

201.67



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

**"Eficiencia de las neurotoxinas de Centruroides limpidus limpidus, para inducir la liberación de norepinefrina de sinaptosomas de cerebro de rata"**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G A

P r e s e n t a :

Patricia Gómez de León Cruces

México, D. F.

1983



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 esta 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.

## INTRODUCCION.

En México se encuentran ampliamente distribuidas varias especies de alacranes muy venenosos, tales como: Centruroides noxius, C. suffusus suffusus, C. limpidus limpidus, C. elegans y C. limpidus tecomanus (Hoffman, 1932). Mazzotti y Bravo-Becherelle (1961), describen las tasas de mortalidad por escorpionismo en las entidades de la República, observando una elevada incidencia sobre todo en los estados de la vertiente del Pacífico comprendidos desde Sinaloa hasta Oaxaca, con dos prolongaciones interiores, una hacia los estados de Durango y Zacatecas y la otra en la cuenca del Río Balsas, en los estados de Morelos, Puebla y México. Las tasas de mortalidad mas altas se registraron en el centro-oeste del país en los estados de Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos, siendo éstas 83.7, 41.6, 41.5 y 37.3 muertes por cada 100,000 habitantes, respectivamente.

Se considera que la picadura de alacrán es la tercera causa de muerte entre los niños menores de cinco años en Huitzucó, Gro. México (Tato y cols., 1978).

El veneno de los alacranes conocidos como peligrosos está constituido por algunas proteínas que han sido conceptuadas por su acción sobre el sistema nervioso, como neurotoxinas.

Miranda y cols. (1970), analizando las neurotoxinas purificadas de Androctonus australis Hector, Buthus oxitanus tunetanus y de Leiurus quinquestriatus establecieron diferencias entre las once neurotoxinas de estos tres alacranes. Estas diferencias están dadas por el número de aminoácidos de cada neurotoxina y las diferencias en el ordenamiento de los mismos.

Los estudios sobre tres neurotoxinas obtenidas del veneno del alacrán americano Centruroides sculpturatus Ewing, realizados por Babin y colaboradores en 1974, demostraron también que estas neurotoxinas difieren en su composición de aminoácidos y en la secuencia y número de los mismos.

Tato y cols. (1978), purificaron tres neurotoxinas del veneno de Centruroides limpidus limpidus. El análisis de aminoácidos de estas neurotoxinas mostró diferencias entre ellas, en relación con la composición y el número de ellos (datos no reportados).

Los venenos de origen animal, tales como el veneno de serpiente, incrementan la liberación y la síntesis de acetilcolina de homogenados de cerebro, este efecto es atribuible a una actividad de fosfolipasa (Bragança y Gonçalves, 1955). Mientras que el veneno de escorpión no presenta actividad fosfolipasa (Diniz y Gonçalves, 1960), sin embargo la incubación de segmentos

de fleo de cobayo con veneno, causa liberación de acetilcolina (Diniz y Torres, 1968).

Moss y cols. (1973), estudiando el veneno crudo del escorpión africano Leiurus quinquestriatus y una neurotoxina purificada de este veneno, observaron liberación de norepinefrina tritiada, de rebanadas atriales de rata y de sinaptosomas, que mimetiza los efectos hipertensivos del veneno in vivo. El mismo autor (1974), estudió el mecanismo de la liberación de norepinefrina por la neurotoxina, en vasos deferentes, reportó que esta liberación parece ser debida a un mecanismo exocitósico, ya que la enzima dopamina B-hidroxilasa fué liberada junto con la norepinefrina, en proporción semejante a la inducida por estimulación nerviosa.

Blaunstein (1975), encontró evidencias de que algunos agentes depolarizantes como el potasio, la veratridina y el veneno de escorpión, estimulan la captación de calcio, en sinaptosomas de cerebro de rata. Los resultados de estos estudios, indican que el mecanismo de liberación del transmisor en sinapsis centrales, es semejante al de las sinapsis periféricas y enfatiza el hecho de que los sinaptosomas se comportan en muchos aspectos como terminales nerviosas intactas.

Romey y cols. (1976), estudiaron bioquímicamente la toxina I

del veneno de escorpión Androctonus australis Hector, con sinaptosomas de cerebro de rata y observaron que esta unión es acompañada por un decremento en su capacidad para acumular GABA, el principal efecto de la toxina fué estimular la liberación del neurotransmisor. Más aún una curva de dosis respuesta indicó una alta afinidad de la toxina por su receptor con una constante de disociación del complejo de  $0.12 \mu\text{M}$ .

La acción farmacológica de las toxinas provenientes de venenos de alacrán, ha sido estudiada en función de que una neurotoxina induce la liberación de un neurotransmisor. Por lo que las preguntas que hemos planteado con base en las teorías extraídas de la información mencionada y la diversidad de neurotoxinas contenidas en el veneno de escorpión son:

¿ Todas y cada una de las neurotoxinas contenidas en un solo veneno, son capaces de inducir la liberación de todos los neurotransmisores involucrados en estos procesos?

¿ Existen neurotoxinas que induzcan la liberación de un solo neurotransmisor?

Si existe más de una neurotoxina que induzca la salida de un neurotransmisor, ¿habrá diferencias en su capacidad para inducir este efecto?

Todas estas interrogantes plantean un proyecto de investi-

gación muy amplio y ambicioso.

Los resultados que se presentan en el siguiente estudio se refieren a la investigación sobre la tercera pregunta; que se refiere a la diferencia en la eficiencia para inducir la liberación de un solo neurotransmisor, la norepinefrina.

## MATERIALES Y METODOS

### COLECTA DE ALACRANES.-

Los alacranes se colectaron en zonas aledañas a Huitzucó, Gro., municipio en el que Centruroides limpidus limpidus, se encuentra en abundancia.

Se realizaron colectas durante el mes de junio de 1981, se trajeron aproximadamente 5,000 especímenes al laboratorio, en donde se identificaron siguiendo las claves de Hoffman (1932). Se mantuvieron a temperatura ambiente, y se les administraron larvas de Tenebrium molitor y agua, ad-libitum.

### OBTENCION DEL VENENO.-

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica, de acuerdo con el siguiente método: cada alacrán se coloca sobre una placa de cobre cubierta con un algodón humedecido con solución salina 0.15 M y conectada al polo negativo de una pila de seis voltios; el manejo de cada espécimen se realiza con dos pinzas entomológicas, con una de ellas se mantiene fijo al alacrán sobre la placa de cobre y con la otra se sujeta el antepenúltimo segmento.



del metasoma. Así, con el electrodo positivo de la pila se friccionan los dos últimos segmentos del post-abdomen del alacrán. El estímulo eléctrico induce la contracción de las glándulas, provocándose así la salida de pequeñas gotas de veneno a través del aguijón, las cuales se reciben en cajas petri estériles que contienen solución salina 0.15 M congelada sobre hielo seco. El veneno así obtenido se liofilizó y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### FRACCIONAMIENTO DEL VENENO. -

Todos los pasos del fraccionamiento, se efectuaron a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , en el primer paso lotes de 100 mg de peso seco de veneno crudo liofilizado, se resuspendieron en 8 ml de amortiguador de acetato de amonio 0.05 M, pH 7.0. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 43,000 g durante veinte minutos en una centrífuga Sorvall modelo RC-5B refrigerada, el sobrenadante se aplicó a una columna de 1.6 x 100 cm de Sephadex G-50 M. (Pharmacia, Suecia), previamente equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 0.05 M, pH 7.0; la muestra se eluyó con el mismo amortiguador de acetato de amonio a un flujo de 70 ml/hr. El material se colectó en alícuotas de 3.2 ml, el material de cada pico se mezcló y liofilizó.

En un segundo paso, el material de la fracción más tóxica

denominada pico II, se procesó de la siguiente forma: se aplicaron 90 mg de peso seco resuspendidos en treinta mililitros de amortiguador de acetato de amonio 0.01 M, pH 7, a una columna de 1.6 x 22 cm de Carboximetil celulosa (Whatman), previamente equilibrada con el mismo amortiguador. La muestra se eluyó por pasos, incrementando la concentración de cloruro de potasio, desde 0.03 M hasta 0.4 M, a un flujo de 62 ml/hr, colectándose en alícuotas de 4.1 ml. El material de cada pico se mezcló y liofilizó.

En los procedimientos cromatográficos, la salida de proteínas se verificó por absorbancia a 280 nm, en un monitor ISCO modelo UA-5, conectado a un graficador automático.

#### TOXICIDAD.-

La estimación de la toxicidad para conocer la dosis letal que mata al 50% de los animales, con las subfracciones obtenidas en Carboximetil celulosa denominadas subfracciones 7,8 y 9, no se investigó. Se prefirió utilizar el material cromatográfico para los estudios de liberación de norepinefrina. Sin embargo, se probaron estas fracciones en ratones de la cepa CD-1 con peso aproximado de 20 gramos, aplicándoles una sola dosis de 20 µg por cada fracción con el objeto de comparar sus efectos tóxicos en grupos de cuatro

animales por dosis por fracción. Los parámetros observados fueron:

- Tiempo de aparición de los síntomas.
- Gravedad del cuadro clínico.
- Muerte de los animales.

#### CORTE ANATOMICO.-

En todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar, con un peso promedio de 220 gramos. Los animales se decapitaron con guillotina e inmediatamente se les extrajo el cerebro para someterse en seguida a la disección anatómica, haciéndose dos cortes: uno, en plano frontal a nivel del pedúnculo olfatorio para separar el pedúnculo olfatorio, otro en el mismo plano a nivel de la protuberancia, para eliminar el rombencéfalo. (Fig 1)

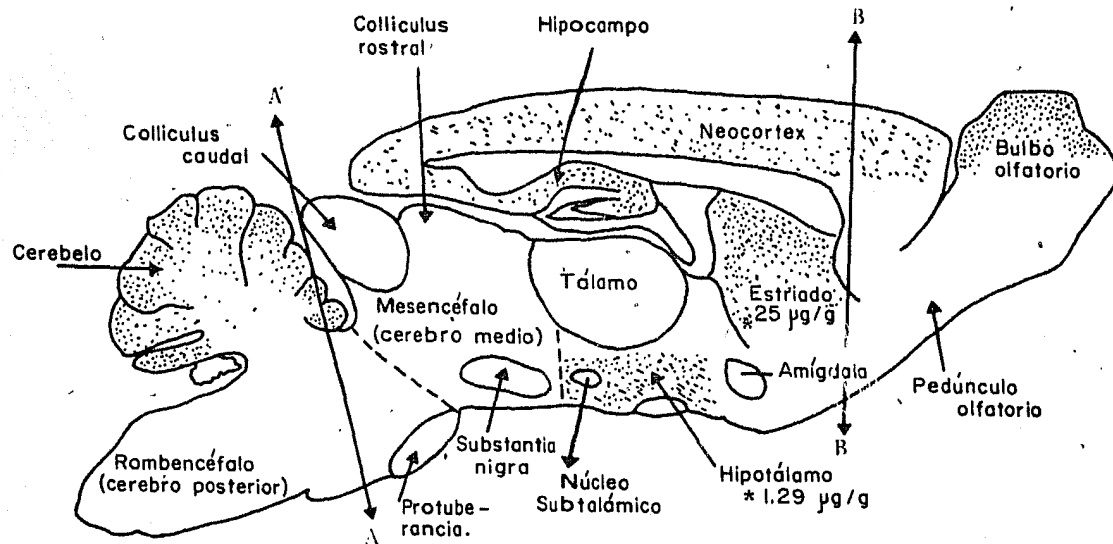


Figura 1. Sección anteroposterior de cerebro de ratona, que indica las distintas estructuras anatómicas del plano medio. Las flechas de A↔A y de B↔B, indican el sitio aproximado de disección. \* µg de norepinefrina por gramo de tejido.

OBTENCION DE LA FRACCION SINAPTOSOMAL. -

Para obtener las fracciones sinaptosomales se probaron tres métodos; el de Tamir y cols. (1974), el de Hajós (1975), y el de Romey y cols. (1976); con la finalidad de elegir cual de ellos podría ser el óptimo en cuanto a proporcionar mayor densidad de sinaptosomas.

Para efectuar las centrifugaciones se usaron rotores Sorvall tipo SS-34, y Beckman 30 de Titanio, éste último para efectuar las centrifugaciones de más de 70,000 g, en centrífuga Sorvall modelo RC-5B refrigerada y ultracentrífuga Beckman modelo L5-65 respectivamente, la relación entre las revoluciones por minuto y gravedades se estableció según la tabla de Garvey y cols. (1977).

Método de Tamir y cols. (1974). (Esquema 1)

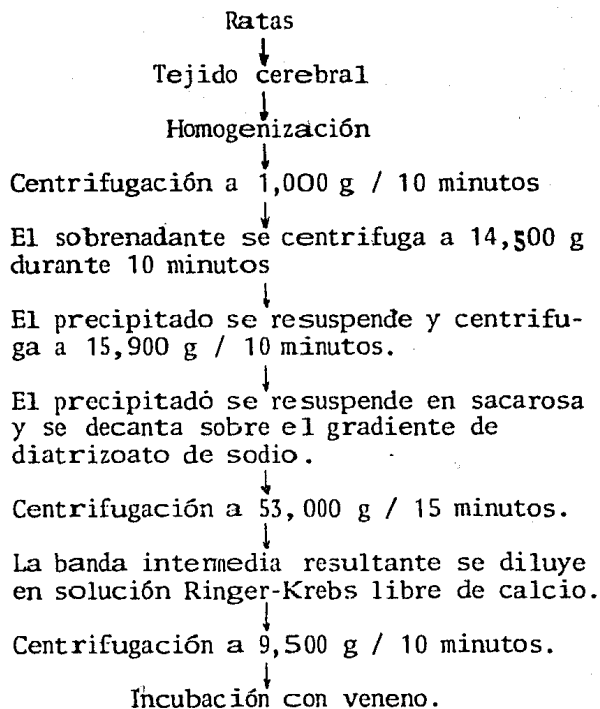
El tejido cerebral de cuatro ratas cuya disección se mencionó antes, se homogenizó en 9 volúmenes de sacarosa 0.32 M, conteniendo  $10^{-4}$  M de EDTA, usando un homogenizador con mazo de Teflón "C" (AH Thomas Co.), dando siete ciclos a 650 rpm cada uno, el homogenado se centrifugó a 1,000 g, se excluyó cuidadosamente la capa blanquecina que queda sobre el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 14,500 g durante diez minutos, el precipitado resultante,

se resuspendió cuidadosamente en un volumen igual de sacarosa 0.32 M, conteniendo  $10^{-4}$  de EDTA y se centrifugó a 15,900 g durante diez minutos. El precipitado se resuspendió en un mililitro de la misma solución por gramo de tejido, después se fraccionó por centrifugación a 53,000 g durante quince minutos, decantándolo cuidadosamente sobre un gradiente lineal del 10 al 18% peso sobre volumen, de Diatrizoato de sodio (Sigma), preparado en una solución Ringer-Krebs libre de calcio, conteniendo:

Cloruro de sodio (NaCl).....	0.118 M
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )...	0.0012 M
Cloruro de potasio (KCl).....	0.0047 M
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ).....	0.0017 M
Bicarbonato de sodio ( $\text{Na HCO}_3$ ).....	0.025 M
Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ).....	0.0056 M

La solución se diluyó con agua destilada para obtener media fuerza iónica y se ajustó a pH 7.4 con 25 mM de Hepes, Sigma (N-2-Hidroxietil piperazina-N'-2 ácido etanosulfónico). Como resultado de la centrifugación se obtuvieron dos bandas y un precipitado, la banda superior y el precipitado se eliminaron por contener mielina y mitocondrias respectivamente, por lo que se colectó la banda intermedia siendo ésta la más rica en sinaptosomas, la cual se diluyó en dos volúmenes de solución Ringer-Krebs libre de calcio, para centrifugar a 9,500 g durante diez minutos. Posteriormente se

resuspendió este precipitado sinaptosomal en 4 ml de solución Ringer-Krebs libre de calcio, muy lentamente, para someterse después a la incubación con veneno.



Esquema 1. Obtención de la fracción sinaptosomal según Tamir y cols. (1974).

Método de Hajós (1975). (Esquema 2)

El tejido cerebral de cuatro ratas, previamente sometido a disección, se homogenizó en 18 ml de sacarosa 0.3 M, usando un homogenizador con mazo de Teflón "C" (AH Thomas Co.), dando siete ciclos a 700 rpm cada uno. Se centrifugó a 1,500 g durante diez minutos, se separó el sobrenadante (1) y el precipitado se resuspendió y centrifugó en las condiciones señaladas arriba. La capa blanquecina dispuesta sobre el precipitado fué descartada y el sobrenadante (2) se mezcló con el sobrenadante (1) y se centrifugaron a 9,000 g, durante veinte minutos. El precipitado se resuspendió en 5 ml de 0.3 M de sacarosa, se depositó suavemente sobre 20 ml de 0.8 M de sacarosa y se centrifugó a 9,000 g durante veinticinco minutos, más un período de aceleración de cinco minutos.

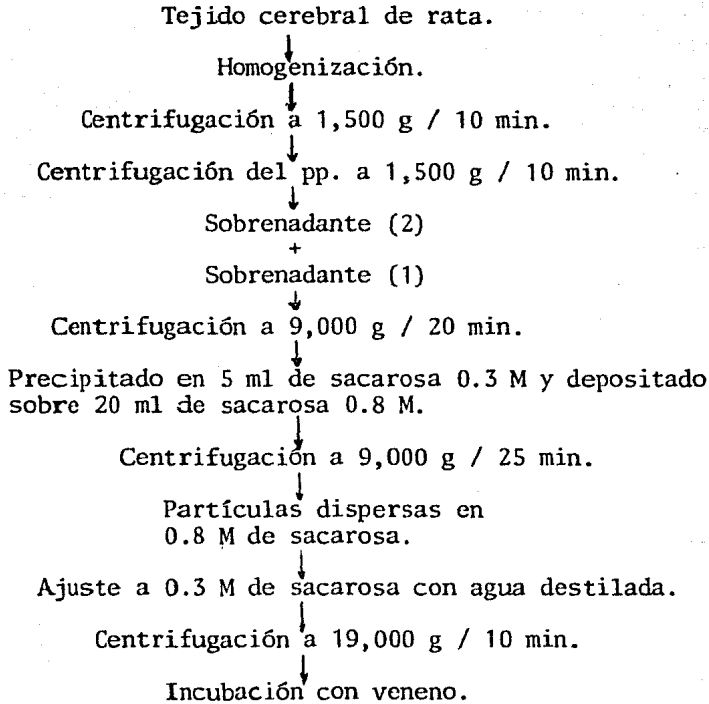
Las partículas quedaron distribuídas en las siguientes fracciones, linealmente de arriba hacia abajo:

- I) Una banda gruesa en la interfase entre 0.3 y 0.8 M de sacarosa compuesta por segmentos de axones mielinizados.
- II) Partículas dispersas en 0.8 M de sacarosa, formada por la fracción rica en sinaptosomas.
- III) El precipitado, que tiene predominantemente mitocondrias.

La fracción II se ajustó a 0.3 M con agua destilada y se centrifugó a 19,000 g durante diez minutos. La fracción sinaptosomal que quedó en el precipitado se resuspendió en 4 ml de solución Ringer-Krebs libre de calcio, para someterse después



a la incubación con veneno.



Esquema 2. Obtención de la fracción sinaptosomal según Hajós (1975).

Método de Romey y cols. (1976). (Esquema 3)

El tejido cerebral de cuatro ratas previamente sometido a disección, se homogenizó usando un homogenizador con mazo de Teflón "C" (AH Thomas Co.), en diez volúmenes de sacarosa 0.32 M, amortiguado con 5 mM de Tris-Cl a pH 7.4, dando diez ciclos a 700 rpm cada uno. El homogenado se centrifugó a 1,200 g durante cinco minutos, el sobrenadante se centrifugó a 23,000 g durante veinte minutos. El precipitado resultante se resuspendió en un mililitro de una solución de sacarosa 0.32 M a pH 7.4 y se depositó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa, consistiendo de tres capas de 10 ml cada una: 1.2, 1.0 y 0.8 M de sacarosa, respectivamente. Posteriormente se efectuó una centrifugación a 83,000 g durante sesenta minutos.

Después de esta centrifugación los sinaptosomas acumulados en la interfase entre 1 y 1.2 M de sacarosa, se colectaron y resuspendieron en 10 ml de solución Ringer-Krebs libre de calcio, para reestablecer las concentraciones iónicas intra y extracelulares, esta suspensión se centrifugó durante cinco minutos a 10,000 g.

Cuatro mililitros de la misma solución Ringer-Krebs, se añadieron al precipitado, para someterlo en seguida a la incubación con veneno.

## Tejido cerebral de rata.

Homogenización en diez volúmenes de sacarosa 0.32 M.

Centrifugación a 1,200 g / 5 min.

El sobrenadante se centrifuga a 23,000 g / 20 min.

El precipitado se resuspende en 0.32 M de sacarosa y se deposita sobre un gradiente de 1.2, 1.0 y 0.8 M de sacarosa.

Centrifugación a 83,000 g / 60 min.

La interfase entre 1.0 y 1.2 M de sacarosa se colecta y resuspende en solución Ringer-Krebs.

Centrifugación a 10,000 g / 5 min.

Incubación con veneno.

Esquema 3. Obtención de la fracción sinaptosomal según Romey y cols.(1976).

DETERMINACION DE PROTEINAS.-

La determinación de proteína sinaptosomal, se efectuó por el método de Lowry y cols. (1951).

## MATERIALES.-

## - Reactivo A-1:

Solución de tartrato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) al 2% en agua destilada.

## - Reactivo A-2:

Solución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) al 1% en agua destilada.

## - Reactivo A-3:

Solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2.0%, en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N.

## - Reactivo A:

Con los reactivos anteriores se prepara el reactivo A, añadiéndolos con la siguiente secuencia:

Reactivo A-1 ..... 0.5 ml

Reactivo A-2 ..... 0.5 ml

Reactivo A-3 ..... 50.0 ml

- Reactivo B:

Reactivo de Fenol (Folin-Ciocalteu) 1.0 N.

- Albúmina sérica de bovino.

#### TRATAMIENTO.-

1. Se ajustaron con  $H_2O$  a volúmenes de 0.4 ml: las muestras con concentración desconocida de proteína sinaptosomal (50 y 100  $\mu g$  de peso seco), los estándares de proteína que incluyeron concentraciones de 12.5 a 100  $\mu g$  de albúmina sérica de bovino, y el blanco, contenidos todos ellos en tubos por duplicado.
2. Una vez ajustado el volumen de cada muestra a 0.4 ml, se añadieron 2.0 ml del reactivo A. Se incubó a una temperatura ambiente durante diez minutos.
3. Después se añadieron 0.2 ml del reactivo B a todos los tubos. Se incubó a temperatura ambiente durante treinta minutos.
4. Se determinó la densidad óptica de las mezclas a 500 nm, en un espectrofotómetro Zeiss.
5. Usando el promedio de la densidad óptica (DO) obtenida para cada muestra de proteína no conocida, se determinó su concentración a partir de la curva de calibración que proporcionaron las lecturas de los estándares.

LIBERACION DE NOREPINEFRINA ENDOGENA, INDUCIDA POR NEUROTOXINAS  
DE Centruroides limpidus limpidus. -

A 15.5 mg de proteína de la fracción sinaptosomal, se agregó cloruro de calcio hasta una concentración final de 1.2 mM y se sometió a una incubación de cinco minutos a 30°C.

Esta fracción se dividió en muestras de 2.4 ml cada una, a las que se añadieron las diversas fracciones de neurotoxinas en diferentes concentraciones, en los experimentos se incluyeron controles sin veneno, se inició la reacción de liberación de norepinefrina endógena inmediatamente, incubando dichas muestras durante treinta minutos a 32°C, el tiempo se seleccionó de experimentos diseñados para conocer el óptimo de la salida del neurotransmisor.

Al término de la incubación, las muestras se centrifugaron a 24,000 g durante diez minutos, se decantaron y desproteinizaron con 0.3 ml de una solución de; ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 1.1 M, Tris-base 0.5 M y 13.4 mM de tetra acetato de etilendiamina, sal disódica ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), se centrifugaron a 28,000 g durante ocho minutos para eliminar las proteínas desnaturalizadas. Esta secuencia metodológica de incubación se tomó de Blaunstein(1975).

Después se procedió a liofilizar las muestras en ausencia de luz para evitar la oxidación de las aminas y con el fin de

reducir el volúmen y convertir posteriormente la norepinefrina de cada muestra en un compuesto fluorescente.

#### DEPENDENCIA DEL CALCIO.-

Con el fin de analizar mejor los resultados de nuestros experimentos, se realizaron ensayos de inducción de la salida de norepinefrina en ausencia de calcio, en virtud de que en experimentos realizados por Blaunstein (1975) y otros, se encontró que la salida de norepinefrina depende de la presencia del calcio y por otro lado, para asegurarnos de que las neurotoxinas no causaran la liberación de norepinefrina por otros mecanismos, como por ejemplo por lisis sinaptosomal.

#### CONVERSION DE LA NOREPINEFRINA EN EL COMPUESTO FLUORESCENTE HIDROXINDOL.-

La determinación de norepinefrina se realizó siguiendo el método de Laverty y Taylor (1968), el cual consiste en la conversión de la norepinefrina en un compuesto fluorescente; la amina<sup>1</sup> (ver figura 2) es oxidada hasta un noradrenocromo<sup>2</sup>, el cual en presencia de un álcali se transforma en noradrenolutina<sup>3</sup> misma que puede ser

estimada fluorométricamente; empleándose un espectrofluorómetro Farrand modelo MK I.

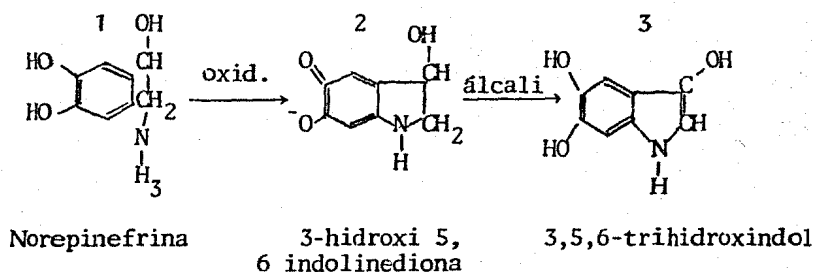


Figura 2. Conversión de noradrenalina en un compuesto fluorescente. (Tomado de Cooper y cols., 1977).

#### MATERIALES:

- Amortiguador de fosfatos: 0.06 M de fosfato monopotásico + 0.06 M de fosfato disódico, pH 6.5
- L-Norepinefrina Bitartrato (Sigma)
- Sulfito alcalino:  $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  p/v +  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1% p/v en 2.5 N de NaOH
- Solución yodada:  $\text{I}_2$  0.02 N, en NaI al 5% p/v
- Acido acético glacial 0.5 N
- Acido clorhídrico 0.01 N
- Carbonato de potasio 5 N



## TRATAMIENTO:

1. Se ajustaron las muestras liofilizadas a un pH de oxidación de 6.5 usando el carbonato de potasio. (cuadro I)
2. Se tomaron 0.5 ml de cada muestra y se llevaron a un volumen de 1.1 ml con el amortiguador de fosfatos.
3. La solución iodurada en un volumen de 0.05 ml, se añadió vigorosamente.
4. Después de tres minutos, se añadieron 0.5 ml de sulfito alcalino.
5. Después de cinco minutos, se añadió el volumen apropiado de ácido acético glacial, para ajustar a un pH final de 4.8
6. Después de treinta minutos, las muestras se sometieron a las lecturas de fluorescencia en un espectrofluorómetro Farrand modelo MK I a longitudes de onda de 380 nm de excitación y 480 nm de emisión. Se procesaron además de las muestras que incluyen al control sin veneno (s/v) y las resultantes de la incubación con veneno, un blanco de reactivos (B) y estándar de norepinefrina (E), conteniendo éste 5 µg de norepinefrina.

Cuadro I. Condiciones óptimas para determinación de catecolaminas y compuestos relacionados, por el método de Hidroxindol. (Tomado de Laverty y Taylor (1968)).

Compuesto	Oxidación		Tautomerización		Acidificación		Desarrollo		Long. de onda.	
	amort.	pH	Sulfito ml	Tiempo (min)	Acido (ml)	Final (pH)	Tiempo (min)	Temp. °C	Excit. (nm)	Emis. (nm)
(NA) norepinefrina	PO <sub>4</sub>	6.5	0.5	5	0.14	4.8	30	20	380	480
(A) adrenalina	CIT	4.0	0.5	1	0.10	5.0	0	20	410	500
(NM) normetanefrina	BO <sub>3</sub>	8.6	0.5	5	0.30	4.2	25	20	380	475
(M) metanefrina	BO <sub>3</sub>	9.1	0.5	1	0.10	5.6	0	20	410	490
(DA) dopamina	PO <sub>4</sub>	7.0	0.25	5	0.10	4.4	40	100	320	375
DOPA	CIT	5.4	0.25	5	0.05	5.7	40	100	330	380

RESULTADOS. -

Del primer paso de fraccionamiento de veneno se obtuvieron cuatro fracciones, que se denominaron picos I, II, III y IV (Fig 3). El material del pico I quedó bien separado del

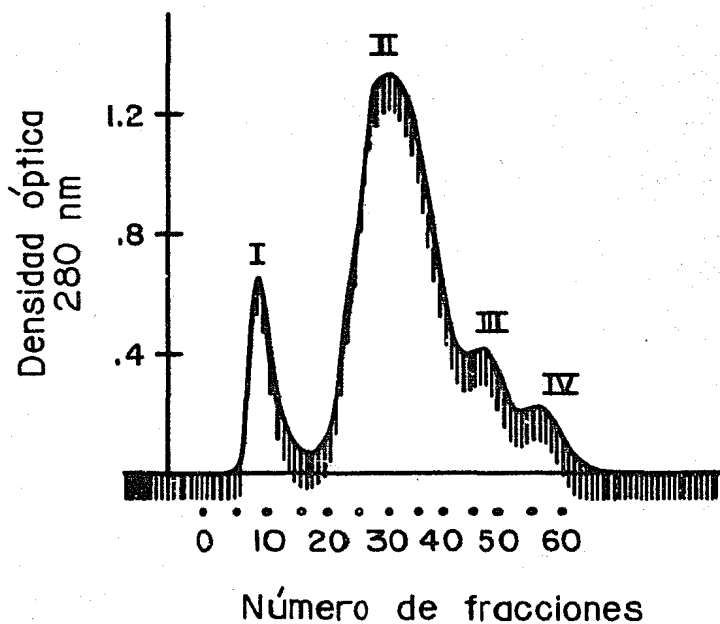


Figura 3. Fraccionamiento del veneno de Centruroides limpidus limpidus, en Sephadex G-50 M.

resto de los componentes del veneno. La caracterización en función de sus pesos moleculares y de su toxicidad ha sido ya establecida (Tato y cols., 1978). Estas fracciones se inocularon en ratones para verificar su toxicidad, los resultados fueron los siguientes y concuerdan con lo reportado en la literatura.

Cuadro 1.

Toxicidad del veneno completo de C. limpidus  
limpidus y sus fracciones obtenidas de Sephadex G-50 M.

Fracción	DL <sub>50</sub> (ug/g)
Veneno completo	1.98
Pico I	5.30
Pico II	1.00
Pico III	1.30

El material del pico II, por ser el más tóxico y para nuestros fines, se fraccionó en un segundo paso en Carboximetil-celulosa el cual se eluyó con cloruro de potasio incrementando por pasos la fuerza iónica, el perfil de elución nos dió 12 subfracciones (Fig 4); este resultado sugiere que el

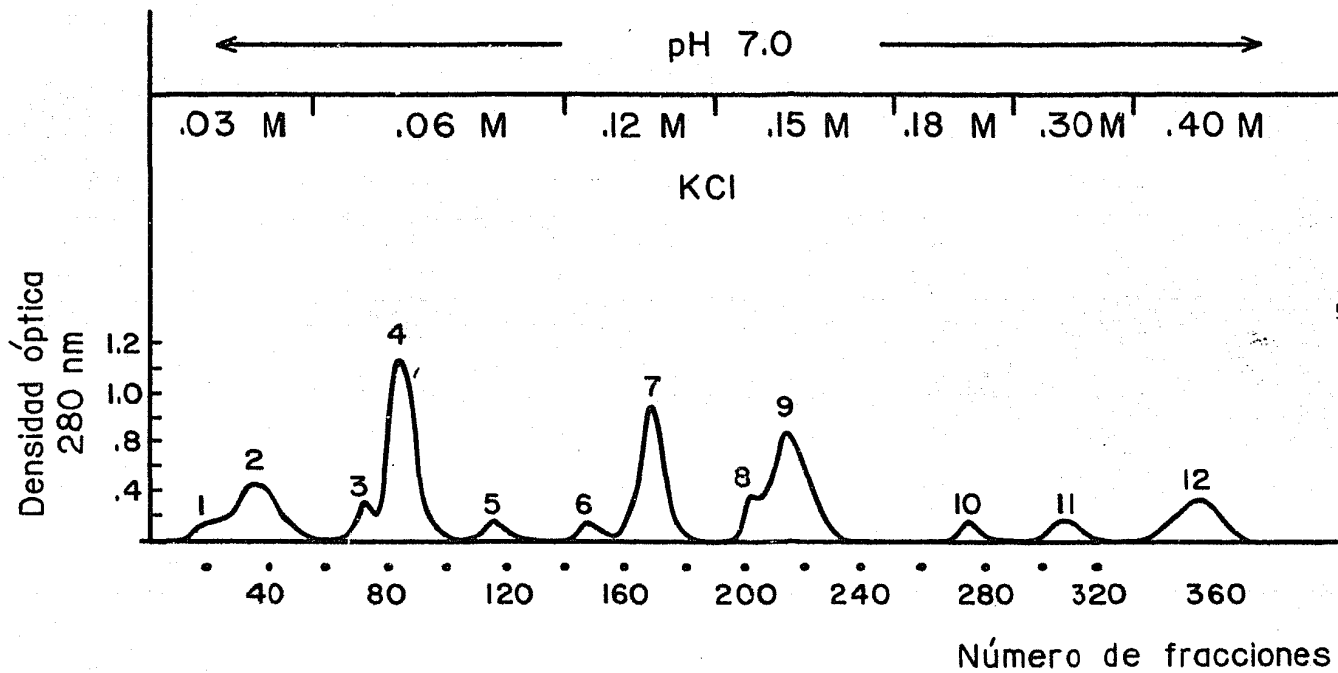


Figura 4. Fraccionamiento de pico II, en Carboximetil celulosa, incrementando la fuerza iónica por pasos.

pico II está compuesto por varias proteínas de un peso molecular parecido pero de distinta carga eléctrica. Estas subfracciones se probaron en ratones para conocer su toxicidad relativa. De los picos probados el 7,8 y el 9, resultaron ser los más tóxicos, siendo la subfracción 8 la que produjo el cuadro clínico más grave. El material neurotóxico se seleccionó así para realizar las pruebas de liberación de norepinefrina endógena, se liofilizó y dializó, y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

### OBTENCION DE LA FRACCION SINAPTOSOMAL.

Durante el desarrollo de esta investigación se probaron tres métodos para la obtención de la fracción sinaptosomal, siguiendo el método de Romey y cols.(1976), se encontró en 12 ensayos, que los resultados por estimación fluorométrica de la norepinefrina, fueron muy variables por lo que no se pudieron procesar estadísticamente y no se muestran en este trabajo. Al analizar por microscopía electrónica los sinaptosomas fueron muy escasos. (Fig 5).

Por el método de Hajós (1975), en las estimaciones de norepinefrina no se obtuvieron diferencias entre los tres ensayos con veneno y sus controles por lo que no se incluyen los datos. Por esta razón no se hizo análisis de las muestras con microscopía electrónica.

El metodo de Tamir y cols.(1974), proporcionó resultados bioquímicos confiables dada la homogeneidad y reproducibilidad de los datos. A la microscopía electrónica las partículas predominantes son sinaptosomas, aunque también aparecen algunas bandas de mielina y fragmentos de membranas, en ocasiones una matriz granular pobremente definida, que pudieran ser vesículas sinápticas después de una lisis sinaptosomal. (Fig 6)

Con base en los resultados obtenidos por los tres métodos,

se optó por elegir el de Tamir y cols. (1974) para nuestro estudio.

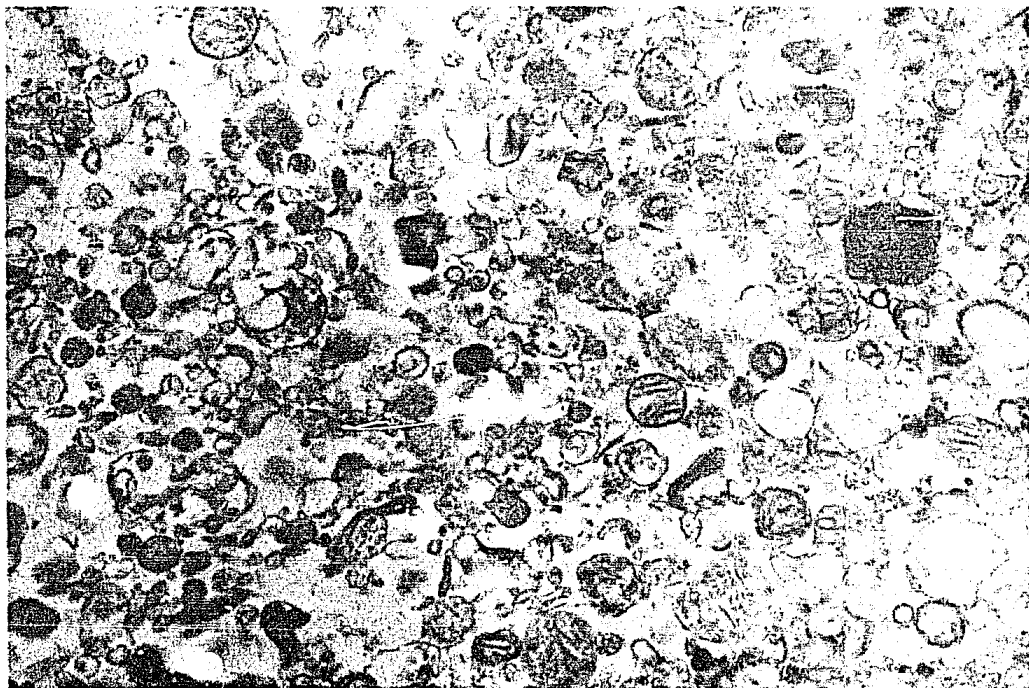


Figura 5. Microfotografía electrónica de la fracción sinaptosomal obtenida según el método de Romey y cols. (1976) X 19,000



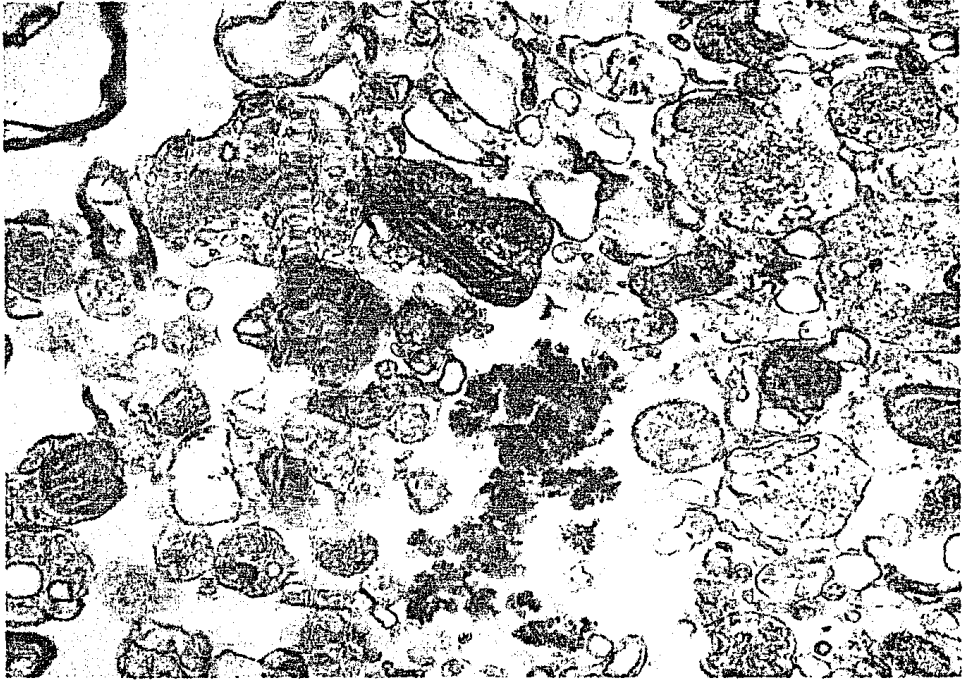


Figura 6. Microfotografía electrónica de la fracción sinaptosomal obtenida según el método de Tamir y cols. (1974). X 34,000

LIBERACION DE NOREPINEFRINA ENDOGENA, INDUCIDA POR NEUROTOXINAS  
 DE Centruroides limpidus limpidus

Dependencia del Calcio.-

Los experimentos que se realizaron para probar la dependencia del calcio en la salida de norepinefrina, indicaron que el veneno provoca la liberación de norepinefrina en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y que al incrementarse las concentraciones del catión en un rango de 0.7 a 1.9 mM, se favorece dicha liberación (cuadro 2). En los ensayos donde no se utilizó  $\text{CaCl}_2$  ó pico II, se estimó que la salida de norepinefrina es espontánea, por lo que la salida neta de norepinefrina inducida por el veneno depen-

Cuadro 2.

Liberación de norepinefrina endógena, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata, incubando con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

$\text{CaCl}_2$	Fracción II	Unidades de Fluorescencia.
----	16 $\mu\text{g}$	0.18 <sup>a</sup>
0.7 mM	16 $\mu\text{g}$	0.22
1.2 mM	16 $\mu\text{g}$	0.23
1.2 mM	-----	0.175
----	16 $\mu\text{g}$	0.35 <sup>b</sup>
1.3 mM	16 $\mu\text{g}$	0.37
1.9 mM	16 $\mu\text{g}$	0.42
2.9 mM	16 $\mu\text{g}$	0.42
1.2 mM	-----	0.32

a y b, son experimentos independientes, los resultados son las medias aritméticas de dos ensayos por experimento.

diente de calcio, es la diferencia con respecto a los valores de sus controles. En b (cuadro 2), se observa que la salida de norepinefrina llegó a su máximo con 1.9 mM de cloruro de calcio, las concentraciones mayores no fueron capaces de inducir más salida de norepinefrina.

Además se hicieron experimentos de liberación de norepinefrina, inducida con la fracción pico II, en función del tiempo, encontrando que durante el período de exposición, la liberación fué tiempo dependiente, alcanzándose un máximo aproximadamente a los cuarenta minutos. (cuadro 3, figura 7)

Cuadro 3.

Liberación de norepinefrina endógena, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. Incubando a diferentes tiempos. Se utilizaron 16 µg de pico II. Se incluyen controles (s/v), blancos (B) y estandar (E= 5 µg de norepinefrina). Los datos se expresan en unidades de fluorescencia.

Tiempo de incubación.	pico II	s/v	B	E
20'	0.21	0.14	0.10	0.25
40'	0.25	0.16	0.10	0.25
60'	0.26	0.16	0.10	0.25

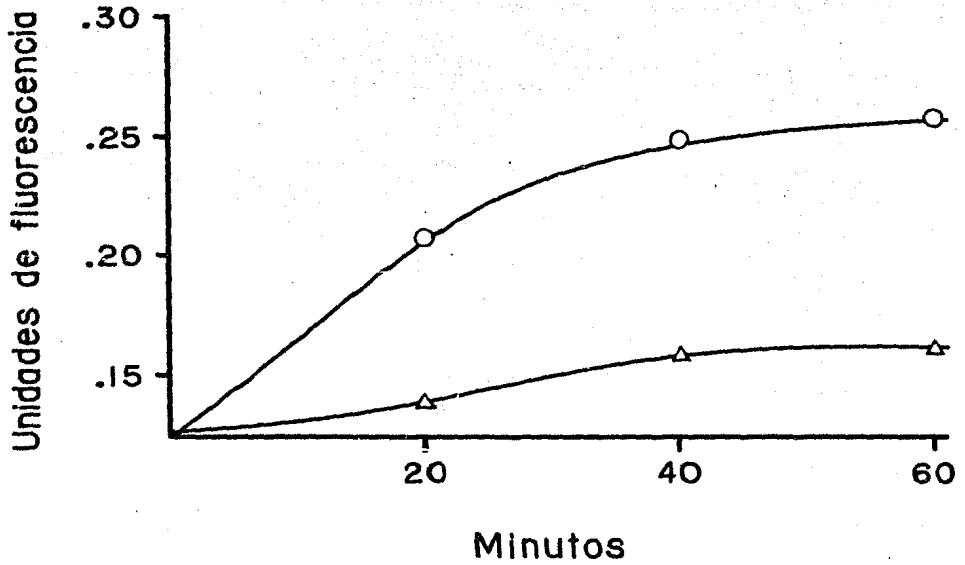


Figura 7. Liberación de norepinefrina endógena inducida por pico II (16  $\mu$ g) de veneno de *C. limpidus limpidus* (O), sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. Control ( $\Delta$ )

Una vez comprobada la dependencia del calcio y el tiempo de incubación óptimo para nuestros experimentos, procedimos a hacer los estudios de liberación de este neurotransmisor mediada por veneno en presencia de  $\text{CaCl}_2$ .

Los resultados se resumen en el cuadro 4, en el que se observa que la máxima salida de norepinefrina se presentó en los ensayos con pico II. Ninguna de las subfracciones probadas (7,8 y 9) indujeron una salida igual a la inducida por el pico II; comparando los resultados de estas tres subfracciones se observó que la 8, indujo en casi todos los ensayos una mayor salida de norepinefrina que la inducida por las demás subfracciones. Esto puede correlacionarse con el hecho de que esta subfracción indujo en los ratones un cuadro de envenenamiento más grave que el producido por las otras dos subfracciones.

Desde el punto de vista estadístico las dosis de 8  $\mu\text{g}$  parecieron ser óptimas en la inducción de la liberación de norepinefrina, ya que ellos dieron resultados significativos con  $p = 0.1$   $0.05$ , en comparación con las dosis de 16  $\mu\text{g}$  cuyos resultados no fueron significativos.

Cuadro 4.

Estimación por fluorescencia, de la liberación de norepinefrina endógena, inducida por el pico II y sus subfracciones, obtenidas del veneno de C. limpidus limpidus, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. Se incluyen controles (s/v), blancos (B) y estándares (E). Los datos se expresan en unidades de fluorescencia.

Pico II	subfracciones de II			s/v	B	E
	7	8	9			
<u>8 µg*</u>						
.58	.55	.56	.35	.26	.12	.22
1.40	.60	.80	.48	.26	.12	.45
.48	.32	.32	.25	.23	.12	.31
<u>16 µg*</u>						
.52	---	.47	---	.39	.05	.18
.35	.31	.32	---	.19	.11	.28
.80	.65	---	---	.55	.28	.45

\* Dosis de pico II ó de sus subfracciones en µg de proteína

En virtud de que las subfracciones de pico II no alcanzaron a inducir concentraciones de liberación de norepinefrina como las inducidas por pico II a la misma concentración, se procedió a estudiar la liberación mediante una curva de saturación con éstas subfracciones, con el objeto de ver si concentraciones mayores que 8  $\mu\text{g}$  alcanzaban a inducir más liberación del neurotransmisor.

Se observó que ninguna concentración probada indujo los niveles inducidos por el pico II (cuadro 5 y figs 8,9 y 10), los resultados sugieren que con 16  $\mu\text{g}$  de las subfracciones 7,8 y 9, se satura el sistema, el cual contenía una concentración de 15.5 mg de proteínas sinaptosomales. La subfracción 7, si bien no alcanzó la saturación tiende a alcanzarla a esa concentración (fig 8).

Es importante señalar que en todos estos ensayos, pico II tuvo una concentración de 8  $\mu\text{g}$ . Con una dosis cuatro veces mayor que la de pico II, estas tres subfracciones indujeron un porcentaje promedio de 61% con respecto al de pico II.

Los resultados de estos tres experimentos se tabulan en el cuadro 6, en donde se pueden ver los valores porcentualizados de la estimación de la norepinefrina inducida por las subfracciones 7,8 y 9 a concentraciones crecientes y tomando como 100% la salida neta inducida por el pico II.

Cuadro 5.

Estimación por fluorescencia, de la salida de norepinefrina endógena, inducida por el pico II y sus subfracciones 7, 8 ó 9 obtenidas del veneno de Centruroides limpidus limpidus, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata, se incluyen controles (s/v), blancos (B) y estándares (E). Los datos se expresan en unidades de fluorescencia.

pico II (8µg)	dosis (µg)	subfracciones de II			s/v	B	E
		7	8	9			
.18	8	.13			.12	.08	.18
	16	.14					
	32	.15					
.46	8		.25		.20	.16	.32
	16		.36				
	32		.36				
.95	8			.69	.64	.06	.20
	16			.88			
	32			.88			



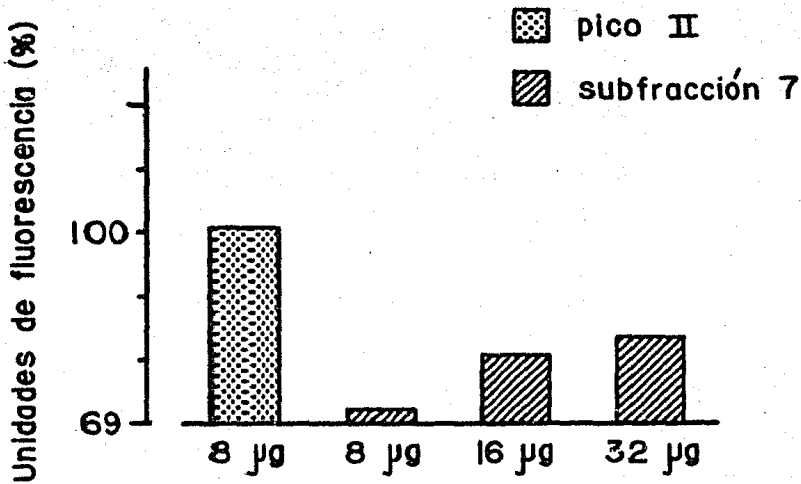


Figura 8. Porcentaje de liberación de norepinefrina endógena, inducida por el pico II del veneno de *C. limpidus limpidus* y su subfracción 7, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. 69 es el valor del control (s/v).

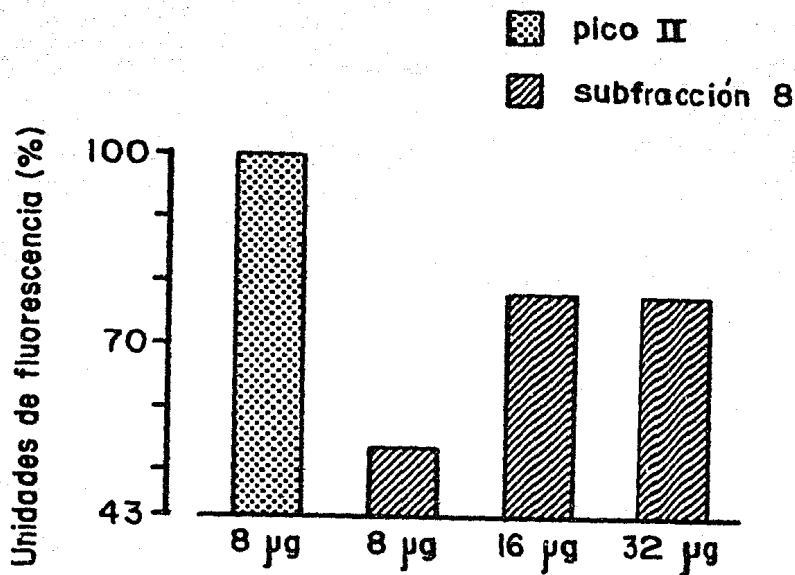


Figura 9. Porcentaje de liberación de norepinefrina endógena, inducida por pico II de Centruroides limpidus limpidus y su subfracción 8, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. 43 es el valor del control sin veneno.

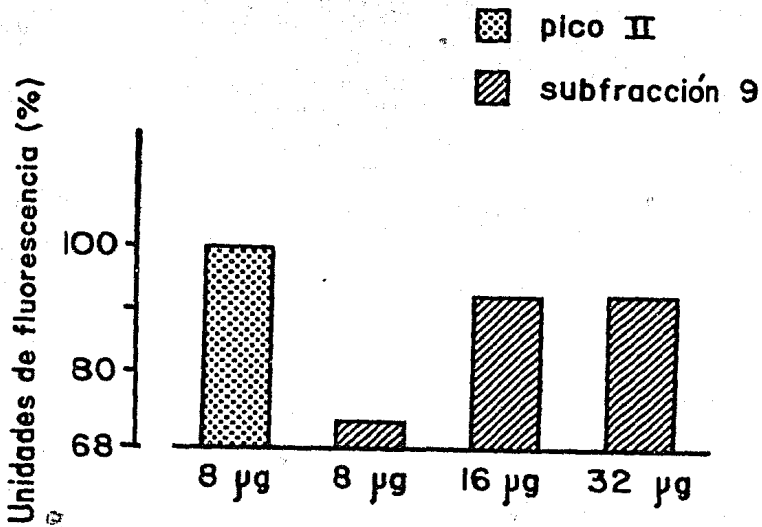


Figura 10. Porcentaje de liberación de norepinefrina endógena, inducida por pico II del veneno de C. limpidus limpidus y su subfracción 9, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. 68 es el valor del control sin veneno.

Cuadro 6.

Porcentaje de liberación de norepinefrina endógena inducida por las subfracciones 7,8 y 9 de pico II, en concentraciones crecientes, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata, en comparación con el pico II del veneno de C. limpidus limpidus. Los resultados se expresan en por ciento.

Dosis ( $\mu\text{g}$ )	Pico II	Dosis ( $\mu\text{g}$ )	Subfracciones de II		
			7	8	9
8	100	8	9	20	14
8	100	16	36	61	76
8	100	32	45	61	76

En los resultados anteriores, se observó que las neurotoxinas contenidas en las subfracciones probadas a concentraciones muy altas no inducen la salida de norepinefrina a los niveles inducidos por pico II, lo que podría sugerir la existencia de diferentes receptores, ya que Jover y cols. (1980) proporcionan datos que apoyan la idea de la presencia de dos receptores distintos en sinaptosomas de cerebro de rata: uno que reconoce a la neurotoxina II de Androctonus australis Hector, y otro que une a una neurotoxina de Centruroides suffusus suffusus.

Si en la membrana de los sinaptosomas existieran diferentes tipos de receptores, en donde algunos de ellos fijaran a una sola fracción, se explicaría probablemente la cinética de saturación de los experimentos anteriores (figs 8,9 y 10), quedando libres otros receptores.

Se diseñó otro experimento donde se podría ver la acción de las subfracciones mezcladas dando una concentración igual a la de pico II, ó una mezcla con una concentración de cada una de las subfracciones igual a la de pico II. Los resultados se pueden observar en el cuadro 7 y en las figuras 11 y 12 comprobándose que cada una de estas subfracciones sigue manteniendo el patrón observado en los experimentos previos, en relación con la liberación de norepinefrina.

## Cuadro 7.

Estimación por fluorescencia, de la salida de norepinefrina endógena, inducida por pico II y sus subfracciones obtenidas del veneno de C. limpidus limpidus, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata, obtenidas según Tamir y cols. (1974), cuando se aplican por separado ó en mezclas. Se incluyen controles (s/v), blancos (B) y estándares. Los datos se expresan en unidades de fluorescencia.

Pico II 9µg	Subfracciones de II				s/v	B	E
	7	8	9	(7,8,9)			
.48	.28	.29	.25	.33 (a)	.22	.10	.17
1.35	.78	.82	.74	.84	.72	.38	.24
.30	.175	.18	.16	.19	.14	.11	.15
.29	.18	.185	.16	.22 (b)	.13	.08	.24

(a) mezcla con tres µg de cada una de las tres subfracciones

(b) el ensayo de este casillero se realizó con una mezcla de las tres subfracciones conteniendo 9 µg de proteína cada una.

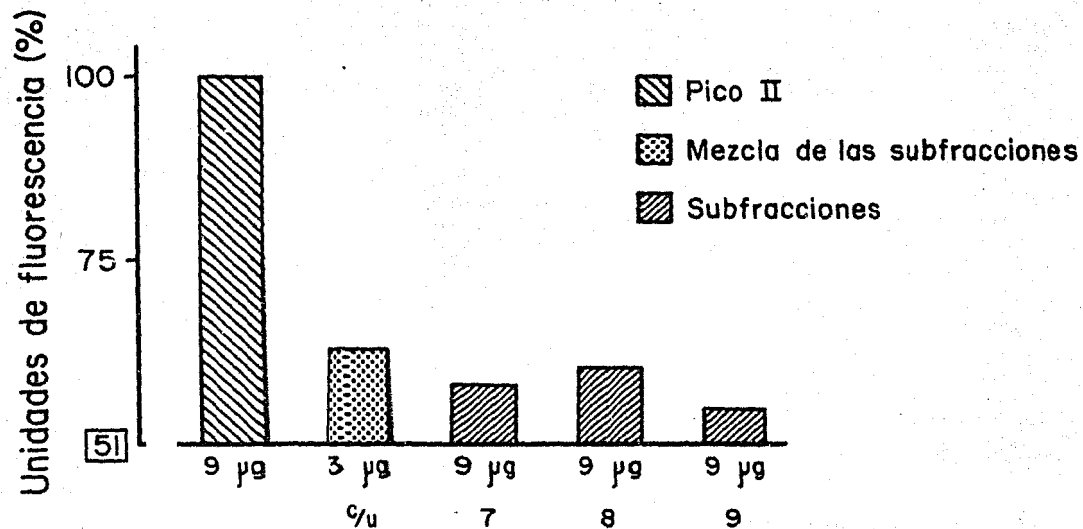


Figura 11. Liberación de norepinefrina endógena, inducida por el pico II del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* y sus subfracciones, se incubó por separado en concentración de 9 µg y mezclando 3 µg de cada una, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. 51 es el valor del control sin veneno.

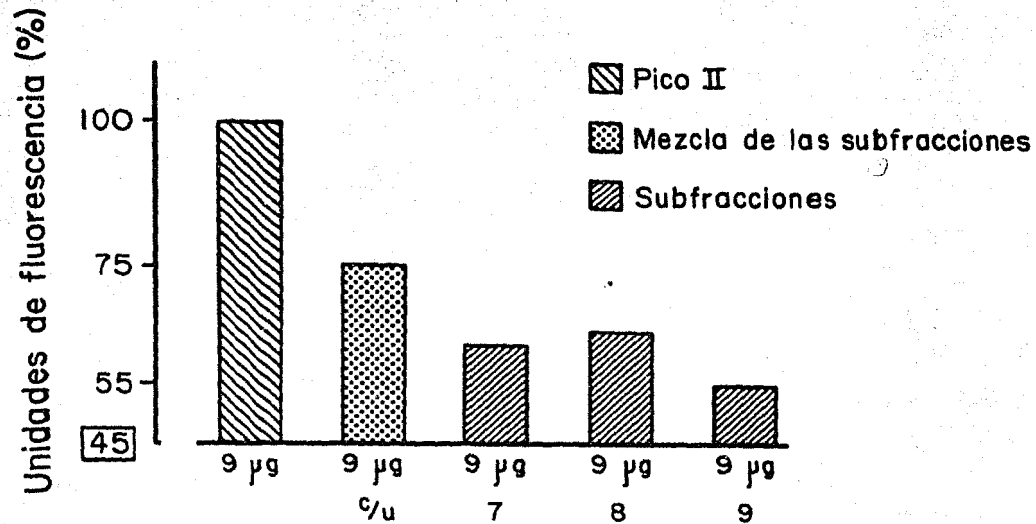


Figura 12. Liberación de norepinefrina endógena, inducida por el pico II del veneno de Centruroides limpidus limpidus y sus subfracciones, se incubó por separado en concentraciones de 9 µg y mezclando 9 µg de cada una, sobre preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata. 45 es el valor del control sin veneno.



## DISCUSION.

Los presentes resultados mostraron que la metodología empleada, fué adecuada para hacer estimaciones de noradrenalina, la cual fué liberada de sinaptosomas de cerebro de rata por estimulación con el pico II del veneno del alacrán Centruroides limpidus limpidus y con sus subfracciones.

Los resultados mostraron que la fracción del veneno pico II, que contiene la mayor parte de los componentes neurotóxicos, fué capaz de inducir con mayor eficiencia la liberación de norepinefrina endógena. Se observó que las subfracciones probadas, indujeron todas ellas la salida del neurotransmisor, sin embargo ninguna de ellas fué tan eficiente como la fracción completa (pico II). Por otro lado se observó que entre ellas también hubo diferencias para estimular la liberación de la norepinefrina.

Se conoce que las neurotoxinas del veneno de escorpión son polipéptidos de una sola cadena. Existen evidencias que indican semejanzas entre ellas, así como residuos conservados tanto internos como externos, con patrones semejantes de enlazamiento de los puentes disulfuro (Fontecilla-Camps y cols., 1982), (Rochat, Sampieri, 1976). Algunos autores han establecido la secuencia de

estas proteínas y los resultados muestran que están constituidas por cadenas de aproximadamente entre 60 y 70 aminoácidos y que hay diferencias en esas secuencias, tanto entre neurotoxinas del mismo veneno como entre las neurotoxinas de diferentes venenos (Babin y cols., 1974), (Miranda y cols., 1970), (Fontecilla-Camps y cols., 1982). La composición de aminoácidos de algunas fracciones del veneno de C. limpidus limpidus han sido estudiadas, los resultados mostraron diferencias al respecto, entre cada una de las fracciones purificadas (datos no publicados, Molinari.), lo cual sugiere que la secuencia de aminoácidos de estas fracciones debe ser diferente.

Estos conocimientos a cerca de las diferencias en las secuencias de los aminoácidos de las fracciones, podrían explicar las diferencias en cuanto a la eficiencia para estimular la liberación de norepinefrina de las terminales nerviosas aisladas. Es decir, es probable que sólo una parte de la molécula de cada fracción, sea la responsable de unirse al receptor de la membrana de las terminales sinápticas; de tal manera que debe haber secuencias con mayor afinidad que otras para unirse a los receptores y de esta forma ser más eficientes para inducir la liberación del neurotransmisor. Esta teoría podría explicar parcialmente nuestros resultados, es decir, la diferencia en la

secuencia de aminoácidos en el segmento que se une al receptor, sería congruente con el hallazgo de que la subfracción 8 fué la más eficiente para inducir la liberación de norepinefrina endógena, lo que se correlaciona además con el hecho de que fué la subfracción más tóxica en ratones, induciendo el cuadro de envenenamiento más grave.

La liberación de norepinefrina mostró ser de tipo lineal en función del tiempo de incubación; creemos que la acción de las neurotoxinas del pico II en los tiempos probados, refleja alta afinidad por los receptores. Sin embargo se requiere estudiar el fenómeno durante tiempos prolongados, para observar cambios en el comportamiento de los componentes neurotóxicos al inducir la salida del neurotransmisor, con el objeto de diseñar experimentos que ayuden a dilucidar con más precisión el mecanismo de acción de las neurotoxinas, es decir cómo se modifica la "fisiología" de las terminales nerviosas durante los procesos de liberación del neurotransmisor.

La liberación del neurotransmisor inducida por neurotoxinas del veneno de escorpión es calcio dependiente (Blaunstein, 1975), lo que apoya la idea de que la salida se debe a un mecanismo exocitósico (Moss y cols., 1974). En esta tesis se presentan experimentos realizados en ausencia de calcio, los cuales mostraron que la salida del neurotransmisor fué considerablemente menor

a la que se indujo en presencia del catión, por lo que se descarta la posibilidad de que el veneno contenga fosfolipasas. Es posible que no haya una dependencia total del calcio extracelular, ya que al omitir el calcio en nuestros experimentos, la liberación fué ligeramente mayor con respecto al control sin veneno, lo que nos hace suponer que hay capacidad de uso de calcio intracelular en la terminal nerviosa, para la liberación del neurotransmisor como ha sido propuesto por Sandoval (1981).

Hemos teorizado sobre la posibilidad de que a través del tiempo y mediante los procesamientos para purificación del veneno las proteínas sufran una posible desnaturalización, siendo éstas causas las que disminuyan la eficiencia de las mismas con respecto a las neurotoxinas menos procesadas contenidas en el pico II.

En la fracción II del veneno de C. limpidus limpidus hay al menos doce componentes, la mayor parte de ellos son tóxicos para el ratón, en el presente trabajo sólo se han explorado tres de ellos por haber sido los más tóxicos, sería conveniente estudiar todos los componentes proteicos de la fracción II del veneno completo, con objeto de dilucidar qué fracciones son las responsables de la mayor eficiencia para inducir la liberación de norepinefrina observada en este trabajo.

Cabe aclarar que el trabajo realizado, se hizo con material

de tipo analítico. En consecuencia se plantea la necesidad de obtener cantidades suficientes de veneno y sus fracciones purificadas para poder realizar más experimentos sobre la acción farmacológica de las neurotoxinas.

## CONCLUSIONES.

Debido a su alta sensibilidad, el método utilizado fué apropiado para estimar la concentración del neurotransmisor liberado.

La fracción más tóxica del veneno de C. limpidus limpidus fué capaz de inducir la liberación de norepinefrina.

Tres subfracciones parcialmente purificadas fueron capaces de inducir liberación de norepinefrina endógena con diferentes grados de eficiencia, sin embargo ninguna de ellas fué capaz de liberar la concentración de norepinefrina inducida por pico II, aún en concentraciones cuatro veces mayores.

El sistema sinaptosomas más veneno pico II ó las subfracciones probadas, fué dependiente del calcio para inducir la liberación de norepinefrina endógena. Esta es una evidencia indirecta de la ausencia de sustancias del tipo de las fosfolipasas que pudieran provocar la salida del neurotransmisor por lisis sinaptosomal.

## REFERENCIAS.

- Babin,D.R., Watt,D.D., Goos,S.M., Mlejnek,R.V.(1974). Amino acid sequences of neurotoxic protein variants from the venom of Centruroides sculpturatus Ewing. Archives of Biochemistry and Biophysics. 164, 694-706
- Blaunstein,M.P.(1975). Effects of potassium,veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. Journal of Physiology 247, 617-655
- Bragança,B., Gonçalves,M.(1955). En: Neurochemistry. (Ed. Elliot Page I.H. and Quastel J.H.) p 627. Charles C.Thomas, Springfield, III.
- Diniz,C.R., Gonçalves,M.(1960). Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. Biochimica et Biophysica Acta. 41, 470-477
- Diniz,C.R., Torres,J.M. (1968). Release of an acetilcholine like substance from guinea-pig ileum by scorpion venom. Toxicon. 5,277-282
- Fontecilla-Camps,J.C., Almasy,R.J., Suddath,F.L., Bugg,Ch.E.(1982). The three-dimensional structure of scorpion neurotoxins. Toxicon 20, 1-7
- Cooper,J.R., Bloom,F.B., Roth,R.H.(1977). Las Bases Bioquímicas de la Neurofarmacología. Ed. El Manual Moderno, México, pp.239
- Garvey,S., Cremer,N.E., Dieter,H.S.(1977). Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc. Massachusetts.

- Hajós, F. (1975). An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Research*. 93, 485-489
- Hoffman, C.C. (1932). Monografías para la entomología médica de México 1. *Anales del Instituto de Biología U.N.A.M. (México)*. 11, 316-324
- Jover, E., Couraud, F., Rochat, H. (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 95, 1607-1614
- Laverty, R., Taylor, K.M. (1968). The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: Improvements and extensions to the hydroxyindole technique. *Analytical Biochemistry*. 22, 269-279
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275
- Mazzotti, L., Bravo-Becherelle, M.A. (1961). Escorpionismo en la República Mexicana. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 21, 3-9
- Miranda, F., Kupeyan, Ch., Rochat, H., Rochat, C., Lissitzky, S. (1970). Purification of animal neurotoxins. *European Journal of Biochemistry*. 16, 514-523
- Moss, J., Colburn, R.W y Kopin, I.J. (1973). Scorpion toxin-induced catecholamine release from synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*. 22, 217-221



- Moss, J., Thoa, N.B., Kopin, I.J. (1974). On the mechanism of norepinephrine adrenergic neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 190, 439-448
- Rochat, C., Sampieri, F., (1976). Structure-function relationships of scorpion neurotoxins. *Biochemistry*. 15, 2254-2261
- Romey, G., Abita, P., Chicheportiche, R., Rochat, H., Lazdunsky, M. (1976). Scorpion neurotoxin mode of action on neuromuscular junctions and synaptosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 448, 607-619
- Tamir, M.M., Rapport, M.M. y Roizin, L. (1974). Preparation of synaptosomes and vesicles with sodium diatrizoate. *Journal of Neurochemistry*. 23, 943- 949
- Tato, Z.P., Gavilanes, M., Muñoz, L., Fletcher, P., Molinari, J.L. (1978). Epidemiological aspects of scorpionism in México. I Purification of neurotoxins from Centruroides limpidus limpidus venom. *Venom Toxins: Animal, Plant and Microbial*. (proceedings of the fifth international symposium.) (pp 636-639). Pergamon Press, Oxford, 1978.
- Sandoval, M.E. (1981). On the role of mitochondria in neurotransmitter release. En: *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission*. (Ed. Tapia, R. y Cotman, C.W. pp 187-203). New York: Plenum press.

Con especial agradecimiento a:

Las autoridades del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la U.N.A.M., por las facilidades que me brindaron para la realización del trabajo.

A los profesores Dr. Jesús Manuel León Cázares, M. en C. Lilián Yépez Mulia, M. en C. Margarita García Garduño y Dra. Beatriz Fuentes Pardo, por su colaboración y revisión de este manuscrito.

Al técnico Lino Mendez Franco, por su ayuda.

A todos mis compañeros del laboratorio por su valiosa cooperación.