

29/202

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"EFECTO DE QUELANTES DE CALCIO Y MAGNESIO,
SOBRE LA CAPTURA DEL ACIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO
EN SINAPTOSOMAS".**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA PRESENTA:

CARMEN SALAZAR GOMEZ VARELA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F. 1989



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.

	pág.
Resumen.	1.
Introducción.	3.
I. Generalidades del sistema nervioso.	3.
II. Neuronas y comunicación neuronal.	5.
III. Transmisión sináptica gabaérgica.	10.
IV. Captura y liberación del ácido γ -aminobutírico.	12.
V. Transporte de calcio e inhibidores del mismo.	14.
VI. Quelantes de calcio y magnesio.	17.
Antecedentes inmediatos y objetivos.	18.
Materiales y métodos.	20.
Método de Hajós para la obtención de sinaptosomas.	20.
Método de Löscher para la obtención de sinaptosomas.	21.
Medición de la captura de GABA.	21.
Resultados.	24.
Efecto del lantano.	24.
Efecto del rojo de rutenio.	26.
Efecto de la nifedipina.	27.
Efecto del EGTA en ausencia y en presencia de calcio y magnesio en el medio.	28.
Efecto del EDTA en ausencia de calcio en el medio.	29.
Efecto del rojo de rutenio sobre la inhibición de la captura de GABA, producida por EGTA.	30.

Efecto del lantano sobre la inhibición de la captura de GABA, producida por EGTA.	31.
Discusión y conclusiones.	33.
I. Inhibición de la captura del GABA por rojo de rutenio y lantano.	33.
II. Inhibición de la captura por EGTA y EDTA.	33.
Referencias.	39.

RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo fué estudiar el efecto de quelantes de calcio y magnesio sobre la captura del ácido γ -aminobutírico (GABA), así como la acción del rojo de rutenio y del lantano sobre dicho efecto. Este estudio aporta datos sobre las características funcionales de la molécula transportadora del GABA en la membrana de las terminales presinápticas en el sistema nervioso central.

Se emplearon sinaptosomas de cerebro completo de ratón, en donde se midió la captura de GABA marcado radioactivamente con tritio.

La captura de GABA se midió bajo diversas condiciones que se enlistan a continuación: lantano 50, 100 y 200 μM ; rojo de rutenio 7 y 20 μM ; nifedipina 1 y 10 μM ; EGTA 0.1 y 1.5 mM; EDTA 1.5 mM estos dos últimos con y sin calcio y magnesio; EGTA 0.1 mM con rojo de rutenio 20 μM ; y EGTA 0.1 mM con lantano 250 μM .

Los resultados obtenidos muestran que el rojo de rutenio y el lantano en un medio con calcio y magnesio, inhiben la captura de GABA en sinaptosomas, mientras que la nifedipina no la afecta.

Por otro lado el EDTA y ERTA inhiben la captura de GABA cuando no hay calcio ni magnesio en el medio. Dicha inhibición se revierte cuando estos cationes están en exceso en el medio, o cuando hay rojo de rutenio 20 μM o lantano 250 μM .

Se concluye que las cargas negativas que se encuentran en la superficie de la membrana -y que probablemente son del ácido siálico, que se sabe que está involucrado en el proceso de neurotransmisión deben neutralizarse con calcio u otro catión

Para que pueda funcionar en forma adecuada el acarreador de GABA,

La inhibición en la captura de GABA producida por rojo de rutenio o lantano se puede explicar por la unión de dichos cationes al sitio de sodio del acarreador de GABA, impidiendo así el correcto funcionamiento del mismo.

INTRODUCCION.

I. Generalidades del sistema nervioso.

El sistema nervioso es por medio del cual la mayoría de los animales se relacionan con su entorno, y que permite al organismo sentir y controlar lo que ocurre en todo su cuerpo. Más aún, es el mismo que hace posible que los seres humanos seamos capaces de pensar, crear y sentir emociones, entre otras muchas actividades. Todo esto lo realiza con tres funciones básicas: la sensorial, la integrativa, y la motora.

La función sensorial está representada por receptores especializados para captar información: la vista, el olfato, la audición, el gusto y el tacto entre otros. En los receptores es donde generalmente se inicia la actividad del sistema nervioso. Una sensación puede provocar una reacción inmediata o bien la información recibida se almacena para determinar una reacción a futuro.

La función integrativa consiste en el procesamiento de la información recibida a través de los receptores sensoriales. De esta información, se selecciona aquella que es importante y se canaliza hacia diferentes regiones del sistema nervioso central para dar la respuesta más adecuada, o bien puede utilizarse en procesos de mayor complejidad como es el pensamiento.

La función motora es la que se refiere al control de las actividades corporales y es el resultado de la actividad neuronal. Las funciones motoras se realizan por estructuras efectoras, como son los músculos y las glándulas. Esta parte del proceso es la que da respuesta a las señales recibidas por los

receptores después de su procesamiento en el sistema nervioso central (Guyton, 1987).

El sistema nervioso se ha clasificado para su estudio en dos grandes partes, el sistema nervioso periférico y el sistema nervioso central. El sistema nervioso periférico inerva a todo el cuerpo y se encarga tanto de la recepción de estímulos, como de la respuesta a los mismos. El sistema nervioso central está conformado por la médula espinal y el cerebro, el cual realiza la función integrativa.

El cerebro es uno de los órganos de mayor complejidad en los seres vivos, en él se dan las funciones reguladoras superiores, no sólo de todo el sistema nervioso en general, sino de todo el cuerpo. Se encuentra formado por un número altísimo de células, básicamente de dos tipos: neuronas y células gliales.

Las primeras son las células que se consideran como la unidad anatómica y funcional del sistema nervioso. Las células gliales son las que dan sostén y mantenimiento a las neuronas. Actualmente se reconoce que tienen una función importante durante la respuesta de las neuronas e incluso se ha observado que también son capaces de generar potenciales de acción.

II. Neuronas y comunicación neuronal.

Las neuronas, al igual que todas las células animales, poseen una membrana celular, la cual es una barrera que separa a todos los componentes internos de la célula del medio externo.

Dicha membrana tiene además de la función de aislante, la de transportar sustancias hacia el interior y exterior de la célula.

Las membranas biológicas se caracterizan por estar formadas por una bicapa de lípidos, principalmente fosfolípidos, con proteínas inmersas. Tanto los fosfolípidos como las proteínas integrales son moléculas anfipáticas, es decir, que tienen una porción hidrofóbica y una hidrofílica, de ahí que los fosfolípidos formen bicapas al estar en contacto con el agua, dejando las partes hidrofílicas, constituidas por los grupos fosfato, expuestas, y las hidrofóbicas que son ácidos grasos, en la parte interna de la bicapa.

La porción hidrofílica de algunos fosfolípidos, así como de algunas proteínas, posee polisacáridos que están únicamente en la cara externa de la membrana; a los lípidos que las poseen se les denomina glucolípidos y a las proteínas glucoproteínas (Figura 1).

Los glucolípidos tienen gran número de funciones y formas (Fishman, 1986). Los glucolípidos de mayor complejidad estructural son los gangliósidos, los cuales tienen una o más moléculas de ácido siálico asociados a sus azúcares. El ácido siálico es una molécula que a pH fisiológico tiene el protón del carboxilo disociado, lo que da una carga negativa neta a los

gangliósidos en la superficie de la membrana.

Los gangliósidos son especialmente abundantes en las membranas neuronales, en donde constituyen el 6% de la masa total de lípidos.

A la fecha se han descrito más de 30 gangliósidos diferentes, de acuerdo a la posición y número de ácidos siálicos. Los más representativos se denominan: G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}, G_{D1}, y G_{T1}, las letras se refieren al número de residuos de ácido siálico que hay en el gangliósido (M=mono; D=di; y T=tri). El número que sigue a la letra es la diferencia entre el número de residuos de azúcares presentes y 5. Los principales azúcares que poseen los gangliósidos son : Glc = glucosa, Gal = galactosa, así como GalNAc = N-acetil galactosamina (Alberts, *et al.*, 1983) (Figura 2).

El ácido siálico tiene muy diversas funciones en las superficies membranales, ya que parece estar involucrado en actividades que afectan el desarrollo y la función celular. Se ha informado que el ácido siálico es un factor importante en el desarrollo y regeneración neuronal (Hayashi y Katagiri, 1974 ; Jeserich *et al.*, 1981), en trabajos recientes se ha relacionado la presencia de gangliósidos con la transmisión sináptica (Wierasko y Seifert, 1984; Zaleska y Erecinska, 1987).

Cada neurona genera, como toda célula, un potencial de reposo, el cual está dado por la distribución asimétrica de cargas a lo largo de las partes interna y externa de la membrana, dicha diferencia de cargas da un potencial negativo aproximadamente de -60mV.

La estimulación eléctrica de la neurona, modifica su

potencial de reposo, mediante un cambio en la permeabilidad al sodio que resulta en una reducción del potencial negativo de la membrana, conocida como despolarización.

Si la despolarización alcanza un valor umbral, se propaga a lo largo del axón, constituyendo un potencial de acción. Cuando éste alcanza al botón terminal, provoca la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje, permitiendo la entrada de calcio. Al incrementarse la concentración de calcio en el interior de la terminal se desencadenan los procesos responsables de la liberación de neurotransmisores, lo cual ocurre en el sitio donde se establece una relación entre dos neuronas que se denomina sinapsis. La transmisión del impulso nervioso en estas sinapsis está mediada por dichos neurotransmisores por lo cual se llaman sinapsis químicas. (Bonilla, 1985)

Para que una molécula sea considerada como neurotransmisor debe cumplir con determinados criterios que han sido establecidos por Werman (1966) (citado en Sandoval y Lara, 1983) los cuales se enumeran a continuación:

1. Identidad de acción: el transmisor debe inducir el mismo resultado que el transmisor natural en la célula postsináptica. Es decir, debe modificar a través de los mismos mecanismos la conductancia iónica de la membrana.

2. Presencia de enzimas que catalicen la síntesis del transmisor putativo en la neurona que lo produce.

3. Inactivación. Presencia de un sistema determinante de la eliminación del transmisor una vez efectuada su acción.

4. Presencia. El transmisor propuesto debe estar presente en la neurona que lo produce y encontrarse potencialmente accesible

para su utilización.

5. Liberación del transmisor durante estimulación nerviosa.

La sustancia transmisora debe ser detectada en el fluido extracelular de la región de la sinapsis activada.

6. Identidad farmacológica. Drogas que modifiquen la transmisión sináptica deben afectar de la misma manera la acción del transmisor propuesto.

Los neurotransmisores pueden ser excitadores o inhibidores según el efecto que tienen sobre la membrana postsináptica, es decir, según produzcan una despolarización o una hiperpolarización.

Una despolarización es excitadora por que aumenta la capacidad de la neurona para generar un potencial de acción. Por el contrario, una hiperpolarización es inhibidora por que disminuye la habilidad de la neurona para generar un potencial de acción (Kandel, et al., 1985).

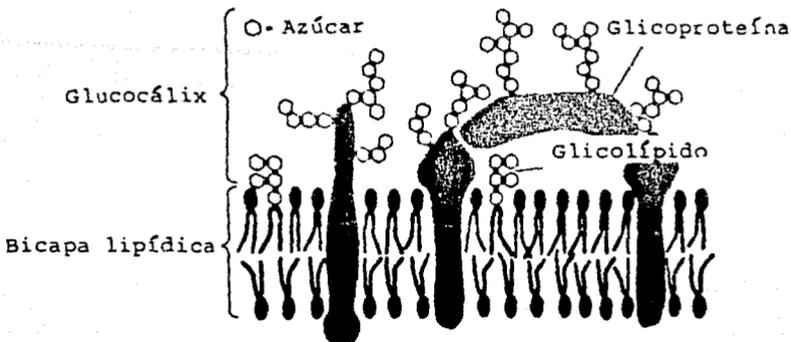


FIG 1. ESQUEMA DE UN FRAGMENTO DE LA MEMBRANA.

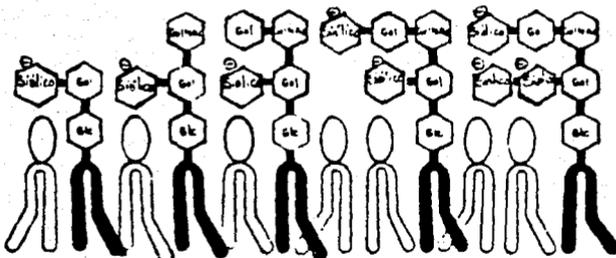


FIG 2. ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES GANGLIOSIDOS
 Glc=Glucosa; Gal=Galactosa; GalNac=N-acetil galactosa
 mina; Siálico=Acido siálico.

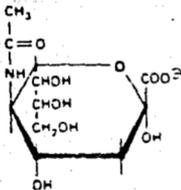


FIG 3. ESTRUCTURA DEL ACIDO SIALICO

III. Transmisión sináptica gabaérgica.

El ácido γ -aminobutírico (GABA), es el neurotransmisor inhibitorio de mayor importancia por su abundancia y por el número de funciones que lleva a cabo en el sistema nervioso central.

Se sintetiza a partir de glutamato por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) y su degradación se lleva a cabo por la enzima GABA-transaminasa (GABA-T) dando lugar a semialdehído succínico y glutamato (Tapia, 1983). La GABA-T actúa en el interior de las células tras la recaptura del GABA, proceso con el que finaliza la neurotransmisión y del que se dan mayores detalles más adelante.

Se han distinguido dos tipos diferentes de receptores gabaérgicos. Uno de ellos, el receptor GABA_A, es un sitio de reconocimiento acoplado a un canal de cloro, que posee, varias subunidades moduladoras en o cerca del sitio de reconocimiento o del canal (Hitzemann y Loh, 1978).

El segundo tipo, llamado GABA_B, parece ser presináptico y posee un sitio de reconocimiento asociado a un canal de calcio (Enna y Gallagher, 1983).

En la figura No. 4 podemos observar como el GABA que ha sido liberado de la terminal presináptica, interactúa con su receptor postsináptico, y una vez libre en el espacio sináptico, es capturado por la terminal, o bien por la glía, la flecha que muestra la captura, indica también la necesidad de sodio y de cloro en este proceso (Iversen y Kelly, 1975) (Iversen y Neal, 1968).

El GABA captado por la glia, es transaminado por la GABA transaminasa formando ácido glutámico que es utilizado por la glutamino sintetasa para formar glutamina, ésta pasa a las neuronas, en donde por acción de la glutaminasa pasa a formar glutamato, que a su vez es descarboxilado por la glutamato descarboxilasa para producir GABA.

El glutamato puede formarse también a partir de glucosa.

En la figura No. 4 se muestra también el paso de piridoxal a fosfato de piridoxal, reacción que es medida por la cinasa de piridoxal. El fosfato de piridoxal funciona como coenzima de la glutamato descarboxilasa.

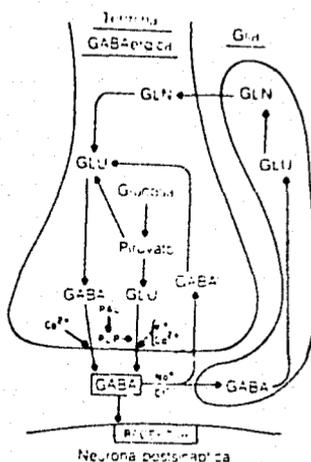


FIG. 4. MECANISMO DE LA TRANSMISION GABAERGICA. GLN= Glutámico+Grupo amino; GLU=Glutámico; PAL= Piridoxal; PLP=Fosfato de piridoxal.

IV. Captura y liberación del ácido γ -aminobutírico.

Como ya se indicó en el inciso anterior, la despolarización de la membrana de la terminal presináptica, induce la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje, y al incrementarse la concentración de calcio en la terminal se produce una liberación de GABA al espacio sináptico, además de ésta liberación de GABA dependiente de calcio, se ha descrito una liberación de GABA exclusivamente dependiente de sodio (Arias *et al.*, 1984).

La captura de GABA es un proceso activo que se lleva a cabo por un acarreador que tiene las siguientes características: (Erecinska, 1987).

1. Exhibe la cinética de Michaelis-Menten.
2. Conduce a una acumulación de GABA en el interior de la célula que da una concentración 3 a 4 veces mayor que en el exterior.
3. Utiliza energía por un proceso que no involucra directamente ATP (Kanner, 1983).
4. Requiere de iones sodio (Lajtha y Sershen, 1975) (Blaustein y King, 1976).

El acarreador de GABA es altamente selectivo a dicho neurotransmisor, sin embargo transporta otros compuestos como son: el ácido hidroxil- γ -aminobutírico (Hitzemann y Loh, 1978), el ácido diamino-butírico (Erecinska *et al.*, 1986), el ácido cis-3-aminociclohexano carboxílico (Neal y Bowery, 1977), la isoguavacina (White y Snodgrass, 1983), y el ácido nipecótico (Kanner, 1983), entre otros.

El proceso de captura de GABA tiene dos componentes, uno de

alta afinidad con una K_m de 0.1 a 2 μM y uno de baja afinidad, menor a 100 μM pero mayor a 2 μM (Cohen y Lajtha, 1972). Además de ser un proceso dependiente de sodio, también depende en gran medida de cloro (Kuhar y Zarbin, 1978) (Kuhar, 1973). Respecto a esto, se ha sugerido que hay un cotransporte de las tres especies: sodio, cloro y GABA, en donde el gradiente de cloro puede servir como fuerza motora para la acumulación de GABA. Dicho cotransporte tiene la siguiente estequiometría: 2 sodio: 1 cloro: 1 GABA (Kanner, 1983).

La importancia del sodio en el sistema de transporte de GABA se manifiesta claramente por el hecho de que si la concentración de este ión en el medio disminuye de 120 ó 140 mM a 60 ó 70 mM, se inhibe la captura de GABA en un 50% y si se elimina totalmente el sodio del medio, substituyéndolo por litio, solamente se observa el 1 ó 2 % de la captura de GABA (Martin, 1973) (Simon, et al. 1974) (Wheeler, 1980).

Con la captura se lleva a cabo el cumplimiento de tres funciones importantes: (Erecinska, 1987)

1. Terminar la neurotransmisión.
2. Mantener constantes y bajos los niveles de GABA en el espacio sináptico, para permitir que la membrana postsináptica sea afectada por el GABA solo cuando la célula presináptica lo libere.
3. Conservar las moléculas de GABA y reducir la necesidad de la síntesis de novo de las mismas.

V. Transporte de calcio e inhibidores del mismo.

El sodio, el potasio, el magnesio y el calcio son cationes de gran importancia en la actividad celular. El calcio entre todos ellos es el que realiza mayor número de funciones en este sistema, por ejemplo:

- a) Mantiene una permeabilidad normal en la membrana.
- b) Protege a las células impidiendo que se lisen por efectos mecánicos, de osmolaridad o de pH.
- c) Estabiliza la membrana al neutralizar las cargas negativas de superficie.
- d) Produce la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas (Miledi, 1973) (Kanner y Kifer, 1981) (Kanner y Marva, 1982) (Kanner, 1978).
- e) Funciona como segundo mensajero. (Rubin, 1982).

Se han descrito tres tipos de canales de calcio sensibles a voltaje en neuronas, los cuales se han denominado "L", "T" y "N" que se diferencian entre sí tanto funcional como farmacológicamente. El canal "L" es un canal lento y el canal "T" es rápido. El canal "L" se activa solo a despolarizaciones intensas, que alcancen un potencial más positivo de -10mV, mientras que el canal "T" se activa con pequeñas despolarizaciones que lleven el potencial de membrana a valores más positivos de -70mV. Los canales del tipo "N" requieren despolarizaciones intensas, similares a las que activan a los canales "L" (Mc Cluskey *et al.*, 1987).

El canal "L" es sensible a dihidropiridinas del tipo de la nifedipina y la nitrendipina, así como al verapamil y al

diltiazem, que son conocidos antagonistas orgánicos de calcio en otros tejidos (Nowicky *et al.*, 1985) (Bolger, *et al.*, 1983) (Reuter, *et al.*, 1985).

Los canales "T" y "N" no son afectados por las dihidropiridinas. Sin embargo se ha informado que los canales de calcio sensibles a dihidropiridinas no son los que están directamente involucrados en el proceso de liberación de neurotransmisores, sitios que a su vez son donde actúan el rojo de rutenio y el lantano, así como la 4-aminopiridina (Massieu y Tapia, 1988) (Tapia, 1982).

Los canales "L" y "N" son afectados por la ω -conotoxina, la cual no afecta a los canales "T". Esto es exclusivo del tejido, ya que en músculo no se afectan los canales "L" por ésta toxina (Mc Cleskey *et al.*, 1987). Los canales "N" también son bloqueados por cationes inorgánicos como Cobalto, Manganeso, Lantano y el rojo de Rutenio.

La ω -conotoxina inhibe además la liberación de acetilcolina y de serotonina (Takemura *et al.*, 1987), por lo cual se sugiere que los canales "T" y "N", sobretodo los segundos, están relacionados con la liberación de neurotransmisores. Los canales "N" se localizan en terminales nerviosas, a diferencia de los canales "L" que parecen encontrarse predominantemente en los somas de las neuronas (Miller, 1987)

Rojo de rutenio y Lantano.

El rojo de rutenio es un colorante que tiene la capacidad de unirse a membranas biológicas y es opaco a los electrones, por lo que ha sido usado para la tinción de preparaciones para

microscopía electrónica. Además, al unirse a la membrana de varios tipos de células o de orgánulos celulares como las mitocondrias, el rojo de rutenio inhibe el transporte de calcio (Reed y Bygrave, 1974).

Cuando se añade rojo de rutenio a preparaciones sinaptosomales (terminales nerviosas aisladas) se observa una inhibición en la acumulación del calcio interno. Debido a esta capacidad de inhibir el transporte de calcio en terminales nerviosas, el rojo de rutenio inhibe también la liberación de GABA y de otros neurotransmisores que es estimulada por despolarización y dependiente de calcio (Meza-Ruiz y Tapia, 1978).

Aún no se ha determinado con certeza el sitio de unión del rojo de rutenio a la membrana. Sin embargo, se ha sugerido que podría unirse al ácido siálico, que en terminales nerviosas son muy abundantes (Wierasko, 1986).

El lantano es un catión trivalente del grupo de las tierras raras, que al igual que el rojo de rutenio se une a membranas biológicas e interfiere con los sitios del calcio (Weiss, 1974). El lantano, por su tamaño, densidad de carga y geometría, tiene mucha más atracción electrostática por los sitios aniónicos de la membrana que el mismo calcio, por lo que es un buen bloqueador del transporte del mismo. (Rubin, 1982).

El lantano, al igual que el rojo de rutenio, inhibe la captura de calcio estimulada por despolarización, y por tanto la liberación de GABA dependiente de calcio (Tapia et al, 1985 b).

VI. Quelantes de calcio y magnesio.

Un quelante es una molécula que tiene la cualidad de atrapar específicamente ciertos iones al formar un complejo quelante-ión. El quelante acepta electrones del ión formándose así una unión coordinada. Dicha unión se da por una atracción electrostática entre ambas partículas.

El ácido etilen-diaminotetra-acético (EDTA) y el ácido etilenglicol-aminoetilertetracético (EGTA), son dos efectivos quelantes de calcio, aunque no quelan exclusivamente a éste ión. La afinidad del EGTA y del EDTA por el calcio es muy similar, pero éste último tiene también una gran afinidad por el magnesio, mientras que el EGTA tiene una mayor especificidad por el calcio (Bell, 1977).

ANTECEDENTES INMEDIATOS Y OBJETIVO.

Se ha mencionado que en la captura de GABA, su captura por las propias terminales que lo liberan, es el proceso mediante el cual se elimina del espacio sináptico, finalizando así su acción inhibitoria. Y que tal proceso depende básicamente de sodio y en gran parte de cloro, aunque se desconocen las propiedades del acarreador membranaral de este neurotransmisor. En este sentido y para plantear los objetivos del presente trabajo, es necesario revisar los antecedentes mas inmediatos relacionados con la liberación de GABA dependiente de sodio. Estos resultados se resumen a continuación:

1. En ausencia de calcio y magnesio en el medio, los quelantes de calcio como el EGTA, estimulan notablemente la liberación de GABA.

2. Esta liberación es estrictamente dependiente de sodio, ya que si éste se omite del medio no se observa la liberación.

3. Si se utiliza EDTA en lugar del EGTA, como quelante de calcio la estimulación de la liberación se presenta aún en presencia de magnesio, ya que el EDTA quela tanto calcio como magnesio.

4. La estimulación de la liberación por los quelantes de calcio se inhibe por ronio de rubenio y por lantano.

La explicación propuesta de los resultados anteriores es que la quelación del calcio que se encuentra unido en la parte externa de la membrana, en ausencia de magnesio, desestabiliza la membrana, al exponer cargas negativas de superficie,

que posiblemente pertenecen a los ácidos siálicos de las glicoproteínas, y como consecuencia ocurre un influjo de sodio, a través de canales, que en condiciones normales son de calcio, y que dicho influjo induce la liberación de GABA.

OBJETIVO.

Con estos antecedentes y tomando en cuenta la importancia del sistema de transporte de GABA mencionado en la introducción, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de quelantes de calcio y magnesio sobre la captura de GABA, así como la acción del rojo de rutenio y del lantano sobre dicho efecto.

Los resultados de este estudio aportan datos sobre las características funcionales de la molécula transportadora de GABA en la membrana de las terminales sinápticas en el sistema nervioso central.

MATERIALES Y METODOS:

Se utilizaron ratones Swiss, machos, adultos, con un peso aproximado de 40 gramos, que se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron sus cerebros para la obtención de sinaptosomas los cuales se prepararon por dos métodos, el de Hajós (Hajós, 1975) o el de Löscher (Löscher *et al.*, 1985) que se describen a continuación:

Método de Hajós para la obtención de sinaptosomas.

Se utilizaron 4 cerebros de ratón sin cerebelo, los cuales se homogenizaron en 10 ml de sacarosa 0.32 M con un mazo de teflón.

El tejido homogenizado se centrifugó a 1500xg durante 10 minutos a 4°C (temperatura a la cual se realizó toda la técnica); el sobrenadante obtenido se centrifugó a 9000xg por 20 minutos y el sedimento resultante se resuspendió en 5 ml de sacarosa 0.32 M y se colocó sobre un colchón de 20 ml de sacarosa 0.8 M. Posteriormente se centrifugó a 9000xg por 25 minutos. Obteniéndose tres fases, la de mielina que queda sobre el colchón de sacarosa, la sinaptosomal en el seno de dicho colchón y la mitocondrial en el fondo del tubo. La interfase en donde se encuentran los sinaptosomas se diluyó con 45 ml de sacarosa 0.32 M en constante agitación y sobre hielo, y se centrifugó a 20000xg por 15 minutos. De esta centrifugación se obtuvieron los sinaptosomas concentrados en el sedimento precipitado, el cual se resuspendió en un volumen final de 3 ml de glucosa 0.32 M.

Método de Löscher para la obtención de sinaptosomas.

Se utilizó un cerebro de ratón al que además de quitarle el cerebelo y los bulbos olfatorios se eliminó el tallo cerebral. Se homogenizó de la misma manera que en el método de Hajós en 2 ml de sacarosa 0.32 M con Tris a un pH de 7. Se centrifugó a $1000 \times g$ por 10 minutos, y el sobrenadante se colocó sobre un colchón de 1 ml de sacarosa 1.2 M y se centrifugó a $218000 \times g$, w^2 de $1.6 \times 10^{10} \text{ rad}^2/\text{seg}$ con aceleración y desaceleración lentas. La fase que contenía los sinaptosomas, se diluyó en un volumen total de 2 ml de sacarosa 0.32 M y se colocó en un colchón de 1 ml de sacarosa 0.8 M que se centrifugó a la misma velocidad y con la misma aceleración que la anterior y se obtuvo un sedimento con los sinaptosomas purificados que fueron resuspendidos en 0.5 ml de glucosa 0.32 M.

Los sinaptosomas obtenidos por los dos métodos descritos se comportaron de manera similar en los experimentos de captación de GABA realizados en este trabajo.

Medición de la captura de GABA.

De la resuspensión final de sinaptosomas se tomaron 0.25 ml y se colocaron en 2.25 ml de un medio Tris-Krebs, con la siguiente composición: 118 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 25 mM de Tris/ HCl, 2.5 mM de CaCl_2 y 1.17 mM de MgSO_4 y ácido aminooxiacético 10^{-4} M para inhibir la degradación del GABA. Tanto el calcio como el magnesio fueron eliminados en algunos experimentos. El medio Tris-Krebs normal incluye además fosfato de potasio, pero éste no se agregó, debido a que este anión

precipita el LaCl_3 presente en algunos experimentos. La ausencia de fosfato no alteró la captura del GABA.

El medio conteniendo los sinaptosomas se preincubó a 37°C con agitación suave por diez minutos, para equilibrar el tejido a esta temperatura. A este tiempo se añadió 50 μl de una mezcla de GABA no radioactivo y tritiado para dar una concentración final de 0.5 μM y 0.83 μCi , y se continuó la incubación. A 1, 2 y 4 minutos se tomaron alicuotas de 0.4 ml por duplicado, que se pasaron a través de filtros Millipore (0.65 μm de diámetro de poro) con ayuda de una bomba de vacío, en un multifiltrador. Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml del medio de incubación, para eliminar el exceso de radioactividad no captada por el tejido. En algunos experimentos se tomaron las alicuotas a tiempos menores (15, 30 y 60 segundos). Todas las drogas estudiadas se agregaron al medio desde el inicio de la preincubación.

Posteriormente se colocaron los filtros en frascos con 5 ml de líquido de centelleo basado en Tritón-X-100 (Tritosol), (Fricke, 1975), se agitaron y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

La cantidad de proteína se midió por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Los valores se expresan en picomolas de GABA por miligramo de proteína. Y los valores de significancia se obtuvieron con la prueba de "t" (Student).

Materiales.

El GABA radioactivo se utilizó de New England Nuclear (Boston, MA). (2,3-³H)GABA (actividad específica 34.7 Ci/mmol). El GABA no radioactivo así como el cloruro de lantano, el rojo de rutenio, el EGTA, el EDTA y la nifedipina, se utilizarón de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La concentración del rojo de rutenio usada se calculó para el compuesto puro.

RESULTADOS.

En general, la curva para la captura de GABA en condiciones control, muestra cierta linealidad hasta el minuto dos, después los valores no corresponden a ésta línea .

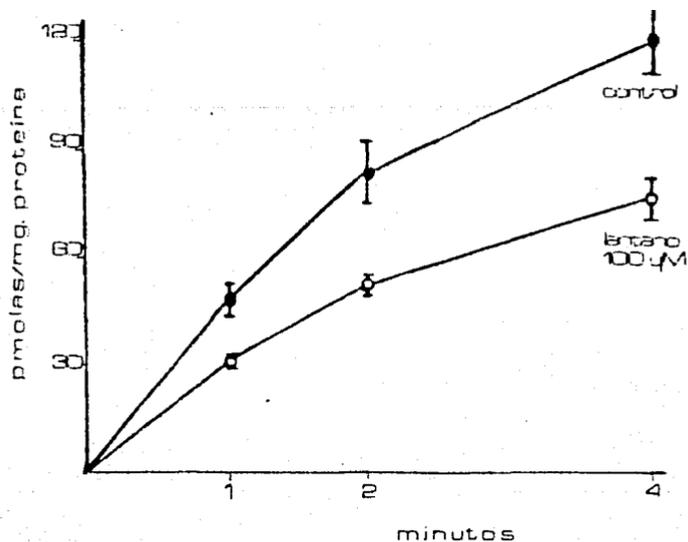
Los porcentajes de inhibición para cada condición probada fueron tomados al segundo minuto.

Para el efecto del EGTA, se realizó una serie de experimentos a tiempos cortos de 15, 30 y 60 segundos, la curva control de dichos experimentos no es estrictamente lineal para los valores de 15 a 30 segundos (Gráfica No. 9).

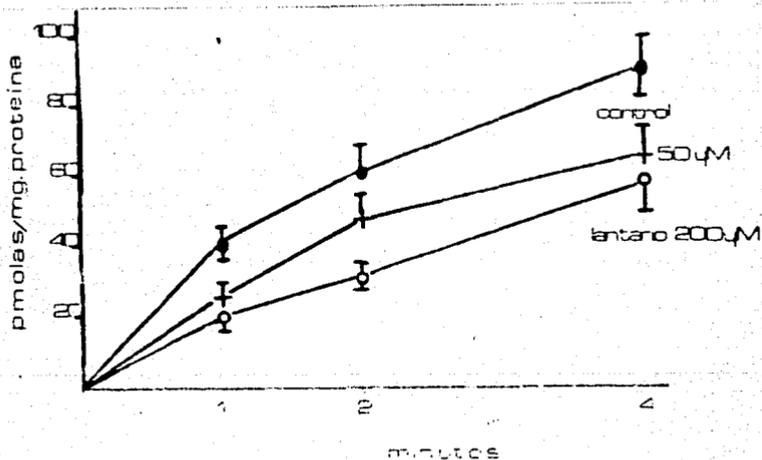
Efecto del lantano.

El cloruro de lantano a concentraciones de 50, 100 y 200 μM . (Gráficas No.1 y No.2) inhibieron la captura de GABA en un 20 %, 40 % y 50 % respectivamente.

El efecto del lantano tuvo una significancia de $P < 0.5$ para 50 μM , de $P > 0.01$ para 100 μM y de $P < 0.01$ para 200 μM .



Gráfica No. 1. Efecto del Lantano 100 uM sobre la captura de GABA. Cada punto es el promedio de 20 experimentos \pm E.S. $p < 0.01$

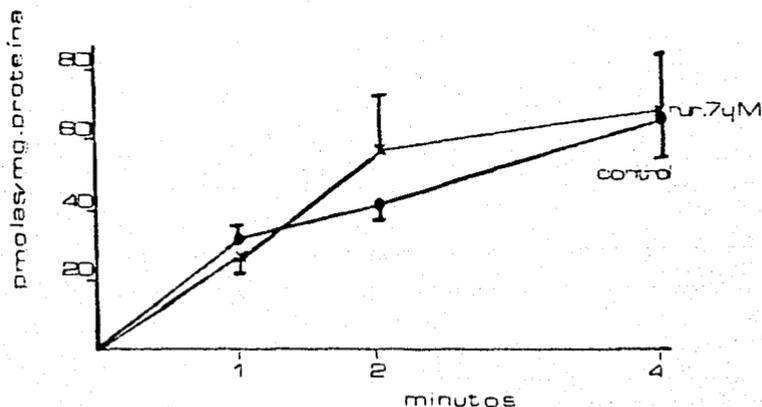


Gráfica No. 2. Efecto del lantano 50 y 200 uM, sobre la captura de GABA. Cada punto es el promedio de 12 experimentos \pm E.S. Donde $p < 0.5$ para 50 uM de lantano, y $p < 0.01$ para 200 uM.

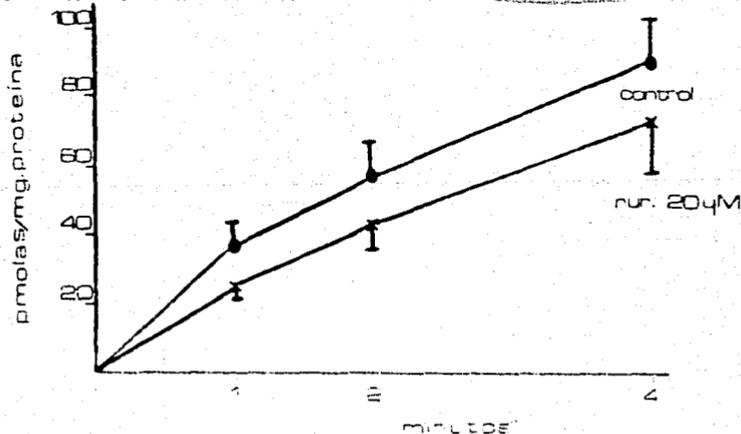
Efecto del rojo de rubenio.

El rojo de rubenio fué probado a concentraciones de 7 y 20 μM . Observándose una inhibición de la captura de GABA solamente con 20 μM . (Gráficas No.3 y No.4).

La concentración de 7 μM no tuvo efecto, y la de 20 μM no fue significativo $P > 0.1$.



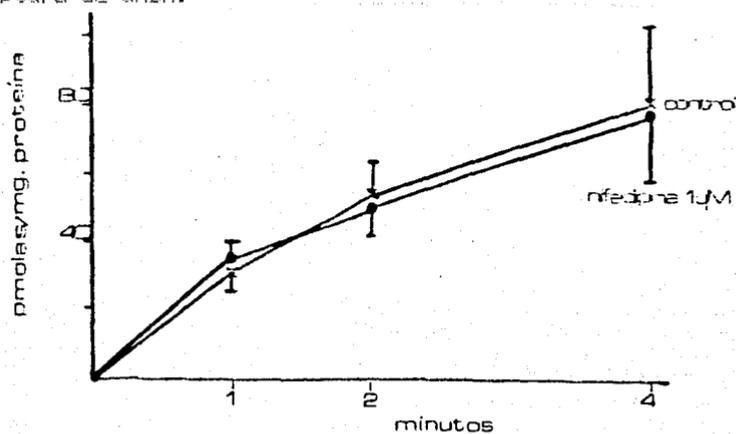
Gráfica No. 3. Efecto del rojo de rubenio 7 μM sobre la captura de GABA. Cada punto es el promedio de 5 experimentos \pm E.S.



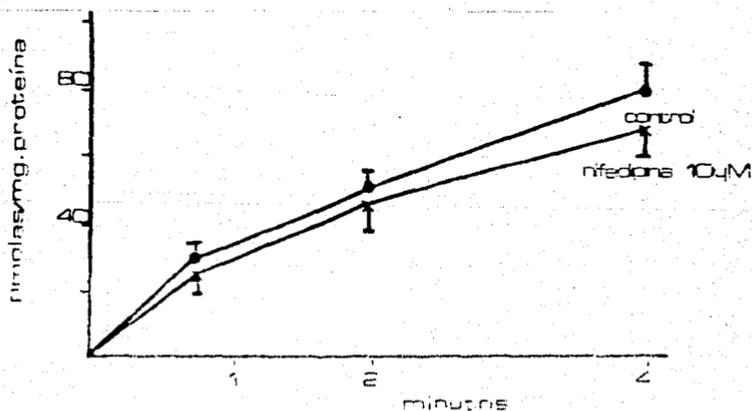
Gráfica No. 4. Efecto del rojo de rubenio 20 μM sobre la captura de GABA. Cada punto es el promedio de 9 experimentos \pm E.S. $p < 0.1$.

Efecto de la nifedipina.

Como se muestra en las gráficas No. 5 y No.6, la nifedipina en concentraciones de 1 y 10 μM , no tuvo ningún efecto sobre la captura de GABA.



Gráfica No. 5. Efecto de la nifedipina 1 μM sobre la captura de GABA. Cada punto es el promedio de 5 experimentos \pm E.S.



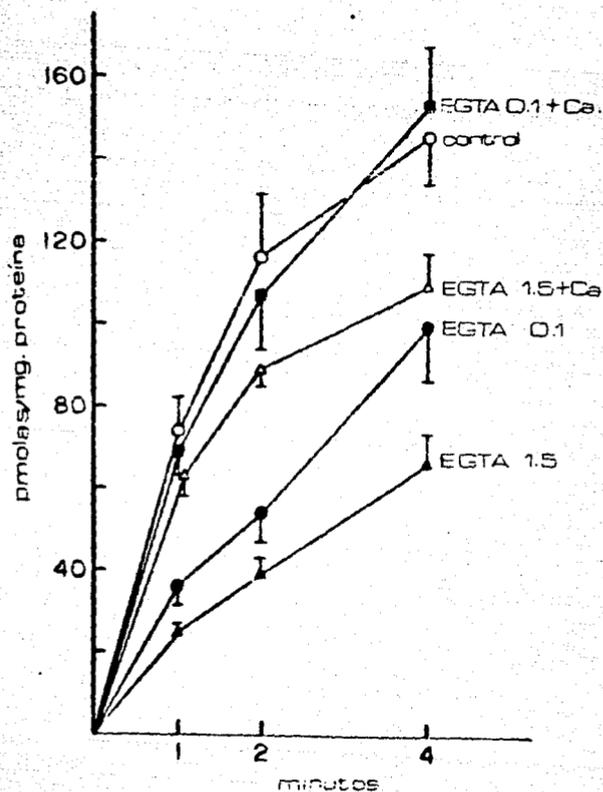
Gráfica No. 6. Efecto de la nifedipina 10 μM sobre la captura de GABA. Cada punto es el promedio de 6 experimentos \pm E.S.

Efecto del EGTA en ausencia y en presencia de calcio y magnesio en el medio.

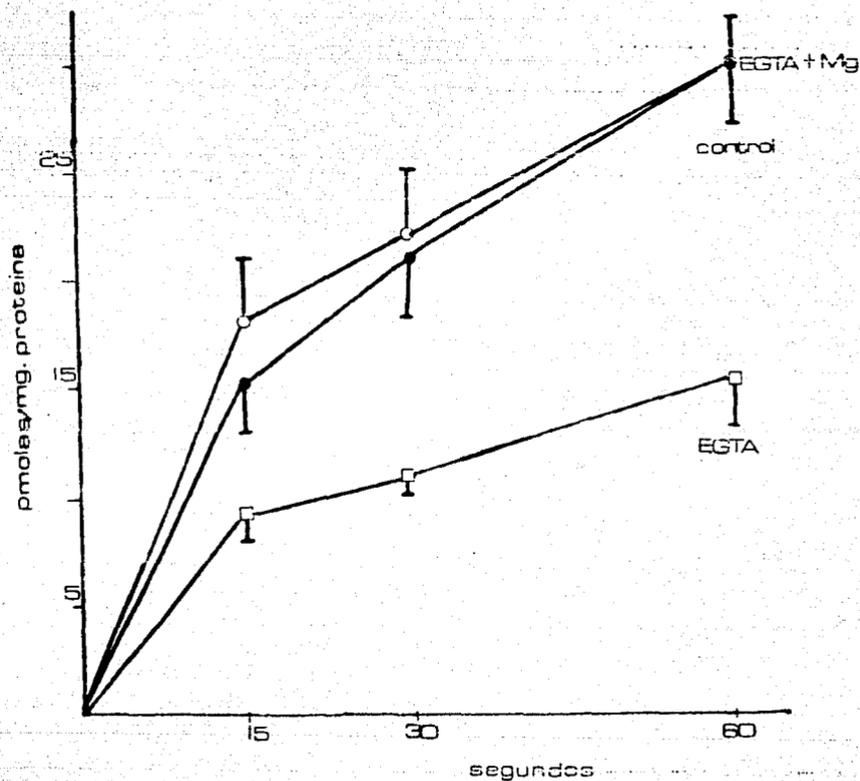
Quando se eliminan el calcio y el magnesio del medio, la captura no se afectó. Sin embargo, la adición de EGTA 100 μ M inhibió la captura de GABA aproximadamente en un 55 %, y esta inhibición aumentó a 67 % con EGTA 1.5 mM (Gráfica No.7). La adición de un exceso de calcio revirtió totalmente la inhibición producida por EGTA.

En la gráfica No.8 se muestra que el magnesio también revirtió la inhibición producida por el EGTA.

La inhibición de la captura por EGTA fué significativa en ambas concentraciones, $P < 0.01$.



Gráfica No. 7. Efecto inhibitor del EGTA 0.1 y 1.5 mM, sobre la captura de GABA en un medio sin calcio ni magnesio, y como se revierte con calcio 2.5 mM. Cada punto es el promedio de 6 experimentos \pm E.S. Donde $p < 0.01$ para la inhibición de la captura con ambas concentraciones.

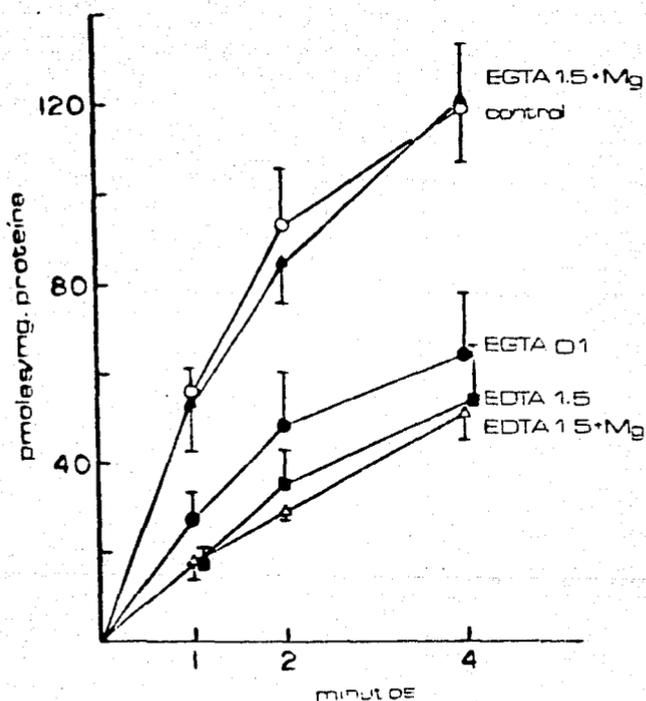


Gráfica No. 8. Efecto del EDTA 0.1 mM sobre la captura de GABA, en un medio sin calcio ni magnesio, y como se revierte dicho efecto con magnesio 1.17 mM. Medición a tiempos cortos. Cada punto es el promedio de 5 experimentos \pm E.S.

Efecto del EDTA.

El EDTA en ausencia de calcio y magnesio tuvo el mismo efecto inhibitor de la captura de GABA que el EGTA, (Gráfica 9). Sin embargo, la adición de magnesio al medio, no revirtió la inhibición producida por el EGTA. (Gráfica No. 9).

Donde los valores de significancia fueron $P < 0.01$ y $P < 0.001$ para EGTA y EDTA respectivamente.

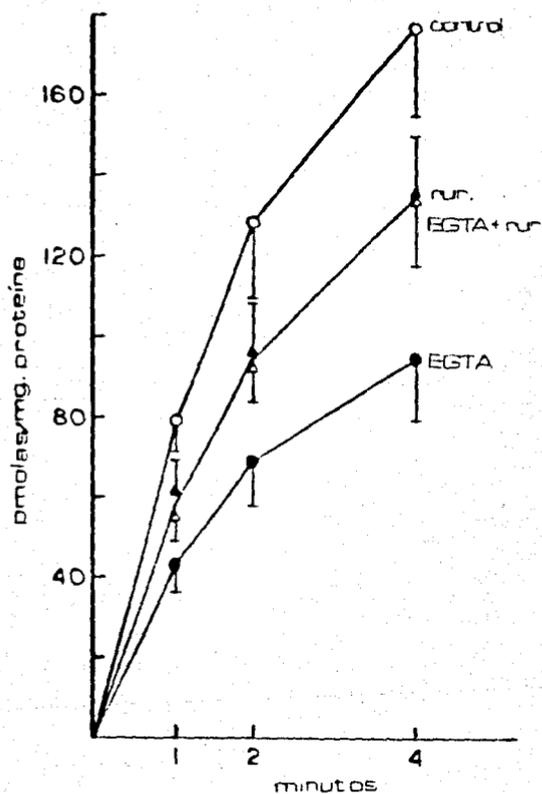


Gráfica No. 9. Efecto del EGTA (0.1 y 1.5 mM) y del EDTA (1.5 mM) sobre la captura de GABA en un medio sin calcio ni magnesio, y como se revierte dicho efecto con magnesio 1.17 mM (en el caso del EGTA). Cada punto es el promedio de 5 experimentos \pm E.S. Donde la $p < 0.01$ y $p < 0.001$ para la inhibición por EGTA 0.1 mM y EDTA 1.5 mM respectivamente.

Efecto del rojo de rutenio sobre la inhibición de la captura de GABA producida por EGTA.

Como se muestra en la gráfica No.10, cuando se añadió rojo de rutenio a una concentración de 20 μM , en ausencia de calcio y de magnesio, se revirtió la inhibición de la captura de GABA producida por el EGTA 100 μM . Solamente se observó la inhibición producida por el rojo de rutenio *per se*.

El valor en presencia de rojo de rutenio no difiere significativamente del control $P > 0.1$.



Gráfica No. 10. Efecto del rojo de rutenio 20 μ M, sobre el efecto inhibitor de la captura de GABA por EGTA 0.1 mM. Cada punto es el promedio de 8 experimentos \pm E.S. Donde $p > 0.1$ entre los valores control y los experimentos con rojo de rutenio.

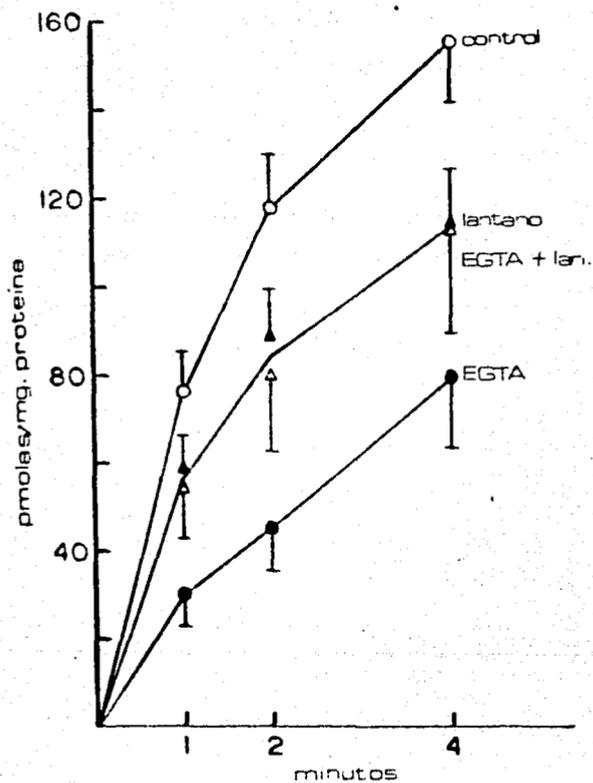
Efecto del lantano sobre la inhibición de la captura de GABA
producida por EGTA.

De manera similar al rojo de rubenio, el lantano en una concentración de 250 μM revirtió la inhibición producida por EGTA 100 μM .

La inhibición observada en presencia de EGTA y lantano fué igual a la producida por este catión solo, pero es de hacerse notar que ésta última fué considerablemente menor a la producida por el lantano per se en presencia de calcio y magnesio. (Compárense las figuras 1 y 11).

El valor en presencia de lantano no difiere significativamente de los valores control, $P > 0.1$.

Para confirmar este dato, se hicieron otros experimentos en los que se estudió el efecto del lantano 250 μM sobre la captura de GABA comparativamente en presencia y en ausencia de calcio y magnesio. Los resultados de éstos experimentos mostraron que efectivamente en ausencia de estos cationes la inhibición promedio producida por el lantano, fué del 24 %, significativamente menor que aquella observada en presencia de EGTA 100 μM (55% ; promedio de 6 experimentos). Lo cual muestra que el lantano por su carácter como catión actúa en una forma similar al magnesio y al rojo de rubenio en ausencia de calcio. La gráfica 11 muestra éstos resultados.



Gráfica No. 11. Efecto del lantano 250 μ M, sobre el efecto inhibitor del EGTA 0.1 mM. Cada punto es el promedio de 8 experimentos \pm E.S. Donde la significancia es de $p > 0.1$, entre el control y los experimentos con lantano.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

I. Inhibición de la captura del GABA por rojo de rutenio y lantano.

Como ya se ha expuesto previamente, cationes antagonistas del calcio como el rojo de rutenio y el lantano inhiben la liberación del GABA dependiente de calcio, (Meza-Ruiz y Tapia, 1978; Tapia et al., 1985a.) además de la entrada de calcio a la terminal estimulada por despolarización en sinaptosomas (Tapia et al., 1985a ; Arias y Tapia, 1986). Sin embargo estos cationes también inhiben la liberación de GABA dependiente de sodio que se observa por la quelación del calcio endógeno (Arias et al., 1986), efecto que parece deberse a que el rojo de rutenio y el lantano funcionan como estabilizadores de la membrana en ausencia de calcio y por ello no hay influjo de sodio que induzca la liberación.

Otra posibilidad es que estos cationes se unan al sitio de sodio del acarreador de GABA, de acuerdo con el mecanismo de transporte ya mencionado. Esta posibilidad se ve apoyada por el hallazgo de que la nifedipina, un bloqueador muy selectivo del canal "L" de calcio, no tuvo ningún efecto sobre la captura de GABA en concentraciones muy superiores a las de su Kd. (Massieu y Tapia, 1988).

II. Inhibición de la captura por EGTA y EDTA.

Como ya se expuso anteriormente, el EGTA y el EDTA inducen, en ausencia de calcio y magnesio en el medio, una liberación de GABA exclusivamente dependiente de sodio (Arias et al., 1984) lo

cual se explica por que al eliminar el calcio de la superficie membranal externa, ésta se desestabiliza, y aumenta la permeabilidad al sodio. El incremento resultante en la concentración interna del sodio en la terminal, provoca la liberación de GABA.

La inhibición de la captura de GABA por EGTA y EDTA descritas en este trabajo, es muy similar en muchos aspectos a lo informado anteriormente para la liberación de GABA (Arias *et al.*, 1984). Tanto la inhibición de la captura, como la estimulación de la liberación producida por EGTA se eliminan completamente con calcio o magnesio en exceso y este último catión no es efectivo cuando se usa EDTA, ya que este quelante "atrapa" también al magnesio. Además, ambos efectos son bloqueados por lantano y por rojo de rutenio. La inhibición de la captura no está dada simplemente por la omisión de calcio y/o magnesio en el medio de incubación, ya que no se observan cambios en estas condiciones a menos que se agregue EGTA o EDTA.

Como se mencionó en la introducción, el aumento en la liberación de GABA por quelación del calcio es estrictamente dependiente de sodio, de lo que se concluye que éste se debe al influjo de sodio a los sinaptosomas como consecuencia de una desestabilización de la membrana por una falta de neutralización de las cargas negativas de superficie. Por tanto, la explicación más inmediata de la inhibición de la captura de GABA reportado en el presente trabajo es que el gradiente de sodio se altera por tratamiento con quelantes de calcio y en consecuencia el GABA tiende a salir de los sinaptosomas lo que resultaría en una

inhibición de la captura, que sería solo aparente y no real.

Sin embargo, dos tipos de observaciones indican que esta interpretación no es probable. Primero, el ácido 2-4-diaminobutírico no afecta la liberación de GABA dependiente de sodio producida por quelantes de calcio, mientras que en condiciones normales este compuesto afecta al acarreador de GABA (Arias *et al.*, 1984), lo cual indica que el flujo de GABA no se lleva a cabo por el transportador. Segundo, los resultados aquí expuestos indican que la inhibición de la captura de GABA por EGTA no es significativamente diferente con o sin preincubación del quelante con los sinaptosomas, lo cual sugiere que la acción del EGTA es inmediata y por lo tanto no depende del establecimiento de un nuevo gradiente de sodio. Es, pues, necesario encontrar otra explicación diferente a la inversión del gradiente de sodio.

Recientemente se ha mostrado que la captura de GABA se reduce proporcionalmente al desprendimiento de ácido siálico producida por el tratamiento de sinaptosomas con neuraminidasa, (Zaleska y Erecinska, 1987). Estos datos sugieren que los residuos de ácido siálico son un componente funcional del acarreador de GABA o de una molécula fisiológicamente asociada a éste.

Los residuos de ácido siálico de glicoproteínas y gangliósidos son responsables de la mayoría de las cargas negativas de superficie que se encuentran en la membrana sinaptosomal que normalmente se encuentran neutralizadas por calcio unido a la parte externa de la membrana. Por lo tanto, parece razonable concluir que los residuos de ácido siálico, que

Parecen participar en el funcionamiento del acarreador de GABA, requieren tener sus cargas negativas neutralizadas por calcio u otro catión, para que el acarreador de GABA sea funcional. Esta interpretación es fuertemente apoyada por el hecho de que el magnesio es muy efectivo previniendo la inhibición de la captura de GABA por EGTA pero no por EDTA, ya que este último es igualmente ávido por el calcio y el magnesio, mientras que el primero es mucho más selectivo para calcio que para magnesio. En la misma línea de pensamiento el efecto protector del lantano y del rojo de rutenio, se puede explicar por la neutralización de las cargas negativas del ácido siálico por estos cationes.

Un apoyo adicional a esta interpretación es el hallazgo recientemente publicado (Hollman y Seifert, 1989) de que existe un transporte de glutamato en sinaptosomas que es independiente de cloro y sodio, el cual es estimulado por la presencia simultánea de gangliósidos y de calcio. Esta estimulación, además solamente se observa cuando los gangliósidos que se incorporan a la membrana poseen residuos de ácido siálico, lo cual es congruente con nuestra interpretación.

Conclusión

En la figura No.5 se muestra un modelo de lo que podría ser el acarreador de GABA, en el cual se ha incluido la participación del ácido siálico y de su neutralización por calcio, en una molécula asociada al acarreador. En el modelo se muestran los sitios de cloro y sodio (que son co-transportados con el GABA), y se postula que el GABA no puede unirse al sitio del transportador

sin la presencia de calcio endógeno en la membrana que neutralice las cargas de los ácidos siálicos asociados al mismo o a una molécula acoplada a él. En la parte A de la figura se observa la forma inactiva del acarreador, en donde el GABA no puede ser transportado. En la parte B se muestra la secuencia que seguiría el acarreador para transportar al GABA, cuando hay calcio neutralizando la carga del ácido siálico en la cara externa de la membrana.

En este caso se cambiaría la conformación del sitio de GABA para permitir la unión del aminoácido y su consecuente transporte hacia el interior del sinaptosoma.

Aunque este modelo es especulativo, permite explicar de manera congruente los hallazgos del presente trabajo, de manera integrada con los de Zaleska y Erecínska (1987) y de Hollman y Seifert (1989).

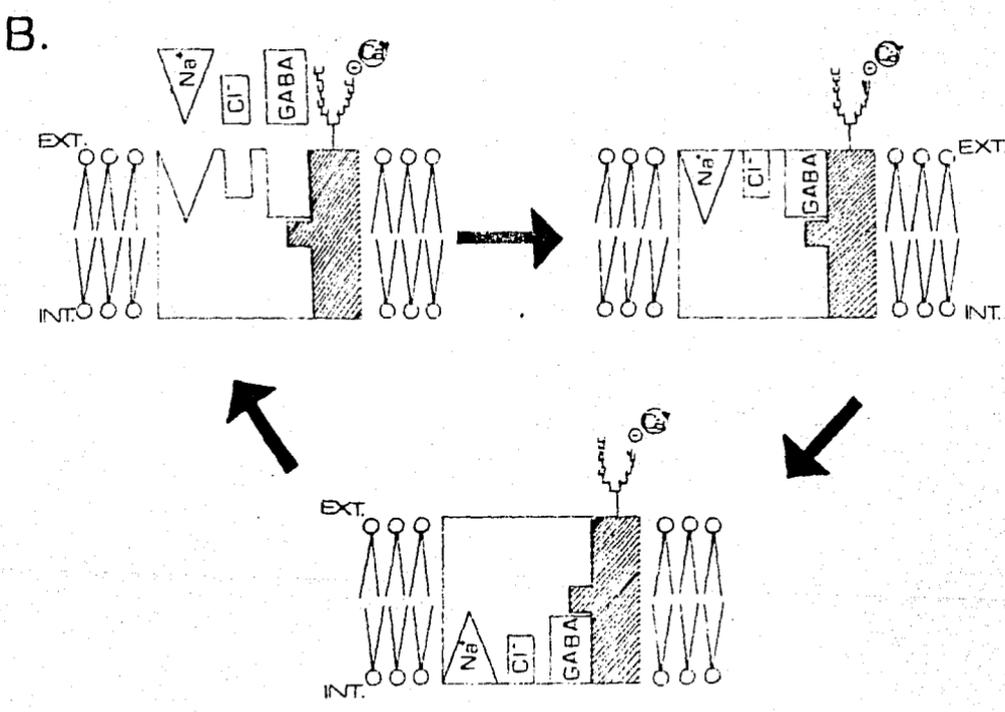
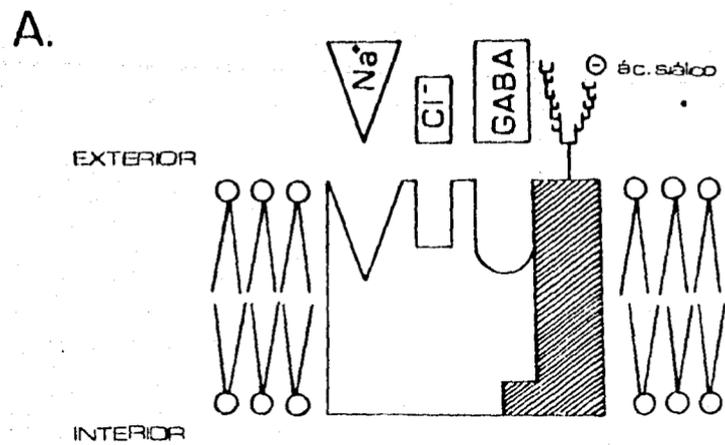


Fig. 5. Modelo del acarreador de GABA y del papel de los gangliósidos, los residuos de ácido siálico y su neutralización por calcio, en su funcionamiento. En A se muestra cómo sin calcio neutralizando las cargas negativas del ácido siálico no se puede unir el GABA ni ser transportado al interior de la célula y en B. el modo en que se podría activar la unión de GABA y su transporte.

REFERENCIAS.

- Adam-Vizi, V., y Ligeti, E. (1984) Release of acetylcholine from rat brain synaptosomes by various agents in the absence of external calcium ions. J. Physiol. 358:505-521.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., (1983) Molecular biology of the cell. Garland pub. Inc. New York. N.Y. U.S.A. 1146 pp.
- Arias, C., Sitges, M., Tapia, R. (1984) Stimulation of (3H)-GABA release by calcium chelators in synaptosomes. J. Neurochem. 45:1507-1514.
- Arias, C., y Tapia, R. (1986) Differential calcium dependence of aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. J. Neurochem. 47:396-404.
- Bell, C. F. (1977) Principles and applications of metal chelation. Clarendon Press. Oxford. G.B. 147pp.
- Blaustein, M.P., y King, Ch. (1976) Influence of membrane potential on the sodium-dependent uptake of gamma-aminobutyric acid by presynaptic nerve terminals: Experimental observations and theoretical considerations. J. Mem. Biol. 30: 153-173.
- Bolger, G.T., Gengo, P., Klockowski, R., Luchowski, E., Siegel, H., Janis, R.A., Triggle, A.M. y Triggle, D.J. (1983) Characterization of binding of the calcium channel antagonist, (3H)Nitrendipine to guinea pig ileal smooth

3
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- muscle. J.Pharmacol. Exp. Ther. 225:291-309.
- Bonilla, E.R. (1985) Bases moleculares de la neurotransmisión. Maracaibo, Venezuela. Astra Data. 486pp.
- Cohen, S.R., y Lajtha, A. (1972) Aminoacid transport. In handbook of Neurochemistry, edit. Lajtha, A. Vol.7. 543-572. Plenum press. New York. N.Y.
- Enna, S.J., Gallanher, J.P. (1983) Biochemical and electrophysiological characteristics of mammalian GABA receptors. Int. Rev. Neurobiol. 24:181-212, 1983.
- Erecinska, M. (1987) The neurotransmitter aminoacid transport systems. Biochem. Pharmacol. 36:3547-3555
- Erecinska, M., Troeger, M.B. y Alston, Th.A. (1986) Aminoacid neurotransmitters in the CNS: Properties of diaminobutyric acid transport. J.Neurochem. 46, 1452-1463.
- Fishman, R.H. (1986) Recent advances in identifying the functions of gangliosides. Chem. Phys. Lipids. 137-151.
- Fricke, U. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on triton-x-100. Anal. Biochem. 63:555-558.
- Guyton, A.C. (1987) Basic neuroscience. Anatomy and Physiology. Philadelphia, P.A. W.B.Saunders Company. 393pp.
- Hajós, F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. 93:485-

- Hayashi, K., y Katagiri, A. (1974) Studies on the interaction between gangliosides protein and divalent cations. Biochem. Biophys. Acta, 337:107-117.
- Hitzemann, R.J., y Loh, H.H. (1978) A comparison of GABA and β -alanine transport and GABA membrane binding in the rat brain. J. Neurochem. 30: 471-477.
- Hollmann, M., y Seifert, W. (1989) Glutamate transport and not glutamate receptor binding is stimulated by gangliosides in a calcium-dependent manner in rat brain synaptic plasma membranes. J. Neurochem. 53:716-727.
- Iversen, L.L., y Kelly, J.S. (1975) Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurones and glial cells. Biochem. Pharmacol. 24:933-938.
- Iversen, L.L. y Neal, M.J. (1968) The uptake of (3H)-GABA by slices of rat cerebral cortex. J. Neurochem. 15: 1141-1149.
- Jeserich, G., Breer, H., y Duvel, M. (1981) Effect of exogenous gangliosides on synaptosomal membrane ATP-ase activity. Neurochem. Res. 6:465-474.
- Kandel, E.R., y Schwartz, J. (1985) Principles of neural science. New York, N.Y. Elsevier. 979pp.
- Kanner, B. (1978) Active transport of γ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. Biochem.

- Kanner, B. (1983) Bioenergetics of neurotransmitter transport. Biochem. Biophys. Acta, 726:293-316.
- Kanner, B.I., y Kifer, L. (1981) Efflux of γ -aminobutyric acid by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. Biochem. 20:3354-3358.
- Kanner, B.I., Marva, E. (1982) Efflux of L-Glutamate by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. Biochem. 21: 3143-3147.
- Kuhar, M.J. (1973) Neurotransmitter uptake: a tool in identifying neurotransmitter-specific pathways. Life Sciences 13:1623-1634.
- Kuhar, M.J., y Zarbin, N.A. (1978) Synaptosomal transport: a chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds. J. Neurochem. 31:251-256.
- Lajtha, A., y Sershen, H. (1975) Changes in aminoacid influx with sodium flow in incubated slices of mouse brain. Brain Res. 84:421-441.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. J. Biol. chem. 193:265-275.
- Löscher, W., Bohme, G., Muller, F., Pagliusi, S. (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions

- of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on the nerve terminal gamma-aminobutyric acid *in vivo*. J. Neurochem. 45:879-889.
- Martin, D.L. (1973) Kinetics of the sodium-dependent transport of gamma-aminobutyric acid by synaptosomes. J. Neurochem. 21: 345-356.
- Massieu, L., and Tapia, R. (1988) Relationship of dihydropyridine binding sites with calcium-dependent neurotransmitter release in synaptosomes. J. Neurochem. 51:1184-1189.
- Mc Cluskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.V., Olivera, B.N. y Tsien R.W. (1987) W-Conotoxin: a direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not in muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:4327-4331.
- Meza-Ruiz, G., y Tapia, R. (1978) GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. Brain Res. 154:163-166.
- Miledi, R. (1973) Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. Proc. R. Soc. B. 183:73-77.
- Miller, R.J. (1987) Multiple calcium Channels and neuronal function. Science. 235:46-52.
- Miller, R.J., y Freedman, S.B. (1984) Are dihydropyridines

- binding sites voltage sensitive calcium channels. Life Sci. 34:1205-1221.
- Neal, M.J., y Bowery, N.G. (1977) Cis 3-aminocyclohexanecarboxylic acid a substrate for the neuronal transport system. Brain Res. 138: 169-174.
- Nowicky, M.C., Fox, A.P., y Tsien, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature 316:440-443.
- Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H., comp. (1983) Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. U.N.A.M. 189pp.
- Reed, K.C. y Bygrave, F.L. (1974) Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. Biochem. J. 140:143-155.
- Reuter, H., Porzig, H., Kokubun, S., y Prod'hom, B. (1985) 1,4-Dihidropiridines as tools in the study of calcium channels. IINS 396-400.
- Rubin, R.P. (1982) Calcium and cellular secretion. Plenum Press, New York. N.Y. 276 pp.
- Simon, J.R., Martin, D.L. y Kroll, M. (1974) Sodium-dependent efflux and exchange of GABA in synaptosomes. J. Neurochem. 23:981-991.
- Takemura, M., Fukui, H., y Wada, H. (1987) Different

- localization of receptors for α -conotoxin and nifedipine in rat brain. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 149:982-988.
- Sandoval, M.E. y Lara, R. (1983) en Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. compiladores. Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. U.N.A.M. 189 pp.
- Tank y Hinzen (1974)
- Tapia, R. (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. Neurosci. Lett. 30:73-77.
- Tapia, R. (1983) Regulation of glutamate decarboxylase activity. Glutamine glutamate and GABA in the C.N.S. pág. 113-128.
- Tapia, R., Arias, C., Morales, E. (1985 a) Binding of lanthanum ions and ruthenium red to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release. J. Neurochem. 45:1464-1470.
- Tapia, R., Sitges, M., Morales, E. (1985 b) Mechanism of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. Brain Res. 361:373-382.
- Weiss, G.B. (1974) Cellular pharmacology of lanthanum. Ann. Rev. Pharmacol. 14:343.
- White, W.F. y Snodgrass, S.R. (1983) Isoguavacine binding, uptake and release: Relation to the GABA system. J. Neurochem. 40: 1701-1708.
- Wheeler, D.D. (1980) Sodium dependence of GABA transport in rat

hypothalamic synaptosomes. J. Neurosci. Res. 5:323-337.

Wierasko, A. (1986) Evidence that ruthenium red disturbs the synaptic transmission in the rat hippocampal slices through interacting with sialic acid residues. Brain Res. 378:120-126.

Wierasko, A., y Seifert, W. (1984) Evidence for a functional role of gangliosides in synaptic transmission: studies on rat brain striatal slices. Neurosci. Lett. 52:123-128.

Zaleska, M.M., Erecinska, M. (1987) Role of sialic acid in synaptosomal transport of amino acid transmitters. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84:1709-1712.