

00562
3
EJ

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

División de Estudios de Posgrado

División de Bioquímica y Farmacia

**"EFECTOS DE LA MELITINA SOBRE LOS
SINAPTOSOMAS"**

**Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas (Bioquímica) presenta la**

Q.F.B. Luxiola Margarita González de la Garza

FALLA DE ORIGEN

1995



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.

El presente trabajo se realizó en la "Unidad de Psicofarmacología Molecular" del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.- Instituto Mexicano de Psiquiatría, S.S. bajo la dirección de la Dra. María Sitges Berrondo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer patente mi agradecimiento:

A la Dra. María Sitges Berrondo, por su excelente orientación, no solamente durante las innumerables tardes de discusión que dedicó a mi formación académica y al desarrollo del presente trabajo. Por su ejemplo de profesionalismo y dedicación, por su paciencia y su apoyo generoso e irrestricto.

A los miembros del jurado: Dr. Ricardo Tapia, Dra. Rocío Salceda, Dr. Fernando Montiel, Dra. Herminia Pasantes y Dr. Adolfo García Sainz por los valiosos comentarios, sugerencias y recomendaciones que me hicieron después de revisar cuidadosamente la tesis.

A las autoridades de la Facultad de Química, UNAM, especialmente a la Dra. Marina Gavilanes y a la Dra. Irma Bernal; así como las autoridades del Instituto Mexicano de Psiquiatría, S.S. por el apoyo y las facilidades que me brindaron.

A el Dr. Juan Ramón de la Fuente por el apoyo y las facilidades que me brindó.

A la Dra. Claudia Lerma por el apoyo que me brindó.

DEDICATORIA

A mis padres Francisco y Luxiola.

A mis hermanos Alberto y Juan Francisco

CONTENIDO

	Página	
ABREVIATURAS		5
RESUMEN		6
I. INTRODUCCION		8
II. ANTECEDENTES		9
II.A. LA MELITINA		9
1. Características fisicoquímicas		10
A) Estructura cristalina		11
B) Estructura en solución		13
C) Interacción con membranas y efecto lítico.		14
D) Hemólisis como modelo de proceso lítico		16
2. Características bioquímicas		18
A) Activación de la PLA ₂		18
B) Efectos reportados sobre diversos sistemas		18
II.B. PLA₂ DE MAMIFEROS		20
1. Localización y funciones.		21
2. Características bioquímicas.		24
3. Regulación.		26
4. Modulación farmacológica de la actividad de la PLA ₂ .		27
5. Las PLA ₂ independientes de Ca ²⁺ .		28
6. Evidencias de actividad de PLA ₂ en sinaptosomas.		29
II.C. GENERALIDADES SOBRE TRANSMISION QUIMICA		30
1. Transmisión Química.		30
2. Almacenamiento del Neurotransmisor.		30

3. Evidencia bioquímica de exocitosis.	31
4. Remoción del Neurotransmisor de la hendidura sináptica.	31
5. Sinaptosomas.	32
III. OBJETIVOS	33
IV. MATERIAL Y METODOS	34
1. Obtención de la preparación sinaptosomal.	35
2. Liberación de neurotransmisores en perfusión continua.	36
A) Medio de perfusión.	36
B) Incorporación de la marca radiactiva.	36
C) Liberación de neurotransmisores.	37
3. Determinación del ácido araquidónico producido por membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón.	38
A) Marcado de los fosfolípidos membranales	38
B) Preparación de membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón.	39
C) Producción de ácido araquidónico.	40
4. Determinación de proteínas.	40
5. Determinación de deshidrogenasa láctica.	41
6. Tratamiento estadístico de los datos.	41
V. RESULTADOS	43
1. Efectos de la melitina sobre los sinaptosomas.	43
A) Efecto de la melitina sobre la liberación de neurotransmisores.	43
B) Efecto de la melitina sobre la producción de ácido araquidónico de membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón.	45
C) Efecto de la melitina sobre la salida de DHL de los sinaptosomas.	46
2) Dilución de la melitina en las membranas.	47
A) Efecto de la concentración de melitina en la membrana de los sinaptosomas sobre la liberación de neurotransmisores.	47
B) Efecto de la concentración de melitina en la membrana de los sinaptosomas sobre la hidrólisis de ácido araquidónico.	50
C) Efecto de la concentración de melitina en la membrana de los sinaptosomas sobre la salida de	

DHL.	52
3. Dependencia de Ca^{2+} en los efectos de la melitina.	53
A) Dependencia de Ca^{2+} para la liberación de [^3H]-GABA.	53
B) Dependencia de Ca^{2+} para la hidrólisis de [^3H]-ácido araquidónico.	54
C) Dependencia de Ca^{2+} para la salida de DHL.	55
4. Efecto del BPB sobre las respuestas inducidas por melitina en sinaptosomas.	56
VI. DISCUSION	60
VIII. REFERENCIAS	69

ABREVIATURAS

BSA	albúmina sérica bovina
BPB	bromofenacil bromuro
CaMPK-II	proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina
CHO	células de ovario de hámster chino
DC	dicroísmo circular
DHL	deshidrogenasa láctica
DTT	ditiotreitól
EET	ácidos epoxieicosatrienoico
GABA	ácido gama amino butírico
HETES	ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HPETES	ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos
(1H-RMN)	resonancia magnética nuclear protónica
IL 1	interleucina 1
IL 6	interleucina 6
MLT	melitina
P2	sinaptosomas crudos
PKC	proteína cinasa C
PL	fosfolípidicos (PL)
PLA2	fosfolipasa A2
PLAP	proteína activadora de la PLA2 de mamífero
TNF	factor de necrosis tumoral

RESUMEN

La melitina (MLT) es un polipéptido invasor de membrana anfipático básico de 26 amino ácidos contenido en el veneno de la abeja *Apis mellifera*, que se conceptualiza como un estimulador directo de la actividad de fosfolipasa A₂ (PLA₂), pero que a concentraciones micromolares causa hemólisis. No obstante los posibles efectos como agente inductor de daño celular, la MLT se ha usado extensamente como herramienta experimental para explorar la participación de la PLA₂ en los procesos de secreción. En este trabajo se analizaron los efectos de la MLT en sinaptosomas (i.e. terminales nerviosas aisladas del cerebro del mamífero) sobre: (I) la liberación de neurotransmisores (como modelo de secreción), (II) la producción de ácido araquidónico (como indicador de activación de la PLA₂) y (III) sobre la salida de deshidrogenasa láctica (DHL) (para detectar daño celular). Encontramos que a concentraciones crecientes (0.3, 1 y 10 μM) la MLT aumenta la liberación de los neurotransmisores (GABA y dopamina) de manera dosis dependiente, con una ED₅₀ (1.37 μM) similar a la reportada anteriormente para estimular la secreción de péptidos y hormonas. También encontramos que la MLT aumenta la producción de ácido araquidónico (uno de los principales productos de la actividad de la PLA₂) en membranas de sinaptosomas en forma dependiente de dosis. Sin embargo, a la concentración de 10 μM la MLT induce la salida del marcador citoplásmico, DHL de los sinaptosomas. Descubrimos que la cantidad de proteína sinaptosomal expuesta a la MLT determina la eficacia de dicha toxina sobre las 3 respuestas estudiadas, lo que indica que la concentración de melitina activa es la que ha alcanzado la membrana sinaptosomal. La presencia de Ca²⁺ externo facilita la liberación de GABA y la producción de ácido araquidónico que induce la MLT a las concentraciones membranales que no alcanzan a inducir salida de DHL, pero no modifica la salida de DHL que induce la concentración elevada (10 μM) de MLT. Asimismo, el inhibidor

de la actividad de PLA₂, bromofenacil bromuro (BPB), disminuye la liberación de GABA inducida por bajas concentraciones de MLT, pero no protege la salida de la DHL que induce la MLT a altas concentraciones. Nuestra interpretación de estos resultados es que la MLT a concentraciones bajas activa a una PLA₂ dependiente de Ca²⁺ capaz de regular la liberación de GABA. El daño independiente de Ca²⁺ que produce la MLT a concentraciones mayores no parece sin embargo, involucrar la actividad de esta enzima. Dadas las características fisicoquímicas de la toxina, el daño celular posiblemente está relacionado con los arreglos conformacionales que adoptan las moléculas de MLT en la membrana sinaptosomal a altas concentraciones. Los resultados presentados en este trabajo ponen de manifiesto que para emplear a la melitina en estudios relacionados con la participación de la PLA₂ en procesos de secreción es crucial escoger cuidadosamente la cantidad de tejido que se expondrá a la toxina, así como la concentración de la misma.

INTRODUCCION

Los mecanismos bioquímicos involucrados en el daño celular tóxico, sobre todo en el sistema nervioso central, han atraído un creciente interés en los últimos años. El desequilibrio de los mecanismos que regulan la homeostasis del Ca^{2+} frecuentemente es un suceso temprano en el desarrollo del daño celular espontáneo (Potts y col., 1992; Trump y Berezsky, 1987). Cuando el aumento en la entrada del Ca^{2+} es sostenido, la activación de la PLA_2 podría dar como resultado un daño extenso en las membranas y la generación de metabolitos tóxicos. Se ha detectado la activación de fosfolipasas A_2 dependientes de Ca^{2+} durante la isquemia (Chien y col., 1979) y la anoxia (Farber y Young, 1981).

La melitina es una molécula anfipática, básica de 26 aminoácidos contenida en el veneno de la abeja *Apis mellifera*, que ha sido conceptualizada como un activador directo de la PLA_2 . La melitina es un péptido activo en membranas que induce en concentraciones nanomolares la formación de poros que permiten el paso de algunos iones, la hemólisis en concentraciones micromolares y la micelización discoidal en altas proporciones lípido:péptido.

Como por un lado, la melitina ha sido ampliamente empleada para explorar la participación de la PLA_2 en los procesos de secreción de péptidos y hormonas, pero también ha demostrado ser un agente inductor de daño celular, en el trabajo experimental de esta tesis se exploraron ambos tipos de efectos. Para ello se analizaron los posibles efectos de la melitina sobre varias respuestas. Se estudió su efecto sobre la liberación de neurotransmisores de terminales nerviosas aisladas, así como sus posibles efectos sobre la producción de ácido araquidónico (uno de los principales productos de la actividad de PLA_2) en membranas obtenidas de los sinaptosomas. Con objeto de detectar posible daño celular, se determinó la salida de deshidrogenasa láctica (que es

una enzima selectivamente localizada en el citoplasma) de los sinaptosomas tratados con melitina.

II. ANTECEDENTES

II.A. LA MELITINA.

La melitina, que es la toxina mas abundante del veneno de la abeja *Apis mellifera*, constituye aproximadamente el 50% del peso seco del veneno, y corresponde al "factor lítico directo", descrito en los primeros estudios del veneno. Es un polipéptido básico de 26 aminoácidos, con carácter anfipático. Su peso molecular es de 2840 Da. Parte de la melitina natural se encuentra formilada en su extremo amino terminal. Después del extremo amino terminal hay un tramo largo que está básicamente constituido por aminoácidos hidrofóbicos. En el extremo carboxilo terminal presenta un hexapéptido con una gran densidad de cargas positivas (Habermann, 1972). Se atribuyen a su estructura primaria sus características de formación de micelas, disminución de la tensión superficial y capacidad para producir hemólisis. Es una molécula muy básica y posee características tensoactivas comparables a las de la digitonina o a la fosforilcolina (Habermann, 1972).

1. Características fisicoquímicas.

La melitina, así como otros péptidos que se unen a membranas o a proteínas membranales es predominantemente hidrofóbica. Carece de puentes disulfuro y los aminoácidos de la cadena lateral no presentan entrecruzamiento, por lo que pueden ser sometidos fácilmente a reacciones de sustitución. Tiene una carga neta de +6, cuatro de estas cargas positivas se encuentran en el altamente básico extremo carboxilo terminal, en el tetrapéptido Lys-Arg-Lys-Arg y solamente una carga en la Lys-7 y otra en el grupo amino, del extremo amino terminal. No hay grupos ácidos en la melitina.

La secuencia de aminoácidos de la melitina ha sido reportada (Bernheimer y Rudy, 1986) y es la siguiente:

NH3+ -Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-CONH2
De Dempsey C.(1990).

A) Estructura cristalina de la melitina.

La estructura cristalina de la melitina ha tenido considerable influencia sobre las ideas subsecuentes acerca de su interacción con las membranas. Para elucidarla se han empleado resonancia magnética nuclear protónica (1H-RMN) de alta resolución en el caso de melitina en micelas de dodecilsulfocolina y análisis de intercambio de amidas. Se ha determinado la estructura cristalina de la melitina tetramérica, con una resolución de 2 a 2.8 Å, encontrándose que en ella la conformación de los 4 péptidos que la forman es helicoidal y esencialmente la misma (Terwilliger y Eisenberg, 1982 a; Terwilliger y Eisenberg, 1982 b). En el monómero cristalino, presenta dos irregularidades entre los residuos 11 a 14, que hacen que la hélice del péptido se doble de tal forma que si se traza una línea por el eje de la hélice de los residuos 1 a 10 y otra de los residuos 16 a 26, éstas se intersectan formando un ángulo de aproximadamente 120°.

El doblado de la hélice mayor permite un empaquetamiento óptimo de las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos amino ácidos dentro del tetrámero de la melitina, con los aminoácidos no polares casi completamente secuestrados en el interior del doblado de la hélice, mientras que los aminoácidos polares con sus cadenas laterales cargadas se acomodan en la cara convexa de la alfa hélice. El enlace peptídico Leu-13-Pro-14 está en la configuración trans que se requiere para tener una estructura de alfa hélice (Inagaki y col.,1989).



B) Estructura de la melitina en solución.

Dado que la melitina se pone en contacto con las membranas a través de una fase acuosa, es conveniente considerar sus propiedades en solución. A pesar de su alta proporción de amino ácidos hidrofóbicos, la melitina es muy soluble en agua (> 250 mg/ml). En solución acuosa la melitina adopta diferentes conformaciones y estados de agregación, dependiendo de factores tales como la concentración del péptido, el pH, la fuerza iónica y el contraión negativo. Así, la melitina puede encontrarse como monómero, a muy bajas concentraciones y en soluciones de muy baja fuerza iónica o en asociaciones tetraméricas cuando se encuentra en soluciones de fuerza iónica elevada.

Cuando el péptido se arregla en forma de alfa hélice, se aprecia una configuración "torcida" de los aminoácidos polares y no polares del péptido. Esto da lugar a que los aminoácidos polares de los primeros 21 residuos queden en caras opuestas de la molécula. Esta característica es la que confiere la llamada "naturaleza anfipática" a la molécula.

Al igual que otros péptidos que contienen prolina, el enlace peptídico entre Leu-13-Pro-14 presenta isomería cis trans, lo suficientemente lenta como para ser detectada mediante 1H-RMN (< 10/s). La estructura secundaria del monómero en el tetrámero es muy interesante, porque al presentar una estructura secundaria anfifílica, los monómeros están arreglados por pares acomodados perpendicularmente. Las dos cadenas en cada par están situadas a una distancia de dos veces el eje de simetría, por lo que todas las fases hidrofóbicas se encuentran en contacto. Las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas estabilizan al tetrámero. De hecho todas las interacciones entre las cadenas son hidrofóbicas y las cadenas laterales de los amino ácidos que las forman están altamente interdigitadas. El resultado es una estructura cuasi globular, con un interior apolar y una superficie externa hidrofílica, altamente

cargada en contacto con el medio acuoso (Terwilliger y Eisenberg, 1982 a; Terwilliger y Eisenberg, 1982 b).

C) Interacción de la melitina con las membranas y efecto lítico.

La asociación de la melitina a las membranas es un tema importante relacionado con los efectos de la melitina sobre las células. Los efectos de la melitina *in vivo* (tras la inoculación del veneno por la abeja) se han adjudicado a lisis celular causada por la activación de la PLA₂ presente en el veneno de la abeja. La enzima produce daño subsecuente y por lo tanto, muerte celular.

Dada la gran dificultad de estudiar interacciones superficiales, orientaciones intramembranales, etc. en sistemas celulares completos como el eritrocito, la gran mayoría de los estudios físicos de la melitina y sus interacciones con los lípidos de membrana se han hecho utilizando membranas modelo o micelas de detergente. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios se han hecho con diferentes concentraciones de melitina, a diferentes temperaturas y con soluciones de diferente composición, lo que no permite compararlos (Georghiou y col., 1982; Dufourcq y col., 1986; Inagaki y col., 1989). Los estudios para determinar el estado de agregación de la melitina en las membranas también han arrojado resultados contradictorios (Georghiou y col., 1982; Dufourcq y col., 1986; Inagaki y col., 1989).

Todos los estudios de melitina en membranas apoyan la conclusión de que este péptido adopta una configuración helicoidal en la membrana (Lavialle y col., 1982; Dufourcq y col., 1986). Los estudios de ¹H-RMN del péptido unido a micelas de dodecilsfosforilcolina confirma la evidencia previa de que la melitina forma una hélice al interactuar con superficies similares a las de las membranas (Inagaki y col., 1989; Vogel, 1981; Lafleur y col., 1987). Estudios de dicroísmo circular (DC) y de espectroscopía Ramman demuestran que la melitina adopta una configuración de hélice en membranas de fosfatidilcolina de huevo, dimetilfosforilcolina y

ditetradecilfosforilcolina (Vogel, 1981). Adicionalmente, los estudios de DC y de espectroscopía Raman en membranas de ditetradecilfosforilcolina indican que la hélice contiene aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, sugiriendo que la secuencia tetrapeptídica terminal puede adoptar una configuración no helicoidal (Vogel, 1981).

Cuando la melitina está unida a una membrana, los potenciales transmembranales la vuelven asequible a las enzimas proteolíticas del lado trans de esta, mientras que no se ha observado efecto de proteinasas en ausencia de un potencial de membrana (Kempf y col., 1982). Este dato es compatible con un cambio dependiente de voltaje en la orientación superficial en la membrana a una orientación transmembranal de la hélice de melitina en la bicapa, pero también es congruente con el movimiento de todo el péptido a través de la membrana, catalizado por la diferencia de potencial transmembranal (Clague y Cherry, 1988).

Dado que las membranas biológicas están compuestas por mezclas de lípidos, se ha explorado la posibilidad de que la melitina interaccione selectivamente con diferentes tipos de lípidos, encontrándose que se une con una afinidad 100 veces mayor a membranas formadas por lípidos negativamente cargados, que a las de lípidos zwitteriónicos, lo que sugiere un importante componente electrostático en la unión de la melitina a las membranas. En estas condiciones la estequiometría de esta unión es de 4-5 moléculas de lípido monovalente y de 2 moléculas para los divalentes; por cada molécula de melitina (Batenburg y col., 1987).

La melitina induce un aumento en la permeabilidad a los iones en membranas lipídicas a las que se aplica un potencial eléctrico negativo en la cara opuesta a la cara en que se aplican concentraciones subléxicas de melitina (Dufourc y col., 1986; Kempf y col., 1982; Hanke y col., 1983). No se observa cambio en la conductancia cuando no se aplica un potencial. El aumento en la conductancia es consistente con la formación de canales que permitan la migración de los iones como respuesta a una reorientación

dependiente de voltaje de la melitina en la membrana (Kempf y col.,1982). Los poros formados por la melitina muestran niveles de conductancia discretos, congruentes con una estructura molecular definida (Hanke y col.,1983). Estos poros dependientes de voltaje muestran selectividad para los aniones sobre los cationes (Dufourc y col.,1986). La permeabilización de las membranas por la melitina indica una alteración en las propiedades de organización de los lípidos membranales. Además se sabe que altas concentraciones de melitina provocan la destrucción de las membranas en forma similar a la solubilización por detergentes (Habermann, 1972). Se ha estudiado la micelización de membranas de fosfatidilcolina por la melitina, empleando concentraciones moderadas del péptido (3 - 6%, péptido/ lípido, mol/mol) (Dempsey y Watts, 1987; Dufourc y col.,1986; Dempsey y col.,1987). Estudios de microscopía electrónica por criofractura indican que las partículas micelares son discos de fase gel organizadas en bicapa con las moléculas de melitina probablemente alineadas en los bordes del disco, protegiendo las cadenas acilo de la interacción con la fase acuosa (Dufourc y col.,1986).

D) Hemólisis como modelo de proceso lítico.

Se ha estudiado a la hemólisis como un modelo de proceso lítico provocado por la melitina. La melitina es capaz de causar la lisis de los eritrocitos a partir de $0.3 \mu\text{M}$ (Habermann, 1972) pero esta se suprime completamente en presencia de fosfato 50 mM . (Hider y col.,1983). Se ha encontrado que son los monómeros de la melitina en solución los que se unen a los lípidos membranales en general y no a sitios específicos. Este proceso presenta una cinética bifásica, con una primera fase rápida disparada por la acumulación de melitina en la cara externa de la membrana, con perturbación de la estructura de la membrana y una fase estacionaria, que se atribuye a la recuperación de la geometría membranal (DeGrado y col.,1982). Se ha propuesto que la melitina provoca la ruptura de los eritrocitos mediante la formación de poros permeables a los

iones, pero impermeables a la hemoglobina, ya que se ha observado que la permeabilidad al Na^+ y al K^+ de estas células aumenta de 200 a 2000 veces durante el primer minuto de su contacto con la melitina, antes de que salga el grueso de la hemoglobina.

Se han propuesto 2 tipos de mecanismos para la lisis causada por la melitina, que son congruentes con los estudios funcionales y estructurales arriba mencionados. En el primer tipo de mecanismo se propone que la melitina forma poros acuosos oligoméricos anclados a la membrana, que exponen a los lípidos de la membrana su lado hidrofóbico y a la parte acuosa del poro su cara hidrofílica. Como es poco probable que los canales así formados sean lo bastante grandes como para permitir el paso de la hemoglobina, este tipo de modelo propone que dichos canales causan un desbalance osmótico, que posteriormente causa la lisis (Tosteson y Tosteson, 1981). El segundo tipo de modelo propone que la melitina causa lisis por la ruptura de la estructura fosfolipídica de la membrana, la cual puede ser seguida o no por lisis osmótica (Bernheimer A.W. y Rudy B., 1986).

La evidencia que apoya la hipótesis de la lisis por un mecanismo osmótico es muy fuerte, pero deja sin aclarar la naturaleza molecular de la primera lesión que induce la melitina.

Tomando como modelo la hemólisis inducida por melitina, las evidencias e interpretaciones caen en tres categorías principales. La hemólisis resulta de perturbaciones en la organización de la bicapa lipídica: 1) debido a la presencia de la hélice anfipática en la zona de los grupos de las cabezas, 2) debido a la formación de canales permeables a los iones, al modo de los poros sensibles a voltaje o 3) como resultado de la habilidad del péptido para formar micelas discoides en las membranas, las cuales dejan huecos a través de los cuales difunden los contenidos celulares. Cada uno de los mecanismos anteriormente mencionados es congruente con un mecanismo de

lisis osmótica, siempre y cuando la perturbación inicial dé como resultado una permeabilidad iónica aumentada.

2. Características bioquímicas.

A) Activación de la PLA₂.

En vivo, a nivel molecular la melitina presenta principalmente dos tipos de acciones; produce la lisis celular y activa a la PLA₂ presente en el veneno de la abeja. La enzima produce daño subsecuente y por lo tanto, muerte celular. La melitina ha sido capaz de lisar a todos los tipos celulares con los que se ha puesto en contacto, es capaz de lisar organelos intracelulares, como las mitocondrias y los lisosomas e inclusive vesículas fosfolipídicas de diversa composición (Habermann, 1972). Recientemente, mediante el uso de anticuerpos contra la melitina se ha encontrado en células de mamífero una proteína que activa directamente a la PLA₂ (Clark y col., 1987). Esta proteína, al igual que la melitina, solamente activa a algunas fosfolipasas A₂ (Steiner y col., 1993).

B) Efectos de la melitina sobre diversos sistemas.

Generalmente se usa el aumento en la producción de ácido araquidónico y sus metabolitos como una medida indirecta de la actividad de la PLA₂. La melitina es capaz de estimular la producción de ácido araquidónico en diversos tipos celulares, por ejemplo, células PC12 de feocromocitoma (Oksoon y col., 1980), fibroblastos de embrión de ratón (Mufson y col., 1979) células de islotes de Langerhans (Metz, 1986), plaquetas (Shier, 1979), células de pituitaria de rata (Kiesel y col., 1987; Abou-Samra y col., 1986). Los bloqueadores inorgánicos de los canales de Ca²⁺ (Cd²⁺ > Mn²⁺ > Co²⁺) inhiben parcialmente el aumento en la producción de ácido araquidónico estimulado por la melitina en células PC12, (Oksoon y col., 1980), mientras que en

islotes de Langerhans el níquel y el lantano la inhiben completamente (Metz, 1986), por lo que se le ha considerado como un activador de la PLA₂, y dado que se ha implicado a la PLA₂ y a la producción de los metabolitos del ácido araquidónico en el mecanismo bioquímico que subyace a los fenómenos de secreción, la melitina ha sido usada para estudiar la secreción de diversos péptidos y hormonas (Burgoyne y Morgan, 1990; Abou-Samra y col., 1986; Ojeda y Negro-Vilar, 1985; Kiesel y col., 1987).

Se ha reportado que la melitina 0.8 μM es capaz de inhibir la diferenciación de células de melanoma de ratón, estimular el crecimiento de células embrionarias de rata transformadas con adenovirus e inducir liberación de ácido araquidónico y la síntesis de prostaglandinas de fibroblastos de embrión de ratón en la misma forma que los ésteres del forbol (Mufson y col., 1979). Además de activar a la PLA₂, la melitina tiene una serie de efectos sobre las células. Por ejemplo, Drust y Martin (1984) reportan que la melitina 0.29 μM es capaz de provocar la fosforilación de las mismas proteínas que los ésteres del forbol en células GH3, lo que podría sugerir que la melitina está funcionando como activador directo o indirecto de la PKC. Estudios *in vitro* muestran que la melitina es capaz de inhibir a la PKC activada de diferentes formas (IC₅₀ de 3 a 8 μM), (O'Brian y Ward, 1989; Raynor y col., 1991; Raynor y col., 1991) por unión directa al dominio catalítico de la enzima, de acuerdo con un mecanismo de inhibición no competitiva con respecto a la unión de ATP (O'Brian y Ward, 1989). La melitina inhibe la unión de forbol dibutirato a PKC (IC₅₀ = 1 μM) (Raynor y col., 1991).

La melitina puede formar un complejo estable con la calmodulina de cerebro bovino. Este complejo se disocia en presencia de EGTA y urea. La afinidad de este complejo es comparable a la de los que forma la calmodulina con sus enzimas blanco y aproximadamente 1000 veces más estable que los que forma la calmodulina con hormonas peptidérgicas básicas o con drogas hidrofóbicas. La melitina inhibe competitivamente la activación de la fosfodiesterasa cerebral por calmodulina (Raynor y col., 1991). La melitina también inhibe a la proteína cinasa dependiente de Ca²⁺ y

calmodulina (CaMPK-II) con una IC_{50} de $1\mu M$, (Raynor y col.,1991); inhibe a la ATPasa de Na^+/K^+ ($IC_{50} = 2\mu M$) (Raynor y col.,1991) y es capaz de provocar la ruptura de fosfoinosítidos, con formación preferente de fosfato de inositol (Oksoon y col.,1980).

II.B. FOSFOLIPASAS A_2 DE MAMIFEROS.

Las fosfolipasas son enzimas pertenecientes a las esterasas, capaces de hidrolizar a sus sustratos *in vivo*. Las fosfolipasas A_2 (PLA₂; fosfátido sn-2-acilhidrolasas; EC 3.1.1.4.) catalizan la hidrólisis de la cadena de los sn-2-acil ácidos grasos de una gran variedad de sustratos fosfolípidicos (PL) para dar lugar a un ácido graso y lisofosfolípidos. Estos productos pueden actuar por sí mismos como segundos mensajeros intracelulares o pueden metabolizarse como precursores en la producción de mediadores lipídicos específicos, por ejemplo, la síntesis de prostaglandinas y los tromboxanos por la ciclooxigenasa, la de leucotrienos, lipoxinas y compuestos relacionados por las lipooxigenasas, ácidos epoxieicosatrienoico (EET) mediante la acción del sistema del citocromo P450 o bien el ácido araquidónico puede sufrir autooxidaciones y dar lugar a la formación de ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETES), que son los precursores de los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETES) (Shimizu y Wolfe, 1990).

En los últimos años se ha incrementado nuestro conocimiento de la diversidad de formas y funciones de las sn-2-acilhidrolasas. Dado que la importancia y funciones de varias de las isoformas de la PLA₂ todavía están por definirse, la nomenclatura formal de estas enzimas se basa únicamente en su estructura y secuencia. Las enzimas de 14-KDa se han categorizado, usando relaciones evolutivas, en tipos I, II y III. La PLA₂ de 85-KDa se ha caracterizado como una sn-2-acilhidrolasa y ha sido clonada y secuenciada por más de un laboratorio, se le ha dado la denominación preliminar de

tipo IV. A causa de la limitada información sobre su estructura, todavía hay otras fosfolipasas A₂ que no han sido clasificadas (Mayer y Marshall, 1993).

Aunque los miembros de esta familia de sn-2-acilhidrolasas no están bien caracterizados, es posible una nueva perspectiva sobre la función de varias fosfolipasas A₂. Las fosfolipasas A₂ tipo I de 14 KDa Ca²⁺ dependientes son las fosfolipasas A₂ más estudiadas. Hay reportes de su presencia en diversos tejidos, como pulmón y riñón (Wallner y col., 1986), también hay reportes de sitios de unión de PLA₂ tipo I en la superficie de las células, pero el papel extrapancreático de esta enzima no se conoce bien. La PLA₂ tipo II de 14 KDa humana se encuentra asociada con varios tipos celulares y tejidos, o extracelularmente, cuando se libera como respuesta a los mediadores proinflamatorios, tales como la interleucina I (IL I) o IL 6 o al factor de necrosis tumoral (TNF). Su presencia en fluidos inflamatorios, exudados tisulares o suero la ha implicado en la inflamación. El papel de la PLA₂ tipo II de 14 KDa en el metabolismo de lípidos debe reevaluarse a la luz de la identificación de otra PLA₂ asociada a las células, pero estructuralmente diferente: la sn-2 acilhidrolasa de 85 KDa. Las fosfolipasas A₂ tipo IV de 85 KDa son los candidatos más probables para ejercer el control de la liberación de ácido araquidónico de sus pozas celulares, ya que, aunque al igual que la PLA₂ tipo II de 14 KDa, es activa a pH neutro y es Ca²⁺ dependiente, a diferencia de las demás sn-2-acilhidrolasas, las fosfolipasas A₂ de 85 KDa tienen una marcada preferencia por el ácido araquidónico en la posición sn-2 de los sustratos (Clark y col., 1991; Kramer y col., 1991).

Es necesario mencionar también un tercer grupo de fosfolipasas A₂, las sn-2-acilhidrolasas independientes de Ca²⁺, que aunque menos conocidas, también deben considerarse como contibuyentes potenciales en la producción de mediadores lipídicos.

1. Localización y Funciones.

La PLA₂ tipo II de 14 KDa soluble que se encuentran en altas concentraciones en los fluidos extracelulares tales como el líquido sinovial (Seilhamer y col., 1989), líquido de ascitis (Kortesuo y Nevalainen, 1991) o suero (Green y col., 1991) durante los episodios inflamatorios. Hay diversos estudios que tratan de establecer su origen, encontrándose que esta PLA₂ soluble puede liberarse de diversos tipos celulares, tales como las plaquetas activadas con trombina (Kramer y col., 1989) y los macrófagos de conejo tratados con f-Met-Leu-Phe (Lanni y Becker, 1983). En este último caso se libera junto con lisozima y glucuronidasa, lo que sugiere una localización lisosomal de la misma (Lanni y Becker, 1983). La producción de prostaglandinas y la liberación de PLA₂ se inhiben con actinomicina D y con cicloheximida, lo que indica su dependencia de la síntesis de RNA y de proteínas. De hecho, se ha reportado que los niveles de mRNA de PLA₂ de 14 KDa se incrementan en células mesangiales de riñón de rata con IL-1 y disminuyen cuando se tratan con dexametasona (Nakazato y col., 1980; O'Banion y col., 1980).

El gen humano que corresponde a dicha PLA₂ se ha clonado de una biblioteca de DNA genómico, encontrándose que codifica tanto para la PLA₂ tipo II de 14 KDa completa, como para una secuencia de señalización.

Con el objeto de saber si las PLA₂ tipo II de 14 KDa bioquímica o inmunológicamente relacionadas provienen de uno o varios genes se han hecho estudios de Southern blot de DNA genómico humano cuyos resultados sugieren que todas las isoenzimas provienen de un solo gen, que codifica tanto para la PLA₂ tipo II de 14 KDa completa, como para una secuencia de señalización (Seilhamer y col., 1989; Kramer y col., 1989). La enzima de tipo II parece estar muy conservada entre las diferentes especies. Entre las enzimas plaquetarias de humano, rata y cerdo hay una homología del 79% en la secuencia en general, con un 100% de homología en el centro activo y el patrón de puentes disulfuro (Seilhamer y col., 1989).

La enzima es sensible al ditioneitol (DTT) y resistente al calor y a condiciones ácidas (Seilhamer y col.,1989; Kramer y col.,1989). La PLA₂ de 14 KDa humana se ha caracterizado como activa a pH de 7 a 9 y requiere Ca²⁺ como cofactor. El Ca²⁺ no puede ser sustituido por otros cationes y algunos metales, como el Fe²⁺, inhiben a la enzima. Esta enzima no muestra preferencia por un ácido graso en especial en la posición sn-2, pero es bastante selectiva con respecto a la clase de sustratos fosfolípidos, ya que prefiere a la glicerofosfoetanolamina o a la glicerofosfoserina e hidroliza muy pobremente a la glicerofosfocolina (Kramer y col.,1989; Hara y col.,1989).

Las sn-2-acilhidrolasas celulares pueden tener varias funciones, como el recambio normal de fosfolípidos, reparación de la peroxidación de lípidos (Van Kuijk y col.,1987) o movilización de ácido araquidónico para la síntesis de mediadores lipídicos (Pernas y col.,1991).

La selectividad para el araquidonilo y la dependencia de Ca²⁺ para la tranlocación son características que se esperan en una enzima implicada en la movilización de ácido araquidónico para la producción de mediadores lipídicos. Hay evidencia, obtenida en células de ovario de hamster chino que sobreexpresan a la enzima, de que la PLA₂ de 85 KDa puede estar involucrada en la producción de ácido araquidónico estimulada por hormonas (Lin y col.,1992).

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra PLA₂ de 85 KDa de plaquetas de conejo se ha identificado una enzima inmunológicamente relacionada, que contribuye aproximadamente con el 50% de la actividad de PLA₂ total en neutrófilos de conejo, plaquetas, cerebro, pulmón e hígado, pero presenta una muy somera actividad en bazo o riñón (Axelrod, 1990). Estos resultados permiten suponer que la PLA₂ de 85 KDa participe en la movilización del ácido araquidónico, pero no definen claramente la relación entre la producción de ácido araquidónico y la producción de

mediadores lipídicos específicos; además de no mostrar evidencia concluyente que excluya la participación de otras isoformas de PLA₂. De hecho se ha reportado la coexistencia de varias enzimas con características de PLA₂ en la misma célula o tejido, por ejemplo, se han caracterizado 3 clases diferentes de sn-2-acilhidrolasas en células cebadas en cultivo y en cerebro de gerbo (Murakami y col.,1992; Rodorof y col.,1991).

2. Características Bioquímicas.

Se ha identificado PLA₂ tipo IV de 85 KDa en tejidos y células como una actividad con 2 características particulares:

1) Una afinidad de 5 a 10 veces mayor por los sustratos fosfolipídicos que tienen un araquidonato en la posición acilo-sn-2, sin que presenten una preferencia significativa por el acilo 1 o por el grupo activo (Gronich y col.,1990; Diez y Mong, 1990; Diez y col.,1992). 2) La translocación de la actividad enzimática de la fracción citosólica a la fracción particulada en condiciones de Ca²⁺ amortiguado que van de 300 a 700 nM (Kramer y col.,1991; Diez y col.,1992; Gornich y col.,1990).

Dos grupos han obtenido el cDNA de la PLA₂ tipo IV de 85 KDa a partir de la secuencia parcial de aminoácidos de la enzima purificada a homogeneidad, encontrándose con una masa molecular ligeramente inferior (85 KDa) a la determinada por electroforesis (95-110 KDa) (Clark y col.,1991; Sharp y col.,1991).

Mediante estudios de Southern blot del genoma humano se ha encontrado que hay una sola copia del gen que codifica para la PLA₂ tipo IV de 85 KDa y que no hay otros genes relacionados. Se obtuvo evidencia concluyente de que este gen codifica para la PLA₂ tipo IV de 85 KDa mediante la expresión de una enzima de idéntica actividad y características bioquímicas en células COS-1 y en células de ovario de hámster chino (CHO); (Clark y col.,1991; Sharp y col.,1991). La comparación entre enzimas provenientes de células U937 y de la línea celular de macrófagos murinos, RAW

264.7, muestra una homología de más del 95% en su secuencia de aminoácidos (Clark y col., 1991). El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló la existencia de un dominio de 45 aminoácidos homólogo al dominio de unión al Ca^{2+} de la PKC y una homología parcial con una proteína surfactante de pulmón, pero no hay homología con ninguna otra proteína conocida, ni siquiera con la PLA₂ tipo II de 14 KDa. Se ha expresado un fragmento, homólogo al fragmento de la PKC antes mencionado, que se ha demostrado que se transloca a la membrana en forma dependiente de Ca^{2+} (Clark y col., 1991). Esta translocación también se ha reportado para PLA₂ de células de Kupfer (Krause y col., 1991).

De acuerdo con la idea de que el Ca^{2+} es necesario para la translocación, se ha reportado que hay un solo lugar de unión para el Ca^{2+} en el complejo ternario formado por la PLA₂, el fosfolípido y el Ca^{2+} . Sin embargo hay actividad hidrolítica en ausencia de Ca^{2+} , cuando se usan concentraciones elevadas de NaCl u otras sales, lo que implica que el Ca^{2+} se necesita para la interacción interfacial, pero no para la catálisis (Wijkander y Sundler, 1992). Este fenómeno no se ha descrito todavía para la PLA₂ tipo II de 14 KDa.

La cinética de la hidrólisis de fosfolípidos por la PLA₂ tipo IV de 85 KDa tiene dos pasos claramente definidos, que involucran diferentes dominios enzimáticos; la unión interfacial y la catálisis (Clark y col., 1991; Wijkander y Sundler, 1992). Se ha estudiado la actividad de la enzima empleando vesículas de diversos fosfolípidos, vesículas mixtas, micelas y hasta membranas de *Escherichia coli* como sustratos, encontrándose que presenta una clara preferencia por el sn-2-araquidionil sobre el sn-2-oleoilfosfolípido y el sn-2-palmitoil es, un sustrato inadecuado. De donde se desprende que el grado de insaturación de la cadena sn-2 determina la afinidad de la enzima por un sustrato dado (Clark y col., 1991; Gronich y col., 1990; Diez y Mong, 1990; Diez y col., 1992; Leslie, 1991). Se ha reportado que la actividad se pierde con el recambio, tal vez debido a inactivación suicida (Leslie, 1991). Esta aparente pérdida

de la actividad se ha atribuido también al agotamiento local de sustrato, conforme la enzima queda atrapada en vesículas de glicerofosforilcolina mientras se acumulan los productos de hidrólisis (Leslie, 1991).

3. Regulación.

La liberación y la formación de mediadores lipídicos está regulada por varios mecanismos. Se supone que el paso limitante de este proceso es la acción de la PLA₂ sobre las pozas de fosfolípidos, lo que da como resultado la disponibilidad de ácido araquidónico. La actividad de la PLA₂ está regulada por la transducción de señales mediada por receptores, la concentración intracelular de Ca²⁺, la interacción con proteínas activadoras e inhibidoras, y el control transcripcional. Actualmente la literatura sobre regulación de la actividad de PLA₂ se complica por el conocimiento de las múltiples actividades de PLA₂ que existen en muchos de los tipos celulares que se han estudiado. La aplicación de las características bioquímicas de las fosfolipasas ya caracterizadas a estudios viejos ocasionalmente permite reconocer a la fosfolipasa cuya actividad se midió.

La activación de la sn-2-acilhidrólisis mediante la transducción de señales se lleva a cabo a través de 2 vías. Una de ellas es la activación de la PLA₂ por una proteína G asociada a un receptor, que no requiere activación de la PLC y la otra es una activación indirecta a través de una vía mediada por PLC que aumenta el Ca²⁺ y activa a la proteína cinasa C, (PKC) o a cinasas subsecuentes (Axelrod, 1990; Tang y coll., 1988).

Las sn-2-acilhidrolasas pueden activarse también mediante una proteína activadora de la PLA₂ de mamífero (PLAP), que contiene una secuencia homóloga a la melitina y ha sido recientemente aislada de células BC3H (Clark y col., 1987). Aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual la PLAP activa a la PLA₂, se ha reportado que ésta proteína es capaz de activar a la PLA₂ de 14KDa, pero no a la PLA₂ de 85 KDa in

vitro, (Steiner y col.,1993) y estimula la actividad de PLA₂ en homogenados de células BC3H (Clark y col.,1987).

La movilización o la disponibilidad de Ca²⁺ intracelular parece ser un requisito indispensable para la activación tanto de la PLA₂ tipo II de 14KDa, como de la la PLA₂ de 85KDa. Como ya se dijo antes, la PLA₂ de 85 KDa requiere de Ca²⁺ (300 a 700 nM) para translocarse del citosol a la membrana, sin embargo cuando se activan los receptores de las células, el transiente de Ca²⁺ subsecuente provoca que se alcancen localmente concentraciones micromolares de Ca²⁺ intracelular (Mayer y Marshall, 1993). Si tomamos en cuenta que la traslocación a la membrana y la actividad catalítica de la enzima son procesos independientes entre sí (Diez y Mong, 1990; Wijkander y Sundler, 1992; Krause y col.,1991; Rehfeldt y col.,1991), la concentración de Ca²⁺ a la que las formas soluble y asociada a membrana de la la PLA₂ tipo II de 14KDa alcanzan su actividad óptima es de 5 mM (Rehfeldt y col.,1991), esto implica que el flujo de Ca²⁺ actúa como un paso en la regulación de la actividad de la PLA₂ de 85KDa. Casi todos los reportes indican que la PLA₂ tipo II de 14KDa requiere de Ca²⁺ en concentraciones milimolares, aunque recientemente se ha publicado un estudio en paralelo en que se demuestra que ambas enzimas tienen requerimientos de Ca²⁺ similares (Marshall y McCarte-Roshak, 1992).

4. Modulación Farmacológica de la PLA₂.

Se ha descrito un gran número de inhibidores de la PLA₂ tipo I, entre ellos, los análogos de fosfolípidos, como los acilamino fosfolípidos (de Haas y col.,1990), que actúan por un mecanismo de competencia, ya que la amida en la posición 2 permite la unión del compuesto a la enzima, pero la estereoselectividad del sitio activo impide que esta se hidrolice (de Haas y col.,1990). Se ha reportado que el bromofenacilbromuro (BPB), inhibe a la PLA₂ tipo I, uniéndose selectivamente a la histidina 48 del sitio activo de la enzima (Inoue y Matsui, 1990). Basándose en este compuesto se han

diseñado los acenaftenos 1-meta- hidroxibencil-2-substituidos, que son compuestos conformacionalmente rígidos, dirigidos contra el sitio activo de la PLA₂ tipo I. Estos compuestos aprovechan la hendidura hidrofóbica situada entre la Leu-2 y la Tyr-69, mientras se dirige la funcionalidad del enlace de hidrógeno hacia el nd1-N de la His-48, por el cual muestran preferencia. Adicionalmente se usa una amina para desplazar al Ca²⁺ y tener un análogo bisustrato (Ripka y col.,1980). Se han encontrado o diseñado algunos inhibidores de la PLA₂ tipo II de 14 KDa (Mobilio y Marshall, 1980). Los compuestos de interés incluyen al manoalide y al scalaradial, que son potentes (IC₅₀ de 15 a 10 nM), pero inespecíficos, ya que actúan a través de una alquilación inespecífica de los residuos de lisina. Otro grupo de interés son las lipocortinas, que se han aislado de exudado peritoneal de rata y se han localizado en diversos tipos celulares humanos (Pepinsky y col.,1986; Wallner y col.,1986). Se han estudiado también para PLA₂ tipo II sustancias análogas a los sustratos, dirigidas al sitio activo y análogos de los estados de transición, tales como amidas tioéter de glicerosfatidilcolina y de gliceroetanolamina (Yu y col.,1990) y el análogo al estado de transición del fosfonato de C7 (Potts y col.,1992). Sin embargo, a la fecha no se han descrito inhibidores de la PLA₂ de 85 KDa, aunque los inhibidores de la PLA₂ de 14 KDa inhiben débilmente a esta enzima.

5. PLA₂ independientes de Ca²⁺.

Se ha encontrado actividad de PLA₂ independiente Ca²⁺ en prácticamente todos los órganos, con la mayor actividad en cerebro, pulmón, corazón e hígado. Esta actividad no se ha caracterizado en la mayoría de los casos y puede representar a una o más isoenzimas. Una enzima de este tipo que ha sido bien estudiada es la PLA₂ independiente de Ca²⁺ de 40 KDa de corazón de conejo. Esta es insensible al BPB, pero que se inactiva con una bromoenolactona o con un agentes sulfidantes (Hazen y col.,1991). También en plaquetas de oveja se ha identificado una actividad de PLA₂

independiente de Ca^{2+} . La secuencia de esta PLA_2 independiente de Ca^{2+} presenta una alta homología con una proteína de función desconocida, originalmente clonada del cerebro (Zupan y col., 1992).

6. Evidencias de actividad de PLA_2 en sinaptosomas.

Bradford (Bradford y col., 1983), reporta la presencia de PLA_2 en sinaptosomas y Moskowitz (Moskowitz y col., 1983) la demuestra, en vesículas sinápticas, esta tiene un pH óptimo de 8.5 y cuya actividad se facilita en presencia de Ca^{2+} externo. Baba (Baba y col., 1986) caracteriza una actividad de PLA_2 en membranas sinápticas, que no es específica para ácido araquidónico, pero tiene un pH óptimo básico y es dependiente de Ca^{2+} . Hay evidencia de que la concentración de ácido araquidónico endógeno aumenta cuando los sinaptosomas son despolarizados con alto K^+ o con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Asakura y Matsuda, 1984). Asimismo se ha reportado que los ácidos grasos insaturados, como el ácido oléico y el araquidónico, cuando se aplican en forma exógena, son capaces de provocar un aumento en la liberación basal de [^3H]-GABA en sinaptosomas de cerebro de rata (Rhoads y col., 1983).

Hay evidencia de que la activación de la PLA_2 está involucrada en diversos fenómenos de secreción, por ejemplo, la secreción de insulina de islotes de páncreas de rata, en secreción de LH de adenohipófisis y en secreción de serotonina por plaquetas. Sin embargo es poco lo que se sabe de su participación en el mecanismo de liberación de neurotransmisores.

II. C. GENERALIDADES SOBRE LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES

Un neurotransmisor es una substancia que se libera sinápticamente de una neurona y afecta a otra célula o grupo de células adyacentes de un modo específico,

produciendo un efecto inmediato y reversible en la(s) célula(s) blanco. Hay 8 sustancias consideradas como neurotransmisores clásicos: acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina, histamina, ácido gama aminobutírico (GABA), glicina y glutamato. Las características que los definen como tales son las siguientes: Se sintetizan en la terminal nerviosa, están presentes en la terminal presináptica y se liberan en cantidades suficientes como para ejercer su acción sobre la neurona postsináptica o el órgano efector. Cuando se aplican en forma exógena, en concentraciones similares a las endógenas, ejercen exactamente la misma acción del transmisor endógeno. Finalmente, existe un mecanismo para su remoción de la hendidura sináptica (Schwartz, 1991).

4. Almacenamiento del Neurotransmisor.

Una vez que se ha sintetizado el neurotransmisor se almacena en las vesículas sinápticas. Estas estructuras tienen dos funciones fisiológicas: Acumular y guardar el neurotransmisor y mediar la liberación del mismo por el proceso de exocitosis (Schwartz, 1991).

Las aminas biogénicas entran a las vesículas sinápticas a favor de un gradiente de pH. En el citosol las aminas biogénicas existen como especies eléctricamente neutras, pues el pH del citosol es de 7 aproximadamente. Como el pKa del subgrupo amino de las monoaminas es de 9, a pH fisiológico solamente el 0.5% del total de las monoaminas está en forma neutra; solo la especie no protonada penetra al interior de la vesícula, porque el pH interior de la misma es de 9. En estas condiciones la cantidad de amina no protonada es 70% menor que en el citoplasma. Consecuentemente, cuando una molécula de amina sin carga entra en la vesícula, es protonada y no puede escapar. Por lo tanto el neurotransmisor llevado a las vesículas por atrapamiento de iones y retenido en el interior de las mismas por la formación de complejos con ATP y proteínas internas. Además de la entrada pasiva, hay evidencia también de un

transporte activo y específico de H^+ junto con las moléculas de transmisor. Lo que provocaría una acumulación de neurotransmisor aún mayor que solo por atrapamiento de iones (Schwartz, 1991).

5. Evidencia bioquímica de exocitosis.

La mejor evidencia de que la exocitosis está involucrada en la liberación de neurotransmisores proviene de experimentos con células de médula adrenal estimuladas para provocar la liberación de aminas biogénicas. Observaciones más recientes sugieren que la liberación de neurotransmisores, a pesar de ser un proceso exocitótico difiere de la liberación glandular y de la neurosecreción. La transmisión sináptica involucra a las vesículas sinápticas, que son más pequeñas que las secretoras, y a muy pocas proteínas de la matriz membranal. La interacción de las vesículas sinápticas con la membrana está facilitada por una estructura especializada que se encuentra en la membrana presináptica. Esta zona se llama zona activa. En estos sitios la transmisión sináptica es rápida, sostenida y repetitiva (Schwartz, 1991).

6. Remoción del Neurotransmisor de la hendidura sináptica.

Una vez que el neurotransmisor liberado ha cumplido con su función la neurona lo retira de la hendidura sináptica mediante los siguientes mecanismos: difusión, recaptura y degradación enzimática. Este último particularmente opera en la inactivación de la acetilcolina (Schwartz, 1991).

En el mecanismo de inactivación participan transportadores de alta afinidad para cada neurotransmisor, que remueven al neurotransmisor respectivo y así permiten economizar la síntesis del mismo al rellenar las reservas de éste en la terminal presináptica. A pesar de que los sistemas de recaptura son específicos, tienen características en común. Todos ellos requieren de Na^+ en el medio externo, usándose

la energía del gradiente de Na^+ a través de la membrana para concentrar el neurotransmisor dentro de la terminal. Aunque estudios recientes del laboratorio indican que para el caso de la dopamina, el Cl^- juega un papel decisivo en la captura de dicha monoamina (Sitges y col., 1994). En el caso del transportador de GABA, que se ha purificado y es, probablemente el mejor conocido, es necesario también el Cl^- como cotransporte. En la estequiometría del transporte de GABA, las proporciones de las especies transportadas son: $2 \text{Na}^+ : 1 \text{Cl}^- : 1 \text{GABA}$. Este es probablemente el mecanismo más común para la inactivación de neurotransmisores (Schwartz, 1991).

7. Sinaptosomas.

Las membranas biológicas tienden a resellarse cuando se rompen. Esta propiedad permite aislar a las terminales nerviosas de homogenados parciales de tejido nervioso preparados en solución isotónica de sacarosa (Gray y Whittaker, 1962). Cuando el tejido nervioso se rompe (homogeniza) en el seno de una solución isotónica, las membranas celulares se rompen en sus zonas más delgadas y menos resistentes, permitiendo que las terminales nerviosas se separen del axón y se resellen, conservando en su interior la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis, almacenamiento, liberación y recaptura de los neurotransmisores (Dunkley y col., 1987; Bradford, 1975). Estas estructuras continuas reciben el nombre de sinaptosomas. La continuidad de su membrana se ha constatado en preparaciones de sinaptosomas observadas al microscopio electrónico (Bradford, 1975; Gray y Whittaker, 1962).

Los sinaptosomas recién aislados tienen características bioquímicas y estructurales semejantes a las de las terminales nerviosas intactas (Bradford, 1975). Se ha demostrado también la presencia de un potencial de membrana en los sinaptosomas, lo que les permite responder a estímulos eléctricos, como los potenciales sinápticos generados por potenciales de acción (Richards y McIlwain, 1967). Los sinaptosomas son capaces de regular el transporte de Ca^{2+} a través de su membrana (McGraw y

col., 1981) y de mantener un nivel de Ca^{2+} citosólico, en reposo, similar al de las células intactas (Nachshen, 1985). Además se ha observado un importante acoplamiento entre la liberación del neurotransmisor y la entrada de Ca^{2+} durante la despolarización rápida (Drapeau y Blaustein, 1983). Los sinaptosomas a 37°C y en presencia de los sustratos adecuados pueden respirar con un consumo lineal de O_2 durante varias horas después de haber sido aislados (Bradford, 1969), además de conservar su sensibilidad osmótica y tener una gran capacidad para amortiguar los cambios de pH externo (Nachshen y Drapeau, 1988).

III. OBJETIVOS

Con base en los antecedentes descritos anteriormente se exploraron y se caracterizaron los efectos de la melitina sobre los sinaptosomas de acuerdo con los siguientes objetivos:

Objetivos:

Como se ha reportado que la melitina es capaz de provocar la liberación de diversos péptidos y hormonas (Burgoyne y Morgan, 1990; Metz, 1986; Gandison, 1984; Kneppel y Gerhards, 1987; Ojeda y Negro-Vilar, 1985; Abou-Samra y col., 1986; Kiesel y col., 1987) y este efecto se ha adjudicado a la participación de la PLA_2 (activada por melitina) en el proceso de liberación de dichos mensajeros químicos pero también se ha demostrado que en eritrocitos la melitina causa hemólisis, en este estudio se exploró:

- 1) El efecto de la melitina sobre la liberación basal de neurotransmisores.
- 2) El efecto de la melitina sobre la actividad de la PLA_2 sinaptosomal, dado que aunque se ha reportado que esta sustancia es capaz de activar a PLA_2 (Clark y col., 1987; Steiner y col., 1993), se ha reportado que no activa a todas las isoformas de la enzima (Steiner y col., 1993).

- 3) El posible efecto lítico de la melitina en sinaptosomas.
- 4) Si la posible contribución de la capacidad de la melitina como activador de PLA₂ subyacía a sus efectos sobre la liberación de neurotransmisores.
- 5) Si la capacidad lítica de la melitina subyacía a sus efectos sobre la liberación de neurotransmisores.
- 6) Si el efecto de la melitina sobre la liberación de neurotransmisores depende de Ca²⁺ externo.
- 7) Si el efecto de la melitina sobre la producción de ácido araquidónico depende de Ca²⁺ externo.
- 8) Si el efecto de la melitina sobre la lisis de los sinaptosomas depende de Ca²⁺ externo.
- 9) Si el efecto de la melitina sobre la liberación de neurotransmisores es sensible al inhibidor de la actividad de PLA₂ dependiente de Ca²⁺, BPB.

IV. MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se estudió la liberación de los siguientes neurotransmisores: [³H]-GABA de sinaptosomas puros del cerebro completo del ratón y [³H]-dopamina de sinaptosomas crudos (P₂) de cuerpo estriado de la rata. También se estudió la producción de [³H]-ácido araquidónico por membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón previamente marcados con el ácido graso radioactivo siguiendo el método de Strosznajder y Samochocki, (1991). El daño que pudieran causar los distintos tratamientos a que fueron sometidos los sinaptosomas se evaluó midiendo la actividad de deshidrogenasa láctica (DHL) en el sobrenadante de los sinaptosomas en

suspensión tratados con melitina. La actividad de DHL se determinó siguiendo el método espectrofotométrico reportado por Daganí y Erecinska (1987).

1) Obtención de la preparación sinaptosomal.

Para preparar los sinaptosomas se siguió el método de Hajos (Hajos, 1975) modificado (Siiges y col., 1993). Para la preparación de los sinaptosomas empleados en este trabajo se usaron ratones macho cepa CD1 de once semanas de edad, en el caso de los experimentos de liberación de GABA; o bien, ratas Wistar macho de 250 g de peso para los experimentos de liberación de dopamina.

Los sinaptosomas se prepararon de la siguiente forma: los animales se matan por decapitación y se extraen los cerebros, en el caso de las ratas se disecciona el cuerpo estriado. A continuación, el tejido obtenido se homogeniza en sacarosa 0.32 M a 4°C. La relación P/V es de 1 g de tejido : 9 ml de sacarosa 0.32 M. El homogenado se centrifuga a 1500 x g durante 10 minutos, en una centrífuga refrigerada Beckman J2-21, desechándose el precipitado. El sobrenadante así obtenido se centrifuga a 9000 x g durante 20 minutos. Cuando se preparan sinaptosomas P2 (fracción sinaptosomal cruda), éste botón de precipitado se resuspende en 3 ml de dextrosa 0.32 M y se procede a la incorporación de la marca radioactiva. Para preparar sinaptosomas puros, el precipitado de la segunda centrifugación se resuspende en 4.2 ml de sacarosa 0.32 M y se coloca formando una banda sobre 20 ml de sacarosa 0.8 M, para formar un gradiente discontinuo por centrifugación a 9500 x g. El gradiente así obtenido presenta 3 bandas: I una banda blanca en la interfase entre las dos soluciones de sacarosa, que contiene secciones de axones mielinizados, una gran proporción de los cuales retiene el axoplasma, incluidas algunas mitocondrias. II una banda opalina, en la que se encuentran las partículas sinaptosomales en suspensión y III un botón de precipitado que contiene predominantemente mitocondrias, aunque también hay sinaptosomas presentes (Hajos, 1975). La fracción II se separa y se diluye con 3 veces su volumen de una solución de sacarosa 0.32 M. Esta suspensión se centrifuga durante 15 minutos a

20000 x g por 15 minutos para concentrar los sinaptosomas puros. El botón de precipitado se resuspende en aproximadamente 3 ml de dextrosa 0.32 M o en el volumen de Ringer necesario para tener la concentración de proteína sinaptosomal que el experimento requiera.

2. Liberación de neurotransmisores en perfusión continua.

A) Medio de perfusión.

Se emplea un Ringer de Krebs bicarbonato a pH 7.4 gaseado con una mezcla de CO_2 : O_2 (5%:95 %) a 37°C. La composición de éste medio es la siguiente: NaCl 127 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, KCl 3.73 mM, CaCl_2 1.8 mM, MgSO_4 1.18 mM, NaHCO_3 20 mM, dextrosa 11.2 mM. En el caso del Ringer sin Ca^{2+} , se omite el CaCl_2 y se agrega EGTA 200 μM .

El Ringer se modifica mediante la adición de diferentes fármacos, ya sea para provocar la liberación de neurotransmisores o para inhibirla. Para inducir la liberación de neurotransmisores el Ringer básico se modifica mediante el empleo de la melitina.

B) Incorporación de la marca radiactiva.

El neurotransmisor radioactivamente marcado se incorpora a los sinaptosomas aprovechando uno de los mecanismos de inactivación de neurotransmisores, que se conservan en los sinaptosomas: la recaptura de alta afinidad. Este mecanismo es dependiente de sodio y de temperatura. El uso del mecanismo de recaptura para el cargado de los sinaptosomas permite que al ser estos colocados en un medio en el que exista la concentración adecuada del neurotransmisor, este sea llevado al interior de los sinaptosomas y allí se almacene para liberarse posteriormente. La incorporación del neurotransmisor radioactivamente marcado a los sinaptosomas se lleva a cabo en un Ringer Krebs con bicarbonato de la siguiente composición: NaCl 127 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, KCl 3.73 mM, CaCl_2 1.8 mM, MgSO_4 1.18 mM, NaHCO_3 20 mM. Esta solución contiene 0.1 mM de ácido aminooxiacético, cuando se estudia la liberación de

[³H]-GABA, o bien 0.1 mM de pargilina y 0.1 mg/ml de ácido ascórbico (como antioxidante) en los experimentos de liberación de [³H]-dopamina. Para efectuar el cargado se toma una alícuota de los sinaptosomas suspendidos en dextrosa 0.32 M (1:9) y se añade al medio de captación. La preparación anterior se preincuba durante 10 minutos o mas a 37°C, al término de los cuales se agrega la cantidad necesaria de una mezcla de [³H]-GABA (0.83 μ Ci) y GABA frío para obtener una concentración final de 0.5 μ M; o bien de una mezcla de [³H]-dopamina (2 μ Ci) y dopamina fría para obtener una concentración final de 0.25 μ M.

La preparación descrita se incuba a 37° durante 10 minutos.

C) Liberación de neurotransmisores.

Una vez que se han cargado los sinaptosomas con el neurotransmisor radioactivo, se procede a estudiar la liberación del mismo empleando un sistema de liberación en perfusión continua, que se describe a continuación. El sistema de perfusión continua que se emplea está compuesto por: Una cámara Swinex multiperforada acoplada a un reservorio. Sobre la base de la cámara se coloca un filtro de nitrocelulosa Millipore con poros de 0.65 μ m, cuya función es retener a los sinaptosomas durante la perfusión (estos miden aproximadamente 1 μ m de diámetro). El Ringer que contiene la condición experimental o sustancia a probar, se coloca en el reservorio y se hace circular a través de la preparación mediante una bomba peristáltica, a una velocidad de 0.5 ml por minuto.

La preparación sinaptosomal es perfundida durante un periodo variable de tiempo (14 min), de acuerdo a las condiciones que requiera el experimento. El líquido de perfusión se recoge mediante una tubería de "tygon" terminada en unas agujas, que se colocan dentro de unos viales con líquido de centelleo, donde se recoge el medio (Fricke, 1975). La radioactividad se cuantifica en un contador Beckman modelo

LS7800. La liberación del neurotransmisor se reporta como el porcentaje de neurotransmisor liberado del neurotransmisor total captado por los sinaptosomas.

3. Determinación de la actividad de PLA₂ de membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón.

La actividad de la PLA₂ sinaptosomal se mide indirectamente, cuantificando la producción de [³H]-ácido araquidónico de membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón.

El ácido araquidónico radioactivamente marcado se incorpora a la membrana sinaptosomal aprovechando el sistema de elongación de ácidos grasos de cadena larga (Yoshida y Bourre, 1992). La reacción requiere de acetil coenzima A, que permite la incorporación del [³H]-ácido araquidónico a los fosfolípidos de la membrana sinaptosomal (Yoshida y Bourre, 1992). Las membranas de sinaptosomas marcadas con [³H]-ácido araquidónico se usan como fuente de PLA₂ y de sustrato para la reacción que da lugar a la producción de [³H]-ácido araquidónico (Strosznajder y Samochocki, 1991).

A) Marcado de los fosfolípidos membranales con [³H]-ácido araquidónico.

El marcado de los fosfolípidos membranales se lleva a cabo en un Ringer Krebs normal con bicarbonato, de la siguiente composición: NaCl 127 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, KCl 3.73 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 20 mM, y Dextrosa 11.2 mM. Esta suspensión contiene 5 mg de proteína sinaptosomal en un volumen de 5 ml (1mg/ml). La preparación anterior se preincuba durante 5 minutos a 37°C, al término de los cuales se agrega 2.51 mM de ATP, 10 mM de MgCl₂, 0.1 mM de acetil coenzima A 0.3 mM de ditiotretol y 2 mCi de [³H]-ácido araquidónico. La preparación descrita se incuba a 37°C durante 40 min, al término de los cuales se

diluye con 15 ml de Ringer Krebs que contiene 150 mg de albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos y se centrifuga a 1000 xg durante 10 min. Este lavado se repite con Ringer Krebs sin BSA. El botón de precipitado resultante se resuspende en la cantidad de Ringer necesaria para tener la concentración de proteína sinaptosomal que el experimento requiera (Strosznajder y Samochocki, 1991).

Tabla I

t(min)	% Acido Araquidónico
0	2.53
15	35.48
30	58.80
45	58.29
60	45.06

Incorporación con respecto al tiempo de [³H]-Acido Araquidónico a los sinaptosomas en incubación. Tiempo de incubación en minutos (t). % Acido Araquidónico se refiere al % de la radioactividad total (ver métodos) incorporada a las membranas.

B) Preparación de las membranas de sinaptosomas de cerebro de ratón.

Para preparar membranas a partir de sinaptosomas puros de cerebro de ratón previamente cargados con [³H]-ácido araquidónico se usa el método descrito por Bennett (1978). Los sinaptosomas de cerebro de ratón previamente cargados con [³H]-ácido araquidónico se resuspenden en 10 ml de buffer Tris 50 mM, pH 7.7 y se homogenizan en un Tissumizer Ultraturrax modelo TR 10 durante 30 segundos a una velocidad de 2300 rpm en baño de hielo. El homogenado resultante se centrifuga a 30 000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante se decanta y se resuspende el botón en Ringer Krebs con bicarbonato. Este proceso tiene un rendimiento del 64.82 %, por lo que para facilitar la comparación de los resultados de la hidrólisis de [³H]-ácido

araquidónico de los fosfolípidos de membrana en las gráficas correspondientes se anota la cantidad de sinaptosomas correspondiente.

C) Producción de [^3H]-ácido araquidónico.

Se toman alícuotas de la suspensión de membranas y se colocan en tubos de centrífuga, se preincuban durante 5 min a 37°C y se les añade la condición experimental; entonces se incuban los tubos durante 10 minutos más a 37° C. Cuando se emplean inhibidores de la PLA₂ o de la lipoxigenasa, estos están presentes desde la preincubación. Una vez que se han incubado los sinaptosomas se separa el sobrenadante centrifugando durante 30 minutos a 30 000 xg. Se decanta el sobrenadante de cada tubo y se toma una alícuota de 500 μl , que se coloca en un vial con 5 ml de tritosol para contar la radioactividad liberada. Con el objeto de cuantificar la fracción del [^3H]-ácido araquidónico que se libera, se resuspende el botón de precipitado en un volumen final de 1 ml, se toman 500 μl , que se coloca en un vial con 5 ml de líquido de centelleo para contar la radioactividad remanente. El remanente se usa para determinar proteínas por el método de Lowry (1951). El resultado se expresa como el porcentaje de [^3H]-ácido araquidónico liberado por mg de proteína.

4) Determinación de proteínas.

La proteína sinaptosomal se cuantifica por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Este método se basa en la reducción de los enlaces disulfuro de las proteínas con Cu^{2+} en medio básico, para formar después un complejo colorido con el reactivo de Folin. Brevemente, se toman alícuotas de 100 μl de los sinaptosomas resuspendidos en Ringer, en agua o en dextrosa 0.32M. A cada tubo se le añade 1 ml de reactivo alcalino (NaOH 0.1N, tartrato de sodio al 0.02%, CuSO_4 al 0.01%) se agita y se deja proceder la reacción por espacio de 10 min, luego se agregan 100 μl de reactivo de Folin 2 N (Sigma) a cada tubo. Se incuba a temperatura ambiente por 30

min mas y se lee en un espectrofotómetro a 660 nm (Beckman modelo DU7). La lectura se interpola en una curva estándar de BSA cuyo rango abarca de 20 a 200 μ g. La determinación se hace por triplicado.

5. Determinación de deshidrogenasa láctica.

Para constatar la integridad de los sinaptosomas se determinó la salida al medio externo del marcador citoplásmico deshidrogenasa láctica (DHL), después de 2 minutos de incubación ya sea en condiciones control o con varios tratamientos. La actividad de la enzima se cuantificó mediante una modificación del método que reportan Clark y Nicklas (1970). Esta es una técnica espectrofotométrica basada en la reducción del piruvato a lactato por la DHL, con oxidación de NADH a NAD⁺, en la que se sigue la desaparición de NADH durante 10 min a 340 nm.

La técnica para la determinación de la actividad de DHL es, la siguiente: Una vez que se ha determinado la concentración de proteína en los sinaptosomas resuspendidos en dextrosa 0.32 M, estos se diluyen con Ringer para ajustar la concentración de proteínas a lo requerido por el ensayo. Se colocan 500 μ l de sinaptosomas diluidos en un tubo ependorff, se preincuban durante 10 min, y se agregan los fármacos que dan la condición experimental deseada. Estos tubos se incuban por 2 min más y entonces se separa el sobrenadante centrifugando durante 5 min a 14700 rpm. El sobrenadante se decanta y el pellet se resuspende en agua. La actividad de DHL se determina en el sobrenadante y se cuantifican proteínas en el pellet por el método de Lowry.

La actividad de la DHL se determina en 100 μ l de sobrenadante, que se añaden a una mezcla de reacción consistente en 3 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5, 300 μ M de piruvato de sodio y 170 μ M de NADH. La reacción se sigue durante 10 min a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. La actividad de la DHL en el sobrenadante se expresa como nM/mg de proteína sinaptosomal.

6. Tratamiento estadístico de los datos.

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de t de Student, considerándose significativas (*) las diferencias entre los datos en las que $P < 0.05$.

V. RESULTADOS

1. Efectos de la melitina sobre los sinaptosomas.

(A) Efecto de la melitina sobre la liberación de neurotransmisores. Se ha reportado que la melitina estimula la actividad secretoria de diversos tipos de células endócrinas, provocando un aumento en la liberación de hormonas y péptidos (Metz, 1986; Gandison, 1984; Kneppel y Gerhards, 1987). Con el objeto de explorar si la melitina es capaz de provocar la liberación de neurotransmisores de sinaptosomas en perfusión continua, se exploró su acción sobre la liberación de GABA de sinaptosomas purificados del cerebro completo del ratón. La Fig. 1 muestra que la melitina a concentraciones crecientes (rango de 0.1 a 10 μM) aumenta la liberación de [^3H]-GABA de manera dosis dependiente. La dosis efectiva media (ED_{50}) calculada es de 1.37 μM .

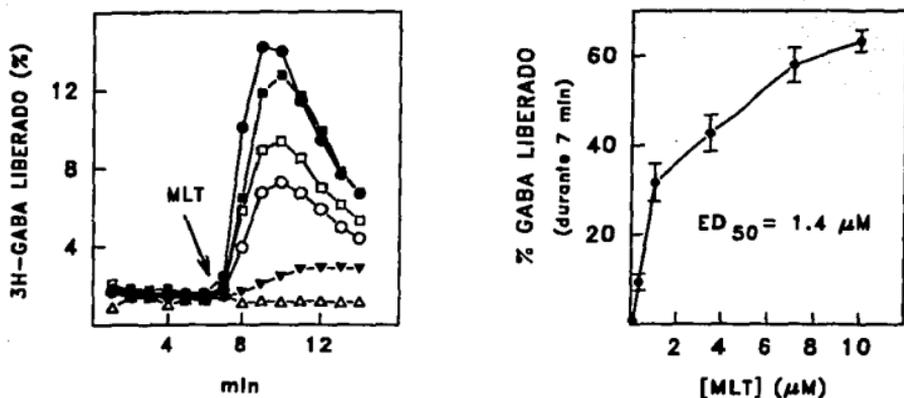


Fig. 1. Efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación basal de [³H]-GABA. (A) Los sinaptosomas puros de cerebro de ratón cargados con [³H]-GABA fueron perfundidos con Ringer normal. Donde se indica (flecha), el Ringer contenía melitina 0.1 (), 0.3 (), 1 (o), 3 () 7 () y 10 (o) μM. (B) El valor de DE₅₀ (1.37 μM) se calculó a partir de la respuesta (en % de la radioactividad total) acumulada en 7 min. Los datos presentados son la media ± el error estándar de 5 experimentos independientes. (429 ± 72 μg de proteína sinaptosomal sobre los filiros).

El efecto de la melitina también se exploró sobre la liberación basal de [³H]-dopamina de sinaptosomas (P₂) obtenidos del estriado de la rata. En la Fig. 2 se muestra el incremento que producen concentraciones crecientes (rango de 0.3 a 10 μM) de melitina sobre la liberación de [³H]-dopamina. Aunque la melitina es menos eficiente para estimular la liberación de este neurotransmisor que para estimular la liberación de [³H]-GABA, también se observa un efecto dependiente de dosis en esta respuesta.

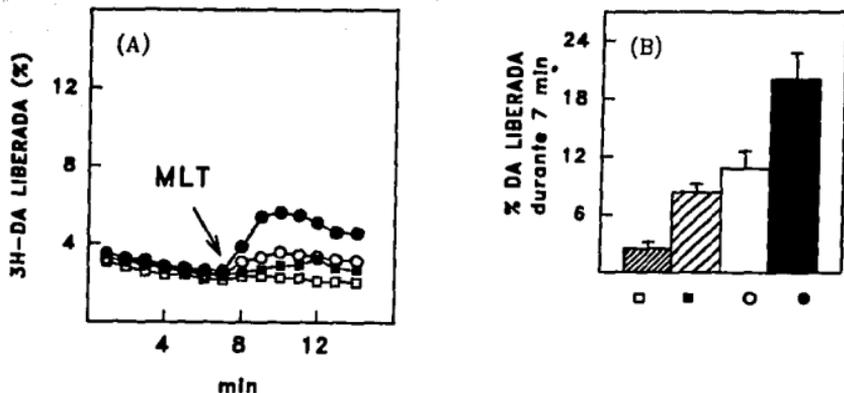


Fig. 2. Efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación basal de $[^3\text{H}]$ -dopamina. (A) Los sinaptosomas P_2 de estriado de rata cargados con $[^3\text{H}]$ -dopamina se perfundieron con Ringer normal. Donde se indica (flecha), el Ringer contenía melitina 0.3 (□), 1 (△), 3 (○) y 10 (●) μM . (B) Las barras son la respuesta (en % de la radioactividad total) acumulada en 7 min. Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 5 experimentos independientes. (1388 \pm 36 μg de proteína sinaptosomal sobre los filtros).

(B) Efecto de la melitina sobre la producción de ácido araquidónico de membranas de sinaptosomas de cerebro de ratón. Como por un lado, estudios anteriores han relacionado la activación de por lo menos una PLA_2 con la liberación de neurotransmisores (Baba y col, 1986; Moskowitz, 1983) y, por otro lado la melitina ha sido caracterizada como un polipéptido estimulador de la actividad de PLA_2 ; decidimos explorar el posible efecto de la melitina sobre la actividad de esta enzima. Para ello estudiamos el efecto de la melitina sobre la producción de ácido araquidónico en membranas de sinaptosomas puros de cerebro de ratón, ya que el ácido araquidónico, junto con su lisoderivado (1-acilfosfoglicérido), resulta de la acción de esta enzima sobre los fosfolípidos membranales. Además, la hidrólisis del ácido araquidónico radioactivo previamente incorporado a las membranas y su concomitante

aparición en el medio donde éstas se encuentran suspendidas se ha utilizado con anterioridad para estimar la actividad de PLA₂ incluso en sinaptosomas (Strosznajder y Samochocki, 1991).

La Fig. 3 muestra el incremento progresivo que producen concentraciones crecientes (0.3, 1 y 10 μM) de melitina en la producción de [³H]-ácido araquidónico previamente incorporado a $322 \pm 81 \mu\text{g}$ de membranas sinaptosomales ($497 \pm 125 \mu\text{g}$ de proteína sinaptosomal).

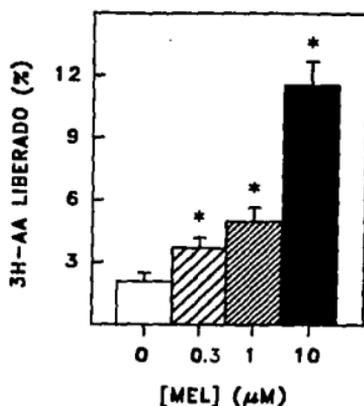


Fig. 3 Efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la hidrólisis de [³H]-ácido araquidónico. Las membranas preparadas de los sinaptosomas puros de cerebro de ratón cargadas con [³H]-ácido araquidónico, se trataron con melitina 0.3, 1 y 10 μM durante 10 min. Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 4 experimentos independientes.

(C) Efecto de la melitina sobre la salida de DHL de los sinaptosomas. La melitina, como polipéptido anfipático, independientemente de las características bioquímicas que le permiten activar a la PLA₂, posee la capacidad de provocar la lisis de células y organelos celulares mediante mecanismos fisicoquímicos que todavía no han sido bien establecidos (Dempsey y Butler, 1992). Con el objeto de averiguar si la

melitina estaba dañando a la membrana de los sinaptosomas, se exploró su efecto sobre la salida de la deshidrogenasa láctica (DHL), ya que esta enzima es un marcador citoplásmico por su ubicación selectiva en el citoplasma de las células. La Fig. 4 muestra que cuando se exponen los sinaptosomas ($366 \pm 24 \mu\text{g}$) suspendidos en buffer a concentraciones crecientes de melitina, la actividad de la enzima en el medio (SN) no se incrementa significativamente a las concentraciones de 0.3 y 1 μM , pero aumenta de manera pronunciada a la concentración alta (10 μM) de melitina.

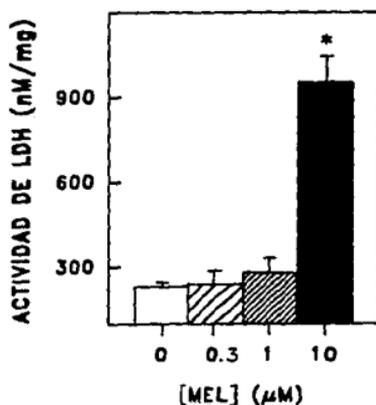


Fig. 4 Efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la salida de DHL de sinaptosomas. Los sinaptosomas puros de cerebro de ratón se trataron con melitina 0.3, 1 y 10 μM durante 2 min. Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 3 experimentos independientes.

2. Dilución de la melitina en las membranas.

(A) Efecto de la concentración de melitina en la membrana de los sinaptosomas sobre la liberación de neurotransmisores. Si analizamos el efecto de la melitina sobre la liberación de los neurotransmisores GABA y dopamina (Figs. 1 y 2), es

evidente que la toxina es mas eficiente para provocar la liberación de [3 H]-GABA de los sinaptosomas del cerebro de ratón que la liberación de [3 H]-dopamina de la fracción sinaptosomal cruda del estriado de la rata. Como la melitina es un polipéptido anfipático "invasor" de la membrana y en los experimentos de liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de estriado de rata se empleó una cantidad mayor de

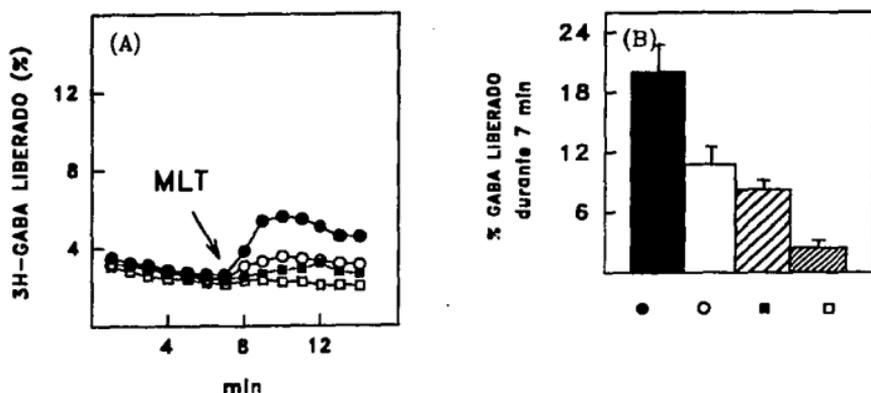


Fig. 5. Efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación basal de [3 H]-GABA de sinaptosomas de estriado de rata. (A) Los sinaptosomas (P_2) cargados con [3 H]-GABA fueron perfundidos con Ringer normal. Donde se indica (flecha) el Ringer contenía melitina, 0.3 (●), 1 (○), 3 (■) y 10 (□) μ M. (B) Las barras son la respuesta (en % de la radioactividad total) acumulada en 7 min. Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 5 experimentos independientes. (1037 ± 250 μ g de sinaptosomas sobre los filtros).

proteína sinaptosomal que en los experimentos realizados con sinaptosomas puros de cerebro de ratón, a saber 1000 versus 400 μ g, decidimos explorar si la diferencia en eficiencia estaba relacionada con la cantidad de proteína sinaptosomal empleada. Para este propósito, estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación de [3 H]-GABA de la fracción sinaptosomal cruda del estriado de la rata,

aprovechando la presencia de terminales gabaérgicas provenientes de las interneuronas en esta región. La Fig. 5 muestra que, la melitina es menos eficiente para incrementar la liberación de [3 H]-GABA de sinaptosomas P₂ de estriado.

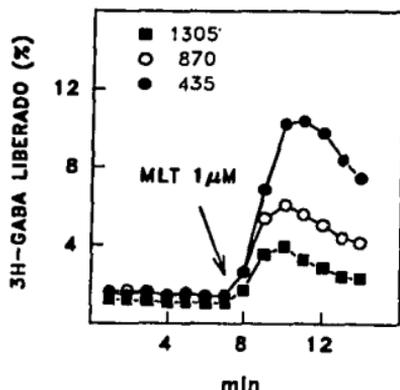


Fig. 6. Efecto de cantidades crecientes de sinaptosomas sobre la liberación de [3 H]-GABA inducida por una concentración constante de melitina. Se perfundieron cantidades crecientes de sinaptosomas puros de cerebro de ratón cargados con [3 H]-GABA (435, 857 y 1350 μ g de proteína sinaptosomal) con Ringer normal. Donde se indica (flecha), el Ringer normal contenía melitina 1 μ M. Se presenta un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Para explorar directamente si la eficacia de la melitina es inversamente proporcional a la cantidad de proteína sinaptosomal empleada (como lo sugieren los datos de la Fig. 5), expusimos cantidades crecientes de sinaptosomas a una concentración constante (1 μ M) de melitina y estudiamos la eficacia de ésta para aumentar la liberación de [3 H]-GABA de sinaptosomas de cerebro de ratón.

La Fig. 6 muestra que la misma concentración de melitina es menos eficaz para aumentar la liberación del neurotransmisor cuando se expone a cantidades crecientes de sinaptosomas. Para mayor claridad, en la tabla I se expresa numéricamente la

magnitud de los cambios en las respuestas inversamente proporcionales en dpms liberadas y en porcentaje de la radioactividad total que produce la concentración constante de melitina (1 μ M) cuando se expone a cantidades crecientes de sinaptosomas. En esta tabla se puede apreciar claramente que la mayor eficacia de la melitina para liberar al neurotransmisor se obtiene con la menor cantidad de sinaptosomas (435 μ g) y la menor eficacia con la mayor cantidad de sinaptosomas (1305 μ g).

Tabla II

μ g PS	dpm/mg	% Total (1 a 8)
435	36159	55.66
870	29567	33.26
1 305	17835	20.07

Efecto de la melitina 1 μ M sobre la liberación de [3 H]-GABA de cantidades crecientes de proteína sinaptosomal (PS). dpm/mg se refiere al [3 H] liberado durante 8 min por la MLT 1 μ M por mg de proteína sinaptosomal (PS). % Total se refiere al % de la radioactividad total (ver métodos) liberada en 8 min.

(B) *Efecto de la concentración de melitina en la membrana de los sinaptosomas sobre la hidrólisis de ácido araquidónico.* Para explorar si la eficacia de la melitina para hidrolizar al [3 H]-ácido araquidónico de las membranas obtenidas de los sinaptosomas previamente marcados con el ácido radioactivo también dependía de la cantidad de sinaptosomas expuestos a la toxina, se expusieron cantidades crecientes de membranas de sinaptosomas a una concentración constante de melitina.

La Fig. 7 muestra que la melitina a la concentración de 10 μ M es menos eficaz para hidrolizar al [3 H]-ácido araquidónico a medida que se incrementa la cantidad de

membranas sinaptosomales. Aunque de manera menos pronunciada, esta relación inversamente proporcional de la melitina para hidrolizar al [^3H]-ácido araquidónico con cantidades crecientes de membranas de sinaptosomas, también es aparente cuando se emplea la melitina a la concentración de $1\ \mu\text{M}$ (Fig. 7).

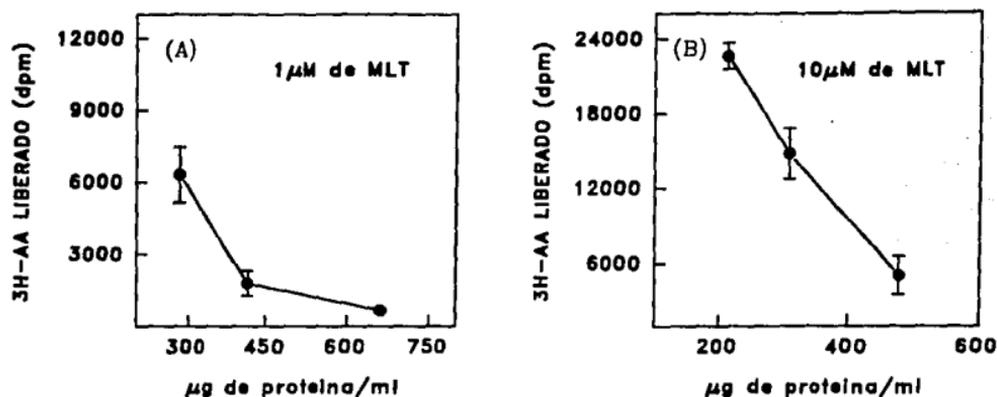


Fig. 7. Efecto de cantidades crecientes de sinaptosomas sobre la hidrólisis de ácido araquidónico inducida por melitina. El [^3H]-ácido araquidónico hidrolizado de cantidades crecientes de membranas por la melitina a una concentración constante ($10\ \mu\text{M}$ en A o $1\ \mu\text{M}$ en B) se cuantificó durante 10 min. Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 4 experimentos independientes.

En la Tabla III se ejemplifica numéricamente este fenómeno para la concentración alta ($10\ \mu\text{M}$) de melitina. Nótese que las diferencias en las respuestas son más aparentes cuando se emplean cantidades menores de sinaptosomas.

Tabla III

$\mu\text{G PS}$	$\mu\text{g PM}$	dpm/mg
333	216	31139
419	272	19032
467	303	12012
672	407	9597
811	526	9401

Efecto de la melitina 10 μM sobre la producción de [^3H]-ácido araquidónico de cantidades crecientes de sinaptosomas. dpm/mg se refiere al [^3H] liberado durante 2 min por la MLT 10 μM por mg de proteína membranal (PM). PS es la cantidad de sinaptosomas en la que está contenida la cantidad de proteína membranal expuesta a la acción de la MLT expresada como μg de proteína sinaptosomal.

(C) *Efecto de la concentración de melitina en la membrana de los sinaptosomas sobre la salida de DHL.* Como tanto la liberación de neurotransmisores en perfusión continua (Fig.6) como la producción de ácido araquidónico (Fig.7) dependen de la cantidad de proteína presente en el experimento, decidimos explorar si la capacidad de la melitina para producir lisis también era inversamente proporcional a la cantidad de sinaptosomas expuestos a la toxina. Para ello medimos la salida de DHL que inducen cantidades constantes de melitina cuando se exponen a cantidades crecientes de sinaptosomas en suspensión. La Fig. 8 muestra que cuando se exponen cantidades de sinaptosomas menores a 250 $\mu\text{g/ml}$, aún la concentración más baja de melitina (0.3 μM) aumenta significativamente la actividad de la DHL en el sobrenadante con respecto al control. Sin embargo, la melitina 0.3 μM no causa daño celular, a juzgar por la falta de salida de DHL, cuando se expone a cantidades mayores de tejido. La concentración 1 μM de melitina induce una salida significativa de DHL solamente

cuando se expone a cantidades de sinaptosomas menores a 500 $\mu\text{g/ml}$. Mientras que a la concentración elevada (10 μM), la melitina causa una salida significativa de DHL aún cuando se expone a cantidades elevadas de sinaptosomas (i.e. 2000 $\mu\text{g/ml}$). No obstante, también a la concentración elevada de melitina (10 μM) la salida de DHL disminuye a medida que se aumenta la cantidad de sinaptosomas.

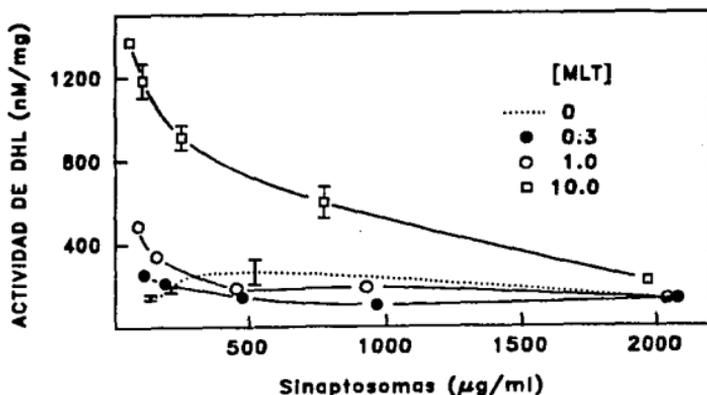


Fig. 8. Efecto de cantidades crecientes de sinaptosomas sobre la salida de DHL inducida por melitina. La salida de DHL de cantidades crecientes de sinaptosomas (rango 54 a 2048 $\mu\text{g/ml}$) expuestos a la melitina (0.3, 1 y 10 μM) se estimó durante 2 min. Se presenta un experimento representativo por cuadruplicado.

3. Dependencia de Ca^{2+} en los efectos de la melitina.

(A) *Dependencia de Ca^{2+} para la liberación de [^3H]-GABA* Con el objeto de explorar la dependencia de Ca^{2+} de la melitina para estimular la liberación de neurotransmisores de los sinaptosomas, se estudió el efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación basal de [^3H]-GABA de sinaptosomas puros

de cerebro de ratón en ausencia y en presencia de Ca^{2+} externo. La Fig. 8 muestra que cuando los sinaptosomas se perfunden con un Ringer sin Ca^{2+} (EGTA 200 μM), a las concentraciones de 0.3 y 1 μM la melitina es menos efectiva para estimular la liberación del transmisor. Este efecto de facilitación de la liberación en presencia de Ca^{2+} no se observa a la concentración elevada (10 μM) de melitina, que incluso produce una salida mas rápida del neurotransmisor en ausencia de Ca^{2+} externo.

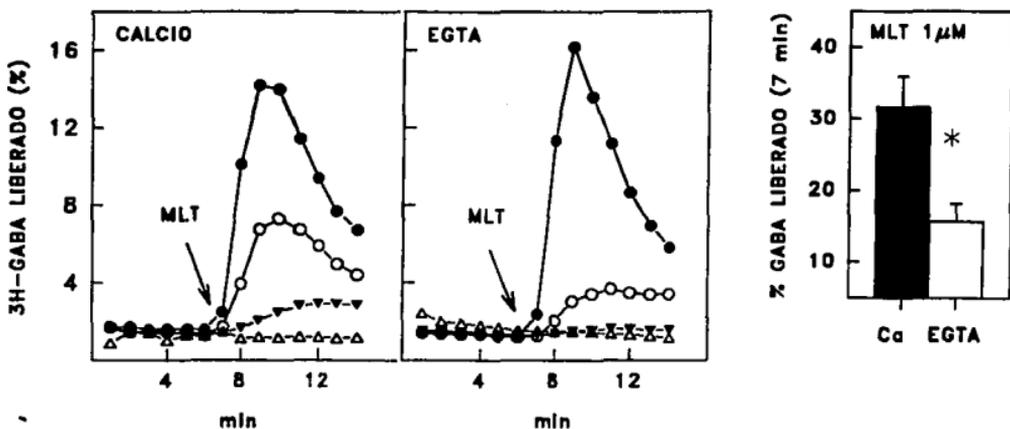


Fig. 9. Efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación de $[^3\text{H}]$ -GABA en presencia y en ausencia de Ca^{2+} . Los sinaptosomas puros de cerebro de ratón cargados con $[^3\text{H}]$ -GABA fueron perfundidos con Ringer normal con (CALCIO) y sin (EGTA) Ca^{2+} . Donde se indica (flecha), el Ringer normal contenía melitina en concentraciones de 0.1 (●), 0.3 (○), 1 (□) y 10 (△) μM . En las barras se ilustra la facilitación que produce la presencia de Ca^{2+} en la respuesta a la melitina 1 μM . La cantidad de sinaptosomas para los experimentos con Ca^{2+} fué de $429 \pm 72 \mu\text{g}$ y de $401 \pm 67 \mu\text{g}$ para los experimentos sin Ca^{2+} . Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 5 experimentos independientes.

(B) Dependencia de Ca^{2+} para la hidrólisis de $[^3\text{H}]$ -ácido araquidónico. Como se ha reportado que la melitina no estimula indiscriminadamente la actividad de todas las fosfolipasas A_2 (Argiolas y Pisano, 1986; Clark y col., 1991; Steiner y col., 1993) y

como en cerebro de gerbo y de la rata se ha reportado la existencia de actividad de PLA₂, Ca²⁺ independiente (Pierik y col., 1988; Rodorof y col., 1991), también resultaba relevante explorar la dependencia de Ca²⁺ de la melitina para hidrolizar al ácido araquidónico. La Fig. 10 muestra que a diferencia del incremento progresivo que producen las concentraciones crecientes de melitina para hidrolizar al [³H] ácido araquidónico preincorporado a las membranas de sinaptosomas en presencia de Ca²⁺, cuando este catión está ausente, la melitina es incapaz de aumentar significativamente la hidrólisis del ácido, incluso a la concentración elevada (10 μM). Esto sugiere que el ácido araquidónico que se hidroliza por efecto de la melitina involucra la activación de una PLA₂ membranal dependiente de Ca²⁺.

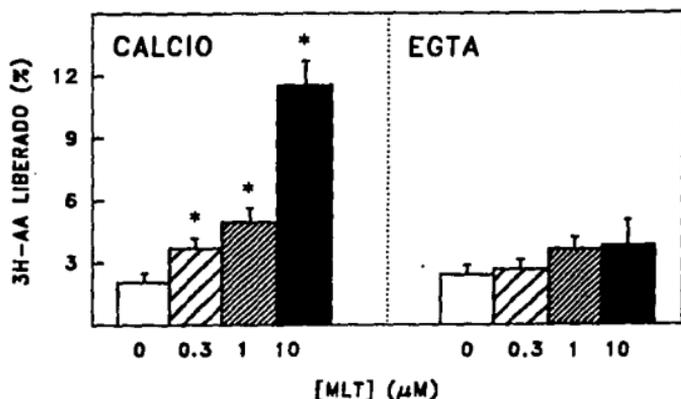


Fig. 10. Efecto de la melitina sobre la hidrólisis de [³H]-ácido araquidónico en presencia y en ausencia de Ca²⁺. El [³H]-ácido araquidónico hidrolizado de las membranas de sinaptosomas marcadas con el ácido radioactivo por la melitina (0.3, 1 y 10 μM) en presencia y ausencia de Ca²⁺ se estimó durante 10 min. La cantidad de proteína sinaptosomal fue de 322 ± 81 μg/ml (equivalente a 496 ± 125 μg/ml de proteína sinaptosomal) para los experimentos en presencia de Ca²⁺ y de 285 ± 24 μg/ml (equivalente a 439 ± 37 μg/ml de proteína sinaptosomal) para los experimentos en ausencia de Ca²⁺. Los datos presentados son la media ± el error estándar de 4 experimentos independientes.

(C) Dependencia de Ca^{2+} para la salida de DHL de los sinaptosomas. Como por una parte se ha sugerido que el Ca^{2+} así como el ácido araquidónico están involucrados en los mecanismos de daño celular (Nicotera y col. 1992) y por otra en el presente estudio encontramos que tanto la activación de la PLA_2 de membranas de sinaptosomas como la lisis de los sinaptosomas (juzgada a partir de la salida de DHL), dependen: (1) de la concentración de melitina en el Ringer y (2) de la cantidad de sinaptosomas, era importante determinar la posible dependencia de Ca^{2+} de la melitina para inducir salida de DHL. Para este propósito se comparó la salida de DHL causada por concentraciones crecientes de melitina (0.3, 1 y 10 μM) de aproximadamente 360 $\mu g/ml$ de sinaptosomas en ausencia y en presencia de Ca^{2+} . La Fig. 11 muestra que con la cantidad de sinaptosomas empleados, únicamente la concentración elevada (10 μM) de melitina incrementa la salida de DHL de manera significativa y que este efecto se presenta aún en ausencia de Ca^{2+} en el medio de incubación.

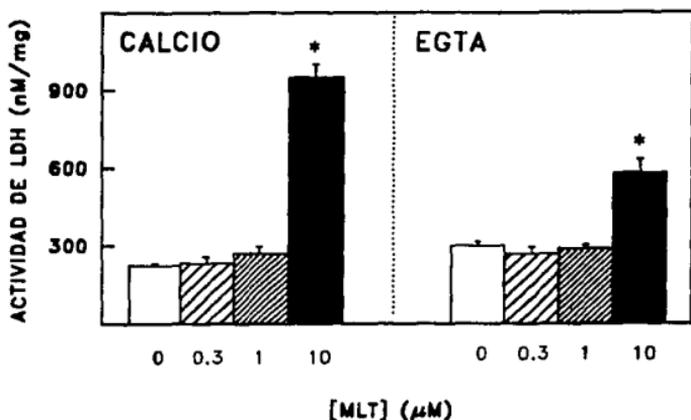


Fig. 11. Efecto de la melitina sobre la salida de DHL en presencia y en ausencia de Ca^{2+} . La salida de DHL de los sinaptosomas inducida por la melitina (0.3, 1 y 10 μM) en presencia y ausencia de Ca^{2+} externo se estimó durante 10 min. La cantidad de sinaptosomas para los experimentos en presencia de Ca^{2+} fue de $366 \pm 24 \mu g/ml$ y de $354 \pm 31 \mu g/ml$ para los experimentos en ausencia de Ca^{2+} . Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 4 experimentos independientes.

4. Efecto del BPB sobre la liberación de [³H]-GABA, la producción de ácido araquidónico y la salida de DHL inducidas por melitina. Se ha reportado que la melitina estimula selectivamente a algunas PLA₂ (Argiolas y Pisano, 1986). El BPB, inhibe a la PLA₂ tipo I, uniéndose selectivamente a la histidina 48 del sitio activo de la enzima (Inoue y Matsui, 1990). Para explorar si la liberación de [³H]-GABA que induce la melitina bajo las condiciones que no estimulan la salida de DHL y que se facilita en presencia de Ca²⁺, dependía de la activación de alguna de las fosfolipasas sensibles a BPB, se expuso una cantidad elevada de sinaptosomas (725 µg) a la concentración de melitina 1 µM en ausencia y en presencia de BPB. La Fig. 12 muestra que el BPB disminuye significativamente la liberación de [³H]-GABA inducida por la melitina en presencia de Ca²⁺. El BPB también disminuye la liberación de [³H] ácido araquidónico preincorporado a las membranas de sinaptosomas (274 µg) con melitina 1 µM en presencia de Ca²⁺ y no modifica significativamente la salida de DHL estimulada también con MLT 1 µM de 400 µg de sinaptosomas. Estos resultados sugieren que la MLT estimula la activación de una PLA₂ tal vez de tipo II de 14 KDa, pero que su activación no está involucrada en el daño causado a los sinaptosomas por la MLT.

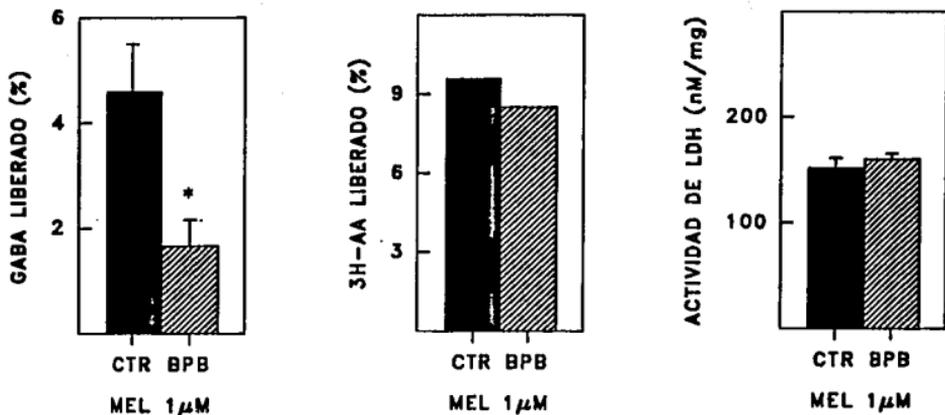


Fig. 12. Efecto de BPB sobre la liberación de [3 H]-GABA, la producción de ácido araquidónico y la salida de DHL inducida por melitina. Los sinaptosomas puros de cerebro de ratón ($725 \pm 80 \mu\text{g}$) se expusieron a la melitina $1 \mu\text{M}$ en ausencia (barras oscuras) y en presencia (barra listada) de BPB $10 \mu\text{M}$ durante 2 min. El [3 H]-GABA liberado se expresa en % de la radioactividad total liberada en 2 min. El [3 H]-AA liberado se expresa en % de la radioactividad total liberada en 10 min. La DHL liberada se expresa en nM/mg de proteína sinaptosomal liberada en 2 min. Los datos presentados son la media \pm el error estándar de 4 experimentos independientes.

DISCUSION

Para caracterizar los efectos de las dosis crecientes (0.3, 1 y 10 μM) de melitina sobre los procesos de secreción en general, en este trabajo se estudiaron las alteraciones que produce esta toxina sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas, pues los sinaptosomas son un buen modelo de secreción, ya que la obtención de esta preparación representa la disección de la maquinaria bioquímica para la liberación de los neurotransmisores.

Los datos presentados en esta tesis muestran que la melitina aumenta la liberación de neurotransmisores de sinaptosomas de manera dependiente de dosis. La DE_{50} de la melitina para aumentar la liberación de [^3H]-GABA de sinaptosomas puros de cerebro de ratón que encontramos es de 1.37 μM , igual a la previamente reportada para aumentar la secreción de insulina de islotes de Langerhans por Morgan y colaboradores (1985). Dentro del mismo rango de concentraciones también se ha encontrado que la melitina aumenta la secreción de prolactina, adenocorticotropina y beta endorfina de pituitaria anterior de rata (Gandison, 1984; Kneppel y Gerhards, 1987). En el presente estudio, sin embargo se demuestra claramente que la eficacia de la melitina para inducir la liberación de transmisores no solo depende de la concentración de la toxina añadida en el medio que baña a la preparación sino de la cantidad de melitina que alcanza la membrana de los sinaptosomas. Este hallazgo no es sorprendente si consideramos que por sus características de polipéptido anfipático básico, la molécula de melitina debe introducirse en las membranas biológicas. Como el factor de dilución de la melitina en membranas nunca ha sido considerado para la determinación de las DE_{50} de la melitina sobre la secreción de péptidos, hormonas y neurotransmisores, es muy posible que en la mayoría de los casos las DE_{50} sean un reflejo de un doble efecto (ver mas adelante) de la melitina sobre los procesos de secreción.

Para explorar los mecanismos que subyacen a los aumentos que producen las concentraciones crecientes de melitina sobre la liberación de neurotransmisores, como modelo de secreción, comenzamos por analizar los efectos de concentraciones crecientes de melitina sobre los dos fenómenos que podrían estar involucradas en sus efectos secretorios: (1). activación de PLA₂, mediante la cuantificación de la producción de ácido araquidónico, uno de los principales productos de la acción de la enzima sobre los fosfolípidos membranales y (2). daño a la membrana celular, mediante la detección de la salida del marcador citoplásmico, DHL.

La actividad de PLA₂ se ha encontrado en neuronas (Woelk y col., 1978), en sinaptosomas (Bradford y col., 1983) en membranas sinaptosomales (Baba y col., 1986) y en vesículas sinápticas (Moskowitz y col., 1983). Estos hallazgos aunados a la producción de ácidos grasos libres, especialmente el ácido araquidónico endógeno tras la despolarización de las terminales nerviosas (Bradford y col., 1983; Majewska y Sun, 1982; Asakura y Matsuda, 1984), son consistentes con la participación de la PLA₂ en los procesos de liberación de neurotransmisores. Nuestro hallazgo de que la melitina aumenta de manera dependiente de dosis la hidrólisis del ácido araquidónico radioactivo previamente incorporado a las membranas de los sinaptosomas, también podría sugerir la participación de alguna PLA₂ en el aumento que produce la melitina sobre la secreción de neurotransmisores. Sin embargo, en este trabajo también encontramos que la melitina aumenta la salida de DHL bajo ciertas condiciones experimentales. Por ejemplo, la salida de DHL solamente aumenta significativamente cuando se exponen 350 µg de proteína sinaptosomal a la concentración alta (10 µM) de la melitina (Fig. 4). Esto indica que la liberación de GABA inducida por 10 µM de melitina de cantidades semejantes de sinaptosomas (400 µg de proteína sinaptosomal, Fig. 9) muy probablemente se deba al daño celular que produce la toxina a esta concentración. En cambio, cuando una cantidad semejante de sinaptosomas (350 µg de proteína sinaptosomal) se expone a las concentraciones mas bajas (0.3 y 1 µM) de melitina, la

presencia de la toxina no induce la salida del marcador citoplásmico (Fig. 4). Esto sugiere que la liberación del neurotransmisor que induce la melitina a las concentraciones bajas no se debe a daño celular sino que probablemente implica a otro mecanismo.

Los resultados de este estudio indican claramente que la concentración efectiva de melitina para causar: liberación de neurotransmisores, actividad de PLA_2 o daño celular, no es la concentración que se añade al medio que baña al tejido, sino la que alcanza la toxina en la fracción membranal del mismo, aunque en este trabajo no se cuantificó la concentración membranal de la toxina. Este factor de "dilución" de la melitina en la membrana que por primera vez se reporta en este estudio, muy posiblemente ha complicado el uso de la melitina como "herramienta experimental" en estudios anteriores y debe dar cuenta de las controversias que aparecen en la literatura en relación con la dependencia de Ca^{2+} o a la incapacidad de observar inhibición farmacológica por algunos autores, particularmente cuando se intentan estudiar los efectos de la melitina en procesos de secreción.

Al explorar la dependencia de Ca^{2+} en los efectos causados por la melitina, encontramos que tanto la hidrólisis de ácido araquidónico como la liberación de GABA inducidas por melitina dependen o se facilitan en presencia de Ca^{2+} (en particular cuando se emplean las concentraciones bajas de melitina). La salida de DHL que induce la melitina a la concentración elevada es, en cambio, independiente de la presencia de Ca^{2+} . Esto sugiere que los efectos de la melitina promovidos por la activación de una PLA_2 , aparentemente dependiente de Ca^{2+} , y cuya activación posiblemente subyace al componente dependiente de Ca^{2+} de la liberación de GABA inducido por melitina, no están mediados por el mismo proceso que causa el daño celular. También es improbable que el efecto lítico que produce la melitina a la concentración de $10 \mu M$ (o que producen las concentraciones menores de melitina cuando se exponen a cantidades bajas de sinaptosomas, ver Fig. 8) esté relacionado con

una aumento tal en la actividad de la PLA₂ dependiente de Ca²⁺ que cause la lisis de los sinaptosomas, pues la salida de DHL que promueve la melitina a la concentración elevada no depende de Ca²⁺, mientras que el aumento progresivo de la hidrólisis de ácido araquidónico que inducen las concentraciones crecientes de melitina solamente se observa en presencia de Ca²⁺.

Nuestro hallazgo de que en ausencia de Ca²⁺ externo, la melitina, ni a la concentración de 10 µM aumente significativamente la producción de [³H]-ácido araquidónico (Fig. 10) indica que la ruptura de la membrana no se debe a que la actividad de alguna PLA₂ esté aumentada al grado de llegar a ser lítica, sino a otro mecanismo, posiblemente relacionado con las características líticas de la melitina descritas por Dempsey (1990). En cambio, la liberación de [³H]-GABA que inducen las concentraciones bajas (0.3 y 1 µM) de melitina cuando se exponen 400 µg de tejido sinaptosomal y que se facilita en presencia de Ca²⁺ externo (Fig. 9), sí parece deberse a la activación de una PLA₂, membranal, dependiente de Ca²⁺, pues es sensible al BPB, que es un inhibidor selectivo de la PLA₂ tipo I y parcial de la PLA₂ tipo II de 14 KDa.

Como se ha demostrado que la melitina es capaz de activar directamente a diversos tipos de fosfolipasas A₂ (Argiolas y Pisano, 1986), ésta ha sido ampliamente usada para explorar la participación de la PLA₂ en procesos de secreción de diversos péptidos y hormonas como activador putativo de la PLA₂ (Kiesel y col., 1987; Nava y Malacara, 1987; Kneppel y Gerhards, 1987; Fujimoto y Metz, 1987; Gandison, 1984; Ojeda y Negro-Vilar, 1985; Morgan y col., 1985; Abou-Samra y col., 1986). Sin embargo, los hallazgos presentados en este trabajo indican que solamente controlando la cantidad de tejido que se expone a la melitina, esta toxina puede ser empleada como herramienta experimental para estudiar la participación de la PLA₂ en algunas respuestas celulares. Asimismo, los hallazgos de este estudio deben ser considerados cuando se pretenda usar a la toxina como causante de daño celular.

Discusión del método para la cuantificación de la actividad de la PLA₂.

La actividad de la PLA₂ de los sinaptosomas se determinó mediante una variación del método reportado por Strosznajder y Samochocki (1991). En el método empleado en este trabajo el [³H]-ácido araquidónico se incorpora a los sinaptosomas aprovechando el mecanismo de elongación de ácidos grasos de cadena larga, que requiere de ATP, Acetil coenzima A y Mg²⁺ y que depende de tiempo. El uso del mecanismo de elongación de ácidos grasos para incorporar al [³H]-ácido araquidónico garantiza una verdadera introducción química del mismo a la membrana de los sinaptosomas.

Para eliminar al [³H]-ácido araquidónico unido inespecíficamente por atracción electrostática a la superficie de las membranas celulares, los sinaptosomas se lavaron con BSA libre de ácidos grasos una vez concluida la incorporación de la marca radioactiva. Como la BSA quela ávidamente a los ácidos grasos libres (Strosznajder y Samochocki, 1991), con este tratamiento se garantiza que el [³H]-ácido araquidónico unido inespecíficamente por atracción electrostática a la superficie de las membranas celulares, no interfiera en la cuantificación del [³H]-ácido araquidónico preincorporado a las membranas y liberado posteriormente por acción de la melitina. Además cualquier efecto inespecífico en la liberación basal de [³H]-ácido araquidónico se detectaría en el control pero no explicaría los aumentos en la producción de [³H]-ácido araquidónico que induce la melitina de manera dosis dependiente (Fig. 3).

Aunque en este trabajo no se estudió a qué tipo de fosfolípido de la membrana de los sinaptosomas de cerebro de ratón se incorpora preferencialmente el [³H]-ácido araquidónico, en un estudio previo Strosznajder y Samochocki (1991) reportaron que el [³H]-ácido araquidónico se incorpora a los fosfolípidos de sinaptosomas crudos de corteza cerebral de rata, en el siguiente orden: fosfatidil inositol > lípidos neutros >

fosfatidil colina > ácido fosfatídico > polifosfatidil inositol > fosfatidiletanolamina > fosfatidil serina.

Una manera de explorar qué tipo (o tipos) de PLA₂ es estimulada por la melitina en los sinaptosomas de cerebro de ratón sería determinando la fuente del [³H]-ácido araquidónico liberado por acción de la melitina. Aunque nosotros no identificamos la fuente de los fosfolípidos preferencialmente hidrolizados por acción de la melitina en los sinaptosomas de cerebro de ratón, se sabe que en sinaptosomas de corteza cerebral de rata, el 50% del [³H]-ácido araquidónico liberado por la simple presencia de Ca²⁺ 2 mM proviene del ácido fosfatídico y el 40% del poli fosfatidil inositol (Strosznajder y Samochocki, 1991). Como estos fosfolípidos son sustratos preferenciales de la PLA₂ de 14 KDa y la actividad de esta enzima se facilita en presencia de Ca²⁺ y es sensible a BPB, es muy probable que cuando menos la liberación de GABA dependiente de Ca²⁺ y sensible a BPB, esté mediada por una PLA del tipo II de 14 KDa, que mediante la activación de algún otro tipo de fosfolipasa A₂. Es improbable que la PLA₂ del tipo IV, cuyo sustrato principal es fosforilcolina, esté involucrada en la liberación de GABA dependiente de Ca²⁺, sensible a BPB, inducida por melitina, pues ese fármaco no inhibe a las fosfolipasas de 85 KDa como la PLA₂ del tipo IV y la actividad de esta enzima es independiente de Ca²⁺ (Mayer y Marshall, 1993).

Probable mecanismo de acción.

Es importante hacer notar que en este estudio no se identificaron individualmente cada uno de los compuestos radioactivos a los que colectivamente llamamos [³H]-ácido araquidónico. Así, estrictamente debimos hablar de [³H]-eicosanos producidos por la melitina en vez de [³H]-ácido araquidónico producido por la melitina. Sin embargo como la producción de los metabolitos del [³H]-ácido araquidónico requiere de la producción previa del mismo por acción de la PLA₂, y nuestro objetivo era estudiar si la activación de esta enzima por melitina subyacia a sus efectos sobre la liberación de

neurotransmisores, decidimos referirnos a liberación de [^3H]-ácido araquidónico. No obstante es importante considerar la probable importancia relativa de cada uno de los eicosanos en el proceso de la liberación de los diferentes neurotransmisores.

Hay evidencia de que la producción de ácido araquidónico o de alguno de sus metabolitos podría ser uno de los eventos bioquímicos que subyacen a la liberación de neurotransmisores (Piomelli y col., 1987). Se ha reportado que cuando los sinaptosomas se despolarizan hay un aumento en la producción de ácido araquidónico (Asakura y Matsuda, 1983). La biosíntesis de los eicosanos depende de la disponibilidad de ácido araquidónico. Dado que el grueso de éste se encuentra esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos, los candidatos mas probables para regular la cantidad de ácido araquidónico disponible son las PLA_2 .

Se ha especulado mucho acerca del mecanismo de activación de éstas enzimas. Se ha propuesto, por ejemplo, que la actividad de las PLA_2 puede estimularse mediante un evento de unión a receptores (Dennis, E.A., 1990). En sinaptosomas hay evidencia de que al estimular los receptores colinérgicos de las membranas de sinaptosomas de cerebro de rata con un agonista hay un aumento en la actividad de PLA_2 (Strosznajder y Strosznajder, 1989; Strosznajder y Samochocki, 1991). En nuestro estudio sin embargo, este no parece ser el mecanismo por el cual la melitina estimula la liberación de GABA, ya que en condiciones no líticas, la liberación de GABA depende de Ca^{2+} y el aumento en la actividad de PLA_2 en sinaptosomas de corteza de rata inducido por los agonistas colinérgicos se produce tanto en ausencia como en presencia de Ca^{2+} externo (Strosznajder y Samochocki, 1991).

Hay evidencia de que la activación de PLA_2 unida a receptores podría estar regulada por proteínas G (Silk y col., 1989; Fernández y Blasinde, 1993; Burch y col. 1986; Axelrod y col. 1988). También en membranas de sinaptosomas de corteza cerebral de rata hay evidencia de que la unión de proteínas G podría estar regulando la activación de una PLA_2 (Strosznajder y Strosznajder, 1989). Lo anterior aunado con la

evidencia de que la PLA₂ de 85 KDa puede ser fosforilada y activada por la proteína cinasa 2 asociada a microtúbulos y por la proteína cinasa C (Nemenoff y col. 1993), así como su localización preferencial en el citoplasma y su dependencia de Ca²⁺ externo para trasladarse del citoplasma a la membrana de la célula (Clark y col., 1991), podrían permitirnos especular que tal vez esta PLA₂ de 85 KDa sea la especie unida a los receptores. Sin embargo nuestros datos tampoco indican que las fosfolipasas A₂ de 85 KDa sean las involucradas en las acciones no líticas de la melitina presentadas en este estudio, como ya se discutió.

Recientemente se ha encontrado una proteína endógena, conocida como PLAP, capaz de activar directamente a fosfolipasas A₂ (Clark y col., 1987). Aunque se sabe muy poco acerca de ésta proteína, resulta muy interesante que la melitina presente un alto grado de homología con la parte de la PLAP correspondiente al centro activo (Steiner y col., 1993). Estos hallazgos aunados al hecho de que la PLAP solamente es capaz de activar a algunos tipos de fosfolipasas A₂, entre las que principalmente se encuentra la PLA₂ tipo II de 14 KDa (Clark y col., 1987; Steiner y col., 1993) nos llevan a especular que la PLAP participa en la regulación fisiológica de la liberación de GABA, pues la activación de una PLA₂ tipo II de 14 KDa también parece subyacer al aumento del componente dependiente de Ca²⁺ de la liberación de GABA inducida por melitina.

En resumen, concluimos que la melitina induce la liberación de GABA dependiente de Ca²⁺ mediante la activación de una PLA₂ dependiente de Ca²⁺ y sensible a BPB, posiblemente del tipo II de 14 KDa. Que la melitina puede ser utilizada como herramienta experimental para estudiar la participación de algunos tipos de fosfolipasas A₂ en los procesos de secreción, siempre y cuando se tomen en cuenta los efectos de dilución de esta toxina para eliminar las acciones fisicoquímicas de la toxina que permiten la salida del mensajero secretado por efectos líticos no relacionados con sus acciones como activador de PLA₂.

Para finalizar quisiera agregar que como la melitina también ha demostrado que es capaz de estimular la secreción de péptidos y hormonas de diversos tipos celulares (Gandison, 1984; Kneppel y Gerhards, 1987; Morgan y col., 1985), en ocasiones (muy posiblemente cuando los efectos lítricos no interfieren con la respuesta) de manera sensible a BPB (Mayer y Marshall, 1993), es posible que la fosfolipasa A₂ activada artificialmente por melitina (y cuyo activador endógeno parece ser la PLAP) no solamente regule la liberación de GABA sino que participe en la regulación de los procesos de secreción en general.

REFERENCIAS

Abou-Samra A. B., Catt K. J. and Aguilera G. (1986) Role of arachidonic acid in the regulation of adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* **119**, 1427-1431.

Argiolas A. and Pisano J. J. (1986) Facilitation of PLA2 activity by Mastoparans, a new class of mast cells degranulating peptides from wasp venom. *J Biol Chem* **258**, 13697-13702.

Asakura T. and Matsuda M. (1984) Efflux of gamma-aminobutyric acid from and appearance of free arachidonic acid inside synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* **773**, 301-307.

Axelrod J. (1990) Receptor mediated activation of PLA2 and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem Soc Trans* **18**, 503-507.

Baba A., Onoe H., Ohata A. and Iwata H. (1986) Assay of PLA2 activity of synaptic membrane using a phospholipid transfer protein: stimulation by depolarization. *Biochim Biophys Acta* **878**, 25-31.

Batenburg A. M., Hibbeln J. C. L. and de Kruijff B. (1987) Lipid specific penetration of melittin into phospholipid model membranes. *Biochim Biophys Acta* **903**, 155-165.

Bernheimer A. W. and Rudy B. (1986) Interactions between membranes and cytosolic peptides. *Biochim Biophys Acta* **864**, 123-141.

Bradford H. (1969) Respiration in vitro of synaptosomes from mammalian cerebral cortex. *J Neurochem* **16**, 675-684.

Bradford H. (1975) Isolated nerve terminals as an in vitro preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release, in *Handbook of psychopharmacology* (Iversen L., Iversen S. and Snyder S. eds) pp. 191-252. Plenum Press, New York.

Bradford P. G., Marinetti G. V. and Abood L. G. (1983) stimulation of PLA2 and secretion of catecholamines from brain synaptosomes by potassium and A23187. *J Neurochem* **41**, 1684-1693.

Burgoyne R. D. and Morgan A. (1990) The control of free arachidonic acid levels. *TIBS* **15**, 365-366.

Chien K. R., Pfau R. G. and Farber J. L. (1979) Ischemic myocardial injury. Prevention by chlorpromazine of an accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction. *Am J Pathol* 97, 505-530.

Clague M. J. and Cherry R. J. (1988) Comparison of p25 presequence peptide and melittin. *Biochem J* 252, 791-794.

Clark J. B. and Nicklas W. J. (1970) The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J Biol Chem* 245, 4724-4731.

Clark J. D., Lin L. L., Kriz R. W., Ramesha C. S., Sultzman L. A., Lin A. Y., Milona N. and Knopf J. L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65, 1043-1051.

Clark M. A., Conway T. M., Shorr R. G. L. and Crooke S. T. (1987) Identification and isolation of a mammalian protein which is antigenically and functionally related to The PLA2 stimulatory peptide melittin. *J Biol Chem* 262, 4402-4406.

Clark M. A., Ozgur L. E., Conway T. M., Dispoto J., Crooke S. T. and Bomalaski J. S. (1991) Cloning of a PLA2 activating protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5418-5422.

Dagani F. and Erecinska M. (1987) Relationship among ATP Synthesis, K⁺ gradients, and neurotransmitter aminoacid levels in isolated rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 49, 1229-1240.

de Haas G. H., Dijkman R., Ransac S. and Verger R. (1990) Competitive inhibition of lipolytic enzymes. IV. Structural details of acylamino phospholipid analogues important for the potent inhibitory effects on pancreatic PLA2. *Biochim Biophys Acta* 1046, 249-257.

de Haas G. H., Dijkman R., van Oort M. G. and Verger R. (1990) Competitive inhibition of lipophilic enzymes. III. Some acylamino analogues of phospholipids are potent competitive inhibitors of porcine pancreatic PLA2. *Biochim Biophys Acta* 1043, 75-82.

DeGrado W. F., Musso G. F., Lieber M., Kaiser E. T. and Kezdy E. J. (1982) Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophys J* 37, 329-338.

Dempsey C. E. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1031, 143-161.

Dempsey C. E. and Butler G. S. (1992) Helical structure and orientation of melittin in dispersed phospholipid membranes from amide exchange analysis in situ. *Biochemistry* **31**, 11973-11977.

Dempsey C. E., Cryer G. D. and Watts A. (1987) The interaction of deuteromethylated melittin with phospholipid membranes studied by deuterium NMR. *FEBS Letters* **218**, 173-177.

Dempsey C. E. and Watts A. (1987) A deuterium and phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance study of the interactions of melittin with dimyristoylphosphatidylcholine bilayers and the effects of contaminating PLA2. *Biochemistry* **26**, 5803-5811.

Diez E., Louis-Flamberg P., Hall R. H. and Mayer R. J. (1992) Substrate specificities and properties of human PLA2 in a mixed vesicle model. *J Biol Chem* **267**, 18342-18348.

Diez E. and Mong S. (1990) Purification of a phospholipase A2 from human monocytic leukemic U937 cells. *J Biol Chem* **265**, 14654-14661.

Drapeau P. and Blaustein M. P. (1983) Initial release of 3H-dopamine from rat striatal synaptosomes: correlation with calcium entry. *J Neurosci* **3**, 703-713.

Drust D. S. and Martin T. F. J. (1984) Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates protein phosphorylation in GH3 pituitary cells by a lipid-linked, PKC mediated pathway. *J Biol Chem* **259**, 14520-14530.

Dufourcq E. J., Faucon J. F., Fourche G., Dufourcq J., Gulik-Krzywicki T. and Le Maire M. (1986) Reversible disc-to-vesicle transition of melittin-DPPC complex triggered by the phospholipid acyl chain melting. *FEBS Letters* **201**, 205-209.

Dufourcq J., Faucon J. F., Fourche G., Dasseux J. L., Le Maire M. and Gulik-Krzywicki T. (1986) Morphological changes of phosphatidylcholine bilayers induced by melittin: vesicularization, fusion, discoidal particles. *Biochim Biophys Acta* **859**, 33-48.

Dunkley P.R., Rostas J.A.P., Heath J.W. and Powis D.A. (1987) Preparation and use of synaptosomes for studying segregation of catecholamines, in *In vitro methods for studying secretion* (Poisner and Trifaro eds) pp. 314-334. Elsevier Science,

Farber J. L. and Young E. E. (1981) Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **221**, 312-320.

Fricke U. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal Biochem* 53, 555-558.

Fujimoto W. Y. and Metz S. A. (1987) Phasic effects of glucose, PLA₂, and lysophospholipids on insulin secretion. *Endocrinology* 120, 1750-1757.

Gandison L. (1984) Stimulation of anterior pituitary prolactin release by melittin, an activator of PLA₂. *Endocrinology* 114, 1-7.

Georgioliou S., Thompson M. and Mukhopadhyay A. K. (1982) Melittin phospholipid interaction studied by employing the single tryptophan residue as an intrinsic fluorescent probe. *Biochim Biophys Acta* 688, 441-452.

Gornich J. H., Bonventre J. V. and Nemenoff A. R. (1990) Purification of a high molecular mass form of PLA₂ from rat kidney activated at physiological calcium concentrations. *Biochem J* 271, 37-43.

Gray E. and Whittaker V. (1962) The isolation of nerve endings from brain: An electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96, 79-87.

Green J. A., Smith G. M., Buchta R., Lee R., Ho K. Y., Rajkovic I. A. and Scott K. F. (1991) Circulating PLA₂ activity associated with sepsis and septic shock is indistinguishable from that associated with rheumatoid arthritis. *Inflammation* 15, 355-367.

Gronich J. H., Bonventre J. V. and Nemenoff A. R. (1990) Purification of a high-molecular-mass form of PLA₂ from rat kidney activated at physiological calcium concentrations. *Biochem J* 271, 37-43.

Habermann E. (1972) Bee and wasp venoms. *Science* 177, 314-322.

Hajos F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res* 136, 387-392.

Hanke W., Methfessel C., Wilmsen H. U., Katz E., Jung G. and Boheim G. (1983) Melittin and a chemically modified trichotoxin from alamethicin-type multi-state pores. *Biochim Biophys Acta* 727, 108-114.

Hara S., Kudo I., Chang H. W., Matsuta K., Miyamoto T. and Inoue K. (1989) Purification and characterization of extracellular PLA₂ from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Biochem (Tokyo)* 105, 395-399.

- Hazen S. L., Zupan L. A., Weiss R. H., Getman D. P. and Gross W. R. (1991) Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* **266**, 7227-7232.
- Hider R. C., Khader F. and Tatham A. S. (1983) Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. *Biochim Biophys Acta* **728**, 206-214.
- Hirashima Y., Farooqui A. A., Mills J. S. and Horrocks L. A. (1980) Identification and purification of calcium independent PLA2 from bovine brain cytosol. *J Neurochem* **59**, 708-714.
- Inagaki F., Shimada I., Kawaguchi K., Hirano M., Terasawa I., Ikura T. and Go N. (1989) Structure of melittin bound to perdeuterated dodecylphosphocholine micelles as studied by two-dimensional NMR and distance geometry calculations. *Biochemistry* **28**, 5985-5991.
- Inoue N. and Matsui H. (1990) Activation of a brain Na pump after glutamate excitation of cerebral neurons. *Brain Res* **534**, 309-312.
- Kandel E.R. (1991) Transmitter release, in *Principles of neural science* (KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H. and JESSELL T. M. eds) pp. 194-212. Appleton & Lange, Norwalk.
- Kandel E.R., Siegelbaum S.A. and Schwartz J.H. (1991) Synaptic transmission, in *Principles of neural sciences* (KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H. and JESSELL T. M. eds) pp. 123-134. Appleton & Lange, Norwalk.
- Kempf C., Klausner R. D., Weinstein J. N., Van Renswoude J., Pincus M. and Blumenthal R. (1982) Voltage-dependent transbilayer orientation of melittin. *J Biol Chem* **257**, 2469-2476.
- Kiesel L., Rabe T., Hauser G., Przylipiak A., Jadali F. and Runnebaum B. (1987) Stimulation of luteinizing hormone by melitin and PLA2 in rat pituitary cells. *Molecular and cellular Endocrinology* **51**, 1-6.
- Kneppel W. and Gerhards Ch. (1987) Stimulation by melittin of adrenocorticotropin and beta endorphin release from rat adenohypophysis in vitro. *Prostaglandins* **33**, 479-490.
- Kortesuo P. T. and Nevalainen T. J. (1991) Phospholipase A2 in human ascitic fluid. *Biochem J* **278**, 263-267.
- Kramer R., Hession C., Johansen B., Hayes G., McGray P., Chow E. P., Tizard R. and Pepinsky R. B. (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem* **264**, 5768-5775.

- Kramer R., Roberts E., Manetta J. and Putnam J. E. (1991) The Ca²⁺-sensitive Cytosolic PLA₂ is a 100-KDa protein in human monoblast U937 cells. *J Biol Chem* **266**, 5268-5272.
- Krause H., Dieter P., Shulze-Specking A., Ballhorn A. and Decker K. (1991) Ca-induced reversible translocation of PLA₂ between the cytosol and the membrane fraction of rat liver macrophages. *Eur J Biochem* **199**, 355-399.
- Lafleur M., Dasseux J. L., Pigeon M., Dufourcq J. and Pezolet M. (1987) Study of the effect of melittin on the thermotropism of Dipalmitoylphosphatidylcholine by raman spectroscopy. *Biochemistry* **26**, 1173-1179.
- Lanni C. and Becker E. L. (1983) Release of PLA₂ activity from rabbit peritoneal neutrophils by f-Met-Leu-Phe. *Am J Pathol* **113**, 90-94.
- Lavielle F., Adams R. G. and Levin I. W. (1982) Infrared spectroscopic study of the secondary structure of melittin in water, 2-chloroethanol and phospholipid bilayer dispersions. *Biochemistry* **21**, 2305-2312.
- Leslie C. C. (1991) Kinetic properties of a high molecular mass arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ that exhibits lysophospholipase activity. *J Biol Chem* **266**, 11366-11371.
- Leslie C. C. and Channon J. Y. (1990) Anionic Phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing PLA₂ from macrophages and reduce calcium requirement for activity. *Biochim Biophys Acta* **1045**, 261-270.
- Lin L. -L., Lin A. Y. and Knopf J. L. (1992) Cytosolic PLA₂ is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6147-6151.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Majewska M. D. and Sun G. Y. (1982) Activation of arachidonoyl-phosphatidylinositol and phosphatidylcholine turnover by K⁺-evoked stimulation of brain synaptosomes. *Neurochem Int* **4**, 427-433.
- Marshall L. A. and McCarte-Roshak A. (1992) Demonstration of similar calcium dependency by mammalian high and low molecular mass PLA₂. *Biochem Pharmacol* **44**, 1849-1858.
- Mayer J. R. and Marshall L. A. (1993) New insights on mammalian phospholipase A₂(s): comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J*, 339-348.

- McGraw C.F., Nachshen D.A. and Blaustein M.P. (1981) Calcium movement and regulation in presynaptic nerve terminals, in *Calcium and cell function* (Cheung W. Y. ed)pp. 81-110. Academic Press, New York.
- Metz S. A. (1986) Lack of specificity of melittin as a probe for insulin release mediated by endogenous PLA2 or lipoxigenase. *Biochem Pharmacol* 35, 3371-3381.
- Mobilio D. and Marshall L. A. (1980) Recent advances in the design and evaluation of inhibitors of PLA2. *Annu Rep Med Chem* 24, 157-166.
- Morgan N. G., Rumford G. M. and Montague W. (1985) Studies on the mechanism by which melittin stimulates insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta* 845, 526-532.
- Moskowitz N., Puszkin S. and Schook W. (1983) Characterization of brain synaptic vesicle PLA2 activity and its modulation by calmodulin, prostaglandin E2, Prostaglandin F2A, cyclic AMP and ATP. *J Neurochem* 41, 1576-1586.
- Mufson R. A., Laskin J. D., Fisher P. B. and Weinstein I. B. (1979) Melittin shares certain cellular effects with phorbol ester tumor promoters. *Nature* 280, 72-74.
- Murakami M., Kudo I., Umeda M., Matsuzawa A., Takeda M., Komada M., Fujimori Y., Takayhashi K. and Inoue K. (1992) Detection of three distinct PLA2 in cultured mast cells. *J Biochem (Tokyo)* 111, 175-181.
- Nachshen D. A. (1985) Regulation of cytosolic calcium concentrations in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J Physiol* 363, 87-101.
- Nachshen D. A. and Drapeau P. (1988) The regulation of cytosolic pH in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J Gen Physiol* 91, 289-303.
- Nakazato Y., Simonson M. S., Herman W. H., Konieczkowski M. and Sedor J. R. (1980) Interleukin-1A stimulates prostaglandin biosynthesis in serum activated mesangial cells by induction of a non pancreatic PLA2. *J Biol Chem* 266, 14119-14127.
- Nava L. E. and Malacara J. M. (1987) Stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone release from perfused hypothalamic fragments by PLA2. *Endocrinology* 121, 1483-1486.

O'Banion M. K., Winn V. D. and Young B. D. (1980) cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4888-4892.

O'Brian C. A. and Ward N. E. (1989) ATP-sensitive binding of melittin to the catalytic domain of protein kinase C. *Mol Pharmacol* **36**, 355-359.

Ojeda S. R. and Negro-Vilar A. (1985) Prostaglandin E₂-induced luteinizing hormone-release involves mobilization of intracellular calcium. *Endocrinology* **116**, 1763-1770.

Oka S. and Arita H. (1991) Inflammatory factors stimulate expression of group II PLA₂ in rat cultured astrocytes. *J Biol Chem* **266**, 9956-9960.

Oksoon H. C., Padgett W. L. and Daly J. W. (1980) Effects of the amphiphilic peptides melittin and mastoparan on calcium influx, phosphoinositide breakdown and arachidonic acid release in pheochromocytoma PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **260**, 369-375.

Pepinsky R. B., Sinclair L. K., Browning J. L., Mattaliano R. J., Smart J. E., Chow E. P., Falbel T., Ribolini A., Garwin J. L. and Wallner B. P. (1986) Purification and partial sequence analysis of a 37-kDa protein that inhibits PLA₂ activity from rat peritoneal exudates. *J Biol Chem* **261**, 4239-4246.

Pernas P., Masliah J., Olivier J. L., Salvat C., Rybkine T. and Bereziat G. (1991) Type II PLA₂ recombinant overexpression enhances stimulated arachidonic acid release. *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 1298-1305.

Pierik A. J., Nijssen J. G., Aarsman A. J. and Van den Bosch H. (1988) Calcium independent PLA₂ in rat tissue cytosols. *Biochim Biophys Acta* **962**, 345-353.

Potts B. C. M., Faulkner D. J., deCarvalho M. S. and Jacobs R. S. (1992) Chemical mechanism of inactivation of bee venom PLA₂ by the marine natural products manoalide, luffariellolide, and scalaradial. *J Am Chem Soc* **114**, 5093-5100.

Raynor R. L., Zheng B. and Kuo J. F. (1991) Membrane interactions of amphiphilic polipeptides mastoparan, melittin, polymyxin B, and cardiotoxin. *J Biol Chem* **266**, 2753-2758.

Rehfeldt W., Hass R. and Goppelt-Struebe M. (1991) Characterization of PLA₂ in monocyte cell lines. *Biochem J* **276**, 631-636.

- Rhoads D. E., Osburn L. D., Peterson N. A. and Raghupathy E. (1983) Release of neurotransmitter aminoacids from synaptosomes: Enhancement of calcium-independent efflux by oleic and arachidonic acids. *J Neurochem* **41**, 531-537.
- Richards C. D. and McIlwain H. (1967) Electrical responses in brain slices. *Nature* **215**, 704-707.
- Ripka W. C., Sipio W. J. and Galbraith W. G. (1980) Molecular modeling in the design of PLA2 inhibitors. *J Cell Biochem* **40**, 279-286.
- Rodorof G., Nemura Y. and Bonventre J. V. (1991) Characterization of phospholipase A2 (PLA2) activity in gerbil brain: enhanced activity of cytosolic, mitochondrial and microsomal forms after ischemia and reperfusion. *J Neurosci* **11**, 1829-1836.
- Schwartz J.H. (1991) Chemical messengers: small molecules and peptides, in *Principles of neural sciences* (KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H. and JESSELL T. M. eds) pp. 213-224. Appleton & Lange, Norwalk.
- Schwartz J.H. (1991) The cytology of neurons, in *Principles of neural sciences* (KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H. and JESSELL T. M. eds) pp. 37-47. Appleton & Lange, Norwalk.
- Selthamer J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J. A., Kloss J. and Johnson L. K. (1989) Cloning and recombinant expression of PLA2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* **264**, 5335-5338.
- Sharp J. D., White D. L., Chiou X. G., Goodson T., Gamboa G. C., McClure D., Burgett S., Hoskins J., Skatrud P. L., Sportsman J. R., Becker G. W., Kang L. H., Roberts E. F. and Kramer R. (1991) Molecular cloning and expression of human Ca²⁺-sensitive cytosolic PLA2. *J Biol Chem* **266**, 14850-14853.
- Shier T. W. (1979) Activation of high levels of endogenous PLA2 in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 195-199.
- Shimizu T. and Wolfe L. S. (1990) Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* **55**, 1-15.
- Sitges M., Chiu L. M. and González L. (1993) Vesicular and carrier mediated depolarization-induced release of [3H]-GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem Res* **18**, 1081-1087.

- Steiner M. R., Bomalaski J. S. and Clark M. A. (1993) Responses of purified PLA2 to purified phospholipase A2 activating protein (PLAP) and melittin. *Biochim Biophys Acta* 1166, 124-130.
- Strosznajder J. and Samochocki M. (1991) Ca-independent, Ca-dependent and carbachol-mediated arachidonic acid release from rat brain cortex membrane. *J Neurochem* 57, 1198-1206.
- Tang C-M., Presser F. and Morad M. (1988) Amiloride selectively blocks the low threshold calcium channel. *Science* 240, 213-215.
- Terwilliger T. C. and Eisenberg D. (1982) The structure of melittin I. Structure determination and partial refinement. *J Biol Chem* 257, 6010-6015.
- Terwilliger T. C. and Eisenberg D. (1982) The structure of melittin II. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* 257, 6016-6022.
- Tosteson M. T. and Tosteson D. C. (1981) The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers. *Biophys J* 36, 109-116.
- Trump B.F. and Berezsky G. (1987) Mechanisms of cell injury in the kidney: the role of calcium, in *Mechanisms of cell injury: implications for human health* (Fowler B. A. ed) pp. 135-151. Wiley, Chichester, U.K..
- Van Kuijk F. J. G. M., Sevanian A., Handelman G. H. and Dratz E. A. (1987) A new role for PLA2: protection from lipid peroxidation damage. *TIBS* 12, 31-34.
- Vogel H. (1981) Incorporation of melittin into phosphatidylcholine bilayers. Study of binding and conformational changes. *FEBS Letters* 134, 37-42.
- Wallner B. P., Mattaliano R. J., Hession C., Cate R. L., Tizard R., Sinclair L. K., Foeller C., Chow E. P., Browning J. L., Ramachandran K. L. and Pepinsky R. B. (1986) Cloning and expression of human lipocortin, a PLA2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* 320, 77-81.
- Wijkander J. and Sundler R. (1992) Macrophage arachidonate-mobilizing PLA2: Role of calcium for membrane binding but not for catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 118-124.
- Woelk H., Goracci G., Arienti G. and Porcellati G. (1978) On the activity of phospholipases A1 and A2 in glial and neuronal cells, in *Advances in prostaglandin and thromboxane research Vol.3* (Galli C., Galli G. and Porcellati G. eds) pp. 77-83. Raven Press, New York.

Yoshida S. and Bourre J. M. (1992) Condensation activity for polyunsaturated fatty acids with malonyl-CoA in rat brain microsomes. Characteristics and developmental changes. *Biochim Biophys Acta* 1123, 316-325.

Yu L., Deems R. A., Hajdu J. and Dennis E. A. (1990) The interaction of phospholipase A2 with phospholipid analogues and inhibitors. *J Biol Chem* 265, 2657-2664.

Zupan L. A., Steffens D. L., Berry C. A., Landt M. and Gross R. W. (1992) Cloning and expression of a human 14-3-3 protein mediating phospholipolysis. *J Biol Chem* 267, 8707-8710.

Vesicular and Carrier-Mediated Depolarization-Induced Release of [³H]GABA: Inhibition by Amiloride and Verapamil

María Sitges,¹⁻³ Luz María Chiu,¹ and Luxiola González¹

(Accepted July 20, 1992)

The Ca²⁺-dependent, presumably exocytotic fraction of the [³H]GABA released by depolarization is dissected from the depolarization-induced Na⁺-dependent, carrier-mediated fraction of [³H]GABA release in mouse brain synaptosomes. GABA homoechange is prevented by the [³H]GABA carrier blocker, DABA. The absence of external Na⁺ completely abolishes the release of the carrier-mediated, presumably cytoplasmic release of [³H]GABA induced by homoechange and heteroexchange with GABA and DABA, respectively. The carrier-mediated, Na⁺-dependent fraction of the depolarization-induced release of [³H]GABA is resistant to tetrodotoxin (TTX) but is sensitive to amiloride and verapamil. The Ca²⁺-dependent fraction of the [³H]GABA released by high K⁺ depolarization is also completely abolished by amiloride (from 300 μM) and sensitive to verapamil (30 μM), but in contrast is insensitive to the absence of external Na⁺ and to DABA. On the basis of these results we conclude that amiloride and verapamil inhibit high K⁺-induced release of [³H]GABA by antagonizing the entrance of Ca²⁺ (and possibly Na⁺ when external Ca²⁺ is absent) through a population of voltage sensitive presynaptic Ca²⁺ channels activated by depolarization.

KEY WORDS: Amiloride; verapamil; Ca²⁺ channels; Na⁺/Ca²⁺ exchanger; homoechange; heteroexchange; synaptosomes; GABA; TTX; neurotransmitter release.

INTRODUCTION

It is generally accepted that Ca²⁺ influx plays a crucial role in stimulus-secretion coupling. The nature of the presynaptic Ca²⁺ channels responsible for the stimulated release of the amino acid neurotransmitters from mammalian isolated nerve terminals (synaptosomes) remains however elusive. In neuronal cells, four types of Ca²⁺ currents (N, L, T and P) have been char-

acterized on the basis of electrophysiological and pharmacological criteria (1,2). The size of synaptosomes (average 1 μM) precludes the study of the synaptosomal Ca²⁺ currents with standard electrophysiological techniques. Pharmacological studies on the other hand, have not been conclusive.

Several studies have shown that neurotransmitter release induced by high K⁺ in synaptosomes is insensitive to dihydropyridines, the organic L-type Ca²⁺ channel blockers (3,4). The dihydropyridine resistant, Cd²⁺ and w-Conotoxin-sensitive N-type Ca²⁺ channel has been proposed to be the predominant form involved in the stimulated release of monoaminergic neurotransmitters, such as 5-HT and norepinephrine (5,6). However, the type of Ca²⁺ channel mainly involved in the depolari-

¹ División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría, SSA.

² Depto. de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

³ Address reprint requests to: Dr. María Sitges, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Antiguo Camino a Xochimilco 101, México 14370, D.F., México. Phone 655-28-11 ext. 112 and ext 140 FAX 6559980

zation-induced release of amino acid neurotransmitters has not been defined (7).

The diuretic amiloride, currently used as a blocker of the Na^+/H^+ antiporter (8), is also a weak inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (9) and has recently shown to be an effective inhibitor of Ca^{2+} currents in neuroblastoma cells (10). The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger extrudes Ca^{2+} from the intraterminal milieu in exchange for external Na^+ and, along with the Ca^{2+} -ATPase, it contributes for the maintenance of the resting Ca^{2+} levels (11). When synaptosomes are depolarized, in addition to the influx of Ca^{2+} through voltage sensitive Ca^{2+} channels, the only other pathway that has been suggested to promote an entrance of Ca^{2+} is the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in its reversed form (12). High K^+ depolarization induces the release of two fractions of the amino acid neurotransmitter GABA. One which depends on the presence of external Na^+ and the other on external Ca^{2+} (12,13,14). The Ca^{2+} -dependent fraction of the stimulated release of GABA is increased when synaptosomes are loaded with the labelled transmitter during longer incubation periods and this fraction is believed to be exocytotically released (15).

In this study we have characterized the effect of amiloride on the Na^+ and on the Ca^{2+} -dependent fractions of the GABA released by high K^+ depolarization in a purified mouse brain synaptosomal preparation preloaded with the radiolabeled transmitter.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Obtention of the Purified Synaptosomes Loaded with [^3H]GABA. Synaptosomes were obtained from the brains (without cerebellum) of 4 albino CD1 mice (11 weeks old), following the methods of Hajós (16). For loading with [^3H]GABA, synaptosomes suspended in the following medium (in mM): 127 NaCl, 1.18 KH_2PO_4 , 3.73 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1.18 MgSO_4 , 20 NaHCO_3 , 11 glucose and 0.1 mM of the GABA transaminase inhibitors amino-oxyacetic acid (Figure 1) or gamma vinyl-GABA (figs. 2 and fig.3C and D), were incubated in the presence of [^3H]GABA (0.83 μCi , 0.5 μM final concentration) at 37°C during 10 min or 25 min, as indicated in the figure legends.

[^3H]GABA Release Experiments. The release of [^3H]GABA was assayed following the continuous perfusion procedure described previously (17). Briefly, synaptosomes (0.2-0.3 mg protein) loaded with the labeled transmitter were transferred to Millipore filters (0.65 μM) lying on multiperforated chambers aligned in parallel. The radioactivity not incorporated into the preparation, was eliminated by rapidly passing (1.3 ml/min) a standard Ringer's medium with a peristaltic pump. When

the washout period was concluded, the flow rate was adjusted to 0.5 ml/min, and fractions were collected at 1 min intervals. After 7 minutes of perfusion, the standard buffer was rapidly replaced by the depolarizing high K^+ medium under the experimental condition to be tested. In some experiments a second replacement at min 13 was performed. The release of [^3H]GABA per minute is expressed as the percentage of the total radioactivity present in the synaptosomes at the beginning of the experiment (i.e. the radioactivity released during 14 or 19 minutes of perfusion plus that remaining in the filter at the end of the experiment).

Perfusion Media. The composition of the standard low K^+ buffer was (mM): 127 NaCl, 1.18 KH_2PO_4 , 3.73 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1.18 MgSO_4 , 20 NaHCO_3 , 11.2 dextrose and 0.1 mM amino-oxyacetic acid (Figure 1) or gamma vinyl-GABA (Figure 2 and Figure 3C and D). The pH was adjusted to 7.4 by gassing the solution with O_2/CO_2 (95%/5% vol/vol). In the Ca^{2+} -free buffer, CaCl_2 was omitted and 0.1 mM EGTA was added. In the Na^+ -free buffer, NaCl was replaced by *n*-methyl-glucamine, and NaHCO_3 was replaced by HEPES buffer (in Figure 1) or by TRIS (in figures 2 and 3) keeping the pH at 7.4. Where indicated, the standard buffer, the Na^+ -free or the Ca^{2+} -free buffers also contained amiloride, TTX, verapamil, GABA or DABA. In high K^+ depolarizing media 50 mM KCl replaced an equimolar concentration of NaCl.

Determination of the Internal Ca^{2+} Level. Purified synaptosomes were resuspended in oxygenated HEPES standard buffer (in mM: 127 NaCl, 1.18 KH_2PO_4 , 3.73 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1.18 MgSO_4 , 20 HEPES, 11.2 dextrose, pH 7.4 with 2 μM probenecid to reduce fura-2 efflux) and incubated with Fura-2AM (5 μM) during 45 min at 37°C . The incubation was stopped by 5-fold dilution with the same buffer followed by centrifugation (8 min at 6,000 g at 4°C). The resulting pellet was resuspended and centrifuged to finish the removal of the unincorporated dye. Fura 2 loaded synaptosomes were resuspended in HEPES buffer and kept at 4°C in the dark. Aliquots of the synaptosomal suspension were transferred to acryl cuvettes, dilute 10 fold to a final volume of 2 ml and stirred continuously. The internal Ca^{2+} level was estimated from fluorescence detected on line in a Perkins Elmer LS-50 spectrofluorometer interfaced with an IBM compatible computer. Data points were collected at 1.89 sec intervals. Calcium was determined by the ratio method of Grynkiewicz et al. (18). Maximum and minimum fluorescence values were determined with 0.6 mM digitonin and 60 mM EGTA, respectively.

Sources of materials. [^3H]GABA (spec. act.

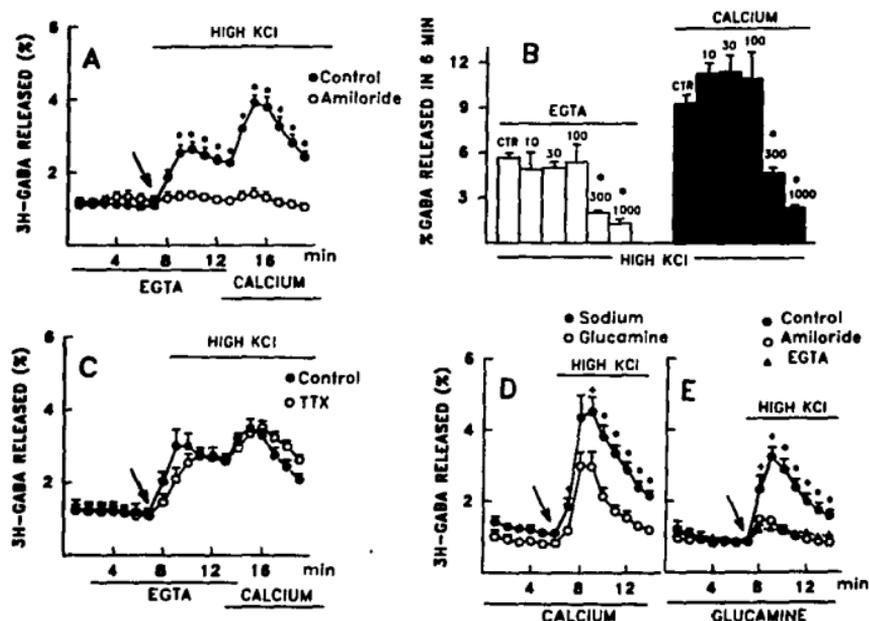


Fig. 1. Aliquots (0.25 mg protein) of synaptosomes loaded with [3 H]GABA (300 nCi/mg protein) during 10 min (A, B, C, and D) or during 25 min (E) were transferred to Millipore filters lying on multiperforated perfusion chambers. After removing (by passing the standard buffer with a peristaltic pump) the radioactivity not incorporated into the preparation, perfusate fractions were collected at 1 min intervals. (A) Control (\bullet) or 1 mM amiloride treated (\circ) synaptosomes were perfused with: Ca^{2+} -free, EGTA buffer (min 1-7), Ca^{2+} -free, EGTA, high K^+ (50 mM) buffer (min 8-13), and 50 mM high K^+ buffer with 1.8 mM CaCl_2 (min 14-19). The percentage of ^3H -GABA released (for this and the following figures) is calculated as the percentage released/min of the total radioactivity contained in synaptosomes at the beginning of the experiment (after removal by washing of the radioactivity not incorporated into the preparation). (B) Synaptosomes were perfused without (CTR = control) or with increasing concentrations (in μM : 10, 30, 100, 300, and 1000) of amiloride as in graph A. The bars represent the sum of the [^3H]GABA released by high K^+ in the absence (empty bars) and in the presence (hatched bars) of 1.8 mM CaCl_2 during 7 min of perfusion over basal values (control without depolarization). (C) Control (\bullet) or 1 μM TTX-treated synaptosomes were perfused as in A. (D) From min 1 to 7, synaptosomes were perfused with Tris buffer containing 147 mM NaCl (\bullet) or 147 mM n-methylglucamine (\circ). From min 8 to 14, 50 mM KCl substituted an equimolar concentration of NaCl (\bullet) or n-methylglucamine (\circ) in the Tris buffer. (E) Synaptosomes were perfused with a Na^+ -free HEPES buffer (n-methylglucamine replacing NaCl) in the absence (\blacktriangle) and in the presence (\bullet) of CaCl_2 , 1.8 mM, or in the absence (\circ , \blacktriangle) and in the presence of 1 mM amiloride (\circ). Data are mean \pm SEM (bars) values from four (A), three (B), four (C), five (D) and four (E) independent experiments. The differences between the releasing responses to high K^+ in the absence and in the presence of amiloride were significant as indicated *, $p < 0.005$, +, $p < 0.05$.

34.7 Ci/mmol), was obtained from New England Nuclear (Boston, M.A.). Tetrodotoxin, amiloride, verapamil hydrochloride, amino-oxyacetic acid, gamma-aminobutyric acid (GABA), L-2,4-diamino-n-butyric acid dihydrochloride (DABA) and procabid were from Sigma Chemical Co. (St. Louis M.O.). Fura-2AM and Fura acid were obtained from Molecular Probes. Gamma-vinyl-GABA was a gift from Dr. S. Brailowsky.

RESULTS

Figure 1A shows that in synaptosomes preloaded with [^3H]GABA during 10 min, high K^+ depolarization induces the release of a fraction of ^3H -GABA in the absence of external Ca^{2+} (●, min 8-13). An additional fraction of ^3H -GABA is released by high K^+ when Ca^{2+} is present in the perfusion medium (●, min 14-19).

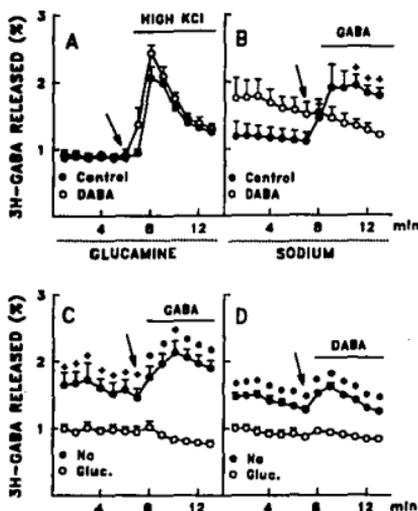


Fig. 2. Synaptosomes were preloaded with [³H]GABA during 25 min and (A) perfused with Na⁺-free TRIS buffer without (●) or with 20 μM DABA (○) and depolarized (arrow) with 50 mM KCl. (B) Synaptosomes perfused with standard buffer without (●) or with 20 μM DABA (○) were exposed to 5 μM GABA (arrow). (C) Synaptosomes perfused with Na⁺-free (○) or Na⁺-containing (●) TRIS buffer were exposed to 5 μM GABA (arrow). (D) Synaptosomes perfused with Na⁺-free (○) or Na⁺-containing (●) TRIS buffer were exposed to 20 μM DABA (arrow). Data are mean ± SEM (bars) values from five (A) or four (B, C and D) independent experiments (*, *p* < 0.005; +, *p* < 0.05).

Amiloride (1mM) completely abolishes these responses to high K⁺ (Figure 1A, ○). A similar inhibition of the two components of the evoked release of [³H]GABA by amiloride is obtained when gamma-vinyl-GABA is used instead of aminooxyacetic acid (data not shown).

The effect of amiloride at lower concentrations than 1 mM was also tested on the two fractions of the [³H]GABA released by high K⁺. These results are shown in Figure 1B, where the bars represent the sum of the [³H]GABA released in response to high K⁺ during 6 min of perfusion in the absence and in the presence of the indicated μM concentrations of amiloride. As shown in the figure, high K⁺ induced responses are markedly diminished by 300 μM amiloride. Lower concentrations (10 - 100 μM) of this compound do not prevent the stimulated release of [³H]GABA either in the absence or in the presence of external Ca²⁺.

In synaptosomes treated with the voltage-sensitive Na⁺ channel blocker TTX, the pattern of the [³H]GABA released by high K⁺ in the absence and in the presence of external Ca²⁺ is similar to control synaptosomes (Figure 1C). At the same concentration (1 μM) of TTX used in Figure 1C, this Na⁺ channel blocker practically abolishes the release of [³H]GABA induced by 20 μM veratridine, a voltage sensitive Na⁺ channel activator (data not shown).

Figure 1D shows that a considerable amount of the [³H]GABA released by high K⁺ is lost in synaptosomes perfused with the Na⁺-free Hepes medium.

For eliminating the Na⁺-dependent component of the [³H]GABA released by high K⁺ depolarization, all the experiments in fig. E were done in synaptosomes incubated with [³H]GABA during 25 min and perfused with a Na⁺-free buffer. Under these conditions, high K⁺ depolarization only elicits [³H]GABA release when Ca²⁺ is present in the perfusion buffer. In the absence of external Ca²⁺ (omission of Ca²⁺ in the buffer plus EGTA) high K⁺ cannot induce any response (Figure 1E, ▲). In the presence of external Ca²⁺, a similar prevention of the stimulated release of [³H]GABA to that obtained without Ca²⁺ is observed when depolarized synaptosomes are treated with 1 mM amiloride (Figure 1E, ○).

Figure 2A shows that when synaptosomes are perfused in the absence of external Na⁺, the Ca²⁺-dependent high K⁺-induced response is insensitive to the blocker of the GABA transporter DABA, which in the presence of external Na⁺, inhibits the transporter-mediated release of [³H]GABA induced by homoexchange with 5 μM of cold GABA (Figure 2B). The complete dependence on external Na⁺ of GABA-induced homoexchange and DABA-induced heteroexchange is shown in Figures 2C and 2D, respectively.

Figure 3A shows that 30 μM verapamil considerably reduces the raise in the internal Ca²⁺ concentration induced by 50 mM K⁺. The raise in the internal Ca²⁺ concentration promoted with 30 mM KCl is similar to that induced by 50 mM KCl and it is similarly diminished by 30 μM verapamil (data not shown). We did not measure the effect of amiloride on the elevation of Ca²⁺ induced by high K⁺, because amiloride completely quenches the fluorescence of the Ca²⁺-sensitive indicator dye fura 2 preloaded in synaptosomes (Figure 3B). Figure 3C shows that as for the case of amiloride, the organic Ca²⁺ channel antagonist verapamil also inhibits both, the Na⁺-dependent and the Ca²⁺ dependent components of [³H]GABA release induced by high K⁺. Furthermore, in the absence of external Na⁺, the Ca²⁺-dependent depolarization induced release of ³H-GABA is also sensitive to verapamil (Figure 3D).

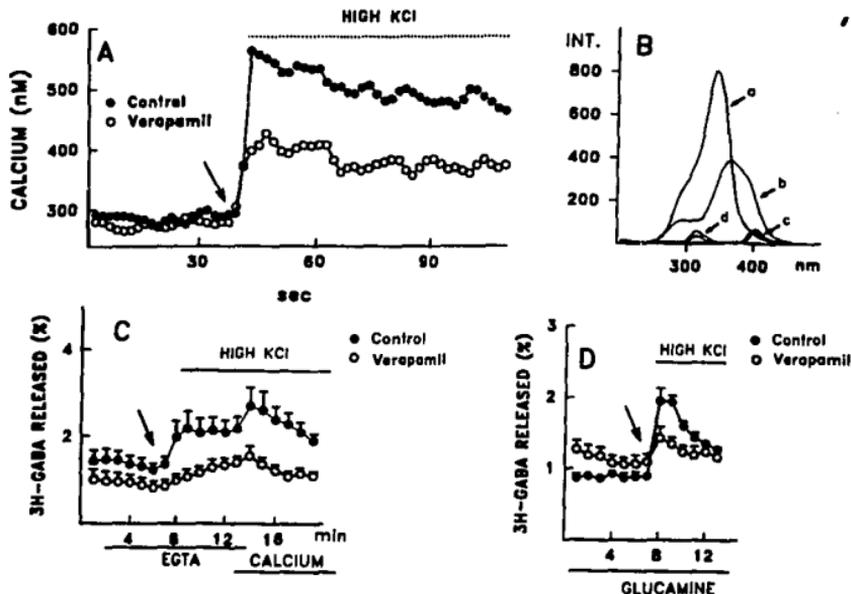


Fig. 3. (A) The internal Ca^{2+} level in Fura-2-loaded synaptosomes was determined as described in Experimental Procedure. After monitoring baseline values in control (●) and 30 μM verapamil treated synaptosomes (○), the preparation was depolarized by rapid addition to the cuvette of an aliquot of a concentrated KCl solution to give a final concentration of 50 mM (arrow). (B) Fura-2 spectrum in the presence (a and c) and in the absence (b and d) of Ca^{2+} without (a and b) or with (c and d) 1 mM amiloride. (C) Synaptosomes loaded with [^3H]GABA during 25 min were perfused with: Ca^{2+} -free (min 1-7), Ca^{2+} -free, high K^+ buffer (min 8-13), and high K^+ buffer with Ca^{2+} (min 14-19) in the absence (●) or in the presence (○) of 30 μM verapamil. (D) Synaptosomes were perfused with Na^+ -free TRIS buffer without (●) or with 30 μM verapamil (○). Fig. 3A is a representative experiment of three independent determinations. In C and D, data are mean \pm SEM (bars) values from four independent experiments (*, $p < 0.005$; +, $p < 0.05$).

DISCUSSION

In this study we have characterized the inhibitory effect of amiloride on the two components of the stimulated release of the amino acid neurotransmitter [^3H]GABA in mouse brain synaptosomes.

In synaptosomes loaded with the labeled transmitter during 10 min, about half of the [^3H]GABA released by high K^+ is Na^+ -dependent and Ca^{2+} -independent (Figure 1A, min 8-12 and Fig. 1B, left bars). This fraction of the evoked release of [^3H]GABA is lost when synaptosomes are perfused in the absence of external Na^+ (Figure 1D) or treated with amiloride (or verapamil) and is TTX insensitive (Figure 1C, min 8-12). Taken together, these results indicate that part of the [^3H]GABA

released by high K^+ is mediated by Na^+ movements through an amiloride (and verapamil) sensitive pathway different from TTX-sensitive Na^+ channels.

To obtain the complete releasing response to high K^+ an influx of both Na^+ and Ca^{2+} is required, because in the absence of external Ca^{2+} , high K^+ depolarization releases part of the releasable [^3H]GABA if Na^+ is present in the extracellular fluid and the other part is released in the absence of external Na^+ , only if Ca^{2+} is present in the external solution. When Na^+ and Ca^{2+} ions are absent from the external solution high K^+ depolarization is unable for stimulating [^3H]GABA release (Figure E, ▲). Thus, the Ca^{2+} -dependent release of [^3H]GABA evoked by depolarization can be dissected from the Na^+ -dependent (Ca^{2+} -independent) release of [^3H]GABA in

the absence of external Na^+ . The finding that the dissected Ca^{2+} -dependent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ evoked by high K^+ is insensitive to the GABA carrier blocker, DABA (Figure 2A), which completely abolishes the Na^+ -dependent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ induced by homoeoexchange (Figure 2B), confirms that in the absence of external Na^+ the carrier-mediated component of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ release is eliminated. The release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ induced by homoeoexchange or heteroexchange, which is mediated through the GABA uptake carrier (19) is in contrast completely dependent on the presence of external Na^+ (Figure 2C and D). A result, further supporting the conclusion that under our experimental conditions the absence of external Na^+ eliminates the carrier mediated release of the labeled transmitter.

The Na^+ -dependent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ triggered by an increase in the internal Na^+ concentration has been proposed to originate from the cytosol and has been ascribed to the reversal of the GABA uptake carrier (15,20). The Ca^{2+} -dependent release, on the other hand, is believed to have a vesicular origin (15). It is generally accepted that depolarization activates voltage sensitive Ca^{2+} channels (VSCC) and triggers neurotransmitter exocytosis in a Ca^{2+} dependent manner. Part of the Ca^{2+} -dependent stimulated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ in synaptosomes has been explained however, by the entrance of Ca^{2+} through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in its reversed form (12). If in synaptosomes perfused in the absence of external Ca^{2+} , high K^+ depolarization activates the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and Na^+ enters the terminal through this pathway, amiloride and verapamil could be inhibiting the Na^+ -dependent fraction of the stimulated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ by blocking this exchanger. However, when Ca^{2+} is added to the perfusion medium the subsequent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ induced by the presence of external Ca^{2+} is also completely prevented by amiloride (fig. 1A, min 13-21). Furthermore, when the Na^+ -dependent carrier-mediated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ is eliminated in synaptosomes perfused with the Na^+ -free medium, amiloride is still completely blocking the Ca^{2+} -dependent fraction of the stimulated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ (Figure 1E), and this dissected Ca^{2+} dependent component of the evoked release of GABA is also sensitive to verapamil (Figure 3D). Thus, it is difficult to propose that the inhibitory effect of amiloride found here is only due to an inhibition of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, because if this is the case it has to be assumed that all the Ca^{2+} that triggers the Ca^{2+} -dependent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ following high K^+ depolarization enters the terminal through this exchanger in its reversed form.

The depolarization-induced increase in the internal Ca^{2+} level may activate the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, which

proposed role is to extrude the Ca^{2+} load. When Na^+ ions are present in the external medium, Ca^{2+} ions cannot enter via the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger for contributing to the Ca^{2+} -dependent evoked response, because under these conditions (see ●, min 8-14 in Figures 1A, or 3C) Ca^{2+} is expected to be extruded by the exchanger. In the absence of external Na^+ in contrast, the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is expected to work in its reversed form. Thus, under these conditions the possibility that part of the Ca^{2+} -dependent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ induced by high K^+ is also due to the entrance of Ca^{2+} via this exchanger cannot be discarded.

Amiloride and verapamil inhibition of the Ca^{2+} -dependent release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ induced by high K^+ can be explained by an antagonistic action of these drugs on VSCC. Also, the inhibitory effect of amiloride and verapamil on the Na^+ dependent-component of the stimulated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ could be explained by an antagonistic effect on VSCC, if we assume that in the absence of external Ca^{2+} , Na^+ enters into the terminal through VSCC and induces $[^3\text{H}]\text{GABA}$ release via reversal of the GABA uptake carrier. Examples of Ca^{2+} channels carrying Na^+ currents in the absence of extracellular Ca^{2+} have been presented in muscle fibers (21), ventricular (22) and neuroblastoma (10) cell preparations. In neuroblastoma cells Tang et al. (10) clearly demonstrated that a TTX-insensitive, amiloride-sensitive Na^+ current passing through Ca^{2+} channels of the T-type is activated when Ca^{2+} is absent from the external medium, and that this Na^+ current carried by Ca^{2+} channels is considerably much larger than that carried by Ca^{2+} ions (10). The kinetics of T channels makes improbable that an amiloride blockade of these specific type of channels could underlie its effect on $^3\text{H}\text{-GABA}$ release. We do not know however, whether amiloride at concentrations above 300 μM , which effectively block Ca^{2+} currents of the T-type without affecting those of the L-type in neuroblastoma cells, is also able to inhibit other Ca^{2+} currents (i.e. N or P-type Ca^{2+} currents) that could be involved in the releasing response.

The increase in fura-2 fluorescence induced by 50 mM K^+ in mouse brain synaptosomes is sensitive to verapamil. This indicates that verapamil antagonizes the entrance of Ca^{2+} induced by high K^+ . Unfortunately, amiloride completely quenches the fluorescence of fura-2, hence we could not measure its effect on the raise in the internal Ca^{2+} concentration promoted by high K^+ using this technique as was done for verapamil. Nevertheless, amiloride and verapamil clearly block the dissected Ca^{2+} -dependent depolarization-induced release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$, and a result showing that amiloride prevents high K^+ -induced elevation in the internal Ca^{2+} concen-

tration will not solve the question of whether only Ca^{2+} channels or both Ca^{2+} channels and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger are responsible of high K^+ -induced Ca^{2+} influx.

In conclusion, we proposed that amiloride and verapamil inhibit the Ca^{2+} -dependent component of the stimulated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ acting as antagonists of a population of Ca^{2+} channels in the mammalian presynaptic membrane activated by high K^+ depolarization. When Ca^{2+} is absent from the external fluid also the blockade of Na^+ influx through these population of Ca^{2+} channels could explain the inhibitory action of these drugs on the Na^+ -dependent, carrier mediated fraction of the stimulated release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$. If however the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger working in its reversed form contributes to the Ca^{2+} -dependent evoked release of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ when Na^+ is absent from the external solution these drugs may also indirectly block this exchanger.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, by project 2150 from Instituto Mexicano de Psiquiatría, S.S.A., by Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM and, by Fundación Miguel Alemán (A.C.).

REFERENCES

1. Fox, A. P., Nowicky, M. C., and Tsien, R. W. 1987. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394:149-172.
2. Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J. W., and Cheskey, B. 1989. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1689-1693.
3. Woodward, J. J., and Leslie, S. W. 1986. Bay K 8644 stimulation of calcium entry and endogenous dopamine release in rat striatal synaptosomes antagonized by nimodipine. *Brain Res.* 370:397-400.
4. Carvalho, C. A. M., Coutinho, O. P., and Carvalho, A. P. 1986. Effects of Ca^{2+} channel blockers on Ca^{2+} translocation across synaptosomal membranes. *J. Neurochem.* 47:1744-1784.
5. Reynolds, I. J., Wagner, J. A., Snyder, S. H., Thayer S. A., Olvera, B. M., and Miller, R. J. 1986. Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by ω -conotoxin fraction GVIA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:8804-8807.
6. Hiring, L. D., Fox, A. P., McCleskey, E. W., Olvera, B. M., Thayer S. A., Miller, R. J., and Tsien, R. W. 1988. Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239:57-61.
7. Terrian, D. M., Dormann, R. V., and Gausson, R. L. 1990. Characterization of the presynaptic calcium channels involved in glutamate exocytosis from rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 119:211-214.
8. Moolenaar, W. H., Boomstra, J., and van der Saag, P. T. 1981. Sodium/proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 256:12883-12887.
9. Kaczorowski, G. J., Barros, F., Dethmers, J. K., and Trumble, M. J. 1985. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of amiloride. *Biochemistry* 24:1394-1403.
10. Tang, C., Presser, F., and Morad, M. 1988. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science.* 240:213-215.17.
11. Rahaminoff, R., Lev-Tov, A., and Meiri, H. 1980. Primary and secondary regulation of quantum transmitter release: calcium and sodium. *J. Exp. Biol.* 89:5-18.
12. Carvalho, A. P., Santos, M. S., Henriques, A. O., Tavares, P., and Carvalho, C. M. 1988. Calcium channels and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in synaptosomes Pages 263-284, in Zimmermann, H. (ed.) Cellular and Molecular Basis of Synaptic Transmission. Berlin: Springer-Verlag.
13. Verhage, M., Benesien, E., Lopes da Silva, F. H., and Ghislen, W. E. J. M. 1989. Ca^{2+} -dependent regulation of presynaptic stimulus secretion coupling. *J. Neurochem.* 53:1189-1194.
14. Silges, M. 1989. Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on γ -amino-n-butyric acid release induced by miosis and veratrine in the absence of external calcium. *J. Neurochem* 53:436-441.
15. Silva, T. S., and Nicholls, D. G. 1987. 4-Aminobutyrate can be released exocytotically from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49:261-267.
16. Hajós, F. 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93:485-489.
17. Silges M. 1989. Characterization of the effect of miosis on amino-n-butyric acid release from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 53:442-447.
18. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
19. Bernath, S. 1992. Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Progress in Neurobiology* 38:57-91.
20. Nicholls, D. 1989. Release of glutamate, aspartate, and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52:331-341.
21. Almers, W., and McCleskey, E. W. 1984. Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J. Physiol. (London)* 353:585-608.
22. Lansman, J. B., Hess, P., and Tsien, R. W. 1986. Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 88:321-347.