

14  
2ej.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA

"EFECTO DE DANTROLENO Y SODIO EN LA LIBERACION DE  
GABA DE SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA"

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 :

GUILLERMO ALEJANDRO AQUINO TELLEZ



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

Introducción .....	4
Elementos estructurales del sistema nervioso .....	4
Potencial de reposo .....	8
Potencial de acción .....	9
Antecedentes del trabajo .....	11
Objetivo .....	15
Métodos .....	16
Aislamiento de sinaptosomas .....	16
Acumulación de aminoácidos radiactivos por los sinaptosomas .....	17
Liberación de aminoácidos radiactivos .....	17
Resultados .....	19
Discusión .....	29
Conclusiones .....	32
Abreviaturas utilizadas .....	33
Bibliografía .....	34

## Introducción

### Elementos estructurales del sistema nervioso

El sistema nervioso está constituido fundamentalmente por dos tipos de células: neuronas y células gliales. El primer grupo se caracteriza por su capacidad de generar y conducir el impulso eléctrico. Existe una gran variedad de tipos de neuronas, pero todas ellas presentan características comunes: tienen un cuerpo celular llamado soma o pericarion con un diámetro de 5-10  $\mu\text{m}$  (3,6) el cual encierra al núcleo y la mayor parte de la maquinaria sintética y metabólica de la célula como lo son: mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico (1-5). Las dendritas son prolongaciones cortas que conducen el impulso nervioso al soma y que por lo general tienden a ser muy ramificadas y amielínicas. Los axones, son prolongaciones largas y delgadas de 1-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, los cuales tienden a viajar en haces (nervios y tractos) y a menudo se ramifican en su región terminal. Los axones conducen el impulso nervioso hacia afuera de la célula (1-6). La mayoría de los axones están envueltos por mielina la cual, está formada por las células de Schwann, que producen la cubierta de mielina de los nervios periféricos (1,2,7,9). Los axones del sistema nervioso central (SNC) están cubiertos por células de neuroglía, la mielina aísla a los axones y aumenta la velocidad del impulso nervioso. Los sitios de interrupción de esta envoltura constituyen los nodos de Ranvier y permiten la regeneración del impulso nervioso (2,3,5,7).  
Figura 1

El segundo grupo, las células gliales generalmente son células pequeñas y poseen prolongaciones relativamente cortas que salen del cuerpo celular (4). Existen tres tipos:

1. Astrocitos, los cuales tienen una estrecha relación con las neuronas y con los vasos sanguíneos y se consideran mediadoras en el transporte de nutrientes entre el sistema vascular y las neuronas (4,9).
2. Los oligodendrocitos y las células satélite, que son abundantes en el sistema nervioso central y forman las vainas de mielina de los axones neuronales.
3. Las células de Schwann, las cuales forman la cubierta de mielina de los nervios periféricos (1,2,7,9).

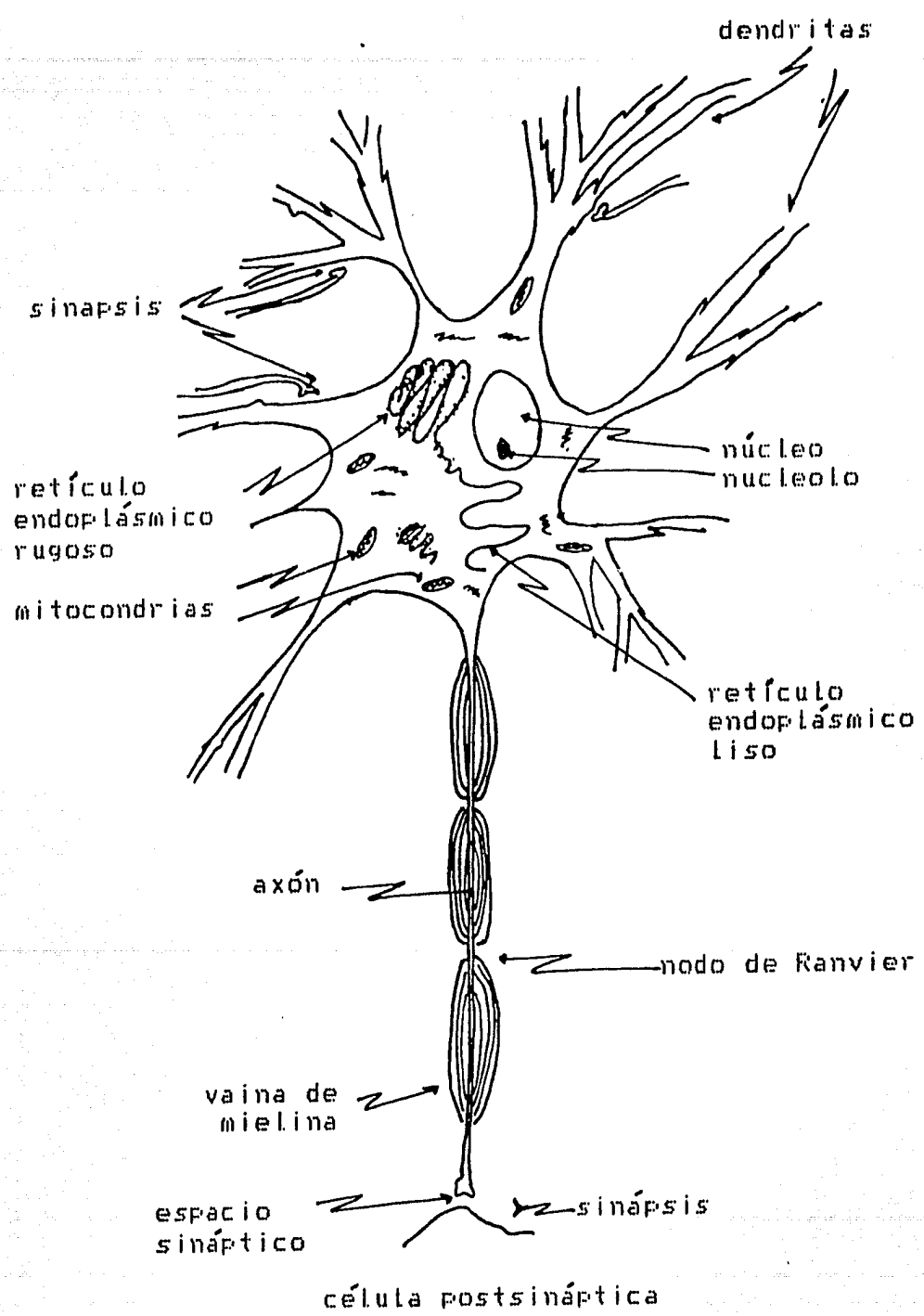


Figura 1. Esquema típico de una neurona.

La comunicación intercelular se lleva a cabo a través de las sinapsis, las cuales presentan una organización estructural y funcional altamente especializada.

La palabra sinapsis significa conexión o conjunción y fué introducida por Sherrington en 1897 (4,5). Las sinapsis presentan formas variables que van desde la simple aposición de axones y dendritas hasta disposiciones muy complicadas. En la mayoría de los casos, una sinapsis consta de una expansión final de una rama axónica en estrecha aposición con la superficie celular de otra neurona. Las terminales nerviosas se denominan de diferente manera: bulbos sinápticos terminales, botón terminal o pies terminales. Sobre las dendritas de las células del sistema nervioso siempre hay terminaciones sinápticas y la función de las prolongaciones dendríticas es la de recibir información neuronal. Además de las sinapsis axodendríticas pueden encontrarse sinapsis sobre el cuerpo celular, en la porción próxima al axón, antes de que la capa de mielina empiece. También puede existir asociación sináptica entre botones terminales de axones de diferentes neuronas.

Las sinapsis pueden ser de tipo eléctrico o químico. Las sinapsis eléctricas o electrotonicas se caracterizan por poseer un espacio de separación de 2 nm entre la pre- y la postsinapsis (3,6), y el contacto de la membrana actúa como un eficaz rectificador eléctrico, permitiendo que la corriente pase con relativa facilidad. La corriente del impulso nervioso que llega a la presinapsis pasa a la postsinapsis casi sin ningún retardo (0.1 ms), despolariza y excita directamente a la postsinapsis. En este tipo de sinapsis la dirección del paso de la información es unidireccional debido a la resistencia eléctrica de las membranas sinápticas en contacto (3,5). Sin embargo, en muchos otros casos este efecto no se presenta y las sinapsis pueden transmitir en ambos sentidos.

Se han observado sinapsis eléctricas en algunos invertebrados como la lombriz de tierra y el cangrejo de río (4), así como en las células maunther del pez dorado (2,7) y en motoneuronas y nervios sensoriales aferentes en anfibios y mamíferos (7).

El segundo grupo de sinapsis son las sinapsis químicas y se caracterizan por presentar un espacio de separación de 20 nm entre las membranas pre y postsinápticas, esta representa

una zona de alta resistencia eléctrica. Debido a esto, el impulso nervioso no puede propagarse directamente a la siguiente neurona y se requiere por lo tanto de un mecanismo que permita cruzar ese espacio. Dicho mecanismo es de naturaleza bioquímica y consiste en que al llegar el impulso nervioso a la terminal presináptica, ésta libera una substancia llamada neurotransmisor a través de un mecanismo dependiente de calcio (4). El neurotransmisor atraviesa el espacio sináptico, llega a la postsinapsis y se une con un receptor específico. Como resultado de la interacción neurotransmisor-receptor la neurona postsináptica se puede despolarizar o hiperpolarizar. Cuando se produce una despolarización y ésta alcanza un cierto valor umbral, se origina un potencial de acción (excitación). Cuando la célula se hiperpolariza (inhibe), se requiere un estímulo con mayor intensidad para que la neurona alcance el valor umbral para que se genere el potencial de acción. A diferencia de las sinapsis eléctricas, la transmisión química se realiza en un sentido: de la membrana presináptica a la membrana postsináptica (5).

## Potencial de reposo.

En condiciones de reposo existe una diferencia de concentración de iones a través de la membrana celular. En el caso específico de la neurona, los principales iones a considerar son el potasio ( $K^+$ ), el sodio ( $Na^+$ ), el ion cloruro ( $Cl^-$ ) y los aniones protéicos. La siguiente tabla muestra las concentraciones de estos iones en el interior y exterior celular del axón gigante de calamar (60).

Tabla 1. Concentraciones iónicas en el axón gigante de calamar.

	concentraciones (mM)			
	$K^+$	$Na^+$	$Cl^-$	Prot $^-$
Interior celular	450	50	120	250
Exterior celular	20	440	560	3

Como puede observarse, el potasio y los aniones protéicos se encuentran más concentrados en el interior celular (aproximadamente 20 y 80 veces, respectivamente, con respecto al exterior), en tanto que los iones cloruro y sodio se encuentran más concentrados en el exterior (aproximadamente 10 y 5 veces, respectivamente, con respecto al interior). Como en todos los casos se trata de partículas eléctricamente cargadas, su equilibrio implica compensar tanto el número de partículas como sus cargas eléctricas en ambos lados de la membrana. En condiciones de reposo los iones distribuidos diferencialmente en ambos lados de la membrana, originan una diferencia de carga eléctrica que la polariza. Esta polarización o potencial de reposo es de unos 70 mV, siendo el interior negativo con respecto al exterior. En esta situación, solo el  $K^+$  y el  $Cl^-$  se encuentran cerca del valor de su potencial de equilibrio electroquímico. El  $Na^+$  y los aniones protéicos no lo están, y por ello tienden a cruzar la membrana (el  $Na^+$  hacia adentro y los aniones protéicos hacia afuera) para alcanzar su equilibrio. La membrana es impermeable a los aniones protéicos y tiene muy baja permeabilidad para el  $Na^+$  en estado de reposo, lo que implica que este último puede alcanzar su equilibrio por difusión de una manera rápida. Además, existe un proceso de transporte activo que lo conduce en un sentido inverso al que su equilibrio electroquímico lo dirigiría. El transporte de  $Na^+$ , llevado a cabo por una bomba electrogénica, está asociado a una entrada de  $K^+$ . Sin embargo, este último no se ve tan afectado en su equilibrio debido a que la membrana es más permeable al  $K^+$ .



## Potencial de acción.

Cuando el impulso nervioso se propaga, la diferencia de voltaje a través de la membrana en el origen del axón disminuye localmente. Inmediatamente por delante de la región alterada eléctricamente (en dirección en que se propaga el impulso nervioso) los canales iónicos que existen en la membrana plasmática se abren, aumentando la permeabilidad de la membrana a los iones sodio.

El proceso se regenera a sí mismo: el flujo de los iones  $\text{Na}^+$  a través de la membrana produce la apertura de un número mayor de canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje haciendo más fácil la entrada de otros iones. En este caso, la corriente de difusión del  $\text{Na}^+$  domina el potencial de membrana y consecuentemente lleva al potencial de membrana hasta el potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$ , a un valor de 50 mV (2,3,6,8). Poco antes de llegar al potencial de equilibrio de  $\text{Na}^+$ , la permeabilidad al ion desciende con la misma rapidez con que había aumentado debido a que los canales de sodio sensibles a voltaje se cierran muy pronto y se produce la apertura de otros canales los cuales, producen un incremento en la permeabilidad al  $\text{K}^+$ . Esto acelera la repolarización por la salida de este ion, restableciendo el potencial de reposo de la membrana plasmática (2,5,7,9).

El potencial de acción es una respuesta de tipo todo o nada, ya que si la despolarización inicial no alcanza un valor umbral, no se produce un potencial. Por otro lado, un estímulo mucho mayor al umbral no produce el potencial de acción mayor al producido por el estímulo umbral. El potencial de acción se trasmite a lo largo de la membrana neural con una velocidad de hasta 120 m/s sin experimentar modificación alguna después de haber recorrido grandes distancias. La amplitud del potencial es constante (100 mV) en neuronas y su duración varía entre 1 y 2 milisegundos (8,60). Las zonas de la membrana que han sido excitadas de esta manera pueden ser excitadas cuando se restablece el potencial de reposo (6,8,9) figura 2. Al tiempo mínimo requerido para provocar dos respuestas sucesivas se le denomina periodo refractario y depende de las propiedades de compuerta intrínsecas al canal de sodio (59).

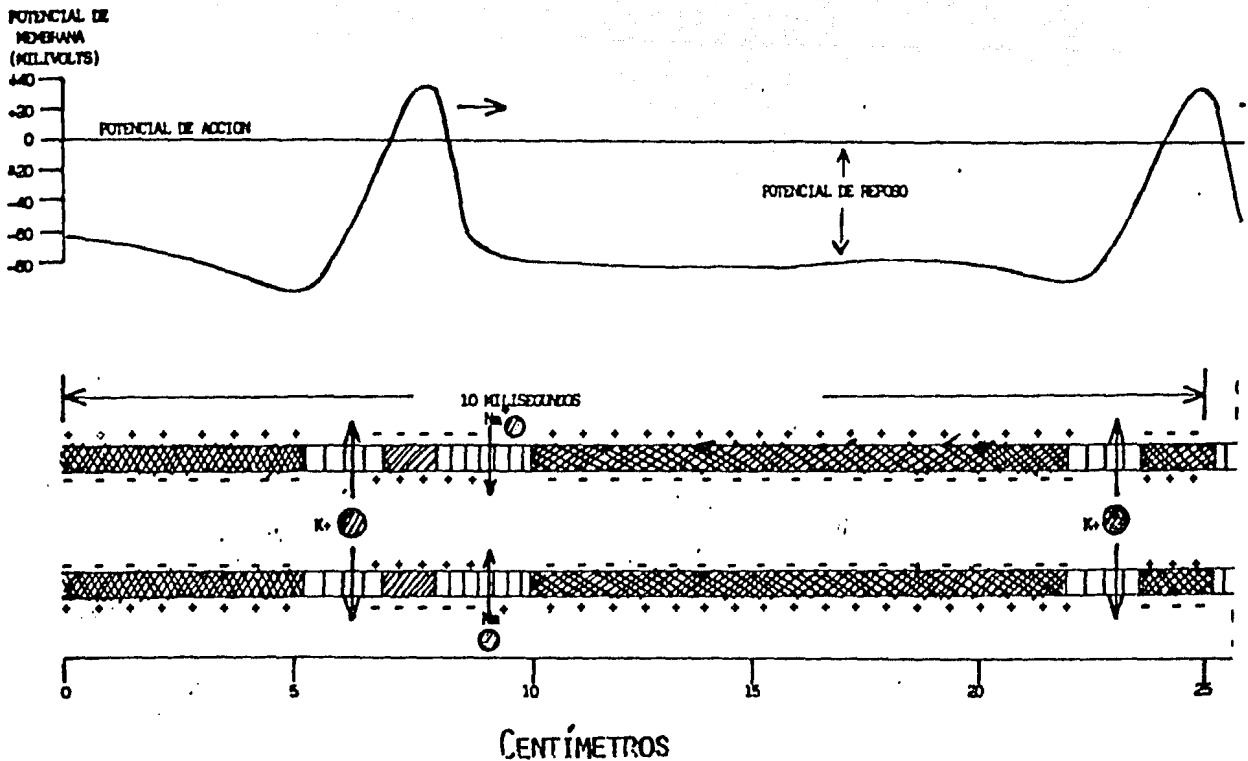


Figura 2. Propagación del impulso nervioso a lo largo del axón que coincide con la afluencia localizada del sodio seguida de salida de potasio, a través de canales operados a modo de compuertas por cambios de voltaje a través de la membrana plasmática. El ligero cambio de voltaje abre algunos canales de sodio, cambiando aún más el voltaje. La afluencia de iones  $\text{Na}^+$  se acelera hasta que la superficie interna de la membrana es positiva localmente. La inversión de voltaje cierra los canales de sodio y abre los canales de potasio. La salida de los iones de  $\text{K}^+$  restablece rápidamente el potencial negativo en el interior de la membrana celular, y la inversión de voltaje conocido como potencial de acción se propaga a lo largo del axón (Figura tomada de Stevens (1980) (8)).

## Antecedentes del trabajo.

El complejo mecanismo sobre el cual se basa la transmisión química es común para todas las neuronas que presentan este tipo de transmisión. En la presinapsis se encuentran los sistemas de almacenamiento del transmisor, ya sea que éste se sintetice *in situ* o sea transportado desde el soma por el flujo axoplásmico o reacumulado desde el espacio sináptico. El almacenamiento del transmisor puede hacerse tanto en las vesículas sinápticas como en el citoplasma. En la presinapsis se encuentran los mecanismos responsables de la liberación del transmisor que son activados cuando la concentración intracelular de calcio libre se incrementa. Este incremento puede originarse por la apertura de canales de calcio (sensibles a voltaje), que ocurre durante la llegada de un potencial de acción a la terminal sináptica. Una vez liberado el transmisor al espacio sináptico, interacciona con su receptor postsináptico específico formando un complejo receptor-transmisor y dependiendo de la naturaleza del receptor, pueden originarse cambios rápidos en la permeabilidad iónica de la membrana postsináptica a través de la activación de canales específicos para los iones sodio, cloruro, calcio o potasio. El complejo transmisor-receptor también puede inducir cambios en la actividad de la adenilciclase, enzima responsable de la síntesis del AMP cíclico que, a su vez, funge como segundo mensajero estimulando la fosforilación de proteínas específicas que modifican la permeabilidad iónica de la membrana postsináptica a más largo plazo. El transmisor en el espacio sináptico es inactivado por acción enzimática o es reacumulado por la presinapsis a través de un sistema de transporte de alta afinidad. En algunos casos se han descrito autorreceptores en la membrana presináptica que, al interactuar con el transmisor liberado, podrían regular los mecanismos de liberación de este, (figura 2.1).

Se considera que la llegada de una corriente despolarizante a la terminal sináptica desencadena la apertura de canales de sodio sensibles a voltaje, que trae como consecuencia un incremento en la permeabilidad de la membrana a los iones calcio (10,13). Se ha demostrado que los canales de sodio son importantes tanto en la conducción del impulso nervioso como en la liberación de neurotransmisores y se ha reportado que se inhiben específicamente por fármacos, tales como la Tetrodotoxina (58-60) y la Saxitoxina (59,60).

Así, en experimentos en donde el impulso nervioso se bloquea inhibiendo la entrada de sodio a la terminal nerviosa con tetrodotoxina (ttx), se inhibe la liberación de noradrenalina (56), ácido glutámico, ácido aspártico y GABA

(57) tanto en rebanadas de cerebro como en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas).

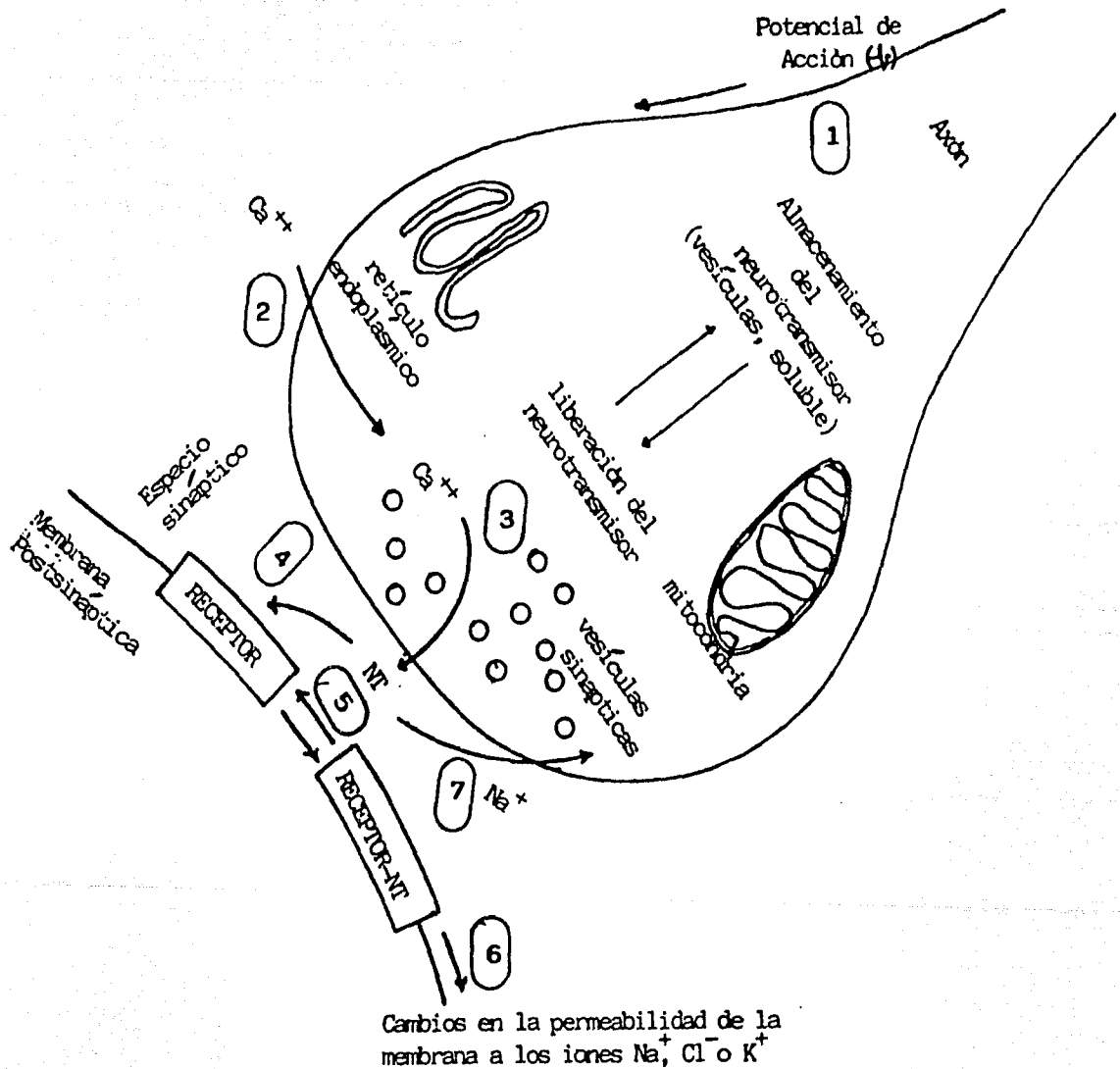


Figura 2.1 Esquema de una sinapsis de tipo químico. El potencial de acción ( $\psi$ ) llega a la terminal nerviosa (1) y como consecuencia, existe una entrada de calcio extracelular al interior de la presinapsis (2), el cual desencadena el mecanismo de liberación del neurotransmisor (NT) al espacio sináptico (3). El neurotransmisor interacciona con su receptor específico en la membrana postsináptica (4) formando el complejo receptor-neurotransmisor (5), produciendo cambios en la permeabilidad de la membrana a los iones  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Cl^-$  (6). La eliminación del neurotransmisor de la sinapsis, se logra por recaptura a la terminal presináptica, a la neurona postsináptica o a células gliales (7), o por hidrólisis enzimática.

Por otro lado, el incremento en los niveles de calcio libre en la terminal nerviosa se ha relacionado directamente con los mecanismos de neurosecreción responsables de la liberación del transmisor. Sin embargo, la despolarización de la membrana no parece ser necesaria para que se produzca la liberación del transmisor, sino que esta liberación depende de manera directa de un incremento en la concentración libre de calcio en el interior de la célula, como lo indican los experimentos en los que el uso de ionóforos de calcio o la inyección de calcio a la terminal nerviosa, estimulan la liberación del transmisor (11,14,21).

La regulación de la concentración libre de calcio es importante para el funcionamiento normal de la célula. La célula posee varios mecanismos que controlan la concentración de este ion. a nivel de la membrana plasmática existen tres mecanismos:

a) Un canal de calcio dependiente de voltaje (10-14), el cual se bloquea por cationes polivalentes como el  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{La}^{+++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , así como por verapamil y D-600 (12,13,16,18).

b) Un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , el cual intercambia un ion de calcio por tres de sodio (10,13,14,17,19), la energía se obtiene por el gradiente electroquímico del sodio transmembranal (13,19). El intercambio es asimétrico y el calcio puede moverse a ambos lados de la membrana, dependiendo del gradiente predominante del sodio. Este sistema no requiere de la hidrólisis de ATP (17) y se inhibe por la despolarización de la membrana y por  $\text{La}^{+++}$  (13,18). El intercambiador tiene una constante de afinidad para el calcio de 8-10  $\mu\text{M}$  (17).

c) Una ATPasa  $\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++}$  que hidroliza ATP y requiere de la presencia de magnesio. Esta ATPasa presenta una estequiometría de 1 mol de calcio transportado por mol de ATP hidrolizado (17) este mecanismo se inhibe por  $\text{La}^{+++}$ .

Asimismo, en el interior de la célula, el retículo endoplásmico, las mitocondrias y las proteínas solubles son capaces de regular la concentración de calcio intracelular. En el sistema nervioso de varias especies se ha reportado la existencia de varias proteínas solubles capaces de secuestrar calcio, tales como: La calmodulina (20,21,23), la proteína L-2 y la S-100 (21). estas proteínas unen calcio con una gran afinidad pero poca capacidad, uniendo sólo del 5% al 10% del calcio del axoplasma (22).

El sistema de captación de calcio del retículo endoplásmico es de alta afinidad y con mayor capacidad para atrapar calcio que la de las proteínas solubles. Los estudios de captación de calcio realizados en el retículo sarcoplásmico demostraron que requiere de magnesio (13,17,22) y de la hidrólisis de ATP, presentando una estequiometría de dos moles de calcio por cada mol de ATP hidrolizado y una constante de afinidad para el ATP de  $10 \mu\text{M}$  (16,17,22). Asimismo, la acumulación de calcio es sensible a tripsina e insensible al carbonil cianuro-p-trifluorometoxi (FCCF), 2,4-Dinitrofenol (2,4-DNP), oligomicina, azida de sodio y al rojo de rutenio (13,16,22).

El papel de la mitocondria en la regulación de la concentración intracelular de calcio ha sido ampliamente estudiado. La energía necesaria para la captación del calcio la proporciona el transporte de electrones o bien la hidrólisis del ATP (10,13,22,25,27,53). Por cada dos electrones que pasan del NADH+ al oxígeno en la cadena respiratoria, se pueden acumular 6 iones calcio ( $\text{Ca}^{++}/2\text{H}$ ) (24). Dicha captación de calcio se inhibe por bajas concentraciones de rojo de rutenio y por lantano (26,27,53), así como por antimicina, rotenona, FCCF, 2,4-DNP y oligomicina (53).

La captación de calcio por la mitocondria se lleva a cabo por dos tipos de transportadores, uno de alta afinidad con una constante de disociación de  $0.1-1 \mu\text{M}$  y una capacidad de  $1 \text{ nM}$  de Calcio/mg. de proteína, y otro de baja afinidad con una capacidad de  $50-70 \text{ nM}$  de calcio/mg. de proteína con una constante de disociación de  $100 \mu\text{M}$  (20,26).

La liberación de neurotransmisores y la secreción de hormonas puede también llevarse a cabo aún cuando el ion calcio no se encuentre presente en el medio extracelular. Experimentos en los que la veratrina (28,34,37,38), ionóforos de sodio (30,39,40), ouabaina (28,32,33,37), la fusión de liposomas conteniendo sodio (15) y altas concentraciones de potasio (20,36,37) incrementan la concentración intracelular de sodio, producen la liberación de insulina de los islotes de Langerhans (28), así como la secreción y liberación de catecolaminas y GABA de células cromafines (30,38) y terminales nerviosas (20,31-35,36-40). Liberación de la que se tiene amplia evidencia de ser un mecanismo dependiente de calcio. Estas observaciones sugieren que un incremento en la concentración intracelular de sodio puede llevar a un incremento en la concentración intracelular de calcio libre, que a su vez induce la liberación de hormonas y neurotransmisores. Se ha sugerido

que el calcio proveniente de sitios endógenos tales como la mitocondria y el retículo endoplásmico, es el responsable de dicha liberación.

## Objetivo

El objetivo de este trabajo es tratar de esclarecer si la liberación de neurotransmisores inducida por sodio en ausencia de calcio extracelular, se debe a un incremento en la concentración libre de calcio proveniente de organelos intracelulares. Para ello, estudiamos como modelo la liberación del ácido gama-aminobutírico (GABA) de sinaptosomas aislados de rata, en ausencia de calcio externo e inducida por agentes despolarizantes que se conoce que incrementan la concentración de sodio intracelular, tales como la veratrina, monensina y altas concentraciones de potasio. Asimismo, estudiamos el efecto que sobre esta liberación presenta el dantroleno. El dantroleno es un fármaco que funciona como relajante muscular, desacoplando el sistema de excitación-contracción, a través de su interferencia con la disponibilidad del calcio intracelular requerido para este proceso (41-43,45,47).

## Métodos

### Aislamiento de sinaptosomas.

Los sinaptosomas se aislaron del cerebro de rata de acuerdo al método descrito por Hajos (54). El cerebro de ratas adultas wistar se homogeneizó en 10 ml. de sacarosa 0.32 M con un homogeneizador de mazo de teflón. El homogeneizado se centrifugó a 1100 g durante un periodo de 10 minutos, desechando el precipitado, que contiene núcleos, mielina y fragmentos de células. El sobrenadante se centrifugó a 8320 g durante 20 minutos, el precipitado de la centrifugación se resuspendió en 5 ml. de sacarosa 0.32 M y la suspensión se colocó sobre 20 ml de sacarosa 0.8 M evitando que ambas fases se mezclasen. Este gradiente se centrifugó a 7470 g durante 25 minutos. Después de centrifugar, se obtuvieron tres fracciones: la fracción superior que contiene mielina, la fracción intermedia que contiene 89% de sinaptosomas, 9% de mitocondrias, 1% de axones mielinizados, el 1% de partículas no identificadas, y la fracción que se localiza en el fondo del tubo contiene principalmente mitocondrias (54). se extrajo la fracción que contiene los sinaptosomas con una pipeta pasteur y se diluyó a una concentración final de sacarosa de 0.32 M con agua bidestilada fría, ésta se agregó en forma lenta y con agitación continua para evitar un choque osmótico. Los sinaptosomas se obtuvieron al centrifugar nuevamente la suspensión a 18100 g durante 10 minutos.

Posteriormente, los sinaptosomas se incubaron en un medio Ringer-Krebs bicarbonato que contiene (mM): NaCl, 115; KCl, 3;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.2;  $\text{NaHCO}_3$ , 25; glucosa 10; EGTA, 1. Cuando la incubación se realizó en presencia de calcio extracelular, el EGTA se eliminó del medio y se adicionó cloruro de calcio a una concentración final de 2 mM de calcio. cuando se estimuló con concentraciones altas de potasio, la concentración de NaCl se disminuyó a 65 mM con el objeto de mantener la isosmolaridad del medio. La veratrina, el verapamil y la monensina fueron disueltos en etanol y se adicionaron al medio de incubación. La concentración final de etanol fue de 0.05%. El pH de los medios de incubación se ajustó a 7.4 habiendo burbujeado con una mezcla de  $\text{O}_2$ - $\text{CO}_2$  (95%-5%) durante 5 minutos



## Acumulación de aminoácidos radioactivos por los sinaptosomas

Los sinaptosomas se resuspendieron en 2 ml de Ringer-Krebs bicarbonato. 500  $\mu$ l de esta suspensión (400-650  $\mu$ g de proteína) se incubaron en un volumen final de 2.5 ml de medio conteniendo 0.1 mM de ácido aminoxacético. Los sinaptosomas se incubaron durante 5 minutos a 37°C con agitación continua y posteriormente se agregó 1  $\mu$ Ci de 3H-GABA (40.2 Ci/mmol) a una concentración final de 0.5  $\mu$ M o 4.2  $\mu$ Ci de 3H-Leucina (47.7 Ci/mmol) a una concentración final de 0.5  $\mu$ M, y se continuo la incubación durante 5 minutos a 37°C con agitación continua.

## Liberación de aminoácidos radiactivos

Una vez que los sinaptosomas acumularon el aminoácido radiactivo, 400  $\mu$ l del medio de incubación se colocaron sobre un filtro milipore en unidades de filtración. La radioactividad que no fué acumulada por los sinaptosomas se eliminó con 3 lavados de 30 segundos con Ringer-Krebs bicarbonato (8 ml). El cual, se eliminó por aplicación de vacío a una presión de 15 cm de Hg, durante 5 segundos. El nivel basal de liberación se estableció después de que los sinaptosomas se perfundieron con 8 ml de Ringer-Krebs a una velocidad de 1 ml/minuto utilizando para ello una bomba peristáltica. La estimulación de la liberación se efectuó por la adición de 1  $\mu$ M de monensina, 0.06 mg/ml de veratrina o 53 mM de potasio en el medio de perfusión durante 1-3 minutos y se continuó la perfusión con medio normal durante 5 minutos. El dantroleno se utilizó a una concentración de 80  $\mu$ M, y estuvo presente durante la incubación del aminoácido radiactivo y hasta el inicio de la estimulación de la liberación.

El medio de perfusión se colectó cada minuto en frascos a los que se agregaron 5 ml de tritosol (50), y la radioactividad se contó en un contador de centelleo líquido. Al finalizar el experimento, los filtros, que contenían a los sinaptosomas se colocaron en frascos con 1 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, conteniendo 20 mM de ácido etilen-dinitrilo-tetracético (EDTA), a pH 8 durante 24 hrs a 25°C o 60 min. a 70°C con el objeto de liberar la radioactividad acumulada, la cual, se determinó como se mencionó anteriormente.

La liberación del aminoácido radiactivo se expresa como el porcentaje (%) de la radioactividad total acumulada por los sinaptosomas.

La concentración de proteínas se determinó conforme al método descrito por Lowry (51), usando como standard albúmina bovina.

El dantroleno se preparó de acuerdo al método empleado por Salata (48). La droga se disolvió a una concentración de 0.5 mg/ml en agua desionizada y se llevó muy lentamente a un pH 10 con NaOH 0.1 N. La solución se dejó en baño de María con agitación durante 10 minutos a 37°C.

Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se obtuvieron usando la prueba T de student.

El 3H-GABA y la 3H-Leucina se adquirieron de New England Nuclear Corporation; la monensina, veratrina y el verapamil se obtuvieron de SIGMA Chemical Company. El dantroleno fue donado por Norwich Eaton Pharmaceutical Inc. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## Resultados

La liberación espontánea de 3H-GABA se mantiene constante y no se modifica por la presencia de dantroleno, como se muestra en la figura 3.

La liberación de 3H-GABA estimulada por monensina se incrementó 300% con respecto a la liberación basal lo que representa el  $4.02 \pm 0.7\%$  de la radioactividad total acumulada por los sinaptosomas (figura 4). La liberación máxima se alcanzó 3 minutos después del inicio de la estimulación. Bajo las mismas condiciones, la liberación de 3H-Leucina no fue estimulada por la presencia de monensina (figura 4).

El efecto del dantroleno sobre la liberación de 3H-GABA estimulada por monensina se muestra en la figura 5. En presencia de dantroleno la liberación de GABA inducida por monensina representa el  $1.21 \pm 0.23\%$  de la radioactividad acumulada, lo que significa una inhibición del 70% comparada con el control.

La liberación de 3H-GABA inducida por veratrina ( $0.06$  mg/ml) se observa en la figura 6, dicha liberación se incrementó en un 225% sobre el control lo que representa el  $3.36 \pm 0.23\%$ . El efecto máximo de la liberación se observa en el segundo minuto de la estimulación. Cuando los sinaptosomas fueron tratados con dantroleno, la liberación de GABA inducida por veratrina se inhibió en un 46% con respecto al control.

En presencia de  $2$  mM de  $Ca^{++}$  extracelular, la liberación de 3H-GABA estimulada por veratrina ( $0.06$  mg/ml) fue 30% mayor con respecto a la observada en un medio sin calcio, y la cantidad de 3H-GABA liberado corresponde a un valor de  $4.1 \pm 0.31\%$  de la radioactividad total acumulada por los sinaptosomas (figura 7). Bajo estas condiciones, la presencia de dantroleno disminuyó en un 49% la liberación de GABA inducida por veratrina (figura 7). Asimismo, el verapamil a una concentración de  $100$   $\mu$ M produce una inhibición del 25%, mientras que la adición simultánea de verapamil y dantroleno inhibe totalmente la liberación de 3H-GABA (figura 8).

La liberación de 3H-GABA estimulada por concentraciones despolarizantes de potasio ( $53$  mM) en presencia de calcio externo ( $2$  mM), se presenta en la figura 9. La liberación de GABA aumentó, en un 240% con respecto a la liberación basal, el valor máximo de liberación corresponde a  $3.54 \pm 0.04\%$  de la radioactividad acumulada por los sinaptosomas. El porcentaje

de liberación así como el tiempo en que ocurre el pico máximo de liberación es muy similar a la obtenida por veratrina en presencia de calcio. La presencia de dantroleno causó una inhibición del 47% en la liberación de GABA estimulada por potasio (figura 9).

Sin embargo, la liberación de GABA estimulada por concentraciones altas de potasio en un medio libre de calcio, no es afectada sensiblemente por la presencia de dantroleno, aunque, en estas condiciones la estimulación por potasio no se observó (figura 10).

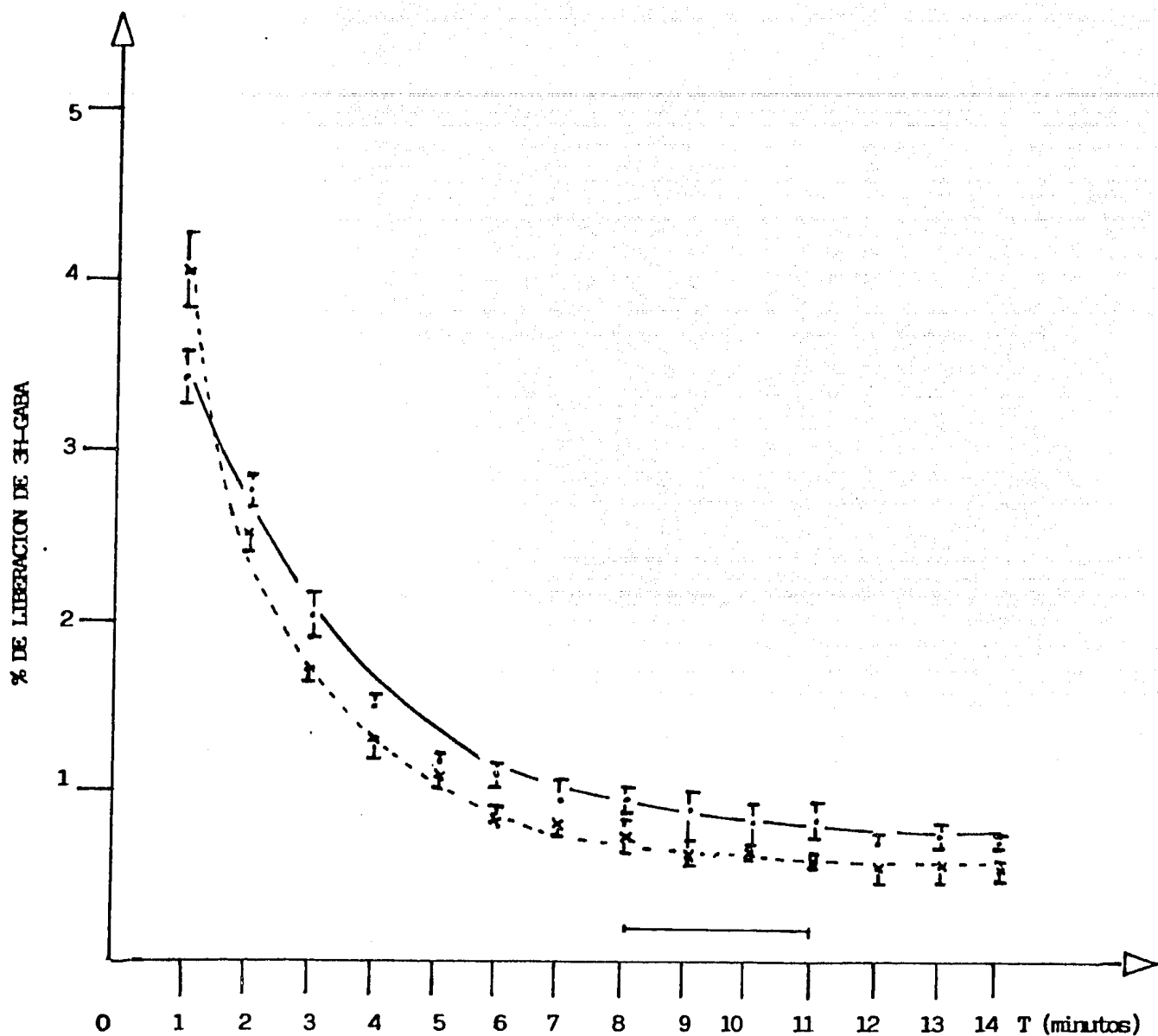


Figura 3. La liberación espontánea de 3H-GABA en sinaptosomas de rata. Los sinaptosomas se perfundieron con medio libre de calcio, en la gráfica se puede observar la liberación espontánea de GABA. La barra indica el cambio de medio simulando la estimulación; (.)-control; (x)-dantroleno. El dantroleno se encuentra presente desde la incubación hasta antes del cambio de medio para la estimulación. Los datos mostrados representan el promedio de 4 experimentos y las barras representan el error standard.

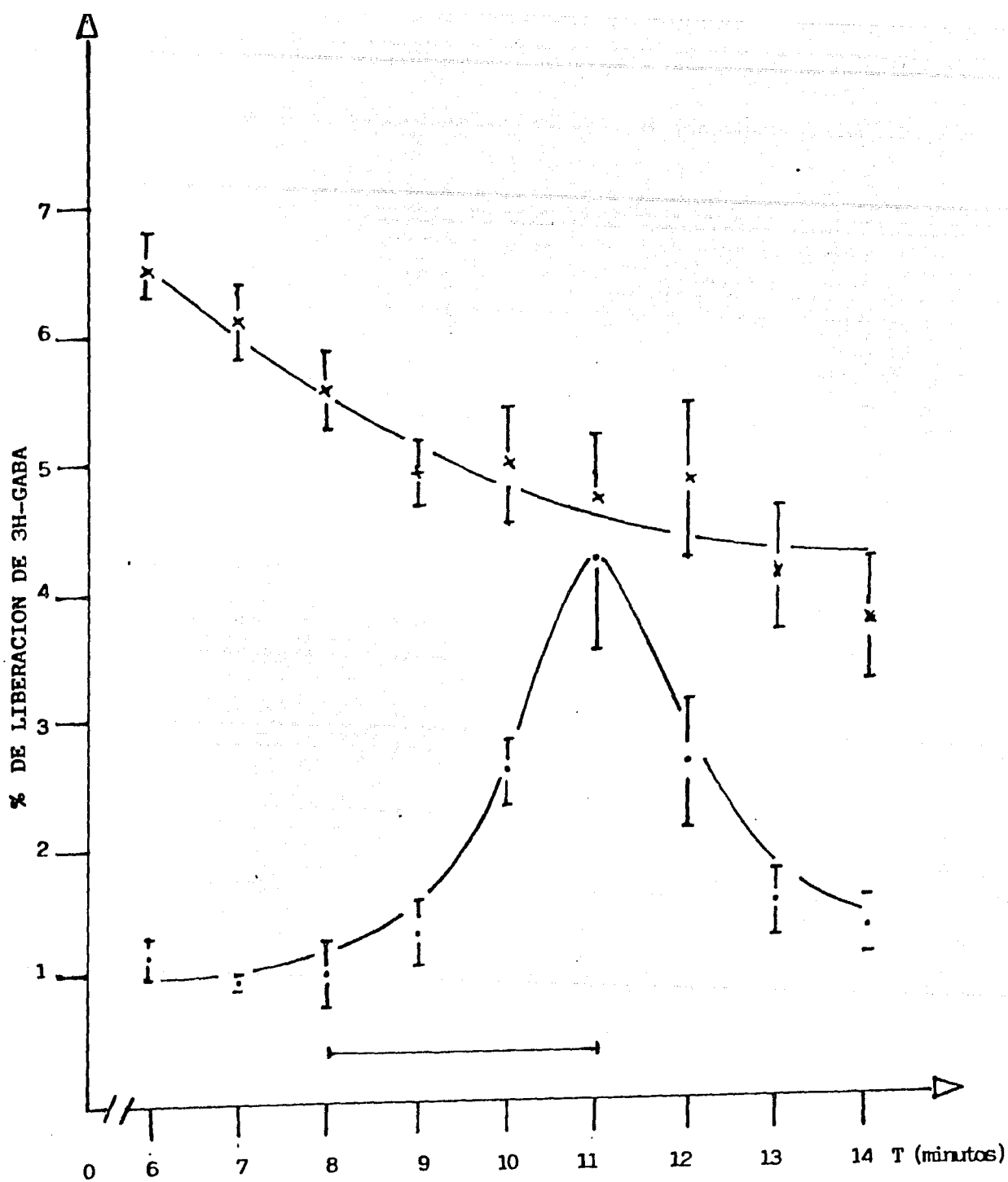


Figura 4. Efecto de la monensina sobre la liberación de 3H-GABA (.) y 3H-Leucina (x) de sinaptosomas. Los datos son la media  $\pm$  e.e. de 4 experimentos. La barra indica el tiempo de estimulación.

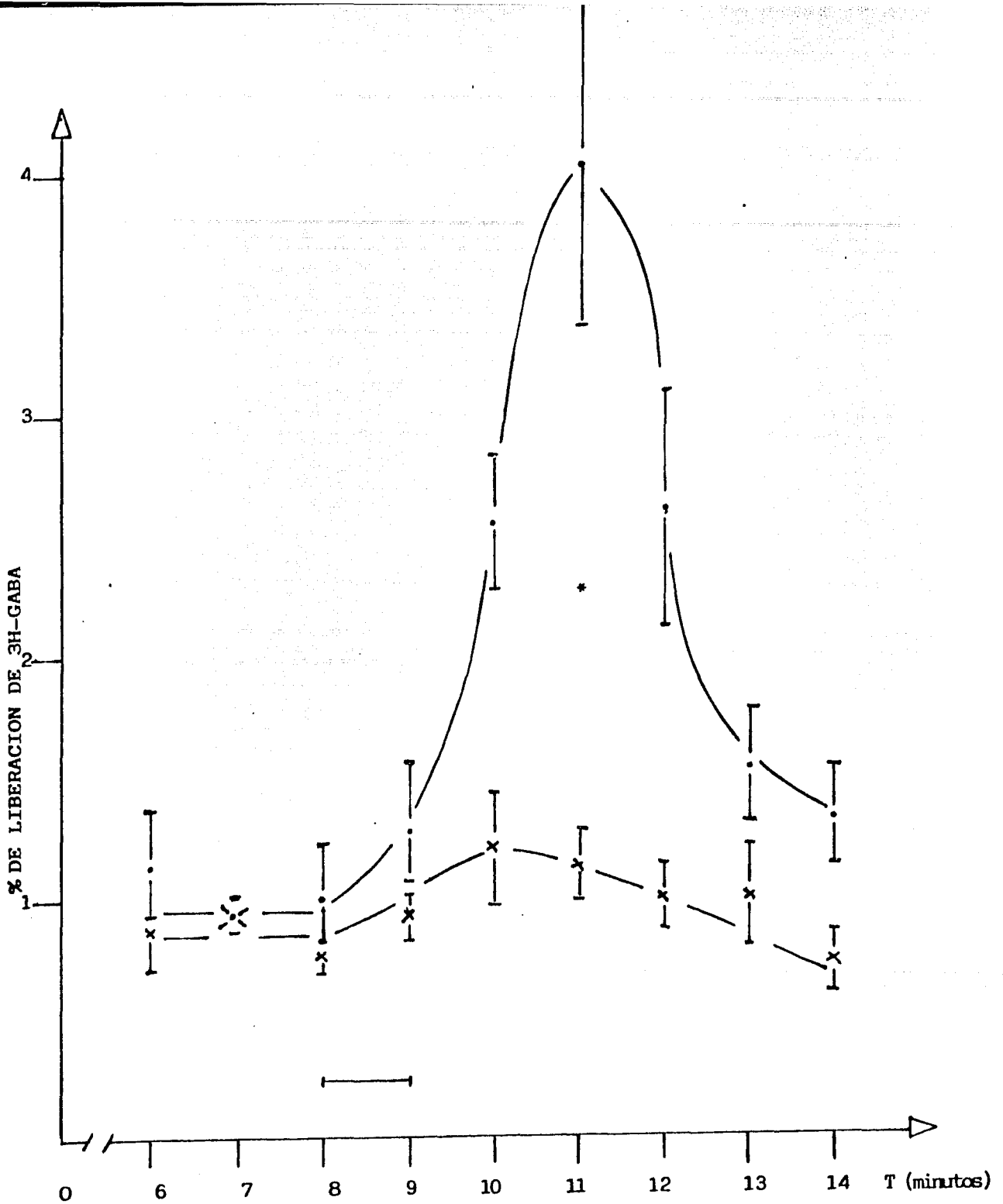


Figura 5. El efecto del dantroleno en la liberación de 3H-GABA inducida por monensina ( $1 \mu\text{M}$ ): (.)-control; (x)-dantroleno. Los datos son la media  $\pm$  e.e. de 4 experimentos; (\*)- $P < 0.005$ ; la barra indica tiempo en que se estimuló la preparación.

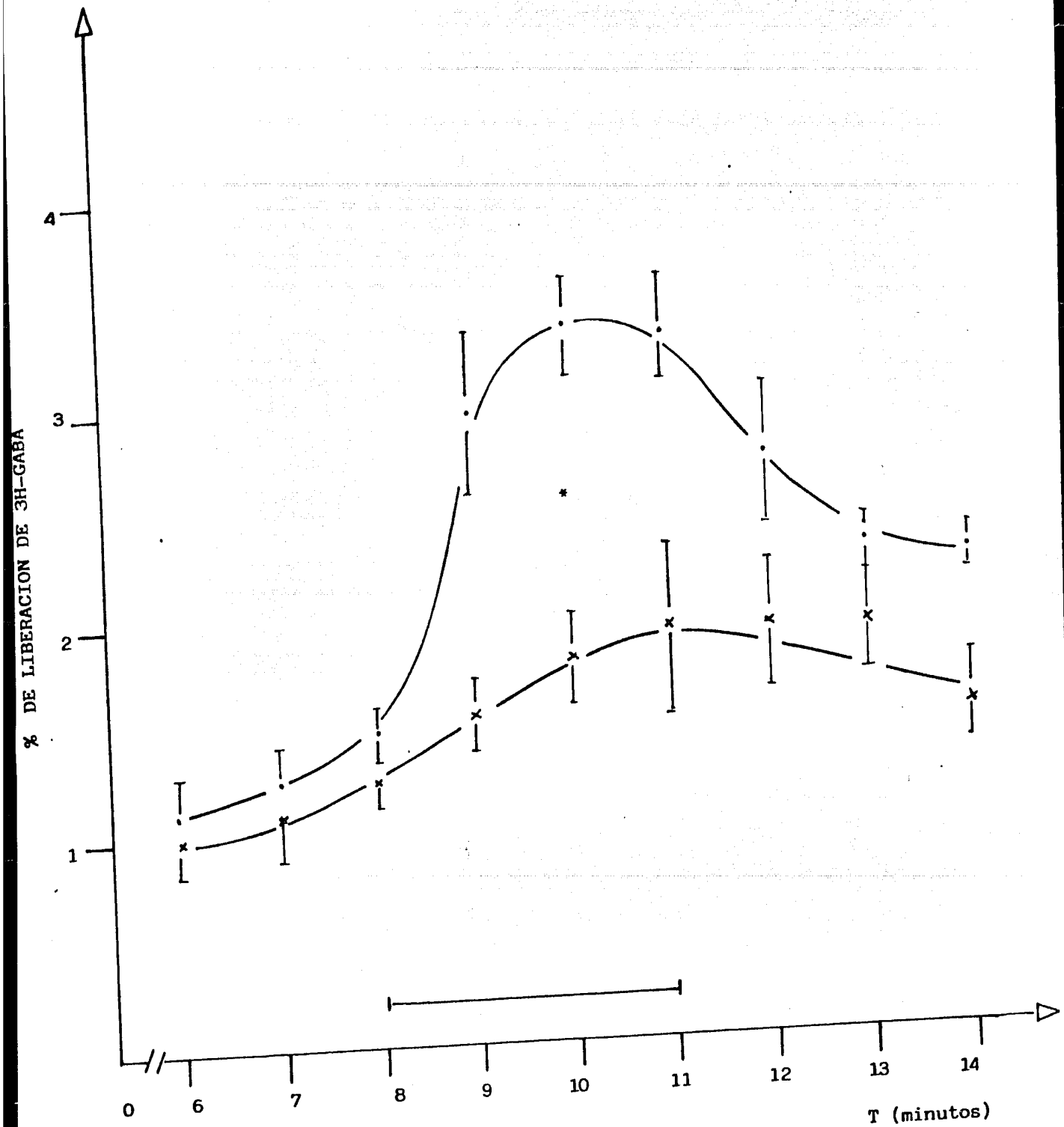


Figura 6. Efecto de dantroleno ( $80 \mu\text{M}$ ) y veratrina ( $0.06 \text{ mg/ml}$ ) sobre la liberación de 3H-GABA: (.)-control (veratrina); (x)-veratrina más dantroleno. Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. de 7 experimentos; (\*)- $P < 0.005$ ; la barra indica el tiempo de estimulación.



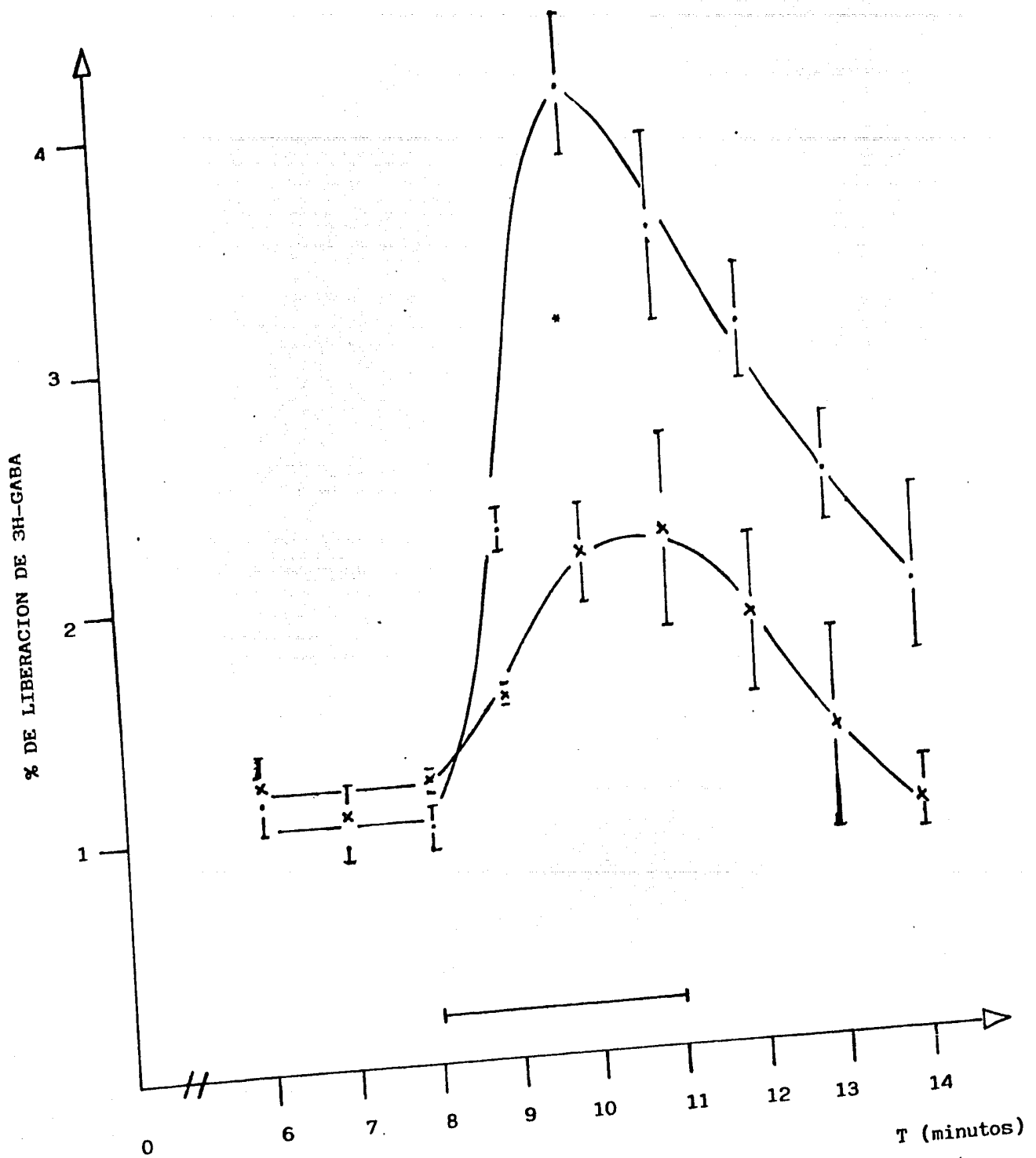


Figura 7. La Liberación de 3H-GABA de sinaptosomas inducida por veratrina (0.06 mg/l) en presencia de calcio extracelular (2 mM); (.)-control (veratrina y calcio); (x)-veratrina y calcio más dantroleno. Los datos presentados son el promedio  $\pm$  e.e. de 5 experimentos; (\*)- $P < 0.005$ ; la barra indica el tiempo de la estimulación.

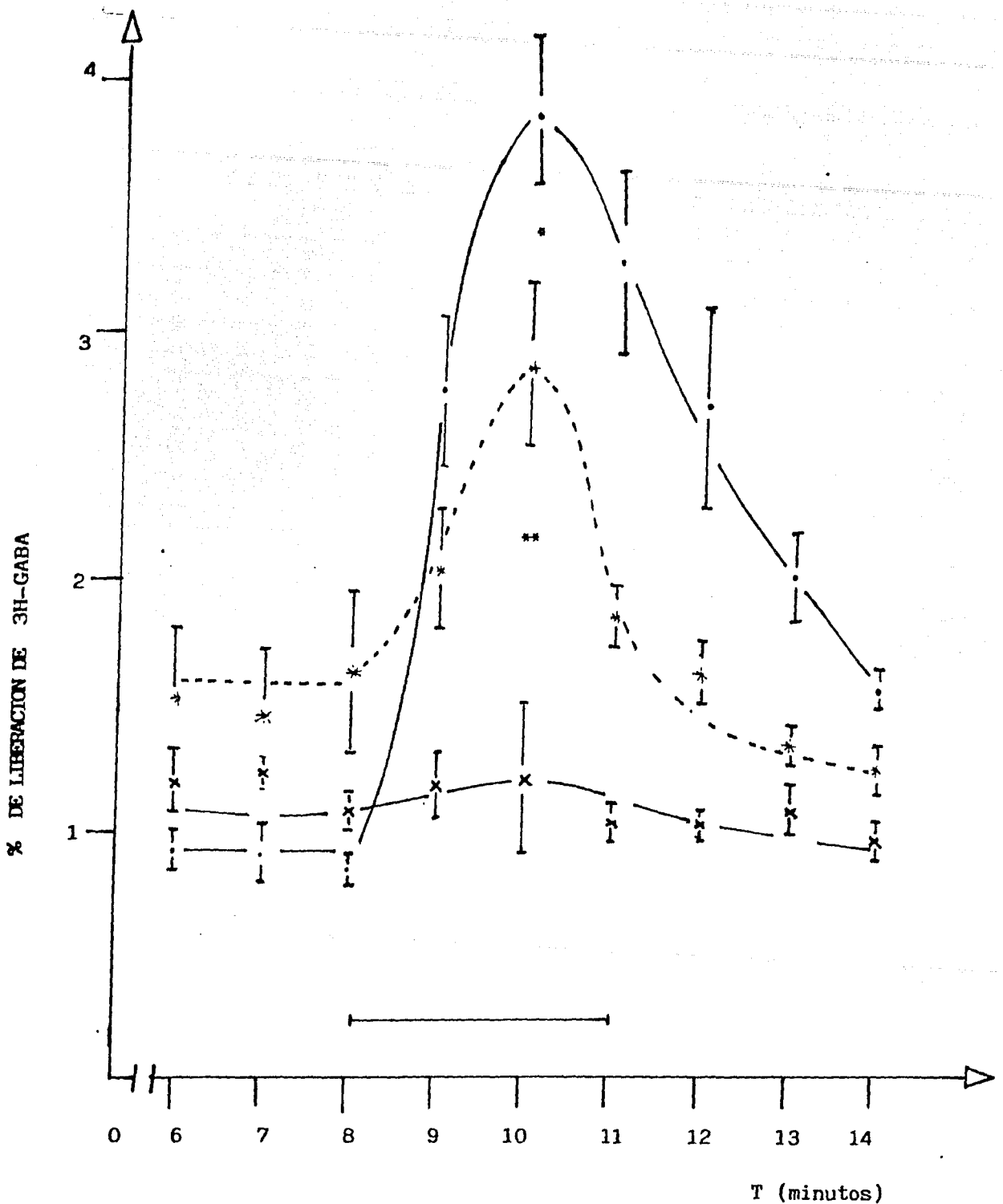


Figura B. Efecto de verapamil ( $100 \mu\text{M}$ ) sobre la liberación de 3H-GABA inducida por veratrina ( $0.06 \text{ mg/l}$ ) en presencia de calcio extracelular ( $2 \text{ mM}$ ); (.)-control (veratrina y calcio); (\*)-veratrina, calcio y verapamil; (x)-veratrina, calcio + verapamil + dantroleno. Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. de 3 experimentos; (\*)- $P > 0.05$ , (\*\*) - $P < 0.005$ ; la barra indica el momento de la aplicación del estímulo así como el tiempo de estimulación.

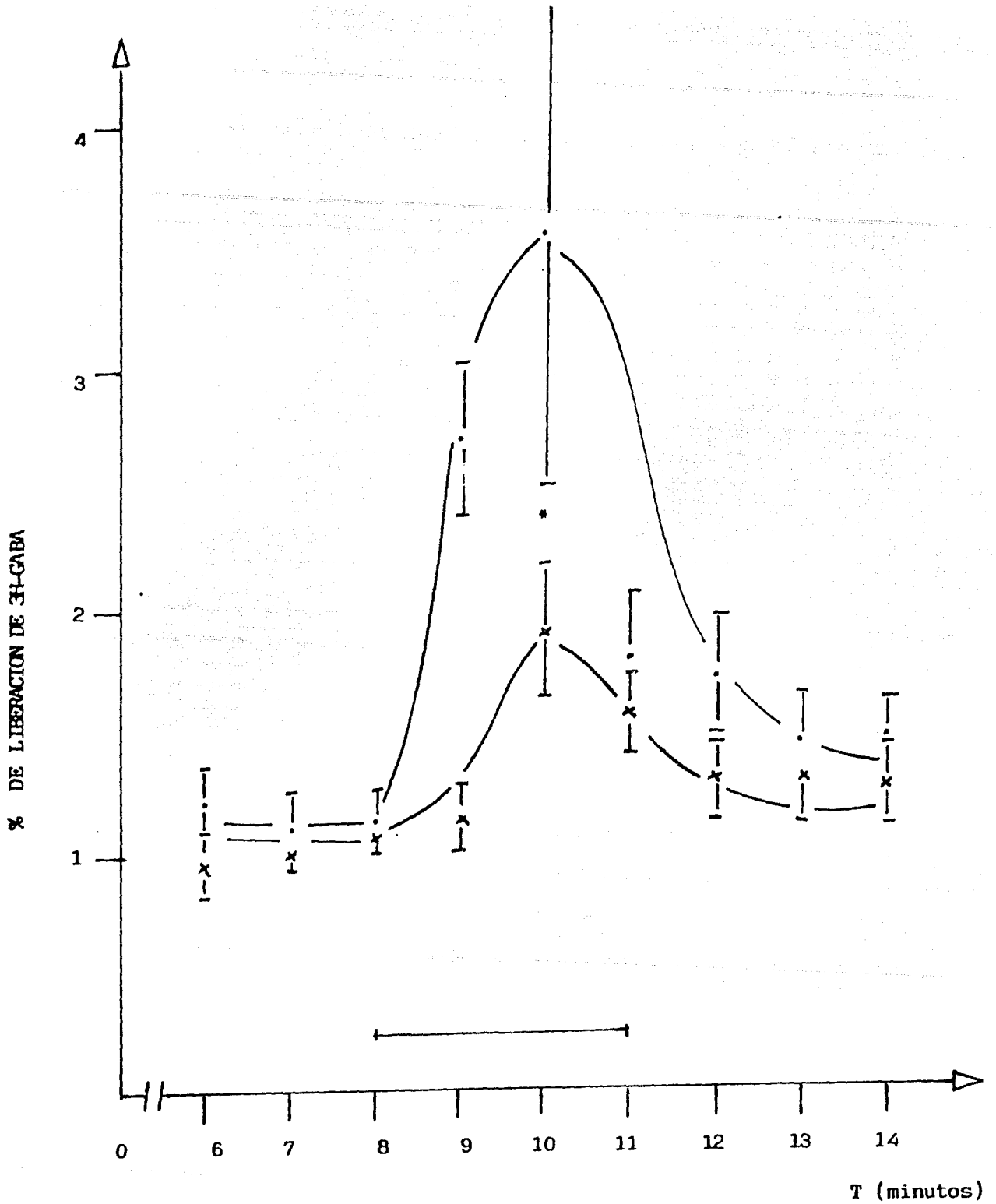


Figura 9. Efecto de 80  $\mu$ M de dantroleno sobre la liberación de 3H-GABA inducida por 53 mM de potasio (KCl) en presencia de calcio extracelular (2 mM); (•)-control (KCl); (x)-KCl + dantroleno. Los datos son la media  $\pm$  e.e. de 4 experimentos; (\*)-P < 0.05; la barra indica el tiempo de la estimulación.

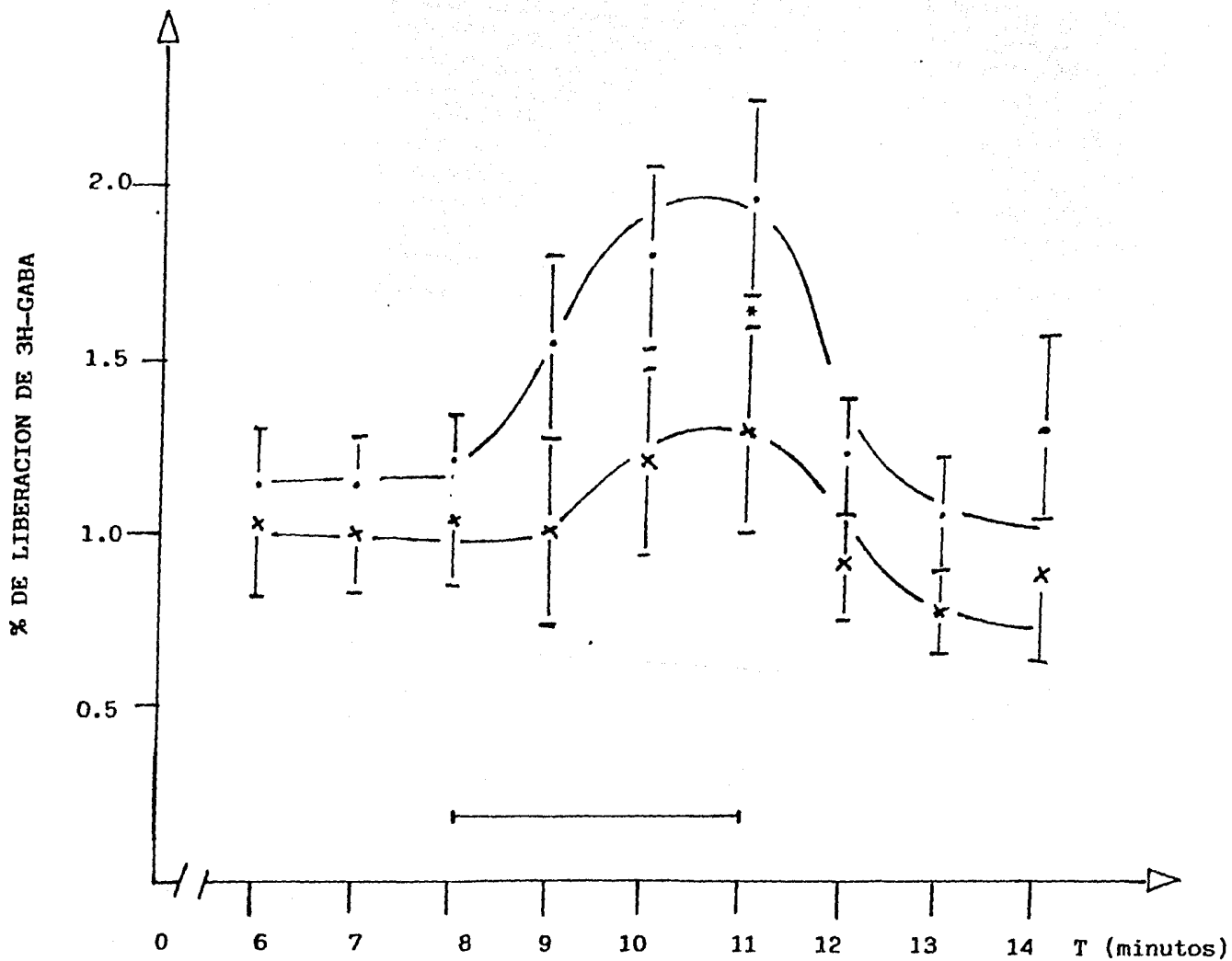


Figura 10. Efecto de  $80 \mu\text{M}$  de dantroleno sobre la liberación de 3H-GABA inducida por  $53 \text{ mM}$  de potasio (KCl) en ausencia de calcio extracelular; (.)-control (KCl); (x)-KCl + dantroleno. Los datos representan la media  $\pm$  e.e. de 7 experimentos; (\*)- $P > 0.05$ ; la barra indica el tiempo de estimulación.

## Discusión

La presencia de sustancias despolarizantes como la monensina, veratrina y concentraciones altas de potasio causaron un incremento notable de la liberación de GABA de los sinaptosomas, efecto que se observó aún en ausencia de calcio externo (figuras 5, 6 y 9). El efecto de estos agentes despolarizantes parece ser específico sobre los mecanismos de liberación de neurotransmisores, ya que la monensina no tuvo ningún efecto sobre la liberación de Leucina, aminoácido del que no se tiene evidencia de que funcione como neurotransmisor.

La liberación de GABA inducida por monensina es 3 veces mayor que la liberación espontánea de los sinaptosomas (figuras 4 y 5). Dicha liberación es mayor a la que se observa en presencia de veratrina o altas concentraciones de potasio. Esta diferencia puede explicarse por el hecho de que la monensina es un ionóforo de sodio y forma un mayor número de canales artificiales en la membrana, comparados con el número de canales de sodio sensibles a voltaje que existen en la membrana plasmática, los cuales son activados por potasio y veratrina. La veratrina induce la apertura de canales de sodio sensibles a voltaje, lo que produce un incremento en la concentración intracelular de sodio, simulando así el potencial de acción. Las concentraciones de potasio intra- y extracelulares son responsables del potencial de reposo. Cuando la concentración de potasio se incrementa en el medio extracelular, el potencial electroquímico del potasio disminuye, provocando una disminución en el potencial de reposo, lo que trae como consecuencia la apertura de canales de sodio sensibles a voltaje de la membrana plasmática, produciendo la despolarización de la misma.

El aumento en la concentración de sodio inducido por monensina, veratrina y altas concentraciones de potasio, en ausencia de calcio extracelular puede promover la salida de calcio de sitios endógenos como la mitocondria y el retículo endoplásmico (15, 20, 22, 27, 28, 34, 36, 55). A través de un intercambiador sodio-calcio, incrementando la concentración de calcio libre intracelular y éste a su vez, producir un incremento en la liberación del neurotransmisor.

En presencia de calcio extracelular (2 mM), se observó que la liberación de 3H-GABA inducida por veratrina se incrementó 32% comparada con la observada en ausencia de calcio externo, bajo las mismas condiciones, concentraciones despolarizantes de potasio, incrementaron la liberación de GABA en un 164%.

La liberación de GABA inducida por altas concentraciones de potasio y por veratrina en presencia de calcio, se incrementó 2.5 veces. El porcentaje de estimulación como, el tiempo en que ocurre dicha liberación, son muy similares. En presencia de veratrina el incremento en la liberación de GABA provocado por veratrina y potasio se debe en buena parte a la presencia de calcio extracelular. La apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje producida por estos agentes despolarizantes inducen un incremento en la concentración de calcio intracelular, el cual, actúa directamente sobre los mecanismos de liberación de neurotransmisores obteniéndose por consiguiente un incremento en la liberación de éstos.

La liberación espontánea de GABA no es afectada por la presencia de dantroleo mientras que, la liberación estimulada por monensina o veratrina en ausencia de calcio en el medio de estimulación, fue notablemente inhibida por el fármaco.

Existen evidencias de que un incremento en la concentración intracelular de sodio inducido por agentes despolarizantes como la veratrina, monensina y altas concentraciones de potasio parece movilizar calcio de reservorios intracelulares y de esta manera producir la liberación de neurotransmisores como el GABA (15,20,28,34,36,37,55). El hecho de que la presencia de dantroleno inhiba la liberación de GABA inducida por estos agentes despolarizantes indica que este fármaco impide el incremento de calcio libre intracelular y por lo tanto su acceso a los mecanismos de liberación de neurotransmisores. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Morgan, Eryant, Desmedt y Cohen, quienes observan que el dantroleno inhibe la salida de calcio de organelos intracelulares (41,43,44). Se ha observado que el dantroleno no afecta las concentraciones intracelulares de iones tales como:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  o el agua (46), el potencial de reposo (43,47) ni la salida de calcio dependiente de ATP (43,47).

El dantroleno no afecta la liberación espontánea de los sinaptosomas (figura 3), pero sí induce una inhibición en la liberación de 3H-GABA producida por la estimulación con monensina (figura 5), o veratrina (figura 6) en ausencia de calcio externo. No obstante, se puede observar que el efecto del dantroleno es mayor sobre la liberación de GABA estimulada por monensina que por la inducida por veratrina.

Este fármaco parece ejercer su acción en el retículo endoplásmico, como lo indican los experimentos de Sengupta (42) en los que se midió la unión de dantroleno marcado radioactivamente a membranas de diferentes organelos. En

este estudio se encontró que el dantroleno posee una mayor afinidad de unión por el retículo sarcoplásmico que por las mitocondrias (42). Otra evidencia la constituye el hecho de que el fármaco es incapaz de inhibir las contracciones musculares inducidas por el 2,4-DNF, el cual, libera calcio proveniente de las mitocondrias (52). Asimismo, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que el dantroleno es incapaz de inhibir la liberación de  $^{45}\text{-Ca}^{++}$  de mitocondrias provenientes de terminales nerviosas en un medio de estimulación conteniendo 100 mM de sodio (datos no publicados).

El hecho de que la liberación de GABA estimulada por veratrina en presencia de calcio extracelular fué ligeramente inhibida por la presencia de verapamil (Figura 8) y que, bajo las mismas condiciones experimentales, la presencia de dantroleno inhibió un 75% dicha liberación, indica que un alto porcentaje de la liberación de GABA depende del calcio proveniente de reservorios endógenos. Sin embargo, Shira (49) ha observado que el verapamil además, de inhibir los canales de calcio dependientes de voltaje, inhibe la despolarización de la membrana plasmática producida por veratrina así como la liberación de GABA, por lo que concluye que la liberación de GABA es producida por la despolarización de la membrana. Sin embargo, es interesante hacer notar a este respecto, que cuando se despolariza la membrana plasmática con concentraciones altas de potasio en un medio libre tanto de sodio como de calcio, no se produce la liberación de 3H-GABA (57).

El dantroleno no parece tener ningún efecto sobre la liberación de 3H-GABA inducida por concentraciones despolarizantes de potasio en presencia y ausencia de calcio externo (figuras 9 y 10), ésto no queda muy claro, ya que existen evidencias de que el dantroleno inhibe la liberación de catecolaminas inducida por concentraciones altas de potasio en glándulas suprarrenales (44). Esto es interesante por que puede indicar que el dantroleno no actúa en la misma forma para transmisores solubles y vesiculados.

Estos resultados indican que el sodio puede liberar calcio de compartimientos intracelulares y producir la liberación de GABA. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que el dantroleno pueda interferir también con el mecanismo de transporte de calcio a través de la membrana plasmática, como lo observa Putney al medir la entrada de calcio al interior celular cuando se produce una despolarización con concentraciones despolarizantes de potasio mayores de 50 mM (46).

## Conclusiones

La liberación de GABA inducida por agentes despolarizantes que aumentan la concentración intracelular de sodio, se lleva a cabo por un mecanismo específico para neurotransmisores ya que, la liberación de Leucina que no se considera neurotransmisor no se modifica.

Los experimentos con dantroleno sugieren que la liberación de GABA dependiente de  $\text{Na}^+$  e independiente de  $\text{Ca}^{++}$  externo estimulada por veratrina y monensina, posiblemente se debe a mecanismos de intercambio sodio-calcio presente en alguno de los reservorios intracelulares, y que la liberación espontánea se lleva a cabo por otros mecanismos.

El efecto inhibitor del dantroleno en la liberación de 3H-GABA en ausencia o en presencia de calcio externo podría deberse a cualquiera de los siguientes mecanismos:

1. Inhibición de la salida de calcio de reservorios intracelulares, actuando principalmente en el retículo endoplásmico.
2. inhibición parcial del acceso de calcio a los mecanismos intracelulares de estímulo-secreción.

Para poder discernir entre estas dos posibilidades, es fundamental conocer la concentración de calcio libre intracelular en el sinaptosoma en presencia y ausencia de dantroleno, cuando se induce un incremento en la concentración intracelular de sodio por sustancias despolarizantes en ausencia de calcio externo.

Asimismo, es necesario estudiar el efecto del dantroleno sobre los flujos de  $\text{Ca}^{++}$  a través de la membrana plasmática, cuando se usan sustancias despolarizantes. Así como el empleo de  $86\text{-Rb}$  como marcador de la despolarización de la membrana plasmática y observar el flujo de este ion en el sinaptosoma en presencia y ausencia del fármaco. De esta forma, se puede saber si la liberación de 3H-GABA estimulada por sustancias despolarizantes en presencia de calcio externo, se debe a una inhibición en la entrada de calcio al sinaptosoma o por que el fármaco actúa a un nivel posterior de la despolarización de la membrana plasmática.



## Abreviaturas utilizadas.

GABA	ácido gama-aminobutírico
3H-GABA	ácido gama-aminobutírico tritiado
3H-Leucina	Leucina tritiada
EDTA	ácido etilen-dinitrilo-tetracético
EGTA	ácido etilenglicol-tetracético
SDS	dodecil sulfato de sodio
2,4-DNF	2,4-dinitrofenol
EGCP	carbonil cianuro-p-trifluorometoxi fenilhidrazona
Dantroleno	hidruro de sodio 1((5-(p-nitrofenil)furfurildeno)amino)
SNP	sistema nervioso periférico
SNC	sistema nervioso central
mV	milivoltios
mM	milimolar
mg	miligramos
ml	mililitros
ms	milisegundo
nm	nanómetros
nM	nanomolar
um	micrómetros
uM	micromolar
ul	microlitros
uCi	micro Curies
e.e.	error standard
Na <sup>+</sup>	ion sodio
K <sup>+</sup>	ion potasio
Cl <sup>-</sup>	ion cloruro
La <sup>++</sup>	ion lantano
Mg <sup>++</sup>	ion magnesio
Ni <sup>++</sup>	ion níquel
ATP	trifosfato de adenosina
Prot-	Proteínas
NADH <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
AMP cíclico	monofosfato de adenosina cíclico
cm	centímetros
Hg	mercurio

## Bibliografía

1. Gardner, E. 1973. Fundamentos de neurología. Ed. Interamericana. 3-ed. México.
2. Giese, A. 1975. Fisiología celular y general. Ed. Interamericana. 4-ed. México.
3. Robertis, E. 1977. Biología celular. Ed. Ateneo. México.
4. Barr, I. 1975. El sistema nervioso humano. Ed. Harla. 2-ed. México.
5. Wolf, B. 1975. Neurobiología. Ed. Blume. España.
6. Dyson, R. 1976. Principios de biología celular. Ed. Fondo Educativo Interamericano. México.
7. Gordon, M. 1977. Fisiología animal. CECSA. México.
8. Stevens, CH. 1980. la neurona. en: El cerebro. libros de investigación y ciencia. Ed Labor. España, 25-36.
9. Bachelard, H. 1974. Brain biochemistry. Chapman and Hall. Londres.
10. Louis, F. R. y Regis B. K. 1983. A molecular description of nerve terminal function. Ann. Rev. Biochem. 52: 871-926.
11. Miledi, R. 1973. Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. Proc. R. Soc. B. 183: 421-425.
12. Hagiwara, S. 1983. The calcium channel: Trends in Neurosci. 6(5): 189-193
13. Megraw, C. 1982. Calcium and cell function. vol 2. Acad. Press Inn. USA, 230 p.p
14. Akerman, K. 1983. Ca<sup>++</sup> transport of transmitter release in isolated nerve endings. Trends in Biochem. Sci. 8(2): 63-64.
15. Sanchez, R. G. 1983. Influencia del calcio mitocondrial en la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
16. Eygrave, F. 1978. Calcium movements in cells: Trends in Biochem. Sci. 3(8): 175-178.

17. Barrit, G. 1981. Calcium transport across cell membranes: progress toward molecular mechanisms. *Trends in Biochem. Sci.* 6(12): 322-324.
18. Lee, K. S. y R. W. Tsien. 1983. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D-600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302 (5911): 76-794.
19. Blaustein, P. M. y Obron J. C. (1975). The influence of sodium on calcium fluxes in pinched-off nerve terminals *in vitro*. *J. Physiol.* 247: 657-686.
20. Sandoval, M. E., Aquino, G. y Chavez J. L. 1985. Sodium-dependent, calmodulin-dependent transmitter release from synaptosomes. *Neuroscience Letters.* 56: 271-277.
21. Campbell, A. 1983. *Intracellular calcium*. Ed. Wiley, USA.
22. Blaustein, M. P., Ratzlaff, R. W. y Kendrick N. Y. 1980. The regulation of calcium in presynaptic ending. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 307: 195-212.
23. DeLorenzo, R. 1980. Role of calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 356: 92-109.
24. Lehninger, A. L. 1979. *Bioquímica*. 2-Ed. Ed. Omega, España.
25. Nicholls, D. 1982. Mitochondrial calcium transport. *Biochem. Biophys. Acta.* 683: 57-88.
26. Affolter, H., y Carafoli, E. 1980. The  $Ca^{++}$ - $Na^{+}$  antiporter of heart mitochondria operates electroneutrally. *Biochem. Biophys. Res.* 95(1). 193-196.
27. Carafoli, E. y Crompton, M. 1978. The regulation of intracellular calcium by mitochondria. de: Calcium transport and cell function *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 307:269-284.
28. Lowe, D. A., Richardson, B. P., P. Taylor y P. Donatsch. 1976. Increasing intracellular sodium triggers calcium release from bound pools. *Nature* 260(5549): 337-339.
29. Aunis, D. y Antonio G. G. 1981. Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and 3H-ouabain binding to plasma membranes. *Br. J. Pharmacol.* 72: 31-40.
30. Suchard, S. J., Frank, A. L., Romert, W. R. y Berton, C. P. 1982. Stimulation of catecholamine secretion from

cultured chromaffin cells by an ionophore-mediated rise in intracellular sodium. *J. Cell. Biol.* 94: 531-539.

31. Birks, R. J. y Cohen M. W. 1968. The influence of internal sodium on the behaviour of motor nerve endings. *Proc. Roy. Soc. B.* 170: 401-421.
32. Baker, F. 1975. A note on the mechanism by which inhibitor of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve. *J. Physiol.* 247: 209-226.
33. Birks, R. J. y Cohen M. W. 1968. The action of sodium pump inhibitors on neuromuscular transmission. *Proc. Roy. Soc. B.* 170: 381-399.
34. Sandoval, K. E. 1980. Sodium-dependent efflux of 3H-GABA from synaptosomes probably related to mitochondrial calcium mobilization. *J. Neurochem.* 35: 915-921.
35. Charlton, M. P. y Atwood H. L. 1977. Modulation of transmitter release by intracellular sodium in squid giant synapse. *Brain Res.* 134: 367-371.
36. Sandoval, M. E. 1981. Liberación de aminoácidos transmisores en ausencia de calcio externo. en: temas selectos de fisiología celular. UNAM, México.
37. Anton, N. K. y Mulder, H. A. 1983. 3H-noradrenaline release from brain slices induced by an increase in the intracellular sodium concentration: role of intracellular calcium stores. *J Neurochem.* 40(3): 615-621.
38. Liang, y. H. y Charlesco, R. 1983. Calcium independent release of 3H-dopamine by veratridine in pargyline and reserpine treated *Coreus striatum*. *Eur. J. Pharmacol.* 89: 153-155.
39. Charlton, P. M., C. S. Thompson., H. L. Atwood y B. Farnell. 1980. Synaptic transmission and intracellular sodium: ionophore induced sodium loading of nerve terminals. *Neurosci. Lett.* 16: 193-196.
40. Atwood, H. L., Miloton P. Ch., y C. S. Thompson. 1983. Neuromuscular transmission in crustaceans is enhanced by a sodium ionophore, monensin and by prolonged stimulation. *J. Physiol.* 335: 179-195.
41. Morgan, G. K. y S. H. Briant. 1977. The mechanism of action of dantrolene sodium. *J Pharmacol. exper. Ther.* 201(1): 138-147.

42. Sengupta, Ch. y Carafoli, E. 1980. Binding of dantrolene sodium to muscle intracellular membranes. *Febs Lett.* 117: 37-38
43. Desmedt, E. j. y K. Hainaut. 1979. Dantrolene and  $\alpha$ -23187 ionophore. Specific action on  $Ca^{2+}$ -calcium channel revealed by the aequorin method. *Bioch. Pharmacol.* 65: 641-645.
44. Cohen, J. y Yehuda, G., 1979. Effects of verapamil, dantrolene and lanthanum on catecholamine release from rat adrenal medula. *Br. J. Pharmacol.* 65: 641-645.
45. Hainaut, K. y J. E. Desmedt. 1979. Effect of dantrolene sodium on calcium movements in single muscle fibres. *Nature.* 252: 728-729.
46. Putney, W. J. y C. P. Bianchi. 1974. Site of action of dantrolene in frog sartorius muscle. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 180(1): 202-211.
47. Desmedt, E. j. y K. Hainaut. 1977. Inhibition of intracellular release of calcium by dantrolene in barnacle giant muscle fibres. *J. Physiol.* 265: 565-585.
48. Salata, J. J., A. Wasserstrom y Jalife, J. 1983. Dantrolene sodium: effects on isolated cardiac tissues. *J. Mol. Cell Card.* 15: 233-243.
49. Sihra, T. S., Ian G. S. y David G. N., 1984. Ionophore  $\alpha$ -23187, verapamil, protonophores, and veratridine influence the release of aminobutyric acid from synaptosomes by modulation of the plasma membrane potential rather than the cytosolic calcium. *J. Neurochem.* 43: 1624-1630.
50. Fricke, U. 1975. Tritosol, a new scintillation cocktail based on triton x 100. *Anal. Biochem.* 63: 555-558.
51. Lowry, D. 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.
52. Halsall, J. P. y Ellis F. R., 1983. The control of muscle contracture by action of dantrolene on the sarcolemma. *Acta. Anaesth. Scand.* 27: 229-232.
53. Whittaker, P. 1978. Mitochondria, estructura, función y formación. CECSA. México.
54. Hajos, F. 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93: 485-489.

55. Sandoval, M. E. 1981. On the role of mitochondria in neurotransmitter release. en: regulatory mechanisms of synaptic transmission. Plenum Pub. 187-203.
56. Blaustein, M. 1975. Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals *in vitro*. J. Physiol, 247: 617-655.
57. Potashner, S. 1978. Effects of tetrodotoxin, calcium and magnesium on the release of amino acids from slices of guinea-pig cerebral cortex. J. Neurochem. 31: 187-195.
58. Fuhrman, F. 1967. Tetrodotoxin, Sci. Amer. 217(2): 60-71.
59. Keynes, R. 1979. Ion channel in the nerve-cell membrane. Sci. Amer. 240(3): 126-135.
60. Kuffler, S. W. y Nicholls J. G. 1976. From neuron to brain. Sinauer Associate, Inc. E.U.A.