

03062  
leg. 7.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

ACCION DE LA 4-AMINOPIRIDINA SOBRE LA LIBERACION DE  
NEUROTRANSMISORES EN SINAPTOSOMAS

TESIS

que para obtener el grado de Maestría en Investigación  
Biomédica Básica presenta

MARIA SITGES BERRONDO

(1982)

TESIS CON  
FALLA EN ORIGEN



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.

## ORGANIZACION DE LA TESIS.

Esta tesis está organizada en 4 partes. En la parte I se tocan brevemente varios tópicos generales que consideré de interés mencionar para ubicar en un marco teórico general y facilitar la comprensión del artículo intitulado : " Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes", el cual constituye la parte II de la tesis. Este artículo acaba de ser publicado en Brain Research 250 (1982) 291-299. Al final de esta parte II, se anexa un apéndice con el fin de ampliar el punto relacionado con la especificidad de la 4-AP sobre la liberación de los neurotransmisores.

La parte III de la tesis incluye la descripción del procedimiento que se usó para demostrar que la 4-aminopiridina (4-AP) aumenta la liberación del neurotransmisor <sup>3</sup>H-acetilcolina, a partir de sinaptosomas cargados con <sup>3</sup>H-colina, y los resultados que se obtuvieron en estos experimentos.

En la parte IV se incluyen una serie de experimentos realizados con el fin de ampliar el estudio sobre el mecanismo de acción de la 4-AP, a través del uso de varias

drogas cuyos mecanismos de acción sobre ciertos canales iónicos están bien establecidos. Estos experimentos permiten descartar algunos de los posibles mecanismos de acción de la 4-AP y refuerzan la conclusión de la parte II en el sentido de la participación fundamental del ión calcio en la liberación de transmisores estimulada por la 4-AP. Las partes III y IV se refieren a experimentos realizados posteriormente al envío del manuscrito de la parte II para su publicación.

La numeración de las figuras de las partes II, III y IV es continúa.

Finalizo la tesis discutiendo brevemente , en un comentario final, la importancia del uso de la 4-AP como herramienta de trabajo para el estudio de los mecanismos responsables de la transmisión sináptica química en el sistema nervioso central.

# I N D I C E .

PARTE I. INTRODUCCION GENERAL.	1
Tipos de sinapsis.	2
Sinapsis químicas y neurotransmisores.	3
La preparación sinaptosomal.	6
Bloqueadores de los canales iónicos relacionados con la transmisión.	8
La 4-aminopiridina y la liberación de los neurotransmisores.	12
Objetivo de la tesis.	14
PARTE II. Artículo intitulado : "EFFECT OF 4-AMINO-PYRIDINE ON TRANSMITTER RELEASE IN SYNAPTOSOMES"	
<u>Brain Res.</u> 250 :291-299 (1982).	16
Apéndice de la parte II.	36
PARTE III. DETERMINACION DE LA MOLECULA RADIOACTIVA LIBERADA EN PRESENCIA DE 4-AP POR LOS SINAPTOSOMAS CARGADOS CON COLINA TRITIADA.	
Introducción.	38
Procedimiento.	40
Resultados.	41
Conclusión.	45

PARTE IV. EXPERIMENTOS SOBRE LOS POSIBLES MECANISMOS DE  
ACCION DE LA 4-AP.

Introducción. 46

Resultados y Discusión. 49

COMENTARIO FINAL. 55

BIBLIOGRAFIA. 56

## PARTE I. INTRODUCCION GENERAL.

El sistema nervioso está constituido básicamente por dos tipos de células : las células nerviosas o neuronas y las células de la neuroglia o gliales. Estas últimas representan el soporte estructural de las neuronas, participan en la transmisión sináptica e intervienen en el transporte de materiales nutritivos desde los capilares hasta las neuronas. Las neuronas son las células especializadas para la recepción de los estímulos y la conducción de los impulsos nerviosos, y son por consiguiente las responsables de la transmisión de la información. La diversidad de formas y tamaños que presentan las neuronas es considerable, pero de una manera simplista una neurona típica está compuesta por un cuerpo neuronal del que parten, por un lado las dendritas, clásicamente conceptualizadas como la porción por donde se recibe preferencialmente la información , y por otro lado, el axón con sus ramificaciones que se encarga de llevar dicha información a las células nerviosas con las que hace contacto. Los extremos terminales de las ramificaciones de un axón constituyen las terminales presinápticas de una neurona.

Toda la información que proviene del mundo exterior y llega a cada uno de nosotros es recibida, procesada y almacenada gracias a las neuronas y a sus interconexiones. La organización y funcionamiento de estas células da lugar a funciones que van desde las formas más simples de relación con el medio ambiente en los animales inferiores hasta los procesos más complejos del pensamiento humano. En vista de esto, el estudio de los mecanismos básicos que hacen posible la comunicación entre las neuronas resulta de gran interés.

### Típos de sinapsis.

La superficie de una neurona con la que hace contacto la terminal presináptica o botón sináptico de otra neurona se denomina post-sinapsis. La zona de comunicación entre las neuronas pre y post-sináptica representa la sinapsis. Tanto desde el punto de vista morfológico como desde el fisiológico, existen dos tipos de sinapsis : la eléctrica y la química. La primera prácticamente no presenta retardo sináptico y carece del espacio o hendidura sináptica de aproximadamente 20 nm que se observa entre las membranas pre y post-sináptica en las sinapsis químicas. En la sinapsis eléctrica el



área de unión entre estas membranas es simétrica en apariencia, mientras que la sinapsis química se caracteriza por la presencia de vesículas sinápticas apiladas en la vecindad de la membrana presináptica, las que junto con las mitocondrias y la mayor opacidad a los electrones contribuyen a la apariencia asimétrica entre las porciones pre y post-sinápticas que conforman las sinapsis químicas (Pappas y Waxman, 1972; Bullock et al., 1977).

Aunque la transmisión eléctrica entre las neuronas de cierto número de sitios del sistema nervioso de invertebrados y vertebrados ha sido demostrada, en el sistema nervioso central de los mamíferos sólo se han encontrado unas cuantas regiones que presentan sinapsis eléctricas, como por ejemplo: el núcleo vestibular lateral de la rata (Sotelo y Palay, 1970), el núcleo trigémino mesencefálico (Hinrichsen y Larramendi; 1968, 1970; y la célula bipolar ganglionar de la retina (Dowling y Boycott, 1966; Ogdén, 1966).

En base a los sitios de contacto entre las neuronas pre y post-sinápticas, las sinapsis se pueden clasificar como : axo-somáticas, axo-dendríticas, axo-axónicas, dendro-dendríticas y somato-somáticas. Cada una de ellas tiene a su vez ciertas variaciones estructurales según la organización de los

circuitos neuronales en, que participan (Bullock et al.,1977).

### Sinapsis químicas y neurotransmisores.

Además de las diferencias que presentan las sinapsis eléctricas y las químicas en cuanto a su estructura fina y en cuanto a la velocidad con la cual es transmitida la información desde una célula nerviosa a otra, la principal característica que las distingue reside en que las terminales nerviosas involucradas en las sinapsis químicas son capaces , a diferencia de las eléctricas, de sintetizar, almacenar y liberar "sustancias sinápticamente activas" las cuales se conocen con el nombre de neurotransmisores y pueden ser de dos tipos: excitadores e inhibidores. Los primeros funcionan despolarizando la membrana de la célula post-sináptica con la cual hacen contacto, mientras que los neurotransmisores inhibidores la hiperpolarizan y de esta manera dificultan que los impulsos excitadores simultáneos o subsecuentes produzcan una despolarización de la membrana post-sináptica suficiente para alcanzar el umbral de disparo de la neurona post-sináptica.

Entre los neurotransmisores excitadores está la acetilcolina (ACh), que es sintetizada a partir de acetyl-CoA y

colina en presencia de la enzima colinacetiltransferasa, que se encuentra localizada en el citoplasma de la terminal nerviosa colinérgica (Jope y Jenden, 1980). La colina que interviene en la síntesis de ACh proviene de la colina libre que es transportada desde el plasma sanguíneo al tejido nervioso (Choi et al., 1975; Freeman et al., 1975). Además de ésta, otra fuente importante de colina es la que se obtiene a partir de la misma ACh que es liberada desde la terminal nerviosa colinérgica e hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa, que se encuentra ubicada en la membrana neuronal, incluyendo las regiones post-sinápticas. En estudios donde se quiere evitar la hidrólisis de la ACh que ha sido liberada a la hendidura sináptica, los anticolinesterásicos como la eserina resultan de gran utilidad (Cooper et al., 1977).

Otro neurotransmisor excitador es el ácido glutámico. Sin embargo, a diferencia de la ACh, este aminoácido no sólo funge como neuroexcitador en algunas zonas del sistema nervioso central de los vertebrados, sino que también es un importante producto intermediario del metabolismo neuronal y además es el precursor directo del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), (Costa et al., 1979; Tapia, 1983), molécula que a su vez es el neurotransmisor inhibitor mas am-

pliamente distribuido en el sistema nervioso central. La enzima responsable de la conversión del ácido L-glutámico a GABA es la glutamato descarboxilasa. Esta enzima se encuentra localizada en el citoplasma de las terminales nerviosas gabaérgicas. La GABA-transaminasa es la enzima involucrada en la catálisis del metabolismo del GABA. Un inhibidor efectivo de dicha enzima es el ácido amino-oxiacético (Tapia, 1983).

#### La preparación sinaptosomal.

Gracias a la propiedad de sellarse que presentan las membranas biológicas que han sido parcialmente rotas, es posible obtener terminales nerviosas aisladas a partir de dispersiones de una estructura cerebral o de cerebro completo en sacarosa isotónica (Gray y Whittaker, 1962; de Robertis et al., 1962). Las terminales nerviosas aisladas, conocidas con el nombre de sinaptosomas, contienen en su interior toda la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis, almacenamiento y liberación de los neurotransmisores, por lo que resultan una preparación muy adecuada para estudiar el metabolismo y liberación de los mismos en diferentes condiciones experimentales (Bradford, 1975).

Puede decirse que los sinaptosomas permiten diseccionar los aspectos neuroquímicos del componente presináptico del proceso de la transmisión.

Las terminales presinápticas, fisiológicamente cuentan con la propiedad de re-captar a los neurotransmisores que han sido liberados al espacio sináptico, o en el caso de la acetilcolina a su precursor la colina, y llevarlos hasta su interior por medio de un sistema de transporte activo de alta afinidad dependiente de sodio y temperatura. Esta propiedad, que es preservada en los sinaptosomas, representa la ventaja de que cuando la preparación sinaptosomal es incubada en un medio que contiene a un determinado neurotransmisor que ha sido marcado radioactivamente, éste es captado por la preparación y se hace posible seguir su liberación o su misma captación en diferentes condiciones experimentales. Además, como los sitios de captura de alta afinidad para un tipo de neurotransmisor parecen estar localizados en las neuronas que normalmente lo sintetizan, almacenan y liberan, esta ubicación específica de sitios de captura de alta afinidad dota a las terminales nerviosas con la propiedad de poder captar selectivamente al neurotransmisor que fisiológicamente liberan ( Fonnum et al., 1981; Wilson et al., 1975). Eviden-

temente, esto representa otra ventaja de la preparación sinaptosomal, ya que a partir de una población heterogénea de sinaptosomas de cerebro completo, sólo aquellos sinaptosomas que cuentan con los sitios de captura de alta afinidad para el neurotransmisor marcado radioactivamente, que ha sido suministrado a una baja concentración, serán capaces de captarlo y liberarlo cuando sean sometidos a las condiciones que propician su liberación (Levi et al., 1978; Bradford, 1975).

Bloqueadores de los canales iónicos, relacionados con la transmisión nerviosa.

La excitación neuronal, la propagación del impulso nervioso y la liberación de los neurotransmisores a partir de las terminales nerviosas, ocurren fisiológicamente como resultado de los cambios iónicos que se producen mediante la apertura o el cierre de canales en la membrana neuronal. En estado de reposo, la composición iónica en el interior de la célula nerviosa se caracteriza por una elevada concentración de  $K^+$ , mientras que es la elevada concentración de  $Na^+$  la que caracteriza al líquido extracelular. La permeabilidad al  $Na^+$  en este estado es mucho menor que la que se observa para el  $K^+$ . Así, la diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la membrana de una célula nerviosa depende, por un lado, de los gradientes de concentración y por el otro, de la permeabilidad selectiva de la membrana. En reposo el potencial de membrana es aproximadamente de -70 milivoltios, negativo en el interior.

La propagación del impulso nervioso que nace en el origen del axón coincide con cambios repentinos en la permeabi-

lidad de la membrana a los iones, de manera que los canales que permiten la entrada de  $\text{Na}^+$  se abren, y este catión penetra en la célula cambiando transitoriamente el potencial de negativo a positivo. Este efecto, a su vez, origina que se abran canales de  $\text{K}^+$ , lo cual hace que este catión salga del axón y se repolarice la membrana. La despolarización de la terminal nerviosa que resulta de la entrada masiva del ión sodio como consecuencia de la llegada del impulso nervioso, puede producirse artificialmente en ausencia de dicho impulso sobre preparaciones "in vitro" tales como los sinaptosomas. Una forma de abordar el estudio de los canales iónicos involucrados en el funcionamiento de la transmisión química, es a través de la disección farmacológica que se basa en el empleo de drogas capaces de abrir o de bloquear selectivamente a un canal específico. Esto hace posible discriminar qué alteraciones en la transmisión ocurren con el canal bloqueado, y qué eventos son primordiales o secundarios para que la transmisión química se lleve a cabo. Por ejemplo, es posible usar drogas que abren los canales de sodio dependientes de voltaje como la veratridina; también es posible des-



polarizar artificialmente a las preparaciones sinaptosomales con medios que contengan una elevada concentración de  $K^+$ , ya que en estas condiciones el gradiente electroquímico se invierte.

El descubrimiento de la tetrodotoxina (TTX), que es un bloqueador altamente específico de los canales de sodio sensibles a voltaje, ha permitido progresar considerablemente en este campo. En axones gigantes de cucaracha (Pelhate y Pichon, 1974) y en el axón gigante del calamar (Yeh et al., 1976) ha sido demostrado que la 4-aminopiridina (4-AP) bloquea selectivamente la corriente de potasio a través de la membrana en ambos sentidos. La 3,4-aminopiridina, también en el axón gigante del calamar, ha demostrado ser un potente bloqueador selectivo de los canales de potasio (Kirsh y Narahashi, 1978). Este bloqueo selectivo que producen las aminopiridinas se consigue con concentraciones del orden micromolar, lo cual las convierte en "herramientas" de considerable interés para la investigación de la transmisión sináptica.

Otro canal sensible a voltaje de considerable importancia en relación a la transmisión química es el canal de calcio sensible a voltaje (Miledi, 1973). En experimentos con

pinza de voltaje en la terminal presináptica del ganglio estrellado del calamar, Llinás (1977) demostró que el potencial excitatorio en la fibra post-sináptica era precedido por una entrada de calcio a la terminal presináptica la cual ocurría 200  $\mu$ seg antes de la aparición de dicho potencial. El registro intracelular de la fibra post-sináptica, que provee una medida de la cantidad de transmisor liberado, simultáneamente con mediciones de la corriente de calcio hacia el interior de la terminal presináptica, demostró que había una correlación directamente proporcional entre estos dos fenómenos (Llinás y Heuser, 1977).

Tanto el colorante inorgánico rojo de rutenio (RuR) como el catión trivalente lantano ( $\text{La}^{+3}$ ), actúan como bloqueadores de los canales de calcio. El bloqueo de la unión y del transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  que produce el RuR ha sido demostrado en varias membranas biológicas (Goddard y Robinson, 1976; Kamino et al., 1976; Swanson et al., 1974; Madeira y Madeira, 1973; Moore, 1971; Reed y Bygrave, 1974; Vasington et al., 1972). En cuanto al  $\text{La}^{+3}$  es conocido desde hace tiempo como un bloqueador de los movimientos de  $\text{Ca}^{+2}$  y de muchos fenómenos bio-

lógicos que dependen de este catión (Weiss, 1974). Heuser y Miledi (1971) demostraron en la placa neuromuscular que la presencia de  $\text{La}^{+3}$  1 mM, aunque no impide la invasión de los impulsos nerviosos a las terminales, sí impide la liberación del neurotransmisor estimulada eléctricamente y dependiente de calcio.

La 4-aminopiridina y la liberación de los neurotransmisores.

Además de los trabajos que demuestran el efecto de las aminopiridinas como bloqueadores específicos de los canales de  $\text{K}^{+}$ , también hay varios estudios que demuestran que las aminopiridinas producen un aumento sobre la liberación de los neurotransmisores en diferentes preparaciones. En la placa neuromuscular la 4-AP aumenta la liberación de ACh (Lundh, 1978; Lundh y Thesleff, 1977; Molgó et al., 1977 ; Molgó et al., 1979 ); su acción sobre las sinapsis de la médula espinal también ha sido estudiada ( Lemeignan, 1973 ; Jankowska et al., 1977 ), así como su efecto sobre la liberación de ACh a partir de ileo de cobayo ( Vizi et al., 1977) y sobre la liberación de noradrenalina a partir de preparaciones como el bazo de gato ( Kirpekar et al., 1977 ) y la vena porta de rata ( Leander et al., 1977 ). Estos datos

sugieren que el bloqueo de los canales de potasio producido por las aminopiridinas se traduce en un incremento de la liberación de los neurotransmisores en general. Sin embargo, es bien sabido que al elevarse la concentración del ión calcio en la terminal nerviosa se promueve la liberación del neurotransmisor contenido en ella ( Miledi, 1973; Rubin, 1974; Llinás y Nicholson, 1975; Llinás y Heuser, 1977 ).

Como el aumento sobre la liberación de los neurotransmisores producido por la 4-AP es dependiente de la presencia de calcio externo ( Thesleff, 1980; Vizi et al., 1977) y esta droga es capaz de revertir "in vivo" la parálisis flácida inducida por la inyección intraperitoneal de RuR (Tapia, 1982), es probable que el mecanismo por medio del cual la 4-AP bloquea los canales de potasio esté relacionado con la inducción de la entrada de calcio a las terminales nerviosas, propiciando así la salida de los neurotransmisores. El bloqueo de la salida de  $K^+$  puede prolongar el potencial de acción y mantener abiertos los canales de calcio sensibles a voltaje por un periodo mas largo de tiempo ( Mólgo et al., 1977).

Objetivo de la tesis.

El mecanismo por el cual las aminopiridinas pueden aumentar la entrada de calcio y así inducir la liberación de los neurotransmisores no se conoce. Hay autores que proponen que la 4-AP puede tener una acción directa sobre la cinética del canal de calcio (Lundh y Thesleff, 1977); otros (Vizi et al., 1977) sugieren que la 4-AP disminuye los requerimientos de calcio externo para el acoplamiento de la excitación-secreción y otros más sugieren que la droga actúa intracelularmente después de haber atravesado la membrana de la célula nerviosa (Lundh, 1978; Molgó et al., 1980). De una u otra forma, como la 4-AP estimula la liberación de los neurotransmisores a partir de las terminales presinápticas y no parece afectar los mecanismos post-sinápticos de la transmisión, pensamos que el estudio, en diferentes condiciones experimentales, de su acción sobre la liberación de distintos neurotransmisores a partir de sinaptosomas, donde se hace posible evitar las influencias de otros elementos tisulares, podría contribuir a esclarecer qué mecanismos del componente presináptico de la transmisión están siendo afectados por esta droga. Asimismo, es claro que esta información puede ayudar a entender los mecanismos de liberación de neu-

rotransmisores en sinapsis del sistema nervioso central, y a establecer las posibles diferencias entre los diversos neurotransmisores.

En vista de que los trabajos en la placa neuromuscular demuestran que el efecto de la 4-AP se obtiene sobre la liberación de acetilcolina estimulada eléctricamente, pero no sobre la liberación espontánea de este neurotransmisor ( Kim et al., 1980; Lundh, 1978; Lundh et al., 1977a; Thesleff, 1980 ), decidimos estudiar inicialmente el efecto de la 4-AP sobre la liberación de acetilcolina en sinaptosomas despolarizados con alta concentración de  $K^+$  y proseguimos estudiando la acción de la 4-AP sobre su liberación espontánea, tanto en presencia como en ausencia de calcio. En la misma serie experimental se incluyeron otros dos importantes neurotransmisores centrales ya mencionados, el GABA y el ácido glutámico. Estos aminoácidos, particularmente el primero, juegan un papel fundamental como neurotransmisores en sinapsis centrales, por lo que el estudio de sus mecanismos de liberación es de gran interés. Los resultados obtenidos de la realización de estos experimentos y otros relacionados están contenidos en el artículo intitulado : "Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes" que se incluye a continuación (Parte II).

PARTE II.

EFFECT OF 4-AMINOPYRIDINE ON TRANSMITTER RELEASE IN SYNAPTOSOMES

Ricardo Tapia and María Sitges  
Departamento de Neurociencias  
Centro de Investigaciones en Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 70-600, 04510-México, D.F.  
(México)

Key words: 4-aminopyridine - synaptosomes - calcium - GABA release -  
ACh release - potassium depolarization

Please send proofs and correspondence to Ricardo Tapia, at the above address

## SUMMARY

The effect of 4-AP on the release of labeled transmitters in mouse brain synaptosomes was studied in a superfusion system. 4-AP at  $\mu\text{M}$  concentrations notably stimulated the spontaneous release of labeled GABA and glutamate, and of acetylcholine (ACh) derived from tritiated choline. No effects on the release of labeled  $\alpha$ -aminoisobutyric acid were observed. The stimulation of GABA and ACh release was dependent on the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the superfusion media, whereas the effect on glutamate release was more variable and no clear  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence was observed. In contrast to these results, 4-AP did not have any effect on the release of the above transmitters stimulated by  $\text{K}^+$ -depolarization in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . These results are discussed in terms of the possible participation of  $\text{Ca}^{2+}$  in the action of 4-AP on spontaneous transmitter release in isolated nerve endings.



## INTRODUCTION

Some aminopyridines are interesting tools to study transmission in chemical synapses, since they have been shown to stimulate the release of neurotransmitters from presynaptic nerve endings without affecting postsynaptic mechanisms (reviewed by Thesleff<sup>22</sup>). 4-Aminopyridine (4-AP) notably enhances the impulse-evoked acetylcholine (ACh) release in neuromuscular junctions<sup>12,15,18,19</sup> and facilitates neurotransmitter release at both excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord.<sup>5</sup> Furthermore, 4-AP antagonizes the inhibitory effect of botulinum toxin and of some antibiotics on ACh release,<sup>13,14,23</sup> as well as the paralyzing effect of this toxin in vivo.<sup>14</sup>

Although the mechanism of the stimulatory effect of 4-AP on transmitter release is still unclear, it has been suggested that an enhanced influx of  $\text{Ca}^{2+}$  into the nerve endings produced directly, or indirectly as a consequence of  $\text{K}^+$  efflux blockade, may be involved in this action.<sup>12,18,19,21</sup> Since the intraterminal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is directly related to the release of neurotransmitters,<sup>10,17</sup> such an effect of 4-AP would be responsible for its releasing action.

Most of the work with 4-AP has been carried out in neuromuscular preparations with electrical recordings of the postsynaptic response to ACh. In the present study we have investigated in a superfusion system the action of 4-AP on the spontaneous and the  $\text{K}^+$ -stimulated release of labeled transmitters in isolated nerve endings (synaptosomes) obtained from mouse brain, as well as the calcium requirements for this action. We have found that 4-AP notably enhanced the spontaneous release of transmitters and

that this effect was dependent to a great extent on the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### MATERIALS AND METHODS

A purified synaptosomal fraction from mouse brain was obtained by the method of Hajós,<sup>4</sup> slightly modified. The final synaptosomal pellet was resuspended in a small volume of 0.32 M glucose for release experiments. The release of neurotransmitters was studied by the superfusion technique previously described in detail,<sup>21</sup> except that we used as superfusion chambers Millipore 25 mm Swinnex, modified in their upper part in order to hold about 10 ml of superfusion medium, instead of the Perspex chambers previously employed. Since these chambers do not have a temperature jacket, the superfusing media were maintained at 37°C before use. Aliquots of the final synaptosomal pellet (approx. 0.8 mg protein) were preincubated in 10 ml flasks for 10 min at 37°C in 5 ml of Krebs-Ringer medium (118 mM NaCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.7 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.17 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 5.6 mM glucose, pH 7.4; the medium contained also 0.1 mM aminooxyacetic acid in the experiments with amino acids and 0.1 mM eserine in those with choline). In the experiments with labeled GABA and glutamic acid, a mixture of [ $^3\text{H}$ ] GABA (0.83  $\mu\text{Ci}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  final concentration), and [ $^{14}\text{C}$ ] glutamic acid (1.4  $\mu\text{Ci}$ , 1.4  $\mu\text{M}$  final concentration) was added and the incubation was continued for 10 min. In other experiments [ $^3\text{H}$ ] choline (2  $\mu\text{Ci}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  final concentration) or [ $^3\text{H}$ ]  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (2.5  $\mu\text{Ci}$ , 0.03  $\mu\text{M}$  final concentration), were added. At the end of this uptake incubation period aliquots containing

0.2-0.3 mg protein were placed on 0.65  $\mu$ m Millipore filters lying on the multiperforated support of the superfusion chambers. After washing with 8-10 ml of the same uptake medium by superfusing at the highest speed of the peristaltic pump, the speed was adjusted to superfuse the filters at a rate of 0.5 ml/min and fractions were collected each min directly in scintillation vials. At 6 min the medium was quickly substituted by a medium containing 47 mM  $K^+$  or different concentrations of 4-AP. In the high potassium media, KCl replaced an equimolar concentration of NaCl. In some experiments  $Ca^{2+}$  was absent from the media from the beginning of the superfusion, and EGTA was added, as indicated in Results.

Four to eight superfusion chambers were arranged in parallel, and with the aid of a multichannel peristaltic pump (Manostat), it was possible to study simultaneously different experimental conditions. At the end of the superfusion period the radioactivity in the fractions and in the filter was counted in a Packard TriCarb scintillation spectrometer after the addition of 5 ml of Tritosol.<sup>3</sup> The results are expressed as per cent of total radioactivity released per min (total radioactivity = total released plus that remaining in the filters). In the experiments in which [ $^3H$ ] GABA and [ $^{14}C$ ] glutamate were added simultaneously, the scintillation counter was adjusted for double label counting. In each experiment the spillover of  $^{14}C$  on  $^3H$  was calculated from standard mixtures of the labeled amino acids, and this value (about 18%) was used to correct all experimental results.

[2,3- $^3H$ ] GABA (sp. act. 36 Ci/mmol), L-[U- $^{14}C$ ] glutamic acid (sp. act. 240 mCi/mmol), [methyl- $^3H$ ] choline chloride (sp. act. 80 Ci/mmol) and

[methyl- $^3\text{H}$ ]  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (sp. act. 36 Ci/mmol), were obtained from New England Nuclear (Boston, MA). 4-AP, aminooxyacetic acid, eserine sulfate, and EGTA were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

## RESULTS

In the initial series of experiments, we studied the effect of 4-AP on the release of labeled GABA and ACh stimulated by high  $\text{K}^+$  concentration in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . As can be seen in Fig. 1, 4-AP present in the 47 mM  $\text{K}^+$  medium at 0.2 or 2.0 mM concentrations did not affect the stimulation of the release of [ $^3\text{H}$ ] GABA produced by  $\text{K}^+$  depolarization. In the ACh experiments, synaptosomes were loaded with [ $^3\text{H}$ ] choline and the effect of 4-AP on the release of radioactivity stimulated by high  $\text{K}^+$  was studied. Although no separation of the labeled choline and ACh was attempted, the radioactivity released may be assumed to be ACh, since we have previously found,<sup>20</sup> and confirmed in these series of experiments (not shown), that under our experimental conditions the  $\text{K}^+$ -stimulated release is dependent on the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium, and it is known that this dependence occurs for ACh but not for choline.<sup>1,26</sup> In these experiments two depolarizing  $\text{K}^+$  concentrations (20 and 47 mM) were used, in an attempt to obtain a submaximal release of ACh which would allow to see more easily a possible enhancing effect of 4-AP on the  $\text{K}^+$  stimulated release. However, as shown in Fig. 2, no significant difference was observed between the releasing effect of 20 and 47 mM  $\text{K}^+$ , and 4-AP present in these high  $\text{K}^+$  media did not further stimulate the release.

A different approach was also used to investigate whether 4-AP could

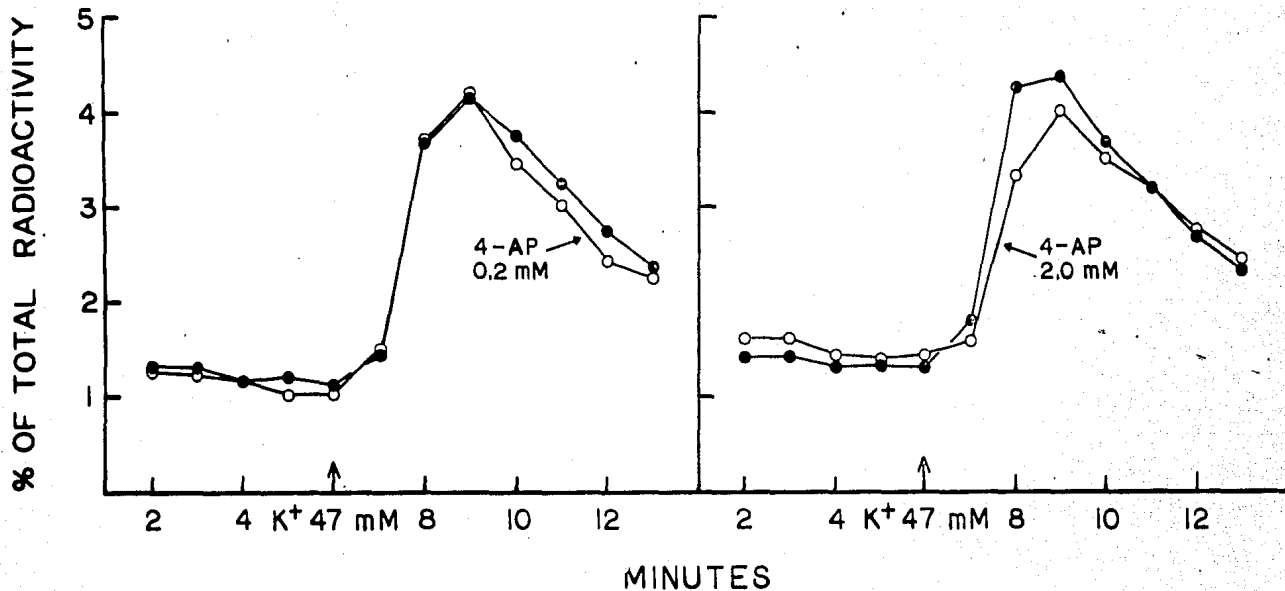


Fig.1. Effect of 4-AP on  $K^+$ -stimulated release of  $[^3H]$  GABA. Synaptosomes loaded with labeled GABA were superfused with normal Krebs-Ringer medium as described in Materials and Methods. At 6 min (arrow) the medium was quickly substituted by a high  $K^+$  (47 mM) medium without ( $\bullet$ ) or with 0.2 or 2.0 mM 4-AP, as indicated. Each point is the mean value of 3 experiments. The differences between control and 4-AP were not significant ( $p > 0.1$ ).

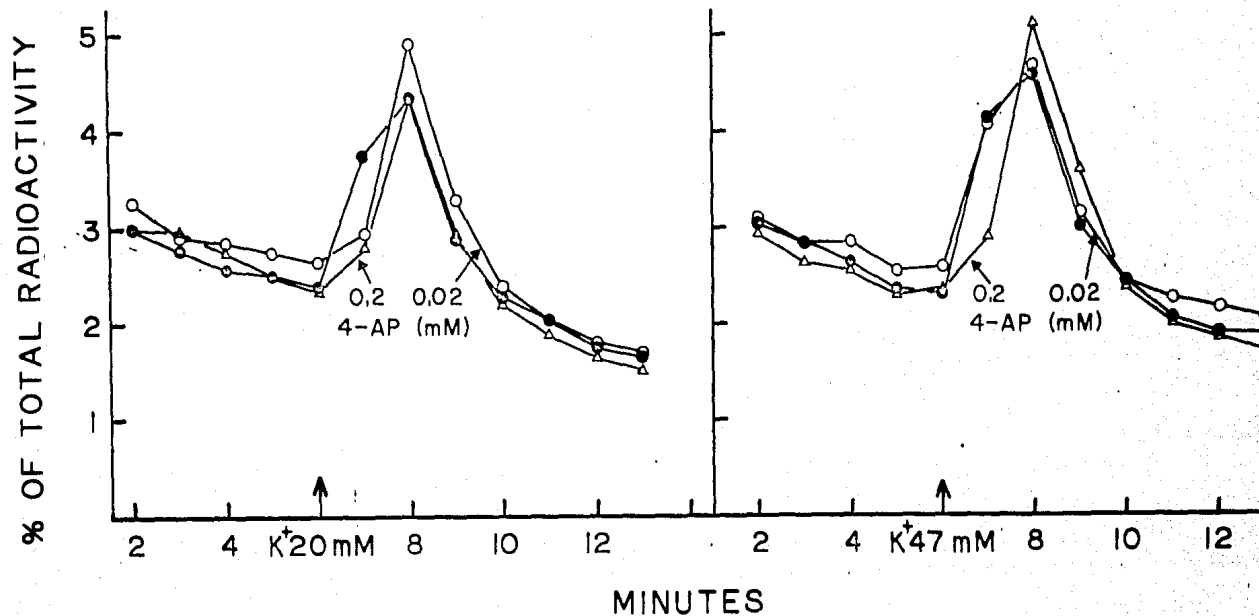


Fig.2. Effect of 4-AP on  $K^+$ -stimulated release of  $[^3H]$  ACh. Details as for fig. 1 except that labeled choline was used to load the synaptosomes, as precursor of ACh, and that two  $K^+$  concentrations were used to stimulate the release, as indicated below the 6 min arrows. Each point is the mean value of 4-6 experiments. The differences between control and 4-AP were not significant ( $p > 0.1$ ).

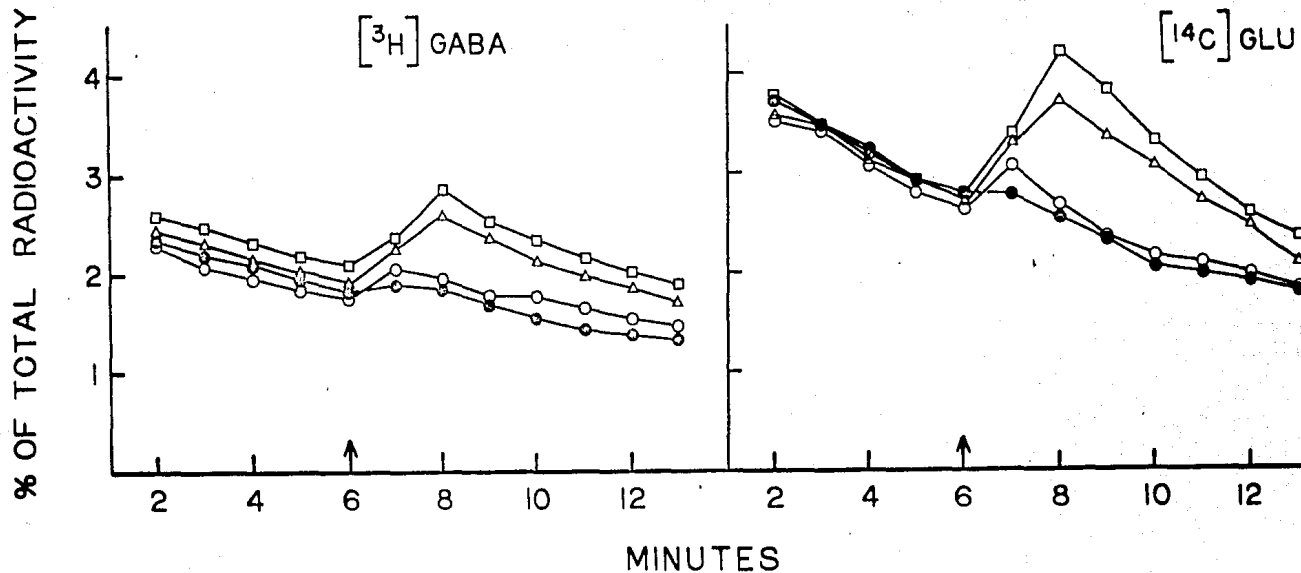


Fig. 3. Effect of 4-AP on the release of labeled GABA (left panel) and glutamate (right panel) in  $K^+$ -depolarized synaptosomes. Synaptosomes loaded with the amino acids were superfused with a high  $K^+$  (47 mM),  $Ca^{2+}$ -free medium containing 0.5mM EGTA, and at 6 min (arrow) the medium was substituted by the same medium ( $\bullet$ , control) or by the same medium containing 2.5 mM  $Ca^{2+}$  ( $\Delta$ ), 2mM 4-AP ( $\square$ ), or 0.2mM 4-AP ( $\circ$ ). Each point is the mean value of 4 experiments.

stimulate the release of labeled transmitters in depolarized synaptosomes. Synaptosomes were superfused initially with a 47 mM  $K^+$  medium but transmitter release was prevented by the omission of  $Ca^{2+}$  and the addition of EGTA to the medium. The results of these experiments are shown in Fig. 3. The release of labeled GABA and glutamic acid was stimulated when the high  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ -free medium was replaced by a high- $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ -containing medium. A similar stimulation to that produced by  $Ca^{2+}$  was observed by a medium containing 2 mM 4-AP, in the absence of  $Ca^{2+}$ . However, smaller concentrations of this drug (0.2 mM) had no significant effect on the release of GABA and glutamate (Fig. 3).

In contrast to the lack of effect of 4-AP on the  $K^+$ -stimulated release of transmitters, when the normal low  $K^+$  Krebs-Ringer medium was substituted by the same medium containing 4-AP, a notable stimulation of the spontaneous release of labeled GABA, glutamate and ACh was observed (Figs. 4 and 5). In the case of GABA and ACh this stimulatory effect was observed with 4-AP concentrations as low as 0.02 mM, and the effect of the drug was abolished or considerably diminished when  $Ca^{2+}$  was absent and EGTA was present in the superfusion media (Figs. 4 and 5). As mentioned above, the  $Ca^{2+}$ -dependence of radioactivity release by 4-AP can be taken as an indication that ACh is being released. As summarized in Fig. 5, the per cent stimulation of GABA and ACh release by 4-AP in the presence of  $Ca^{2+}$  was dependent on the concentration of the drug between 0.02 and 0.05 mM. No further stimulation of GABA release was observed with 0.2 or 2.0 mM 4-AP. The dependence of this effect on external  $Ca^{2+}$  was absolute in the case of ACh, and it was also very notable for GABA, even with the highest concentration of 4-AP used. In contrast, the stimulation of glutamate release by 4-AP was in general more



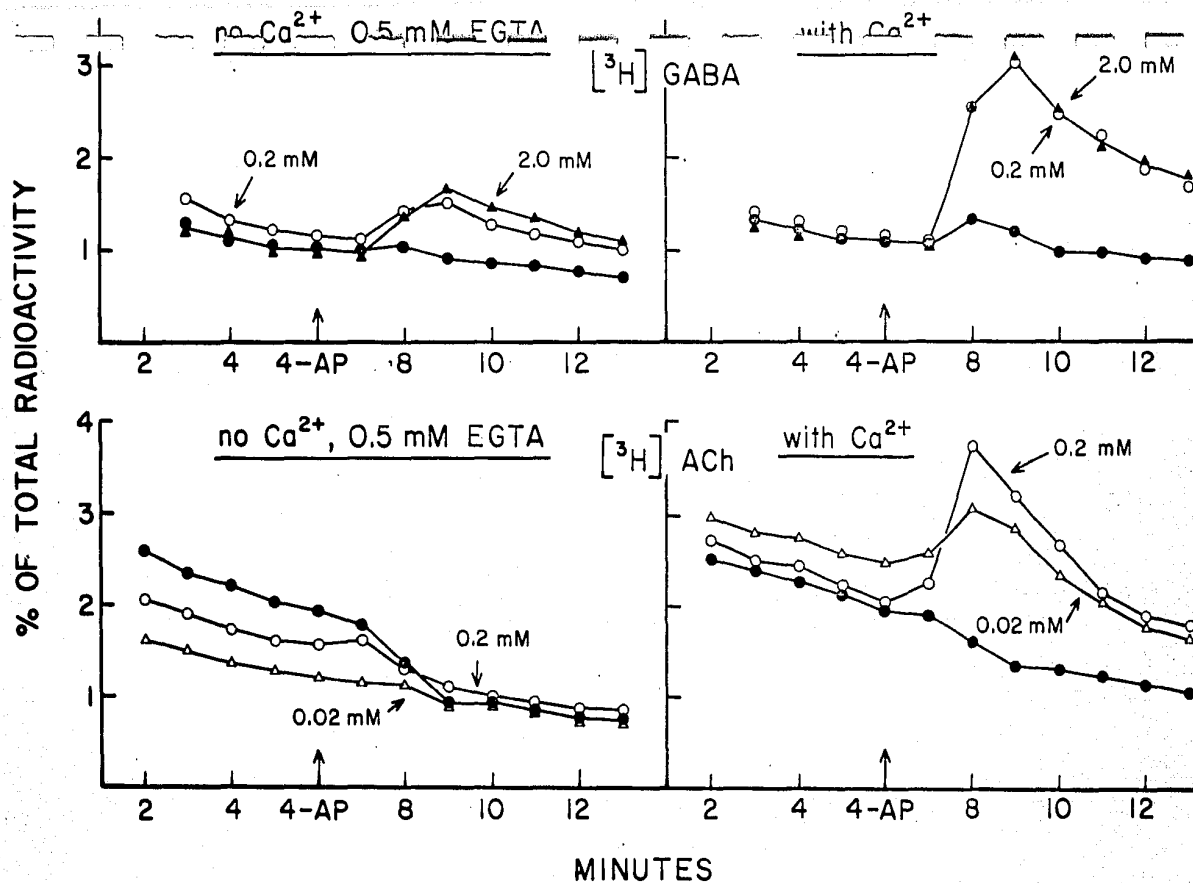
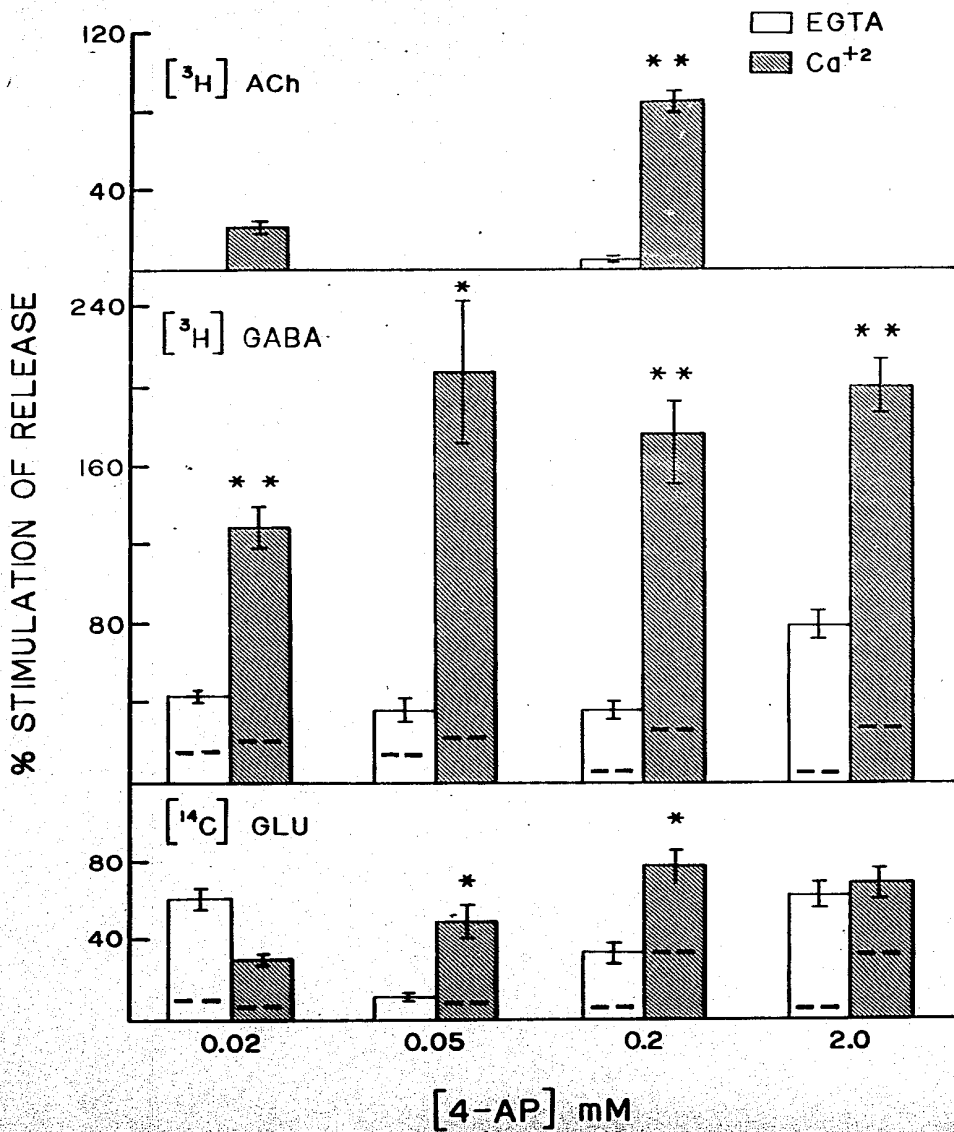


Fig. 4. Effect of 4-AP on the spontaneous release of [<sup>3</sup>H]GABA (top panels) and [<sup>3</sup>H]ACh (bottom panels) in the absence (left panels) and in the presence (right panels) of Ca<sup>2+</sup>. Details as for Fig.1 except that at 6 min (arrow) the medium was substituted by the same low K<sup>+</sup> medium (●, control), or by the same medium containing 0.02–2.0 mM 4-AP, as indicated for each curve. The left panels show the results obtained with Ca<sup>2+</sup>-free media containing 0.5 mM EGTA, and the right panels those obtained with medium with 2.5 mM Ca<sup>2+</sup> and without EGTA. Each point is the mean value of 4 experiments.



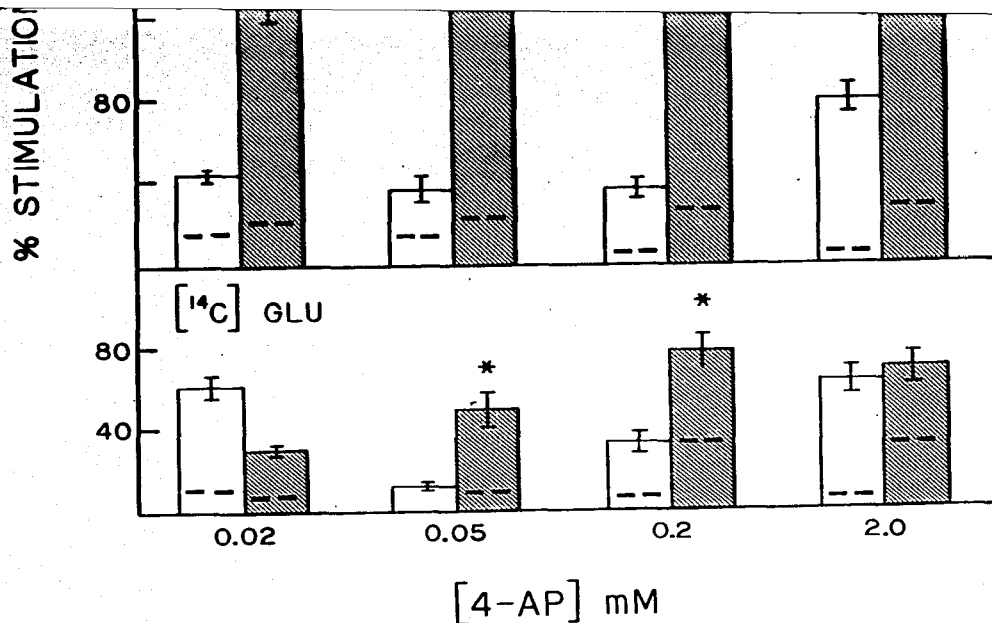


Fig. 5. Per cent stimulation by 4-AP of the spontaneous release of labeled ACh, GABA and glutamate, in the absence (empty bars, EGTA) and in the presence (shaded bars) of  $\text{Ca}^{2+}$ . The per cent data shown were calculated as the peak value of release as compared to the lowest value prior to the change to the superfusion media containing 4-AP. Each bar indicates the S.E.M. for the number of experiments indicated in Fig. 4 (3 experiments for glutamate). The dashes on each bar indicate the change observed in the control curves. The asterisks on top of the bars represent the significance of the differences between the absence and the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  for each 4-AP concentration (t test): \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; for ACh at 0.02 mM 4-AP the value in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  is zero. For GABA and glutamate the differences between the changes in the control curves and the stimulation by 4-AP, in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , were all significant ( $p < 0.001$  or  $p < 0.01$ ), with the exception of 0.05 mM 4-AP ( $p > 0.1$ ).

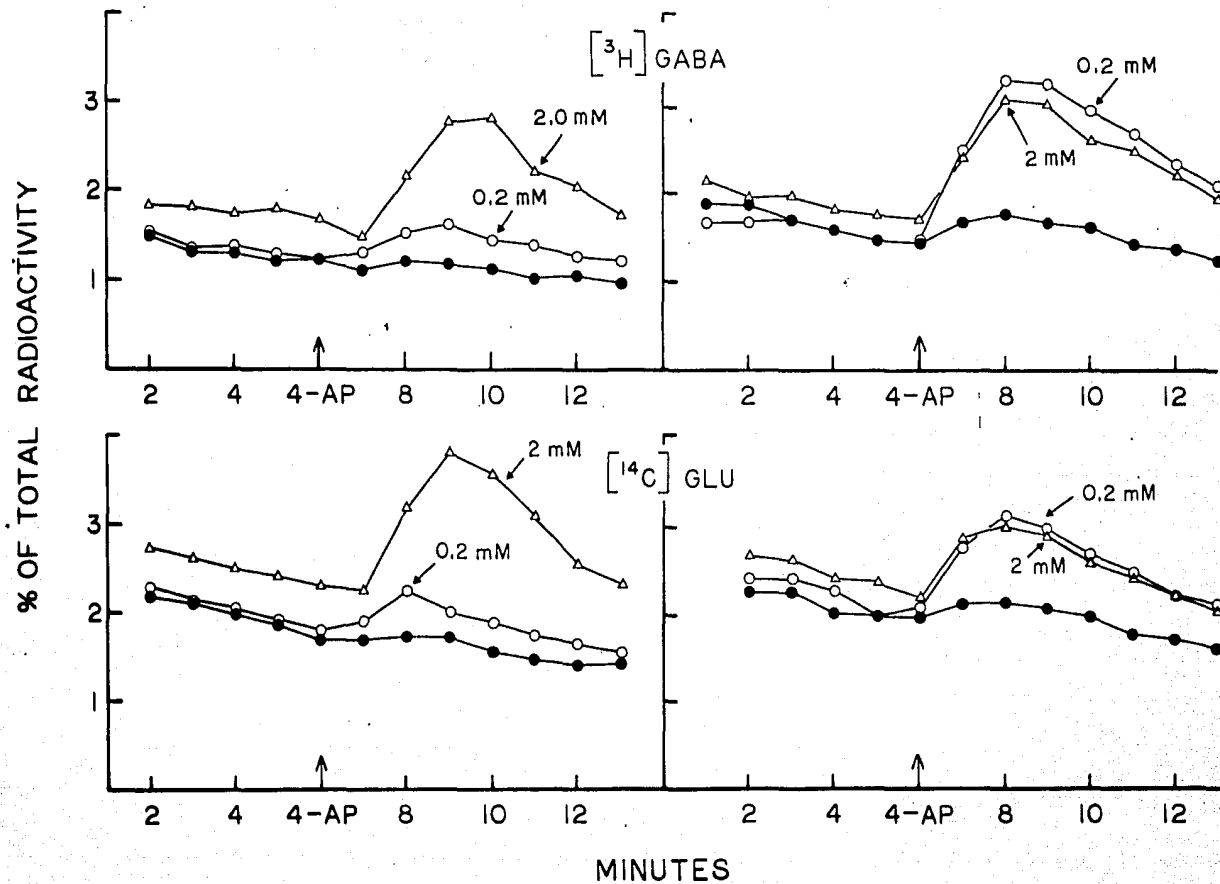


Fig. 6. Effect of 4-AP on the spontaneous release of labeled GABA (top panels) and glutamic acid (bottom panels), in the absence (left panels) and in the presence (right panels) of  $\text{Ca}^{2+}$ . Details as for Fig. 4, except that no EGTA was added to the  $\text{Ca}^{2+}$ -free media. Each point is the mean value of 3 experiments.

variable and less dependent on external  $\text{Ca}^{2+}$ . The release of GABA was stimulated by the drug 2-4 fold more than that of ACh or glutamate (Fig. 5).

The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of the effect of 4-AP on the spontaneous release of GABA and glutamate was also studied in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium to which no EGTA was added. As shown in Fig. 6, under these experimental conditions no difference was observed in the stimulation of GABA release by 2 mM 4-AP in the absence and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , whereas with 0.2 mM 4-AP a partial  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence was observed with both GABA and glutamate.

In order to assess the specificity of the stimulatory effect of 4-AP on transmitter release, a series of experiments was carried out using labeled  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, an analog of GABA normally absent in nervous tissue. This amino acid was not well retained by the synaptosomes, and its release was not affected neither by high  $\text{K}^+$  nor by 4-AP, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium.

## DISCUSSION

The results of the present report show that 4-AP at  $\mu\text{M}$  concentrations is capable of stimulating the spontaneous release of three putative central neurotransmitters, GABA, glutamate and ACh, in synaptosomes, whereas it has no action on their release stimulated by  $\text{K}^+$ -depolarization. A possible explanation for these findings is that depolarization by  $\text{K}^+$  in our experimental conditions induces a maximal stimulation of release which cannot be increased further, whereas in the resting state the releasing mechanism is sensitive to the effect of 4-AP. This interpretation is supported by the observation that 2 mM 4-AP was capable of stimulating the release of GABA and glutamate in  $\text{K}^+$ -depolarized synaptosomes under

conditions (absence of  $\text{Ca}^{2+}$ ) which prevent the release normally induced by depolarization (Fig. 3).

These results are at variance with those obtained in mammalian neuromuscular junctions, in which marked enhancement of the stimulated release of ACh, but in general no effects on spontaneous transmitter release, have been observed with 4-AP.<sup>6,12,14,22</sup> However, in frog endplates increases in the frequency of miniature endplate potentials (mEPP) by 4-AP treatment, and the occurrence of giant potentials after treatment with the more potent aminopyridine, 3,4-AP, have been reported.<sup>2,12,16</sup> The discrepancy of these results and the present study might be due to the differences in the stimulation procedure. Whereas in the neuromuscular preparations action potentials were induced by electrical stimulation, in our experiments relatively long exposure to high  $\text{K}^+$  concentration was used. In other peripheral synapses in which transmitter release has been measured chemically or radioisotopically instead of recording the postsynaptic response, a stimulation of spontaneous transmitter release by 4-AP was observed, similarly to our results in synaptosomes. Leander et al.<sup>8</sup> have shown that 1 mM 4-AP stimulated the spontaneous release of labeled noradrenaline from rat portal vein in vitro, although no studies on the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of this phenomenon were done. In guinea pig ileum preparation, 4-AP at  $\mu\text{M}$  concentrations produced a remarkable stimulation of the spontaneous release of ACh, which was reduced in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium and completely abolished when EDTA was present in the medium.<sup>25</sup> These results are therefore similar to the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent increases in spontaneous release of GABA and ACh produced by  $\mu\text{M}$  concentrations of 4-AP in synaptosomes (Figs. 4 and 5).

4-AP showed some stimulatory effect on GABA and glutamate release which was not dependent on external  $\text{Ca}^{2+}$ , particularly at the highest concentration used. A similar  $\text{Ca}^{2+}$ -independent effect on noradrenaline release has been reported in cat spleen with high concentrations (10 mM) of 4-AP.<sup>7</sup> In this tissue 0.5-1 mM 4-AP enhanced the release of noradrenaline produced by electrical stimulation, but no enhancing effect was observed, similarly to our results in synaptosomes, when the tissue was depolarized by high  $\text{K}^+$  concentration. In frog neuromuscular junction it has also been found that the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent increase in mepg frequency produced by  $\text{K}^+$ -depolarization was not affected by 4-AP.<sup>24</sup>

Our results suggest that the mechanism of action of  $\mu\text{M}$  concentrations of 4-AP on spontaneous neurotransmitter release in isolated nerve endings from the central nervous system probably involves an enhancement of  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the terminals. Although it cannot be excluded that 4-AP might have a depolarizing effect on the synaptosomal membrane,<sup>9,11,16</sup> another explanation for the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent stimulation of release by 4-AP might be a ionophore-like action. However, we have been unable to find a stimulation by 4-AP of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx into synaptosomes, under conditions in which a 2-3 fold stimulation by  $\text{K}^+$ -depolarization is observed (Tapia and Morales, unpublished experiments). Therefore, a more likely explanation for the action of 4-AP seems to be a lowering of the  $\text{Ca}^{2+}$  requirements of the transmitter release process. This mechanism has been previously suggested by Vizi et al.<sup>25</sup> to explain the effects of 4-AP on ACh release in the guinea pig ileum. This interpretation is supported by their and our findings that  $\text{Ca}^{2+}$  omission in the medium is not enough to prevent the effect of 4-AP, but a  $\text{Ca}^{2+}$  chelator needs to be present in order to completely abolish it. The stimulatory effects of 4-AP in the presence

of EGTA, especially at 2 mM concentration, might also be accounted for by a lowering of  $\text{Ca}^{2+}$  requirements, such that the residual  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium might be sufficient to trigger the release.

The fact that the releasing effect of 4-AP was quantitatively different between GABA, ACh and glutamate suggests that not all central transmitters are equally sensitive to 4-AP action, at least under our experimental conditions of synaptosomes superfusion. However, these differences might only reflect the capacity of the transmitter systems for release, since they were observed also with  $\text{K}^+$ -stimulation. In any case, the action of 4-AP seems to be specific for neurotransmitters, since the release of  $\alpha$ -AIB was not affected by the drug.

In conclusion, we have demonstrated that 4-AP is capable of stimulating the basal release of transmitters in isolated nerve endings from the central nervous system. This stimulation seems to involve a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism and apparently does not require depolarization of the terminals, although a depolarizing action by 4-AP itself cannot be excluded. These results indicate that 4-AP is a useful tool for studying the release mechanisms in synaptosomes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grant No. PCCBNAL 790214 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México, D.F.).



REFERENCES

1. Carrol, P.T. and Goldberg, A.M., Relative importance of choline transport to spontaneous and potassium depolarized release of ACh, J. Neurochem., 25 (1975) 523-527.
2. Durant, N.N. and Marshall, I.G., The effects of 3,4-diaminopyridine on acetylcholine release at the frog neuromuscular junction, Europ. J. Pharmacol., 67 (1980) 201-208.
3. Fricke, U., Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100, Analyt. Biochem., 63 (1975) 555-558.
4. Hajós, F., An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity, Brain Research, 93 (1975) 485-489.
5. Jankowska, E., Lundberg, A., Rudomin, P. and Sykova, E., Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord, Brain Research, 136 (1977) 387-392.
6. Kim, Y.I., Goldner, M.M. and Sanders, D.B., Facilitatory effects of 4-aminopyridine on normal neuromuscular transmission, Muscle & Nerve, 3 (1980) 105-111.
7. Kirpekar, M., Kirpekar, S.M. and Prat, J.C., Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation, J. Physiol. (Lond.), 272 (1977) 517-528.
8. Leander, S., Arner, A. and Johansson, B., Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro, Europ. J. Pharmacol., 46 (1977) 351-361.
9. Lemeignan, M., Analysis of the effects of 4-amino pyridine on the lumbar spinal cord of the cat. II-Modifications of certain spinal inhibitory phenomena, post-tetanic potentiation and dorsal root potentials, Neuropharmacology, 12 (1973) 641-651.

10. Llinás, R. and Nicholson, C., Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 72 (1975) 187-190.
11. Llinás, R., Walton, K. and Eehr, V., Synaptic transmission in squid giant synapse after potassium conductance blockage with external 3- and 4-aminopyridine, Biophys. J., 16 (1976) 83-86.
12. Lundh, H., Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission, Brain Research, 153 (1978) 307-318.
13. Lundh, H., Cull-Candy, S.G., Leander, S. and Thesleff S., Restoration of transmitter release in botulinum-poisoned skeletal muscle, Brain Research, 110 (1976) 194-198.
14. Lundh, H., Leander, S. and Thesleff, S., Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat, J. neurol. Sci., 32 (1977) 29-43.
15. Lundh, H. and Thesleff, S., The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals, Europ. J. Pharmacol., 42 (1977) 411-412.
16. Marshall, I.G., Lambert, J.J. and Durant, N.N., Inhibition of aminopyridine-induced contractile activity in skeletal muscle by tetrodotoxin and by magnesium, Europ. J. Pharmacol., 54 (1979) 9-14.
17. Miledi, R., Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals, Proc. roy. Soc. B, 183 (1973) 421-425.
18. Molgó, J., Lemeignan, M. and Lechat, P., Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction, J. Pharmacol. exp. Therap., 203 (1977) 653-663.

19. Molg6, J., Lemignan, M. and Lechat, P., Analysis of the action of 4-aminopyridine during repetitive stimulation at the neuromuscular junction, Europ. J. Pharmacol., 53 (1979) 307-311.
20. Tapia, R. and Arias, C., Calcium transport and the release of neurotransmitters: effects of drugs in vivo and in vitro. In R. Tapia and C.W. Cotman (Eds.), Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission, Plenum Press, New York, 1981, pp. 169-186.
21. Tapia, R. and Meza-Ruiz, G., Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [<sup>3</sup>H] GABA in synaptosomal fractions, Brain Research, 126 (1977) 160-166.
22. Thesleff, S., Aminopyridines and synaptic transmission, Neuroscience, 5(1980) 1413-1419.
23. Uchiyama, T., Molg6, J. and Lemignan, M., Presynaptic effects of bekanamycin at the frog neuromuscular junction. Reversibility by calcium and aminopyridines, Europ. J. Pharmacol., 72 (1981) 271-280.
24. Van der Kloot, W. and Madden, K. S., 4-Aminopyridine does not increase m.e.p.p. frequencies at junctions depolarized by potassium, Brain Research, 210 (1981) 467-470.
25. Vizi, E.S., Van Dijk, J. and Foldes, F.F., Effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release, J. neural Transm., 41 (1977) 265-274.
26. Wonnacott, S., Marchbanks, R.M. and Fiol, C., Ca<sup>2+</sup> uptake by synaptosomes and its effect on the inhibition of acetylcholine release by botulinum toxin, J. Neurochem., 30 (1978) 1127-1134.

Apéndice de la parte II.

Con el propósito de ampliar el punto relacionado con la especificidad de la 4-AP sobre la liberación de los neurotransmisores que ya se mencionó en el manuscrito de esta parte, consideré apropiado añadir este apéndice.

Para estudiar si el efecto estimulador de la 4-AP sobre la liberación de los neurotransmisores era específico se realizó una serie experimental que consistió en cargar los sinaptosomas con el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, que es un análogo del GABA que normalmente está ausente en el tejido nervioso. Como se muestra en la Fig. 7 este aminoácido no es retenido por los sinaptosomas, ya que su liberación en los primeros minutos de superfusión es 3 a 4 veces mayor que la del GABA o la acetilcolina. Ni el cambio de medio de  $K^+$  alto, ni la presencia de 4-AP afectaron la liberación del ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico.

Los resultados de esta serie experimental reafirman la selectividad de la 4-AP para estimular la liberación de los neurotransmisores y no de cualquier molécula.

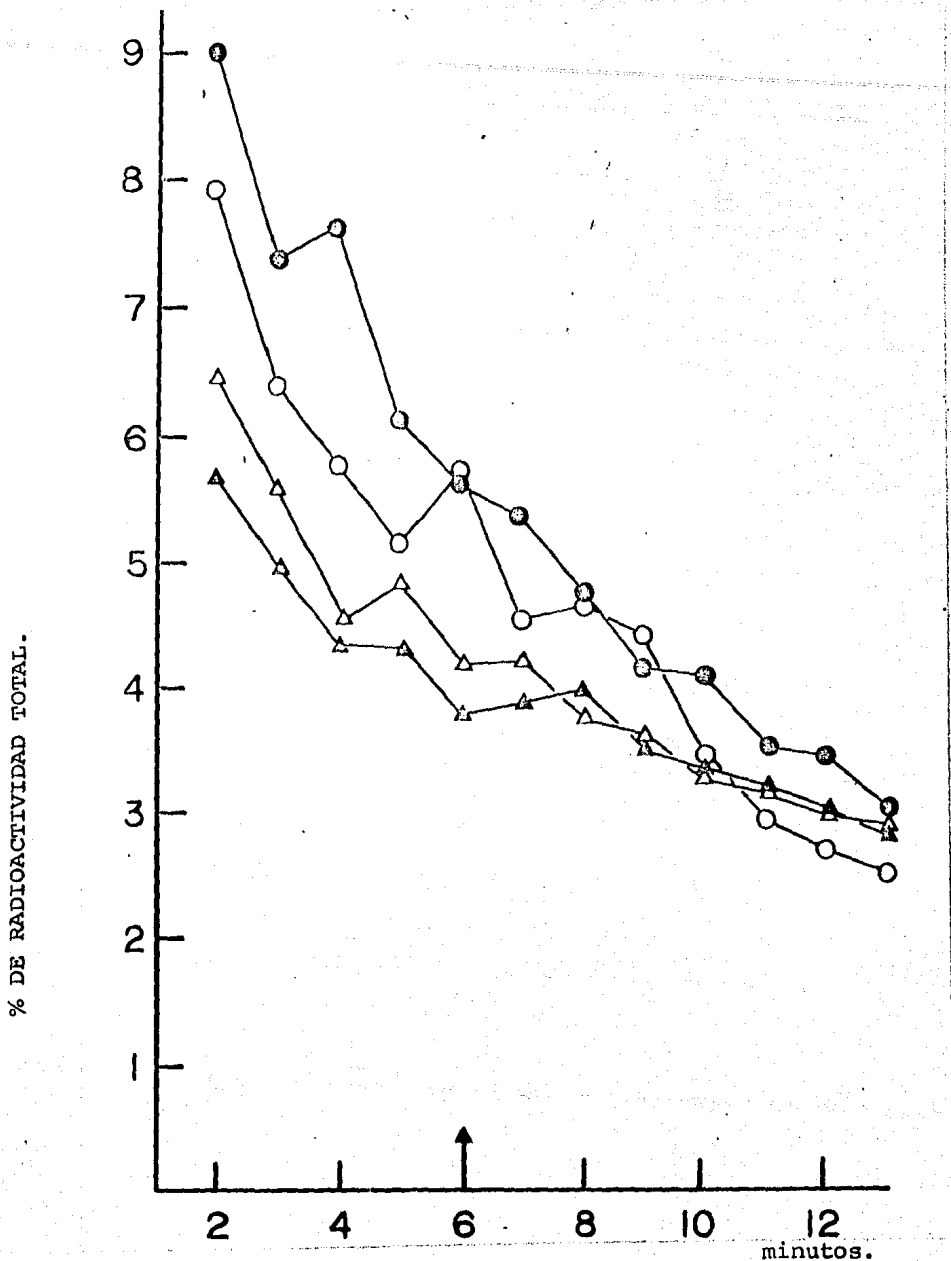


Figura 7. Efecto de la despolarización con alto  $K^+$  y de la 4-AP sobre la liberación del ácido  $^3H$ - $\alpha$ -aminoisobutírico en presencia de  $CaCl_2$  2,5mM. En el minuto 6 (flecha) de superfusión de los sinaptosomas previamente cargados con el aminoácido, el medio normal fué sustituido : por el mismo medio ( $\Delta$ ); por un medio de potasio 47mM ( $\circ$ );  $\circ$  por un medio normal con 0.2mM ( $\bullet$ ) o con 0.02mM ( $\blacktriangle$ ) de 4-AP. Cada punto es el promedio de 4 experimentos.

PARTE III. DETERMINACION DE LA MOLECULA RADIOACTIVA LIBERADA EN PRESENCIA DE 4-AP POR LOS SINAPTOSOMAS CARGADOS CON COLINA TRITIADA.

Introducción.

Los aminoácidos neurotransmisores GABA y glutamato marcados radioactivamente son captados directamente por los sinaptosomas gabaérgicos y glutamatérgicos a través de los sistemas de alta afinidad dependientes de sodio y temperatura, que están localizados en las membranas sinaptosomales respectivas, y en las condiciones experimentales del trabajo que constituye la parte II más del 85% de la radioactividad liberada corresponde a dichos aminoácidos (López-Colomé et al., 1978). Sin embargo, en el caso de la acetilcolina, este neurotransmisor no puede ser captado como tal, sino que es su precursor, la colina radioactiva, la que es tomada por los sinaptosomas colinérgicos dentro de los cuales se encuentra la colinacetiltransferasa, enzima que cataliza la síntesis de la acetilcolina tritiada. En el caso de la figura 4 del artículo incluido como parte II de esta tesis, el efecto de la 4-AP fue estudiado sobre la liberación de la radioactivi-

dad por lo que era necesario discernir si el aumento en el porcentaje de radioactividad liberada que se observaba en presencia de esta droga pertenecía a la acetilcolina o a su precursor. Aunque, como se señala en dicho artículo, la dependencia de  $Ca^{+2}$  externo sugiere que es la ACh el compuesto liberado por la 4-AP era importante obtener evidencia directa dado que no se conoce el mecanismo de acción de la droga. Para resolver este punto fue necesario emplear un método que nos permitiera distinguir a cuál de las dos moléculas se encontraba unida la marca o en qué porcentaje estaban siendo liberadas si la marca se repartía entre ambas. Para ello nos basamos en el procedimiento descrito por Fonnum (1975) para extraer por intercambio catiónico líquido; la acetilcolina marcada radioactivamente de una mezcla de incubación; lo que se consigue empleando tetrafenilborato (Kalignost) en acetonitrilo y se usa directamente la mezcla de centelleo (tolueno, PPO, POPOP) como el solvente orgánico que extrae (Fonnum, 1975). Sin embargo como nuestro propósito era separar la acetilcolina de la colina tritiada, y esta última también es extraída en la fase orgánica junto con la acetilcolina marcada radioactivamente, era necesario convertir a la colina en un compuesto no extraíble. Esto se logró

mediante la reacción de fosforilación de la  $^3\text{H}$ -colina, en presencia de ATP, catalizada por la enzima colina-cinasa (Goldberg y McCaman, 1973); la fosforil- $^3\text{H}$ -colina es retenida en la fase acuosa, donde la marca radioactiva no es detectada por el contador de centelleo. Así, sin la interferencia de la radioactividad perteneciente a la  $^3\text{H}$ -colina, fue posible determinar por centelleo líquido de la solución bifásica agua-tolueno, qué cantidad de acetilcolina tritiada estaba siendo liberada.

### Procedimiento

Para determinar qué porcentaje de la radioactividad liberada era colina tritiada, un ml de cada medio de superfusión con la marca radioactiva total ( $^3\text{H}$ -colina -  $^3\text{H}$ -acetilcolina) liberada durante 2 minutos (véase la metodología en la parte II de esta tesis) fue dividido en dos volúmenes iguales. A ambos volúmenes se les añadió la cantidad necesaria de amortiguador concentrado de glicil-glicina pH 8.5,  $\text{MgCl}_2$  y EDTA para obtener una concentración final en la fase acuosa de 50,15 y 1 mM respectivamente. A una de las dos muestras se añadieron 0.005 unidades de la enzima colina-cinasa y la



cantidad necesaria de ATP (pH 9) para obtener la concentración final de 1 mM. Ambas muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se procedió a la extracción añadiendo 2 ml de una solución de 5 mg de kaliginost/ml de acetonitrilo y 10 ml del líquido de centelleo (tolueno, PPO al 0.5%, POPCP al 0.02%) y mezclando por inversión. La contribución de colina tritiada a la radioactividad total liberada en cada condición experimental se determinó por la diferencia de radioactividad entre la muestra que se incubó sin la enzima y aquella con enzima. En cada experimento se hizo una determinación patrón, agregando una cantidad conocida de  $^3\text{H}$ -colina a dos mezclas de incubación y agregando colina-cinasa sólo a una de ellas.

### Resultados.

En la tabla 1 se muestra la liberación en desintegraciones por minuto (dpm) de colina tritiada ( $^3\text{H}$ -Ch) y de acetilcolina tritiada ( $^3\text{H}$ -ACh) que se obtuvo al superfundir la preparación sinaptosomal con diferentes medios. Estos datos se presentan en forma porcentual en la figura 8.

Tabla 1. Separación entre la colina tritiada ( $^3\text{H-Ch}$ ) y la acetilcolina tritiada ( $^3\text{H-ACh}$ ) liberadas en presencia de 4-AP a partir de sinaptosomas cargados con  $^3\text{H-Ch}$ .

	Liberación en medio normal.		Liberación en un medio despolarizante (47mM $\text{K}^+$ ).	
	(dpm/fracción)		(dpm/fracción)	
	<u>A</u> sin 4-AP	<u>B</u> con 4-AP	<u>C</u> sin calcio	<u>D</u> con calcio
$^3\text{H-Ch}$	3432 $\pm$ 725	2778 $\pm$ 454	3216 $\pm$ 1063	3247 $\pm$ 1113
$^3\text{H-ACh}$	3119 $\pm$ 487	4660 $\pm$ 733	2888 $\pm$ 387	8456 $\pm$ 3125

Las cifras son promedio de 4-5 experimentos  $\pm$  desviación estandar. A y B son datos obtenidos de la superfusión de una misma población de sinaptosomas con un medio Krebs normal con  $\text{CaCl}_2$  2.5mM en ausencia (A) y en presencia de 4-AP 200  $\mu\text{M}$  (B). C y D son datos también obtenidos a partir de una misma población de sinaptosomas, superfundidos con un medio despolarizante de  $\text{KCl}$  47 mM : sin calcio y con EGTA 0.5mM (C) y con calcio 2,5mM (D). A y C : fracción de los minutos 4 y 5 de superfusión continua. B y D : fracción de los minutos 7 y 8.

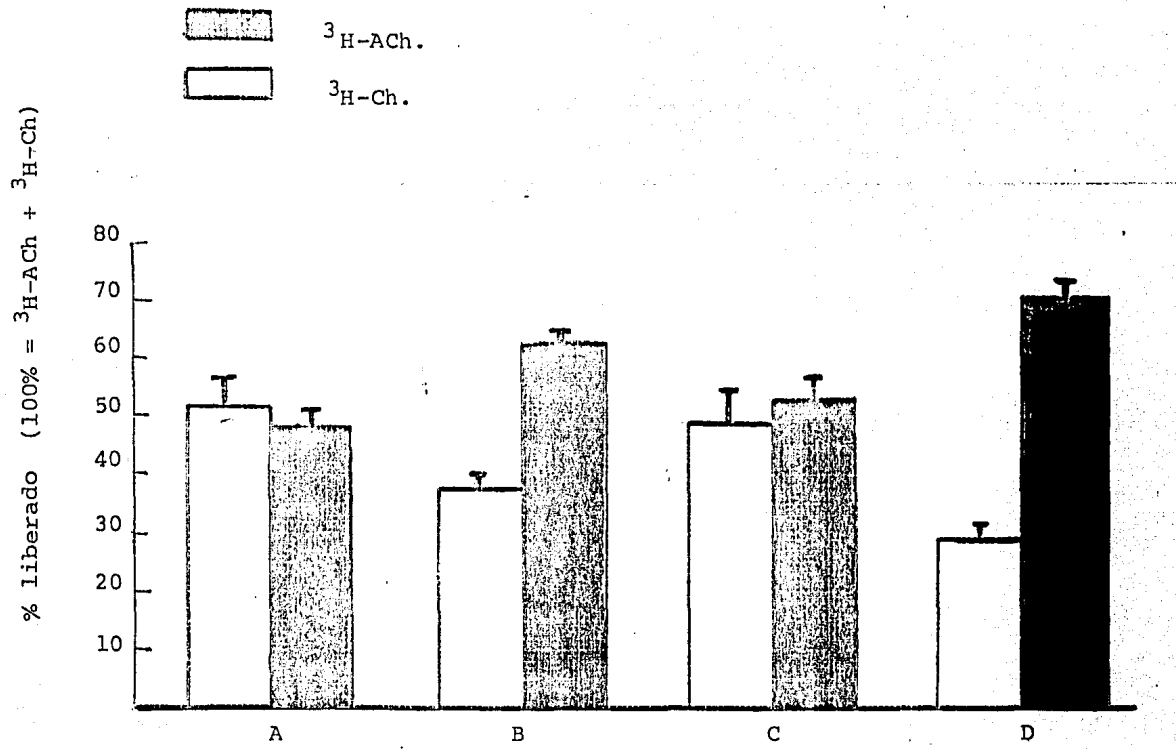


Figura 8. Porcentaje de liberación de colina tritiada ( $^3\text{H-Ch}$ ) y de acetilcolina tritiada ( $^3\text{H-ACh}$ ) liberadas a partir de sinaptosomas previamente cargados con  $^3\text{H-Ch}$ , en diferentes condiciones experimentales, calculado de la tabla 1. (A) Medio normal con calcio; (B) Medio normal con calcio y 4-AP 200  $\mu\text{M}$ ; (C) Medio despolarizante (KCl 47mM) sin calcio, EGTA 500  $\mu\text{M}$ ; (D) Medio despolarizante con calcio.

Si comparamos la liberación en dpm de  $^3\text{H-Ch}$  que se obtuvo en los minutos 4 y 5 al superfundir los sinaptosomas con el medio normal sin 4-AP con la liberación de dicha molécula durante los minutos 8 y 9 en presencia de 4-AP (mitad izquierda de la tabla), vemos que esta droga no incrementa la liberación de  $^3\text{H-Ch}$ , sino por el contrario, se observa una ligera disminución de su liberación. En cambio, en el caso de la liberación de  $^3\text{H-ACh}$ , la comparación de la liberación basal en ausencia y en presencia de 4-AP permite apreciar el incremento que esta droga produce sobre la liberación del neurotransmisor. Esto se vé con toda claridad en la figura 8 (B) donde se pone de manifiesto un aumento en el porcentaje de  $^3\text{H-ACh}$  liberada en presencia de 4-AP. Los resultados obtenidos indican que la presencia de 4-AP  $200 \mu\text{M}$  no modifica el curso temporal normal de la liberación espontánea de  $^3\text{H-Ch}$  ( compárese con la condición control de la fig. 4, parte II de la tesis ); mientras que sí incrementa la liberación de  $^3\text{H-ACh}$ .

La liberación de  $^3\text{H-Ch}$  y de  $^3\text{H-ACh}$  en las condiciones de superfusión con el medio despolarizante de KCl  $47 \text{ mM}$  sin

y con calcio, se muestra a la derecha de la tabla 1. La liberación en dpm de  $^3\text{H-Ch}$  a partir de los sinaptosomas despolarizados con calcio comparativamente con la liberación obtenida de la superfusión con el medio despolarizante carente de calcio no se vio modificada. Por otro lado, la liberación de  $^3\text{H-ACh}$  experimentó un aumento considerable en el medio despolarizante con calcio. En la Fig. 8 ( C y D ) está graficado porcentualmente dicho aumento.

### Conclusión.

Estos datos indican que la molécula responsable del incremento en la radioactividad liberada que se obtiene tanto en las condiciones despolarizantes con calcio como el que se observa en presencia de  $200 \mu\text{M}$  de 4-AP es la acetilcolina que funge como neurotransmisor y no la colina , su precursor.

PARTE IV. EXPERIMENTOS SOBRE LOS POSIBLES MECANISMOS DE  
ACCION DE LA 4-AP.

Introducción

La primera parte del trabajo experimental que está recopilada en el artículo incluido (parte II de la tesis), nos permite afirmar los siguientes puntos :

- 1.- En la preparación sinaptosomal es posible detectar el efecto de la 4-AP sobre la liberación de los neurotransmisores en las condiciones de liberación espontánea por superfusión de los sinaptosomas con medio Krebs normal, y este efecto es en gran parte dependiente de la presencia de  $Ca^{++}$ .
- 2.- La 4-AP no modifica el porcentaje de liberación de los neurotransmisores a partir de sinaptosomas despolarizados con KCl 47 mM.
- 3.- Para observar el efecto de la 4-AP sobre la liberación espontánea de los neurotransmisores en la preparación sinaptosomal, la concentración de 4-AP con la que se consigue una respuesta cercana a la máxima, sin ser una concentración muy elevada, y por consiguiente resulta la concentración adecuada, es la de 200  $\mu$ M.

4.- La 4-AP aumenta la liberación de los neurotransmisores específicamente, ya que no tiene efecto sobre la liberación de cualquier molécula marcada radioactivamente que pueda ser tomada por los sinaptosomas, como por ejemplo el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (parte II) o la colina (parte III). La especificidad de la 4-AP para aumentar la liberación de los neurotransmisores sugiere que la acción de esta droga está directamente relacionada con algún paso del proceso de liberación de los mismos, conclusión que se ve apoyada por los requerimientos de  $Ca^{++}$  para que el incremento en la liberación de los neurotransmisores sea inducido por la 4-AP. Además, esta especificidad también indica que la 4-AP no actúa lesionando la membrana del sinaptosoma, ya que no promueve la salida de cualquier molécula captada.

En cuanto al mecanismo por el cual actúa la 4-AP a nivel de la terminal presináptica, los experimentos anteriores, sin embargo, sólo nos permiten concluir que el efecto de esta droga es dependiente de  $Ca^{++}$  externo.

Esta dependencia de calcio podría explicarse por una acción despolarizante directa de la 4-AP sobre la membrana sinaptosomal. En efecto, en el axón gigante de calamar ha sido

descrito que las aminopiridinas producen potenciales de acción repetitivos en ausencia de estimulación nerviosa (Yeh et al., 1976; Kirsch y Narahashi, 1978) y en el músculo cervicis biventer del pollo ha sido demostrado que la tetrodoxina (TTX) inhibe la actividad contráctil inducida por 3,4 diaminopiridina (Marshall et al., 1979). La producción de estos fenómenos aparentemente se debe a un efecto directo de las aminopiridinas sobre la excitabilidad de la membrana. Por otro lado hay evidencias experimentales en el axón gigante del calamar que demuestran que el bloqueo que produce la 4-AP sobre las corrientes de  $K^+$  es casi total a despolarizaciones moderadas, mientras que a despolarizaciones mayores es parcialmente revertido y desaparece en condiciones de despolarizaciones sostenidas (Yeh et al., 1976).

Con el fin de estudiar si el aumento sobre la liberación de los neurotransmisores inducido por la 4-AP, que observábamos en la preparación sinaptosomal, estaba mediado por una despolarización de la membrana del sinaptosoma provocada por la presencia de 4-AP, decidimos estudiar su efecto en condiciones de bloqueo de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje, condición que se consigue añadiendo TTX. Si el



efecto de la 4-AP se debiera a una acción despolarizante, la estimulación que produce sobre la liberación de los neurotransmisores debería ser inhibida en presencia de TTX, ya que dicha despolarización resulta de la apertura de canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje.

### Resultados y Discusión.

En las figuras 9 y 10 están graficados los resultados que se obtuvieron al estimular la liberación de  $^3\text{H-ACh}$  y  $^3\text{H-GABA}$  con 4-AP en ausencia y en presencia de TTX. Se puede observar que la adición de 4-AP  $200 \mu\text{M}$  induce la liberación de  $^3\text{H-GABA}$  y de  $^3\text{H-ACh}$  de modo similar en las condiciones control y en condiciones en que los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje han sido bloqueados con TTX. Aunque en esta última condición se observó una ligera disminución de la liberación de  $^3\text{H-GABA}$  en relación al control, esta diferencia resultó estadísticamente no significativa. En la parte izquierda de la figura 9 se muestra que en las condiciones experimentales usadas, la TTX si es efectiva ya que inhibió casi totalmente la estimulación de la liberación de  $^3\text{H-ACh}$  producida por la veratridina, droga que actúa abriendo los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje.

La posibilidad de que en el proceso de aislamiento de las terminales nerviosas se propicie una ligera despolarización de las mismas parece improbable, ya que no se aprecia ninguna diferencia en el porcentaje de liberación espontánea en presencia de TTX durante los 6 primeros minutos de superfusión.

Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción mediante el que la 4-AP promueve el aumento en la liberación espontánea de los neurotransmisores de manera dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, no involucra a los canales de  $\text{Na}^{+}$  sensibles a voltaje que son bloqueados por TTX y aparentemente no está relacionado con la despolarización de la membrana de los sinaptosomas.

En vista de los resultados que acabamos de describir, decidimos estudiar el efecto de la 4-AP en presencia de veratridina con el fin de conocer si los efectos que producen ambas drogas individualmente, se sumaban, ya que parecen actuar mediante mecanismos diferentes. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta serie experimental ( figura 11) demuestran que, como en el caso de las terminales despolarizadas con alto potasio, el aumento sobre la liberación de los neurotransmisores que promueve la 4-AP en condiciones de li-

beración espontánea no se manifiesta en sinaptosomas despolarizados por la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje inducida por veratridina. De estos resultados se puede concluir que en la preparación sinaptosomal, la 4-AP aparentemente no incrementa la liberación de los neurotransmisores mas que cuando este mecanismo de liberación no está "saturado" por despolarización.

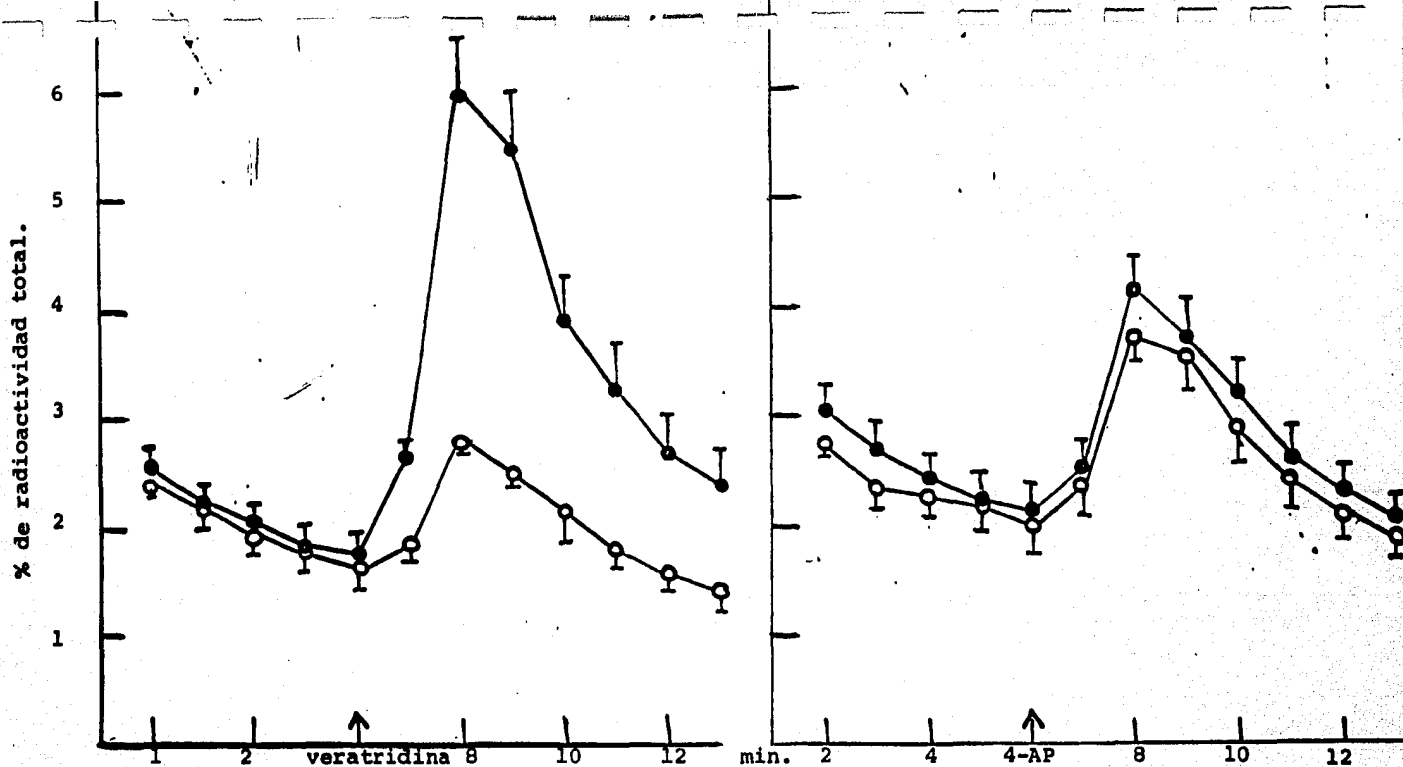


Figura 9. Efecto de la 4-AP sobre la liberación espontánea de  $^3\text{H-ACh}$  en presencia de tetrodotoxina (TTX). Los sinaptosomas previamente cargados con  $^3\text{H-Ch}$  fueron superfundidos con un medio Krebs normal sin (●) y con TTX  $1\ \mu\text{M}$  (○). En el 6° minuto de superfusión, el medio fue reemplazado por un medio Krebs normal que contenía veratridina  $75\ \mu\text{M}$  (mitad izquierda de la gráfica) o con un medio con 4-AP  $200\ \mu\text{M}$  (mitad derecha). Cada punto es el promedio de 4 experimentos. Las barras hacia arriba o hacia abajo de cada punto representan el error estandar de los datos obtenidos en cada minuto.

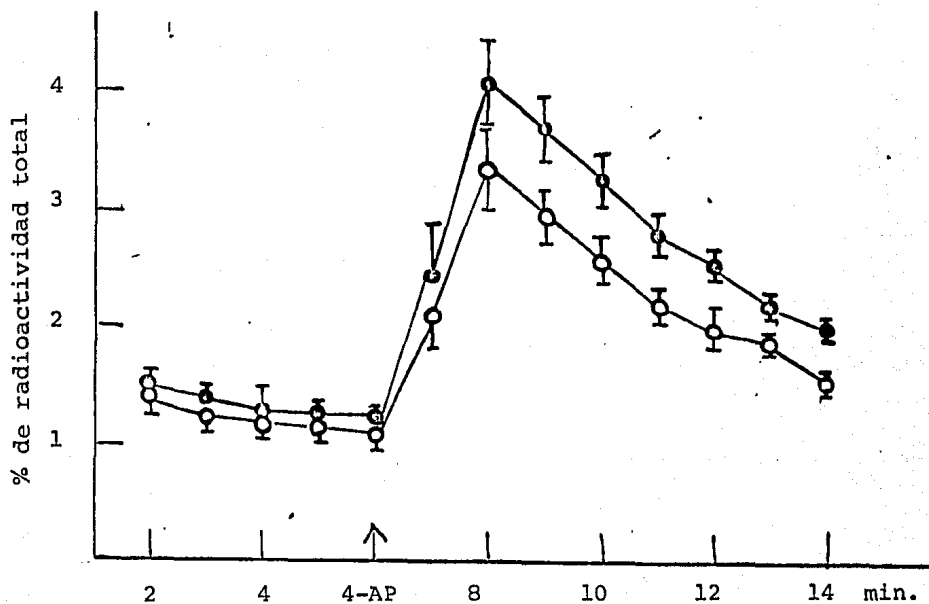


Figura 10. Efecto de la 4-AP sobre la liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -GABA en presencia de TTX. Los sinaptosomas previamente cargados con  $^3\text{H}$ -GABA fueron superfundidos con un medio Krebs normal en ausencia (●), o en presencia de TTX  $1\ \mu\text{M}$  (○). Al minuto 6 de superfusión el medio fué sustituido por uno igual pero que contenía 4-AP  $200\ \mu\text{M}$ . Cada punto es el promedio de 4 experimentos. Las barras hacia arriba o hacia abajo representan los errores estandar de cada punto.

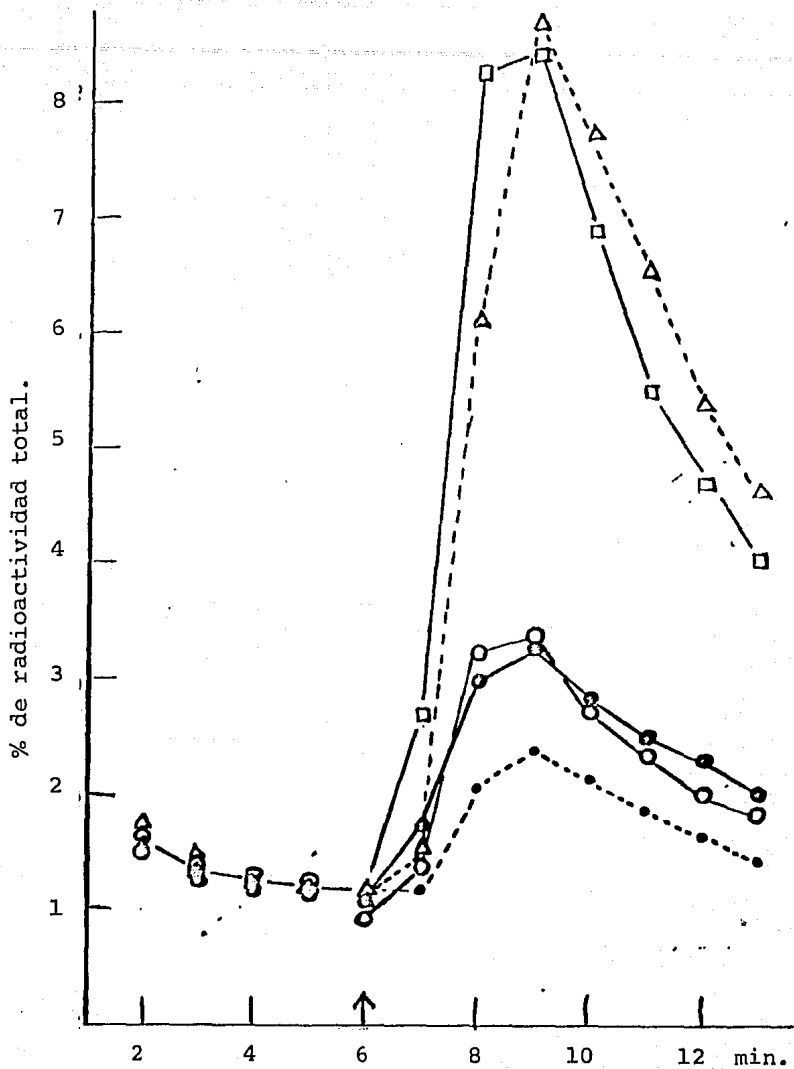


Figura 11. Efecto simple y combinado de la veratridina y la 4-AP sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA en ausencia y en presencia de TTX. Los sinaptosomas cargados con  $^3\text{H}$ -GABA fueron superfundidos con un medio Krebs normal con calcio hasta el minuto 6, en el que el medio de superfusión de cada cámara fue reemplazado con el mismo medio conteniendo: veratridina  $75\ \mu\text{M}$  (□-□); 4-AP  $200\ \mu\text{M}$  (●-●); veratridina  $75\ \mu\text{M}$  y 4-AP  $200\ \mu\text{M}$  (Δ-Δ); veratridina  $75\ \mu\text{M}$  y TTX  $1\ \mu\text{M}$  (●-●); veratridina  $75\ \mu\text{M}$ , 4-AP  $200\ \mu\text{M}$  y TTX  $1\ \mu\text{M}$  (○-○). Cada punto es el promedio de 4 experimentos. Los errores estandar no se señalan en esta gráfica para claridad de la misma pero el máximo error estandar fue del 20% del valor promedio correspondiente y en la mayor parte de los puntos fue inferior al 8% del valor promedio.

COMENTARIO FINAL.

En este trabajo se pone de manifiesto la utilidad de la 4-aminopiridina como herramienta para conocer los mecanismos presinápticos de la transmisión química en el sistema nervioso central. Los hallazgos de estos experimentos en la preparación sinaptosomal nos permiten establecer varios puntos que contribuyen a la caracterización del mecanismo de acción de la 4-AP y por consiguiente a la mejor comprensión de dichos mecanismos presinápticos. Estos puntos ya han sido enumerados en las páginas :45,46,47, 50 y 51 de esta tesis, por lo que no se repetirán aquí.

Es interesante establecer una correlación entre los resultados "in vitro" del efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores y sus acciones "in vivo". La 4-aminopiridina ha sido empleada "in vivo" como agente anticurare, como antianalgésico ( Bowman,1982) y como agente efectivo para revertir el bloqueo de la transmisión neuromuscular producido por la toxina botulínica (Lundh et al., 1976; Lundh et al., 1977a), por la amikacina (Singh et al., 1978) o por el RuR (Tapia, 1982). Clínicamente ha sido usada para revertir las fallas en la transmisión neuromuscular en pacientes con miastenia gravis (Lundh et al.,1979; Kim,

et al., 1980) o con síndrome miasténico de Eaton-Lambert (Lundh et al., 1977c; Agoston et al., 1978).

Lo anterior convierte a la 4-AP no solamente en una herramienta muy útil para aclarar parte de los mecanismos involucrados en la transmisión sináptica química, sino también en una droga de interesante potencial terapéutico en ciertas enfermedades que resultan de disfunciones en la transmisión sináptica.



BIBLIOGRAFIA

- Agoston,S., Weerden van,T., Westra,P., Broekert,A.,  
Effects of 4-aminopyridine in Eaton-Lambert  
syndrome, Br.J.Anaesth., 50 (1978) 383-385.
- Bowman,W.C., Aminopyridines: their pharmacological  
actions and potential clinical uses. TIPS,  
3 (1982) 183-185.
- Bradford,H., Isolated nerve terminals as an in vitro  
preparation for the study of dynamic aspects  
of transmitter metabolism and release, En :  
Handbook of Psychopharmacology, (Iversen,L.,  
Iversen,S. y Snyder,S.eds.) Vol.1, Plenum  
Press, New York (1975) 191-252.
- Bullock,T.,Orkand,R. y Grinnell,A., Introduction to Nervous  
Systems, W.H. Freeman, San Fco. (1977) 9-96 pp.
- Choi,R.L., Freeman, J.J. y Jenden, D.J., Kinetics of plasma  
choline in relation to turnover of brain choline  
and formation of acetylcholine, J. Neurochem.,  
24 (1975) 735-741.
- Cooper,J., Bloom, F. y Roth,R., Las bases bioquímicas de la  
Neurofarmacología, Editorial El Manual Moderno,  
México,D.F. (1977) 55-76 pp.

Costa, E., Guidotti, A., Moroni, F. y Peralta, E., Glutamic acid as a transmitter precursor and as a transmitter, En : Glutamic Acid : Advances in Biochemistry and Physiology, (L.J. Filer, Jr. ed.) Raven Press, New York (1979) 151-161.

Dowling, J.E. y Boycott, B.B., Organization of the primate retina: electron microscopy. Proc. Royal Soc. Series B:166 (1966) 80-111.

Freeman, J.J., Choi, L. y Jenden, D.J., Plasma choline : its turnover and exchange with brain choline, J. Neurochem. 24 (1975) 729-734.

Fonnum, F., Radiochemical assays for choline acetyltransferase and acetylcholinesterase, En : Research Methods in Neurochemistry, (N. Marks y R. Rodnight, eds.) Vol.3, Plenum Press, New York (1975) 253-275.

Fonnum, F., Malthe-Sorensen, D., Kvale, I., Soreide, A., Skrede, K. y Walaas, I., Glutameric neurons : Localization and release of the transmitter, En: Regulatory mechanisms of synaptic transmission, (R. Tapia y Cotman, C. eds.) Plenum Press, New York (1981) 59-70.

Goddard, G.A. y Robinson, J.D., Uptake and release of calcium by rat brain synaptosomes, Brain Research, 110 (1976) 331-350.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Gray, E. y Whittaker, V., The isolation of nerve endings from brain : An electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation, J. Anat. 96 (1962) 79-87.
- Goldberg, A.M. y Mc Caman, R.E., The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain, J. Neurochem., 20 (1973) 1-8.
- Heuser, J. y Miledi, R., Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junctions, Proc. R. Soc. Lond. B., 179 (1971) 247-260.
- Hinrichsen, C.F.L. y Larramendi, L.M.H., Synapses and cluster formation of the mouse mesencephalic fifth nucleus, Brain Research, 7 (1968) 296.
- Hinrichsen, C.F.L. y Larramendi, L.M.H., The trigeminal mesencephalic nucleus, II. Electron microscopy, Am. J. Anat., 127 (1970) 303-320.
- Jankowska, E. , Lundberg, A. , Rudomin, P. y Sykova, E. , Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord , Brain Research , 136 (1977) 387-392.
- Jope, R. v Jenden, D., The utilization of choline and acetyl-coenzyme A for the synthesis of acetylcholine, J. Neurochem. 35 (1980) 318-325.

- Kamino, K. , Ogawa, M. , Uyesaka, N. y Inouye, A. , Calcium binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. IV. Effects of ruthenium red on the cooperative nature of calcium-binding , J. Membrane Biol. , 26 (1976) 345-356.
- Kim , Y.I. , Goldner, M.M. y Sanders, D.B. , Facilitatory effects of 4-aminopyridine on normal neuromuscular transmission, Muscle & Nerve, 3 (1980) 105-111.
- Kirpekar, M., Kirpekar, S.M. y Prat, J.C. , Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation, J. Physiol (Lond.) , 272 (1977) 517-528.
- Kirsh, G.E. y Narahashi, T., 3,4-diaminopyridine: a potent new potassium channel blocker, Biophys. J., 22 (1978) 507-512.
- Leander, S., Arner, A. y Johansson, B., Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro, Europ. J. Pharmacol., 46 (1977) 351-361.
- Lemeignan, M., Analysis of the effects of 4-AP on the lumbar spinal cord of the cat. II. Modifications of certain spinal inhibitory phenomena, post-tetanic potentiation and dorsal root potentials, Neuropharmacology, 12 (1973) 641-651.

Levi, G., Banay-Schwartz, M. y Raiteri, M., Uptake, exchange  
and release of GABA in isolated nerve endings,

En : Amino Acids as Chemical Transmitters,

(F. Fonnum, ed.) Plenum Press, New York (1978)

327-350.

Llinás, R., Calcium and transmitter release in squid synapse.

En: Society for Neuroscience Symposia, Vol. II.

Approaches to the cell biology of neurons. Cowan,

W.M. y Ferrendelli, J.A., eds. Bethesda, Md. :

Society for Neuroscience, (1977), pp. 139-160.

Llinás, R. y Heuser, J. (eds.) , Neurosciences Res. Prog. Bull.

15 (1977) 557-687.

Llinás, R. y Nicholson, C., Calcium role in depolarization-

secretion coupling : an aquorin study in squid

giant synapse, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 72

(1975) 187-190.

Llinás, R. y Steinberg, I., II. The place of a calcium hypo-

thesis in synaptic transmission, En: Neurosciences

Res. Prog. Bull., Vol. 15 (1977) 565-574.

- López-Colomé, A.M., Tapia, R., Salceda, R. y Pasantes-Morales, H.,  $K^+$ -stimulated release of labeled  $\gamma$ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system, Neuroscience, 3 (1978) 1069-1074.
- Lundh, H., Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission, Brain Research, 153 (1978) 307-318.
- Lundh, H., Cull-Candy, S.G., Leander, S. y Thesleff, S., Restoration of transmitter release in botulinum-poisoned skeletal muscle, Brain Research, 110 (1976) 194-198.
- Lundh, H., Leander, S. y Thesleff, S., Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat, J. Neurol. Sci. 32 (1977a) 29-43.
- Lundh, H. y Thesleff, S., The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals, Europ. J. Pharmacol., 42 (1977) 411-412.
- Lundh, H., Nilsson, O. y Rosén, I., 4-aminopyridine a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 40 (1977c) 1109-1112.
- Lundh, H., Nilsson, O. y Rosén, I., Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 42 (1979) 171-175.

- Madeira, V.M.C. y Antunes-Madeira, M.C., Interaction of Ca<sup>+2</sup> and Mg<sup>+2</sup> with synaptic plasma membranes, Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 323 (1973) 396-407.
- Marshall, I.G., Lambert, J.J. y Durant, N.N., Inhibition of amino-pyridine-induced contractile activity in skeletal muscle by tetrodotoxin and by magnesium, Europ. J. Pharmacol., 54 (1979) 9-14.
- Miledi, R., Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals, Proc. roy. Soc. B., 183 (1973) 421-425.
- Molgó, J., Lemeignan, M. y Lechat, P., Effect of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction, J. Pharmacol. exp. Therap., 203 (1977) 653-663.
- Molgó, J., Lemeignan, M., Uchiyama, T. y Lechat, P., Inhibitory effect of kanamycin on evoked transmitter release. Reversal by 3,4-diaminopyridine, Europ. J. Pharmacol., 57 (1979) 93-97.
- Molgó, J., Lundh, H. y Thesleff, S., Potency of 3,4-diaminopyridine and 4-AP on mammalian neuromuscular transmission and the effect of pH changes. European Journal of Pharmacology, 61 (1980) 25-34.

- Moore, C.L., Specific inhibition of mitochondrial  $\text{Ca}^{++}$  transport by ruthenium red, Biochem. biophys. Res. Commun., 42 (1971) 298-305.
- Narahashi, T., Chemicals as tools in the study of excitable membranes, Physiol. Rev. 54 (1974) 813.
- Ogden, T.E., Intraretinal slow potentials evoked by brain stimulation in the primate, J. Neurophysiol. 29 (1966) 898-908.
- Pappas, G. y Waxman, S., I. Synaptic fine structure- morphological correlates of chemical and electrotonic transmission, En : Structure & function of synapses ( G.Pappas y D. Purpura, eds,) Raven Press, New York (1972) 1-43.
- Pelhate, M. y Pichon, Y., Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach, J. Physiol. (Lond.) , 242 (1974) 90-91.
- Reed, K.C. y Bygrave, F.L., The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red, Biochem. J. 140 (1974) 143-155.
- Robertis de, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lores Arnais, G. y Salganicoff, L., Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain, J. Neurochem. 9 (1962) 23-35.



Rubin, R.P., Calcium and the secretory Process, Plenum Press,  
New York, (1974) 189 pp.

Singh, Y.N., Marshall, I.G. y Harvey, A.L., Some effects of the  
aminoglycoside antibiotic amikacin on neuro-  
muscular and autonomic transmission, Br. J.  
Anaesth., 50 (1978) 109-117.

Sotelo, C. y Palay, S.L., The fine structure of the lateral  
vestibular nucleus in the rat. II. Synaptic  
organization. Brain Research 18 (1970) 93-116.

Swanson, P.D., Anderson, L. y Stahl, W.L., Uptake of calcium  
ions by synaptosomes from rat brain, Biochem.  
biophys. Acta (Amst.), 356 (1974) 174-183.

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

Tapia, R., -Aminobutyric Acid: Metabolism, and biochemistry  
of synaptic transmission, En.: Handbook of Neurochemistry,  
2nd. Ed. (A. Lajtha, ed.) Vol.3, Plenum Press, (1983)  
en prensa.

Thesleff, S., Aminopyridines and synaptic transmission,  
Neuroscience, 5 (1980) 1413-1419.

- Vasington, F.D., Gazzoti, P., Tiozzo, R. y Carafoli, E., The effect of ruthenium red on  $\text{Ca}^{++}$  transport and respiration in rat liver mitochondria, Biochem. biophys. Acta (Amst.), 256 (1972) 43-54.
- Vizi, E.S., Van Dijk, J. y Foldes, F.F., Effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release, J. neural. Transm., 41 (1977) 265-274.
- Weiss, G.B., Cellular pharmacology of lanthanum, Ann. Rev. Pharmacol., 14 (1974) 343-354.
- Wilson, J., Wilkin, G. y Balázs, R., Biochemical dissection of the cerebellum- Functional Properties of the "glomerulus particles", En: Metabolic Compartmentation and Neurotransmission, (Berl, S., D. Clarke y D. Schneider, eds.) Plenum Press, New York, (1975) 427-436.
- Yeh, J.Z., Oxford, C.H., WU, C.H. y Narahashi, T., Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes, Biophys. J., 16 (1976) 77-81.