DISCUSION Y CONCLUSIONES

1.- Efecto del Rojo de Rutenio sobre la conducta motora

El objetivo central del presente trabajo fue determinar si el RRu es capaz de bloquear la liberación del neurotransmisor inhibitor GABA, por interacción con la membrana sinaptosomal, para explicar de esta manera el efecto convulsivante que tiene esta droga in vivo. Inicialmente era entonces importante conocer la dosis apropiada de RRu, así como sus efectos en el tiempo.

La acción que tiene el RRu in vivo, en la rata, así como en otros modelos experimentales en los que se han usado otras especies animales (Tapia et al, 1976), es dependiente de la dosis.

Estas observaciones demuestran que el RRu es capaz de inducir un efecto bifásico en la rata, ya que provoca parálisis flácida generalizada y después convulsiones tónico-clónicas, al ser administrado por vía sistémica, como había sido encontrado por Feria-Velasco et al, (1982). El hecho de que la acción central del RRu, estuvo precedida por un estado de parálisis flácida, que es un efecto periférico (Tapia, 1982), sugiere que el compuesto penetra lentamente a través de la barrera hematoencefálica, porque una vez que lo hace sus efectos centrales predominan sobre los periféricos.

El mecanismo que provoca la parálisis flácida, desde el punto de vista neuroquímico, se ha determinado con base en estudios realizados con anterioridad, que demuestran que tanto la 4-aminopiridina como la guanidina, que facilitan notablemente la liberación de neurotransmisores mediante

mecanismos dependientes de Ca^{2+} , son capaces de antagonizar la acción paralizante del RRu (Tapia, 1982). Por otra parte, el RRu es capaz de inhibir la captación de calcio en los sinaptosomas, estimulada por despolarización, lo que sugiere que esta droga bloquea los canales de calcio sensibles a voltaje (Tapia et al, 1985). Todo esto indica, que dichos canales están involucrados en el mantenimiento del tono muscular, y que probablemente están regulando la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular, en donde el RRu es capaz de inhibir la liberación de neurotransmisores (Alnaes y Rahamimoff, 1973 ; Person y Kuhn, 1979).

La parálisis flácida generalizada que se induce en las ratas, es similar al efecto observado en el ratón y el gato, después de la administración intraperitoneal del colorante. Sin embargo, las convulsiones tónico-clónicas generalizadas, que se observan en la rata después del periodo paralizante, no ocurren en las otras especies, a menos que el RRu se administre intracranealmente.

Debido a que el RRu es una molécula policatiónica, es difícil concebir que sea capaz de atravesar membranas biológicas libremente. Además, ya que el paso de sustancias no liposolubles de bajo peso molecular a través de las uniones intercelulares en el endotelio de capilares cerebrales de mamíferos adultos es restringido, parece remota la posibilidad de que el RRu sea capaz de atravesar libremente la pared de los capilares cerebrales.

Estos hechos sugieren que en la rata adulta, a diferencia de lo que ocurre en otros mamíferos, la penetración del RRu al tejido nervioso se lleva a cabo en áreas nerviosas que carecen de

barrera hematoencefálica, o ésta es menos estricta. Aunque es difícil explicar la razón de estas diferencias entre especies, podría especularse que en la rata algunos capilares cerebrales y/o la glía que los rodea, son más permeables al RRu, lo cual se fundamenta en los trabajos realizados por Arauz-Contreras y Feria-Velasco (1982), en los que se muestra que el colorante es capaz de atravesar vasos sanguíneos cerebrales en la rata, y en consecuencia, puede ejercer un efecto central cuando es administrado por vía sistémica. Esto no parece ocurrir en los otros mamíferos en los que se ha probado el efecto del RRu sobre la conducta motora, ya que la administración (ip) de la droga no altera la actividad eléctrica del cerebro, a ningún tiempo después del tratamiento, lo cual sugiere un efecto nulo del colorante sobre el sistema nervioso central de estos animales (Tapia et al, 1976).

Finalmente, es necesario mencionar que en todos los animales tratados con la dosis convulsivante del RRu (4.4 mg/Kg), el patron conductual fue constante, aunque hubo diferencias en la duración de las conductas descritas en los resultados aquí presentados. Un hecho importante que se debe hacer notar, es que aproximadamente después de 6 horas de la administración del colorante, las convulsiones pueden ser inducidas al decapitar a los animales, lo cual sugiere que algún mecanismo que se genera en el momento del sacrificio, y que es difícil proponer, desencadena las convulsiones tónico-clónicas en las ratas tratadas con RRu.

2.- Efecto del Rojo de Rutenio sobre la GAD

La inhibición en la actividad de esta enzima ha sido específicamente relacionada con la aparición de convulsiones, debido probablemente a que in vivo su actividad está acoplada a la liberación del neurotransmisor inhibitor GABA, (Tapia, 1983). Era entonces de interés evaluar la posible relación del efecto convulsivante del RRU con la inhibición de la GAD en diferentes regiones cerebrales, especialmente en el hipocampo y la sustancia nigra, las cuales se reconocen como altamente epileptogénicas (Roberts, 1986), y en estriado y corteza frontal, que son estructuras relacionadas con el control de la actividad motora (Ghez, 1985).

Los resultados obtenidos indican que no hay tal efecto inhibitor del RRU, lo cual hace poco probable la participación de éste mecanismo en la ocurrencia de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas desencadenadas por el colorante. Estos datos coinciden con resultados previos, en los que se observó que la GAD no se altera durante las convulsiones tónico-clónicas producidas por la inyección intracranial del RRU (Meza-Ruiz y Tapia, 1978). Los valores más altos en la actividad enzimática se observaron en la sustancia nigra, región en la que Sze (1979) ha determinado altas actividades específicas a la GAD en relación con otras estructuras del tejido cerebral que también han sido estudiadas. Según Wu (1983), en la sustancia nigra se observa un alto número de reacciones positivas a la GAD en terminales axónicas que forman sinapsis axo-somáticas y axo-dendríticas en esta región, la enzima fue visualizada tanto

por microscopia de luz como electrónica por un método basado en el empleo de inmunoperoxidasas.

3.- Efecto del Rojo de Rutenio sobre la liberación de [³H]-GABA

A pesar de que las convulsiones producidas por la administración intracisternal o intraventricular del colorante, pueden explicarse por la acción inhibitoria del RRU sobre la liberación de GABA en sinapsis centrales, debido a la acción prominentemente membranal de el RRU en sinaptosomas (Meza-Ruiz y Tapia, 1978), sin duda la interpretación de los resultados de este trabajo es difícil, por la gran complejidad del sistema nervioso central, si los comparamos con la acción paralizante que se produce después de la administración intraperitoneal de este colorante. En efecto, en el sistema nervioso central son muchos los neurotransmisores cuya liberación puede ser afectada por el RRU, y por consiguiente son también numerosos los circuitos neuronales que pudieran estar alterados en su funcionamiento.

Sin embargo, como las convulsiones son la consecuencia final de una actividad excitatoria que supera la capacidad del tejido nervioso para modular la actividad, es posible postular, sobre la base del trabajo anterior ya citado (Meza-Ruiz y Tapia, 1978), y de las numerosas evidencias que demuestran que los estados convulsivos se desencadenan cuando la transmisión GABAérgica inhibitoria es bloqueada, que en la acción convulsivante del RRU administrado sistémicamente pueda estar involucrada una inhibición de la liberación de GABA, no obstante, los resultados obtenidos muestran que en estas condiciones experimentales, no

hay inhibición alguna sobre la liberación de [3 H]-GABA dependiente de Ca^{2+} , a partir de terminales nerviosas aisladas, en ninguna de las regiones estudiadas. Esto sugiere que el RRu, no está actuando por este mecanismo, o bien que su efecto queda enmascarado por otros eventos compensatorios que pueden estar ocurriendo a nivel de terminales nerviosas, dado el largo período que transcurre entre la administración del colorante y la aparición del estado convulsivo. Esta posibilidad debe considerarse, ya que, aunque no se observa la inhibición de la liberación de [3 H]-GABA, en algunos de los resultados aquí presentados (Fig. 1D, 2A y 2B), tal parece que se genera un aumento en la liberación de [3 H]-GABA, en las terminales nerviosas aisladas de los animales tratados con RRu, lo que probablemente corresponde a tal respuesta compensatoria. Es interesante especular en este sentido que este incremento pudiera estar dado por la liberación de GABA dependiente de Na^+ y no de Ca^{2+} , la cual se ha caracterizado en trabajos publicados con anterioridad (Levi y Raiteri, 1978; Arias et al, 1984; Arias y Tapia, 1986). Asimismo, se ha demostrado que la liberación de GABA en sinaptosomas, bajo condiciones que despolarizan la membrana e incrementan la entrada de Na^+ , es independiente de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Sihra et al, 1984).

Otra explicación posible del efecto estimulador del RRu sobre la liberación de GABA sería que, aunque se supone una incapacidad del RRu para atravesar libremente las membranas de las terminales nerviosas (Singer et al, 1971), probablemente en la rata, así como es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, también sea capaz de entrar a las terminales

nerviosas. La consecuencia de ésto sería la posibilidad de interactuar con las membranas de las mitocondrias intrasinaptosomales, en las que se ha observado que el RRU es un bloqueador de la captura de Ca^{2+} (Vasington et al, 1972 ; Reed y Bygrave, 1974 ; Luthra y Olson, 1977), con la consecuente elevación de la concentración intraterminal de Ca^{2+} , lo cual sería responsable del incremento en la liberación de [3H]-GABA.

En conclusión, las convulsiones tónico-clónicas generalizadas inducidas por la administración sistémica del RRU en la rata, parecen no deberse a una inhibición en la liberación de GABA, aunque las especulaciones que fueron mencionadas anteriormente, pueden de algún modo explicar la posible participación de éste neurotransmisor en las alteraciones paroxísticas desencadenadas por el RRU.

Por otro lado, cabe mencionar que éste estudio se enfocó en la cuantificación de algunos parámetros neuroquímicos relacionados con la transmisión GABAérgica, por lo que, como el RRU es un compuesto cuyo efecto presináptico puede alterar la liberación de todas las sustancias neuroactivas cuyo mecanismo de liberación es dependiente de Ca^{2+} , probablemente sea otro mediador el que esta propiciando la aparición de convulsiones tónico-clónicas en la rata.

REFERENCIAS

Arauz-Contreras, J. y Feria-Velasco, A. (1982): Brain vessels permeability to ruthenium (RR) in the adult rat. A qualitative x-ray spectrometric study with the scanning electron microscope (SEM). Ann. Proc. Electron Microsc. Soc. Amer. 40: 202-203.

Alnaes, E. y Rahamimoff, R.J. (1975) On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) 248: 285-306.

Arias, C., Sitges, M. y Tapia, R. (1984) Stimulation of [³H]-gama-aminobutyric acid release by calcium chelators in synaptosomes. J. Neurochem. 42: 1507-1514.

Arias, C. y Tapia, R. (1986) Differential calcium dependence of gama-aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. J. Neurochem 47: 396-404.

Bakay, R. y Harris, A.B. (1981) Neurotransmitter receptor and biochemical changes in monkey cortical epileptic foci. Brain Res. 206: 387-404.

Baux, G., Simonneau, M. y Tauc, L. (1979) Transmitter release: ruthenium red used to demonstrate a possible role of sialic acid containing substrates. J. Physiol. (Lond.) 291: 161-178.

Blaustein, M. P., Johnson, E. M. y Needleman, P. (1972) Calcium-dependent norepinephrine release from presynaptic nerve endings in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 69: 2237-2240.

Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. (1982) Amino Acids. In: The Biochemical basis of Neuropharmacology. Edit. by Oxford University press. New York, 249-294.

Curtis, D. R. (1973) Tetanus toxin and the synaptic release of GABA. Brain. Res. 51: 362-385.

De Groat, W. C. (1972) GABA-depolarization of a ganglion: antagonism by picrotoxin and bicuculine. Brain Res. 38: 429-432.

Dingledine, R. y Somjen, G. (1981) Calcium dependence of synaptic transmission in the hippocampal slice. Brain Res. 207: 218-222.

Feria-Velasco, A., Arauz-Contreras, J. y Gomez-Plascencia, J. (1982) Induction of flaccid paralysis followed by seizure activity by means of general administration of ruthenium red to adult rats. Arch. Invest. Med. (Mex) 13: 271-276.

Fricke, U. (1975) Tritosol: A new scintillation cocktail based on triton X-100. Analyt. Biochem. 63: 555-558.

Gale, K. (1986) Role of the substantia nigra in GABA-mediated anticonvulsant action Adv. Neurol. 44: 343-364.

Ghez, C. (1985) Introduction to the motor systems. In: Principles of neural science edited by Kandel E. Elsevier Sci. Publish. Co. Inc. New York, 429-442.

Heffner, G. T., Hartman, A. J. y Seiden, S. L. (1980) A rapid method for the regional dissection of the rat brain. Pharmacol. Biochem. Behav. 13: 453-456.

Iversen, L. L. (1979) The chemistry of the Brain. Sci. Am. 241: 134-149.

Kamino, K., Masaharu, O., Nobuhoro, U. y Akira, I. (1976) Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. IV. Effects of ruthenium red on the co-operative nature of calcium binding. J. Membrane Biol. (Wash.) 26: 345-356.

Katz, B. y Miledi, R. (1967) The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. Proc. R. Soc. B. 167:23-38.

Kevin, J. (1986) Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid in the rat hippocampal formation. Neurosci. Lett. 69: 7-12.

Lee, H. K., Dunwiddie, T. y Hoffer, B. (1980) Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal circuitry in the rat hippocampus. II. Effects on interneuron excitability. Brain Res. 184: 331-342.

Levi, G. (1984) Release of putative transmitter amino acids. In: Handbook of Neurochemistry. Vol. 6. Edit. Lajtha, A. Plenum, New York, 463-509.

Levi, G. y Raiteri, M. (1978) Modulation of gama-aminobutyric acid transport in nerve endings: role of extracellular gama-aminobutyric acid and cationic flux. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash) 75: 2981-2985.

Llinas, R. y Nicholson, C. (1975) Calcium role in depolarization secretion coupling an aequorin study in squid giant synapse. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 72: 187-190.

Llinas, R., Steinberg, I. Z. y Walton, K. (1976) Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: voltage clamp study in giant synapse and theoretical model for the calcium gate. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 73: 2918-2922.

Löscher, W., Bohme, G., Muller, F. y Pagliusi, S. (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions from one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gama-aminobutyric acid in vivo. J. Neurochem. 45: 879-889.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Luft, J. H. (1971a) Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec. 171: 347-368.

Luft, J. H. (1971b) Ruthenium red and violet II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec. 171: 369-392.

Lundh, H. (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Brain Res. 153: 307-318.

Lundh, H. y Thesleff, S. (1977) The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. Eur. J. Pharmacol. 42: 411-412.

Luthra, R. y Olson, M. (1977) The inhibition of calcium uptake and release by rat liver mitochondria by ruthenium red. FEBS Lett. 81: 142-146.

Madeira, M. C. y Antunes-Madeira, M.C. (1974) Interaction of ruthenium red with isolated sarcolemma. J. Membrane Biol. 17: 41-50.

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

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

Nachshen, A. D. (1984) Selectivity of the Ca²⁺ binding site in synaptosome Ca²⁺ channel. J. Gen. Physiol. 83: 941-967.

Nichol, R. A., Alger, B. E. y Jahr, C.E. (1980) Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. Nature 287: 22-25.

Obata, K. (1974) Transmitter sensitivities of some nerve and muscle cells in culture. Brain Res. 73: 71-88.

Olsen, R. W., Lamar, E. E. y Bayless, J. D. (1977) Calcium-induced release of gamma-aminobutyric acid from synaptosomes: effects of tranquilizer drugs. J. Neurochem. 28: 299-305.

Person, R. J. y Kuhn, J. A. (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at the neuromuscular junction. Brain Res. Bull. 4: 669-674.

Pumplin, D. W., Reese, T. S. y Llinas, R. (1981) Are the membrane particles the calcium channels?. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 78: 7210-7213.

Rahamimoff, R. y Alnaes, E. (1973) Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 70: 3613-3616.

Raiteri, M., Angelini, F. y Levi, G. (1974) A simple apparatus for studying the release of neurotransmitters from synaptosomes. Eur. J. Pharmacol. 25: 411-414.

Reed, K. C. y Bygrave, F. L. (1974) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. Biochem. J. 140: 143-155.

Ribak, C. E., Harris, A. B., Vaughn, J. E. y Roberts, E. (1979) Inhibitory GABAergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. Science 205: 211-214.

Roberts, E. (1986) Failure of GABAergic inhibition: a key to local and global seizures. *Adv. Neurol.* 44: 319-341.

Rubin, R. P. (1974) Calcium and the secretory process. Plenum Press, N. York.

Schramm, M. (1986) Calcium antagonist and calcium agonist drugs. In: Ion channels in neural membranes. Edit. by Alan R., Liss Inc. New York, 213-225.

Sihra, T. S., Scott, I. G. y Nicholls, D. G. (1984) Ionophore A23187, verapamil, protonophores and veratridine influence the release of gamma-aminobutyric acid from synaptosomes by modulation of the plasma membrane potential rather than the cytosolic calcium. *J. Neurochem.* 43: 1624-1630.

Singer, M., Krishnan, N. y Fyfe, A. D. (1971) Penetration of ruthenium red into peripheral nerve fibers. *Anat. Rec.* 171: 375-380.

Sze, P. Y. (1979) L-Glutamate decarboxylase. In: Advances in experimental medicine and biology. Edit. by Plenum Press, New York. 123: 59-78.

Tapia, R. (1983) gamma-Aminobutyric acid: metabolism and biochemistry of synaptic transmission. In: Handbook of Neurochemistry. Vol.3. Edit. Lajtha, A., Plenum Press N. York. 423-466.

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

Tapia, R. (1985) Effects of drugs on neurotransmitter release: experiments In vivo and In vitro. *Neurosci. Biobehav. Res.* 9: 391-397.

Tapia, R., Arias, C. y Morales E. (1985) Binding of lanthanum ions and ruthenium red to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release. *J. Neurochem.* 45: 1464-1470.

Tapia, R. y Awapara, J. (1969) Effects of various substituted hydrazones and hydrazines of pyridoxa 1-5-phosphate on brain glutamate decarboxylase. *Biochem. Pharmacol.* 18: 145-152.

Tapia, R. y Meza-Ruiz, G. (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [³H] GABA in synaptosomal functions. Brain Res. 126: 160-166.

Tapia, R., Meza-Ruiz, G., Duran, L. y Drucker-Colin, R. (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. Brain Res. 116: 101-109.

Vasington, F. D., Gazzoti, P., Tiozzo, R. y Carafoli, E. (1972) The effect of ruthenium red on Ca²⁺ transport and respiration in rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 256: 43-54.

Waller, M. B. y Richter, J. A. (1980) Effects of pentobarbital and calcium on the resting and K⁺-stimulated release of several endogenous neurotransmitters from rat midbrain slices. Biochem. Pharmacol. 29: 2189-2198.

Watson, E. L., Vicenzi, F. F. y Davis, P. W. (1971) Ca²⁺ activated membrane ATPase: selective inhibition by ruthenium red. Biochem. Biophys. Acta. 249: 606-610.

Wu, J. Y. (1983) Decarboxylases: brain glutamate decarboxylase as a model. In: Handbook of Neurochemistry edited by A. Lajtha. Plenum Press, New York. 111-131.