

Lej. 167



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DEL CALCIO MITOCONDRIAL EN LA LIBERACION
DE NEUROTRANSMISORES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

T E S I S

que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

GABRIEL SANCHEZ RODRIGUEZ

Director de Tesis: Dra. MARIA ELENA SANDOVAL BERNAL

MEXICO 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.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
I. Estructura y Organización del Sistema Nervioso.....	2
II. Componentes Celulares del Tejido Nervioso.....	4
III. Características Funcionales de las Neuronas.....	7
IV. Potencial de Reposo.....	9
V. Potencial de Acción.....	10
VI. Diferentes Tipos de Sinapsis.....	13
VII. Procesos de Plasticidad Sináptica.....	16
ANTECEDENTES DEL TRABAJO	18
I. Mecanismos de Regulación de la Concentración de Calcio en Las Terminales Nerviosas.....	19
II. Importancia Fisiológica del Calcio Mitocondrial.....	25
III. Sinaptosomas.....	29
IV. GABA.....	30
V. Liposomas.....	31
VI. Ionóforos y Formadores de Canales.....	33
MATERIALES Y METODOS	36
I. Preparación de Sinaptosomas.....	36
II. Acumulación de GABA- ³ H por Sinaptosomas.....	37
III. Preparación de Liposomas.....	37
IV. Cuantificación del Volumen Atrapado por Liposomas Durante su Formación.....	38
V. Fusión Sinaptosomas-Liposomas.....	39
VI. Cuantificación de la Fusión Sinaptosomas-Liposomas..	39
VII. Liberación de GABA- ³ H por Sinaptosomas.....	40
VIII. Funcionalidad de los Sinaptosomas Después de su Fusión a Liposomas.....	40
IX. Determinación de Lípidos en Liposomas.....	42
X. Determinación de Proteínas.....	43

RESULTADOS.....	44
I. Atrapamiento del Medio por Liposomas.....	44
II. Fusión Sinaptosomas-Liposomas.....	44
III. Efecto de la Fusión de LG sobre la Funcionalidad de Sinaptosomas.....	46
IV. Efecto de la Fusión Entre Sinaptosomas y LG, ^{L}Ca , o ^{L}Na Sobre la Liberación Espontánea de GABA- ^{3}H	46
V. Liberaciones Basales e Inducidas en S, S-LG, S- ^{L}Ca , y S- $^{L}EGTA$	50
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES.....	62
REFERENCIAS.....	64

Abreviaciones Utilizadas:

GABA.....	Acido gama-amino butírico
GABA- ^{3}H ...	Acido gama-amino butírico tritiado
LG.....	Liposomas que contienen glucosa
^{L}Ca	Liposomas que contienen $CaCl_2$
^{L}Na	Liposomas que contienen $NaCl$
EGTA.....	Liposomas que contienen EGTA (ácido etilenglicol-tetraacético).
S- ^{L}X	Sinaptosomas fusionados a cualesquiera de los tipos de liposomas arriba mencionados.

I N T R O D U C C I O N

El hombre es la especie animal que tiene más dominio sobre el medio que le rodea. Sin embargo, ese dominio no ha sido adquirido solamente por las características genéticas seleccionadas por la mortalidad y reproducción diferencial de los organismos en una población, que son los procesos que guían la evolución orgánica de los seres vivos; sino por el desarrollo de la cultura (que es un mejor conocimiento del medio que le rodea); resultado de su capacidad de recordar, de anticiparse e imaginar el futuro y de comunicarse (1). Ese conocimiento le permite analizar los problemas a que se enfrenta y dar la mejor de las soluciones posibles.

Las características que posee el hombre le han dado la ventaja de no ser tan fácilmente seleccionado por el medio como otros organismos, ya que puede llegar a adaptar el medio a sus necesidades y no simplemente él adaptarse al medio.

Aunque el hombre es, en este sentido, un organismo excepcional, tiene muchas características en común con los demás animales. Entre las más importantes está el que todos tienen la capacidad de percibir cambios químicos y energéticos en el medio a través de estructuras especialmente adaptadas para ello.

Estas estructuras registran toda la información que recibe el

animal del medio, la cual es integrada y analizada en centros cuyas características les permiten procesar de manera rápida todas las sensaciones. El grado en que se puede procesar la información en esos centros varía grandemente en diferentes organismos y puede involucrar desde un simple respuesta refleja hasta complicados circuitos que almacenan información y la procesan en formas muy sofisticadas. Una vez habiéndose tomado una decisión en estos centros, se envían señales al resto del organismo para realizar la acción más conveniente.

El conjunto de receptores de estímulos, y los centros de procesamiento, así como las vías que transmiten información entre ellos y las que transmiten las señales de las decisiones tomadas a los efectores correspondientes constituyen lo que conocemos como SISTEMA NERVIOSO.

I. ESTRUCTURA Y ORGANIZACION DEL SISTEMA NERVIOSO

En todos los vertebrados, el sistema nervioso tiene una organización similar. Funcionalmente se divide en:

a) Sistema Nervioso Central (SNC), que realiza todas las funciones de asociación, integración y almacenamiento de información:

b) Sistema Nervioso Periférico (SNP), que comunica al SNC con el medio (y con el resto del organismo) por medio de sus

órganos receptores, e interviene en la transmisión de decisiones voluntarias hasta los órganos efectores correspondientes; y

c) Sistema Nervioso Autónomo, que conecta al SNC con todos los efectores involuntarios (involucrando exclusivamente fibras eferentes (2)).

Estructuralmente, el SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo es una masa de tejido de forma irregular cuya superficie se encuentra completamente plegada; se subdivide en varias estructuras entre las que podemos citar al cerebro, el cerebelo, los tubérculos cuadrigéminos, el bulbo raquídeo etcétera.

El SNC está rodeado por tres capas de tejido conjuntivo, denominadas meninges, que contribuyen a su protección, así como también a su nutrición ya que poseen vasos sanguíneos. Existen otras estructuras que también protegen al SNC: el cráneo (que recubre al encéfalo), y las vértebras (en las que se encuentra la médula espinal) (3).

El SNP está constituido por nervios (agrupaciones de fibras nerviosas sensitivas y motoras con tejido conectivo y vasos sanguíneos acompañantes) que se ramifican al salir del SNC. Las fibras de los nervios se llaman sensitivas cuando se originan en receptores en cualquier parte del organismo y llegan hasta el SNC: cuando las fibras salen del SNC y llevan información hasta los órganos efectores se denominan fibras motoras (4).

El sistema nervioso autónomo, que se encarga de relacio

nar al SNC con los efectores involuntarios (músculo liso del tracto digestivo y de los vasos sanguíneos, glándulas, etcétera), consta de fibras que se conectan al SNC con un ganglio (los ganglios nerviosos se localizan por pares en la parte ventral de la médula espinal) de donde parten otras fibras que llegan hasta el órgano efector correspondiente (2,4).

A pesar de las diferencias que existen en estructura y organización entre los tres subsistemas del sistema nervioso, todos poseen la misma base funcional, es decir, la capacidad de transmitir y procesar información. esta capacidad se debe a las propiedades de las células del tejido nervioso.

II. COMPONENTES CELULARES DEL TEJIDO NERVIOSO

Los diferentes grupos celulares que constituyen el tejido nervioso son los siguientes:

- A) Las neuronas
- B) Las células gliales
- C) Las células de Schwann

A) La neurona es la célula especializada del tejido nervioso que posee las características particulares a las cuales se debe el funcionamiento único del mismo. La neurona puede tener distintas formas y tamaños en las diferentes regiones del SN pero en general se le distinguen las siguientes regiones:

- 1) La dendrítica
- 2) La somática
- 3) La axónica

1) La región dendrítica está formada por una gran cantidad de la membrana celular, todas ellas muy delgadas y cortas. Esta característica le confiere a esta región una superficie muy grande a la que se pueden "conectar" las terminales axónicas (rara vez las dendríticas) de otras neuronas. Las dendritas, que son las prolongaciones membranales antes mencionadas, reciben la mayoría de contactos provenientes de otras neuronas. También el soma celular y los axones los reciben, aunque en menor proporción. (figura 1)

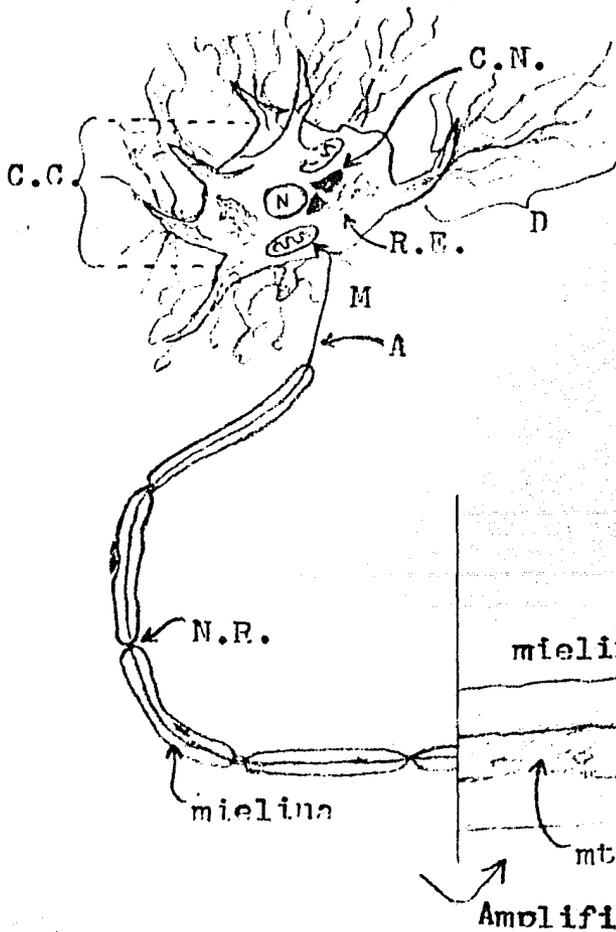


Figura 1. Esquema en que se representan las regiones de una neurona.

- C.C. - cuerno ó soma celular.
- D. - dendritas
- A. - axón
- (N - núcleo, M - mitocondria, RE - retículo endoplásmico, V - vesículas, mf. - microfilamentos, mt. - microtúbulos, C.N. - cuernos de Nissl)

2) La región somática es la más voluminosa de la célula (5-100 μm de diámetro) (5), y en ella se localizan los organelos celulares entre los que se encuentran microfilamentos y microtúbulos (para la contracción y el transporte) así como los cuerpos de Nissl, de forma típica para cada grupo de neuronas (6,7). El soma constituye la región más importante para la síntesis de macromoléculas. Es importante hacer notar que una vez desarrollada la neurona como tal, el núcleo pierde su capacidad de dividirse, por lo que no existe la capacidad de reponer células muertas mediante la división celular.

4

3) El axón es una prolongación de la membrana neuronal a manera de tubo de un diámetro extremadamente pequeño (1-20 μm en vertebrados). En el SNP, se encuentra rodeado por una o varias capas de mielina. La mielina es una sustancia compuesta de fosfolípidos y proteínas: que se encuentra cubierta por el neurilema (membrana de las células de Schwann). La mielina no cubre por completo a los axones, sino que se encuentra interrumpida periódicamente por espacios llamados nódulos de Ranvier, en los que la membrana axónica sólo está cubierta por el neurilema (7). La longitud del axón es variable y puede llegar a tener casi el tamaño del organismo a que pertenece. Como el soma, el axón presenta varios organelos (mitocondrias, neurofilamentos, neurotúbulos, y en ocasiones vesículas) (8). En su parte terminal, el axón forma un ensanchamiento llamado botón sináptico. En este botón existen mitocondrias pequeñas, un aparato similar al retículo endoplásmico, microtúbulos, así como pequeñas vesículas (6,9). Existe también

un engrosamiento de la membrana en la región que hace contacto con la siguiente neurona.

B) Otro grupo de células en el sistema nervioso que sobrepasa en número a las neuronas, y cuya función se conoce parcialmente es el de las células gliales en el SNC. Entre las funciones que cumplen y que ya se conocen se encuentran las de proporcionar un soporte estructural a las neuronas, limitar la libre difusión de sustancias entre neuronas (salvo en las sinapsis), efectuar fagocitosis, y cuidar la regeneración de axones. Las funciones de las células gliales no están directamente involucradas en el proceso de transmisión de estímulos en el SN.

C) En el SNP existe un tipo de células que, al menos en su función protectora, es análogo a las células gliales del SNC. Su actividad más importante es la de producir mielina, y con ella rodear independientemente a los axones. Se denominan células de Schwann.

III. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS NEURONAS

Las neuronas tienen un consumo de energía alto en comparación a otras células del cuerpo. Su principal fuente de energía en condiciones normales de alimentación y actividad la constituye la glucosa. La excitación de la neurona es el resultado del funcionamiento de su membrana, y es la que le confiere sus características particulares. La membrana es la que se encarga de controlar la entrada y salida de moléculas del citoplasma. Las moléculas no

polares pueden atravesarla de manera pasiva. Sin embargo, las moléculas polares y los iones tienen propiedades que les impiden un paso fácil a través de la membrana (10) y requieren de canales o acarreadores especiales que permitan su paso. Algunos acarreadores transportan moléculas o iones que han de ser conducidos en un sentido opuesto al que su gradiente de concentración a uno y otro lado de la membrana les impone, aún cuando la membrana sea permeable a ellos. Estas formas de transporte difieren de la forma pasiva en que requieren del consumo de energía y por ello se les conoce como procesos de transporte activo.

La membrana está polarizada debido principalmente a un desequilibrio químico de Na^+ y K^+ . Esta polarización se llama potencial de reposo y es de alrededor de -70 mV.: aunque puede aumentar (hiperpolarización) o disminuir (despolarización) por acción de estímulos fisiológicos. Cuando una despolarización alcanza el valor umbral de excitación de la neurona se genera un potencial de acción.

Las neuronas tienen un funcionamiento polarizado ya que transmiten los potenciales de acción (o impulsos) desde el origen del axón hasta el botón sináptico. Este botón sináptico tiene comunicación con otra neurona por medios eléctricos o químicos a través de lo que se denomina sinapsis. Por medio de la sinapsis se transmite la información de una neurona a otra a través de mensajes químicos (iones o neurotransmisores). Los neurotransmisores son sintetizados, liberados durante la actividad nerviosa, y recapturados por la neurona.

La neurona también puede enviar información a células no

nerviosas (musculares o glandulares) por medio de neurotransmisores.

IV. POTENCIAL DE REPOSO

En condiciones de reposo existe una diferencia de concentración de iones a través de la membrana celular. En el caso específico de la neurona, los principales iones a considerar son el potasio, el sodio, el cloro, y los aniones proteicos. La siguiente tabla muestra las concentraciones de estos iones en el interior y exterior de la célula para el caso del axón de calamar (11)

	CONCENTRACION (mM)			
	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	Prot ⁻
INTERIOR	450	50	120	250
EXTERIOR	20	440	560	3

Como puede observarse, el potasio y los aniones proteicos se encuentran más concentrados en el interior (aproximadamente 20 y 30 veces, respectivamente, con respecto al exterior), en tanto que los iones cloro y sodio se encuentran más concentrados en el exterior (aproximadamente 10 y 5 veces, respectivamente, con respecto al interior). Como en todos los casos se trata de partículas eléctricamente cargadas, su equilibrio implica compensar tanto el número de partículas como sus cargas eléctricas a ambos lados de

la membrana. En condiciones de reposo, los iones, distribuidos diferencialmente a ambos lados de la membrana, originan una diferencia de carga eléctrica que la polariza. Esta polarización o Potencial de Reposo es de 70 mV, siendo el interior negativo con respecto al exterior. En esta situación, sólo el K^+ y el Cl^- se encuentran cerca del valor de su potencial de equilibrio electroquímico. El Na^+ y los aniones proteicos no lo están, y por ello tenderían a cruzar la membrana (el Na^+ hacia adentro y los aniones orgánicos hacia afuera) para alcanzar su equilibrio. La membrana es impermeable a los aniones proteicos y tiene muy baja permeabilidad para el Na^+ en estado de reposo, lo que impide que éste último alcance su equilibrio por difusión de una manera rápida. Además, existe un proceso de transporte activo que lo conduce en un sentido inverso al que su desequilibrio electroquímico lo dirigiría. El transporte de Na^+ , llevado a cabo por la bomba electrogénica, está asociado a una entrada de K^+ . Sin embargo, este último no se ve tan afectado en su equilibrio debido a que la membrana es más permeable al K^+ .

V. POTENCIAL DE ACCION

Un estímulo puede alterar la permeabilidad de la membrana al Na^+ . Esto provoca que el ión se difunda en la dirección que tiende a establecer su equilibrio electroquímico (hacia el interior de la célula), lo que obviamente va a redundar en una reducción del potencial de reposo de la membrana. Si esta reducción llega a un valor crítico (umbral), se produce una drástica movilización de

Na^+ hacia el interior celular. Esto se debe a que en la membrana existen canales para Na^+ sensibles a voltaje que son activados (abiertos) cuando disminuye el potencial de reposo. La apertura de los canales permite que el Na^+ penetre libremente a la célula y provoca que el potencial de membrana cambie desde $-70(-90)$ hasta $+50 (+30)$ mV. Este cambio eléctrico se conoce como Potencial de Acción. Se dice que es un potencial todo o nada ya que si la des polarización inicial no alcanza un valor umbral, este potencial no se produce; por otro lado, un estímulo mucho mayor al umbral no produce un potencial de acción diferente al producido por el estímulo umbral. El potencial de acción se transmite a lo largo de la membrana neuronal con una velocidad de hasta 120 m/s sin experimentar modificación alguna después de haber recorrido grandes distancias. Su amplitud es siempre constante (100 mV), y su duración varía entre 1 y 2 msog. (11,12). Las zonas de la membrana que han sido excitadas de esta manera no pueden ser excitadas nuevamente hasta que se reestablece el potencial de reposo. La duración del potencial de acción implica tanto la apertura de los canales de Na^+ , como el cierre de los mismos, así como la apertura desfasada de canales de K^+ (que casi coincide en tiempo con el cierre de los canales de Na^+ y contrarresta el efecto despolarizador de éstos hasta restablecer el potencial de reposo), y su posterior inactivación. El potencial de acción se transmite a todo lo largo de un axón, desde su inicio en el cuerpo celular hasta el botón sináptico, y transmite en esta forma información en las neuronas en base a su frecuencia (puesto que las características individuales de los potenciales de acción no varían entre sí) (figura 2)

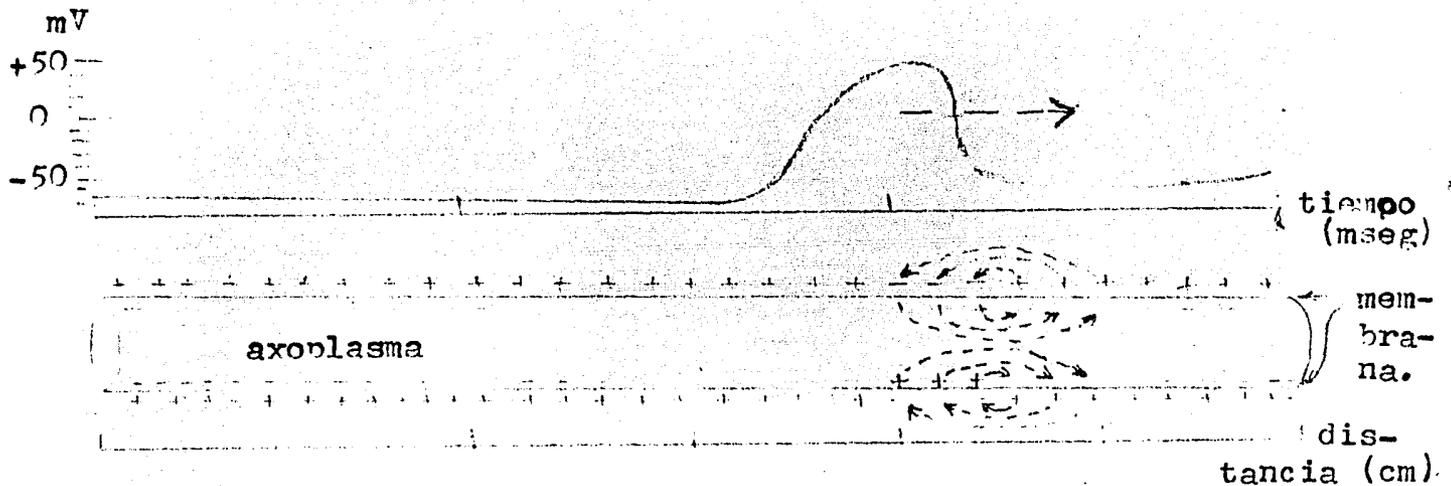


Figura 2. Relación entre los cambios de potencial electroquímico a lo largo de un axón. En la parte superior se muestran los cambios de potencial y el tiempo en que se realizan. En la parte inferior se observan los cambios de carga eléctrica (producidos por flujo de iones) que se producen en la membrana durante el cambio de potencial. Modificado de Miles(13)

VI. DIFERENTES TIPOS DE SINAPSIS

Una vez que el potencial de acción alcanza el botón sináptico, este impulso se transmite a las zonas receptoras (dendrita, soma, o axón) de otra neurona a través de la sinapsis.

Existen dos tipos de sinapsis: la eléctrica y la química. En la sinapsis eléctrica, parte de la membrana del botón sináptico (presináptica) se encuentra muy próxima a la membrana a la cual va a transmitir el impulso nervioso (postsináptica). El espacio que las separa es de únicamente 2 nm., a diferencia del espacio normal que separa a las células en el tejido nervioso, que es de 20 nm. (11). Esta zona de cercanía opone poca resistencia al paso de corrientes iónicas y se denominan Uniones Estrechas (Gap Junctions). Estas se caracterizan porque, tanto en la membrana presináptica como en la postsináptica, existe una gran acumulación de partículas que se cree son canales que permiten un intercambio iónico rápido. Esta característica se sugiere en base a la rápida transmisión que se lleva a cabo por este tipo de sinapsis, en la cual no se produce ningún retardo. En muchos casos, el impulso nervioso se transmite unidireccionalmente, de la membrana presináptica a la postsináptica, debido a un efecto de rectificación de corriente. Sin embargo, en muchos otros casos este efecto no se presenta y la sinapsis puede transmitir en ambos sentidos. Las sinapsis eléctricas han sido asociadas a respuestas rápidas en algunos insectos y peces (como la huida de un predador). Sin embargo, en el caso de los mamíferos no se ha definido que función podrían desempeñar. (11)

En el caso de las sinapsis químicas, existe una distancia de 200 m. entre las membranas pre- y postsinápticas, por lo que en estos casos la resistencia eléctrica es bastante grande. En este caso el impulso no se transmite directamente mediante iones, sino por medio de intermediarios químicos llamados neurotransmisores. Los neurotransmisores son moléculas (aminoácidos, monoaminas o péptidos) que son producidos en la célula presináptica y almacenados en su botón terminal, de donde son liberados a la hendidura sináptica como respuesta a un potencial de acción. Los neurotransmisores se difunden hasta la membrana de la célula postsináptica, en donde se unen a sus receptores químicos específicos. Los receptores están asociados a canales de Na^+ , K^+ , o Cl^- , los cuales se abren cuando el neurotransmisor entra en contacto con los receptores. Hay que hacer notar que existe además un mecanismo alternativo al anterior en el que, en el caso de las catecolaminas, interviene un segundo mensajero en la célula postsináptica para realizar la apertura de los canales iónicos (6,14), en cuyo caso la respuesta es más prolongada, por lo que se le ha asociado a fenómenos como la memoria (6).

Cuando los canales que se abren son de K^+ , o de Cl^- , se provoca una hiperpolarización de la membrana (6,11); si por el contrario, los canales abiertos corresponden a Na^+ , se provocará un incremento en la concentración de Na^+ interno y se despolariza la membrana (6,9,11). Si el grado de despolarización es suficiente, se activan los canales sensibles a voltaje y se produce un potencial de acción, como se mencionó anteriormente.

Los neurotransmisores son sintetizados en las terminales

serviéndose a partir de precursores y por medio de enzimas provenientes del cuerpo celular. Una vez formados, quedan almacenados en vesículas (como las monoaminas) o bien se acumulan en el citoplasma (como algunos aminoácidos).

La liberación de neurotransmisores es altamente dependiente de Ca^{++} . En el momento de una despolarización producida por un potencial de acción, el Ca^{++} penetra en la terminal axónica a través de canales específicos para Ca^{++} , sensibles a voltaje. Dentro de la célula, el Ca^{++} desencadena los mecanismos responsables de la liberación del neurotransmisor (11,12). El neurotransmisor, que difunde hasta sus receptores en la membrana postsináptica, no queda permanentemente en contacto con ellos, puesto que ésto impediría que la neurona recibiera estímulos en serie. Por el contrario, en corto tiempo, el transmisor que fué liberado es retomado por la terminal misma, o acumulado por las células gliales que delimitan las hendiduras sinápticas (como en el caso del GABA y la Dopamina), o puede ser degradado en la hendidura sináptica por medio de enzimas específicas (como en el caso de la Acetil Colina).

En esta forma, el cambio en la permeabilidad de la membrana inducido por el transmisor, termina rápidamente y, tan pronto como se restablece el potencial de reposo, la neurona postsináptica se encuentra en condiciones de ser estimulada nuevamente. Puesto que en general, las características de las señales no varían, la codificación de la información depende de la frecuencia de transmisión de señales en cada neurona. Tanto en la sinapsis química como en la eléctrica, el potencial postsináptico es inducido en respuesta a la activación presináptica se denomina potencial sináptico, y a dife-

amplitud del potencial de acción, su amplitud es constante.

El proceso que se ha descrito hasta aquí es la forma más sencilla de transmisión nerviosa. Sin embargo, existen variaciones de este patrón básico que dan lugar a fenómenos más complejos conocidos como Fenómenos de Plasticidad Sináptica.

VII. PROCESOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA

Los procesos de plasticidad sináptica son básicamente una modificación de la respuesta de una célula ante un mismo estímulo, producida por la experiencia.

Cuando a través de una sinapsis pasan varios estímulos en un tiempo relativamente corto, puede llegar a producirse un fenómeno de Facilitación. La facilitación consiste en que, dados dos estímulos de características idénticas aplicados a una terminal nerviosa, con una mínima diferencia en tiempo, el segundo estímulo provoca un potencial sináptico de mayor amplitud que el primero debido a la activación previa de la membrana neuronal. Otro proceso que puede ocurrir en la sinapsis es la Potenciación: ésta consiste en que durante algún tiempo después de haber aplicado estímulos presinápticos de alta frecuencia, los estímulos de baja frecuencia producen un potencial sináptico de mayor amplitud que el que producirían si no se hubiera aplicado la serie de alta frecuencia. Un tercer fenómeno plástico es la Depresión, que consiste en una disminución de la amplitud del potencial sináptico como resultado de una excesiva frecuencia de estimulación (4, 15). Se ha sugerido que todos estos fenómenos se pueden originar a nivel presináptico, o que

Los posibles factores involucrados son: (6)

A. Cambios en la cantidad de transmisor liberado debidos a:

- 1.- Cambio en la magnitud del estímulo.
- 2.- Un incremento o disminución del Ca^{++} disponible para activar la descarga.
- 3.- Cambio en el número de vesículas libres disponibles para la liberación.
- 4.- Aumento o disminución de la probabilidad de que un número dado de vesículas disponibles se descarguen.

B. Disminución o aumento de los fenómenos de recaptura que altera la cantidad de transmisor disponible a los receptores.

A nivel postsináptico, se ha postulado que podrían actuar los siguientes procesos:

- A. Incremento o decremento de los receptores disponibles
- B. Cambios en los procesos de permeabilidad.
- C. Cambios en los procesos de inactivación.
- D. Modificación del metabolismo que altera el efecto de de los transmisores en el metabolismo celular.

Estos procesos postsinápticos se combinan con los efectos presinápticos.

El flujo de la información disponible señala al Ca^{++} como uno de los factores reguladores más importantes en los fenómenos de liberación de neurotransmisores. Por ejemplo, se ha demostrado que el

efecto de potenciación depende de la concentración de calcio externo ($[Ca^{++}]_e$) que existe durante la aplicación del tren de estímulos, y que la tasa de aparición de los potenciales miniatura se incrementa mediante estimulación repetitiva de manera dependiente de la $[Ca^{++}]_e$. La facilitación es calcio-dependiente (6).

En general, lo que aparentemente sucede es que, durante los procesos de estimulación que dan lugar a los fenómenos plásticos, se propicia un incremento de la entrada de Ca^{++} a la terminal axónica, lo que aumenta la movilización o la liberación de neurotransmisores.

ANTECEDENTES DEL TRABAJO

Como se ha mencionado, el Ca^{++} es considerado un factor esencial, tanto en los procesos de transmisión nerviosa simple, como en los de plasticidad sináptica. A pesar de ello, varios autores han reportado que aún en ausencia de Ca^{++}_e es posible inducir incrementos en la liberación de transmisores por despolarización.

Tanto en placa neuromuscular (16-21), como en sinaptosomas (22-24), rebanadas de cerebro (25), células de la médula adrenal (26) e islotes de Langerhans (27), se ha demostrado que bajo condiciones que promueven la acumulación de Na^+ en las terminales nerviosas (despolarizaciones eléctricas y farmacológicas sostenidas, fusión de liposomas conteniendo Na^+ , introducción por medio de ionóforos, etcétera) se incrementan los procesos de secreción, tanto espontánea como inducida, aún en ausencia de Ca^{++} externo. El mecanismo

de acción del Na^+ se desconoce.

El hecho de que evidencia ya clásica (6,14,23) apoya al Ca^{++} como el ión más importante en la relación estímulo-secreción, cuando a la existencia de diversos sistemas con gran capacidad para almacenar Ca^{++} en las terminales nerviosas, han inducido a pensar que, aún cuando este ión se encuentre ausente del medio extracelular, la concentración interna del Ca^{++} libre podría incrementarse al se liberara de dichos almacenes internos (18,23,24,29,30). Varios autores apoyan la idea de que el Na^+ podría actuar en este proceso de liberación de Ca^{++} (18,23,30,31).

I. MECANISMOS DE REGULACION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO EN LAS TERMINALES NERVIOSAS

Existen varias estructuras capaces de controlar la concentración de Ca^{++} interno ($[\text{Ca}^{++}]_i$):

A. Membrana Plasmática

Bajo condiciones de reposo, la membrana plasmática es prácticamente impermeable al Ca^{++} . Sin embargo, en condiciones de despolarización, el Ca^{++} puede atravesarla por medio de dos tipos de canal:

- 1) Uno sensible a tetrodotoxina que parece ser un canal de Na^+ de selectividad imperfecta.
- 2) Otro, más específico para el Ca^{++} , que actúa en forma dependiente de voltaje (11,22,23).

Además un sistema de intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ que fun-

ción exclusivamente aprovechando el gradiente electroquímico del Na^+ (sin ATP) (15), al cual entra para que salga el Ca^{++} .

B. Proteínas Captadoras de Calcio

Se han descrito tres proteínas capaces de captar Ca^{++} en células excitables. Estas son la Calmodulina, la Troponina C, y la Parvalbúmina (34,35). La primera ha sido localizada en muchos tejidos, incluyendo encéfalo (en conejo), la segunda es especialmente abundante en músculo estriado. La calmodulina y la troponina C tienen gran semejanza entre sí y las tres tienen bastante homología en lo que respecta a los sitios captadores de Ca^{++} , teniendo alta afinidad por dicho ión (35).

C. Retículo Endoplásmico

Existe un sistema de captación de calcio en el retículo endoplásmico, tanto en axoplasma de calamar, como en terminales nerviosas de mamíferos (15,36). Sus características son las siguientes:

- 1) Funciona específicamente con ATP o desoxiATP
- 2) Requiere la presencia de magnesio
- 3) Se inhibe por sodio; también por litio, aunque en menor grado
- 4) No se bloquea por inhibidores mitocondriales (ácido de sodio, DNP, FCCF, oligomicina, rojo de Antenio) pero sí por el ionóforo valilomicina
- 5) Tiene una constante de saturación media por ATP (15,36)

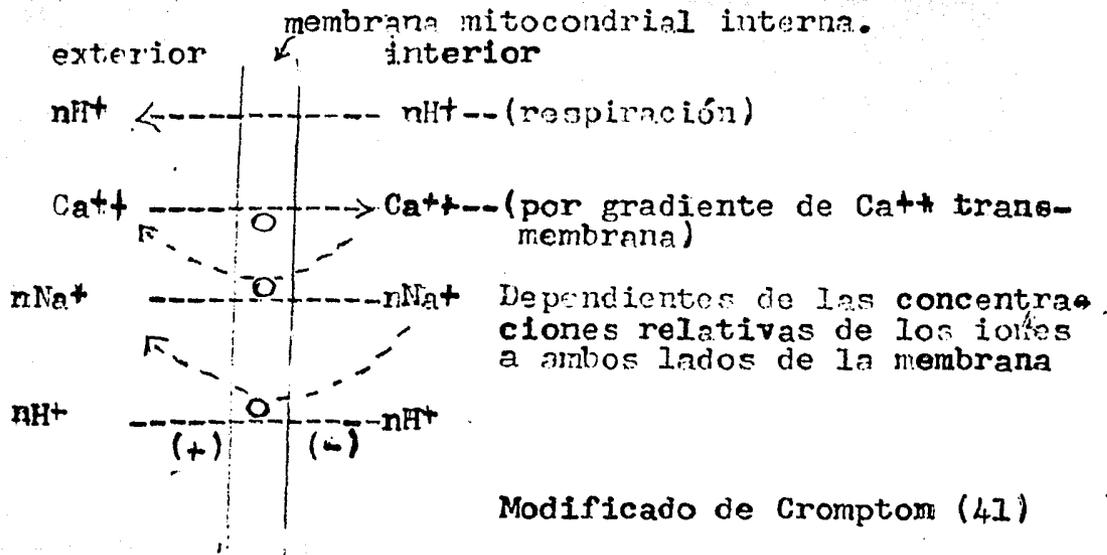
de ~ 10 μM , y por Ca^{++} (Mg^{++}) de entre 0.1 y 0.35 μM

D. Mitochondria

La mitocondria tiene la capacidad de captar Ca^{++} por medio de un acarreador unidireccional cuyo funcionamiento requiere de ATP o de la energía producida por la cadena de transporte de electrones (el Ca^{++} introduce 2 cargas positivas para neutralizar la salida de protones, la cual no se acompaña por salida de aniones (37)). El acarreador unidireccional es sensible a concentraciones fisiológicas de Mg^{++} (38), y a rojo de Rutenio (37). Según Carafoli (38), la entrada del Ca^{++} resulta ser pasiva por responder al gradiente de protones, el cual es un proceso electrogénico.

En cuanto a los sistemas de liberación de Ca^{++} , se sabe que las mitocondrias de tejidos excitables pueden liberar Ca^{++} por medio de un sistema antiportador independiente de la ruta de entrada (37,39) a cambio de la entrada específica de Na^+ (aunque el Li^+ puede producir un efecto similar pero cuantitativamente menor) (27,38). La capacidad del sistema es de 4 nmol de Ca^{++} / mg de proteína/3 min. (40), y por estar asociado a movimiento de protones (41), resulta ser un proceso electroneutral (42). Este proceso es más sensible a elementos de la serie lantánida que el sistema de captación (39). También se sabe que su función se acelera con rojo de Rutenio (38), es saturable por Na^+ y dependiente del estado energético de la célula, y de las concentraciones relativas de iones (38).

El esquema de los sistemas de captura y liberación de Ca^{++} en mitocondria es el siguiente:



Existe otro sistema de eflujo de Ca^{++} mitocondrial de similar capacidad al anterior que se encuentra en tejidos excitables y no excitables. Lehninger (37) demuestra la existencia de un eflujo de Ca^{++} que depende del estado Red-Ox de los nucleótidos de piridina; independiente de Na^+ , de la respiración, y del estado Red-Ox de las flavoproteínas. Sin embargo, dicho sistema parece ser demasiado lento para las necesidades de los tejidos excitables.

¿Cuál ó cuales de los sistemas antes mencionados pueden tener mayor relevancia en la aportación de Ca^{++} (excluyendo la penetración de Ca^{++} externo), y por ende, en la liberación de neurotransmisores?

A pesar de que las proteínas captadoras de Ca^{++} tienen una elevada afinidad por el ión, su capacidad es bastante baja, ya que en axón de calamar sólo llega a "secuestrar" entre un 5 y un 10 % de la cantidad total de Ca^{++} en el axoplasma (15); por lo que no parecen constituir un sistema suficiente para regular la $[\text{Ca}^{++}]_i$.

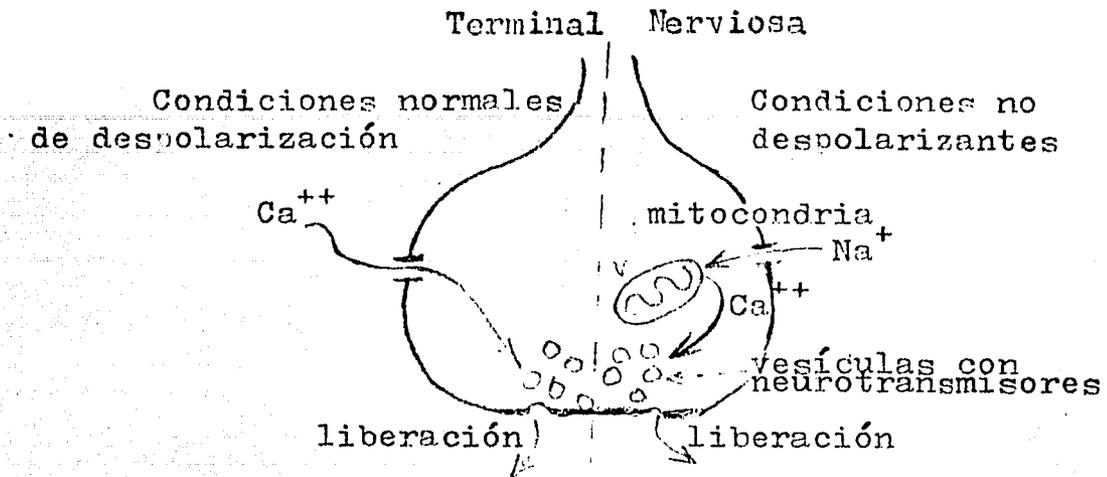
En cuanto al retículo endoplásmico, tiene una $K_{\text{Ca}^{++}}$ de $0.35 \mu\text{M}$, por lo que a concentraciones de Ca^{++} de $0.7 \mu\text{M}$ se encuentra ya saturado. A diferencia de éste, la mitocondria tiene una $K_{\text{Ca}^{++}}$ más elevada ($1.5 \mu\text{M}$) por lo que no se satura hasta una $[\text{Ca}^{++}]_i$ de $\sim 3 \mu\text{M}$. Si consideramos que ambos sistemas de captación de Ca^{++} son antagonizados por una elevada concentración de Na^+ en citoplasma, el sistema que más Ca^{++} liberaría por este factor sería la mitocondria. La aportación en este caso por parte de la mitocondria es aún mayor que la del retículo ya que, según Nicholls(43), rara vez

se llegan a ver membranas que puedan considerarse como retículo en micrografías electrónicas de sinaptosomas. Además, si consideramos cierta la proposición hecha por Nicholls (43) de que la $[Ca^{++}]_i$ se incrementa a $5 \mu M$ durante una despolarización, el primer sistema que se saturaría sería el del retículo, y al producirse la inducción de liberación de Ca^{++} por Na^+ , el primer sistema involucrado sería la mitocondria.

Además de lo anteriormente expuesto, existen otras evidencias que apoyan a la mitocondria como la estructura interna más probablemente involucrada en el control de la liberación de neurotransmisores mediante la regulación que ejerce sobre la concentración interna de Ca^{++} libre.

Por un lado, existen evidencias de que agentes que desacoplan la fosforilación oxidativa ó inhiben la cadena de transporte de electrones inducen la liberación de Ca^{++} previamente captado por mitocondrias, y estos mismos factores son capaces de inducir un incremento en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas (23,30,44).

Por otro lado, al elevar la concentración de Na^+ en el medio de suspensión de mitocondrias de tejidos excitables se observa un incremento en la liberación de calcio previamente captado (27,38-42); y en terminales nerviosas, el incremento en la concentración interna de Na^+ induce un incremento en la liberación pasiva e inducida de neurotransmisores (ver pág. 16). de tal forma que parece haber una estrecha relación entre los factores que afectan la liberación de neurotransmisores (en terminales nerviosas) y de Ca^{++} (en mitocondria). En base a lo anterior, se puede postular el siguiente esquema para el papel del calcio mitocondrial en la neuroliberación:



Aquí se añade al papel tradicional del Ca^{++} en la liberación de transmisores la aportación del calcio de mitocondria, inducida por sodio.

II. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL CALCIO MITOCONDRIAL

Bajo condiciones de despolarización, el Ca^{++} liberado por mitocondria parece ser de menor importancia a los procesos de liberación de transmisores ya que se promueve un incremento en la permeabilidad al Ca^{++} que, por estar en mucho mayor concentración en el exterior celular que en el interior, penetra en grandes cantidades. Sin embargo, existen varios procesos en los que parece ser relevante.

Para que la mitocondria pueda donar Ca^{++} se requieren las siguientes condiciones:

1. Que la neurona en que se encuentre haya sido despolarizada para permitir el acceso de Ca^{++} al interior celular y por lo tanto a los sistemas que lo sequestran, quedando así cargados del ión, mientras que el citoplasma tiende a

recuperar su concentración de Ca^{++} normal en reposo. (Obviamente se requiere también que los canales que permitieron el influjo de Ca^{++} a la terminal se hayan cerrado)

2. Concentraciones de Na^+ en el medio son suficientes para inducir una liberación de Ca^{++} de la mitocondria. Según Branton (30,40), concentraciones de Na^+ del orden de 1 mM son capaces de inducir liberación de Ca^{++} de mitocondrias aisladas incrementar así la $[Ca^{++}]$ en el medio a $2.5 \mu M$, en tanto que concentraciones mayores, como 20 mM, llegan a elevar el Ca^{++} externo hasta cerca de $5 \mu M$ (sin cambio en el medio, la $[Ca^{++}]_i$ permanece muy cerca de $1.5 \mu M$). (Como puede verse en la tabla de la pág. 9, aún la concentración de Na^+ intraterminal en estado de reposo, al menos en calamar - $50 \mu M$ - es suficiente para inducir un incremento en la liberación de Ca^{++} mitocondrial)

A. Importancia en el Estado de Reposo

Las condiciones anteriores se cumplen en el estado de reposo celular, durante el cual existe liberación de transmisores en forma discreta (es decir, en tan poca cantidad que no llega a provocar un potencial de acción en la célula a la cual excita). Este proceso puede muy bien deberse a la movilización de Ca^{++} mitocondrial que se ha descrito.

Podríamos aceptar la proposición de Nicholls (43) que sugiere que:

- 1) La $[Ca^{++}]$ citosólica durante el estado de reposo es de $0.1 \mu M$.
- 2) Durante la despolarización se eleva a $1-10 \mu M$.
- 3) Al ocurrir captación por mitocondrias desciende a $1 \mu M$.
- 4) Mediante el eflujo de Ca^{++} a nivel de la

membrana plasmática (que incluye la liberación del Ca^{++} mitocondrial para ser expulsado) la concentración de Ca^{++} citosólico regresa a $0.1 \mu\text{M}$.

Así, durante el proceso (4), en el que se transporta el Ca^{++} desde la mitocondria hasta la membrana plasmática (a través del citoplasma), el ión puede llegar a estar en contacto con los sistemas que inducen la liberación de transmisores y por de esta manera responsable de la liberación espontánea de los mismos como lo han sugerido Almers (30) y Wandoval (32).

B. Importancia en la Facilitación

Otro proceso en que parece estar implicado el Ca^{++} mitocondrial es la facilitación a largo plazo observada en crustáceos. Atwood (45) menciona que el fenómeno de facilitación en crustáceos, que es inducida por estímulos de alta frecuencia, se realiza en dos fases; una rápida y dependiente de Ca^{++} (facilitación a corto plazo) que ocurre durante los primeros 1-2 minutos, y otra más lenta a continuación de la primera dependiente de Na^+ (facilitación a largo plazo).

Atwood y Charlton (46) proponen la posibilidad de que el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ observado durante la estimulación repetitiva de la facilitación a largo plazo (en ausencia de Ca^{++} externo) provoque un incremento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$, y por lo tanto, estimule los mecanismos de neuroliberación.

C. Importancia en la Potenciación Post-tetánica

Sinks (17) sugiere que al disminuir la $[\text{Ca}^{++}]_i$ se

llega a producir un decremento en la potenciación post-tetánica, (Aunque Charlton -46- refiere varios artículos en los que se observa la potenciación aún en ausencia de sodio). También menciona que la frecuencia de los potenciales sinápticos miniatura (espontáneos) se incrementa, en un medio libre de Ca^{++} , por Ouabaina ó Digoxina (que incrementan la $[Na^+]_i$, y que en corazón se presenta menor contracción en ausencia de Na^+ que cuando lo hay (ambos en presencia de Ca^{++}). El mecanismo que Birks propone para la acción del Na^+ es el siguiente: Existe un acarreador $Na^+ - Ca^{++}$ en la membrana plasmática que tiene un sitio aniónico al cual se puede unir cualquiera de los dos iones dependiendo de sus concentraciones relativas ya sea en el interior ó en el exterior de la célula. Cuando el Na^+ se acumula en la terminal nerviosa, aumenta la probabilidad de unión a dicho sitio (y disminuye la probabilidad de que el Ca^{++} se una), por lo que sale más sodio que calcio y este último puede actuar en los sistemas de liberación de transmisores en mayor medida que en ausencia de Na^+ .

Para el caso de los potenciales miniatura, así como posiblemente para la facilitación a largo plazo, este mecanismo tendría la desventaja de que provocaría un bloqueo a la salida de Ca^{++} , que es indispensable para que la célula elimine el Ca^{++} que captura durante períodos de actividad. Si así ocurriera, la $[Ca^{++}]_{\text{citosólico}}$ se hallaría incrementada y afectaría los procesos enzimáticos dependientes de Ca^{++} que ahí se realizan.

Parece muy probable, en base a lo anterior, que la mitocondria constituya un regulador indirecto de algunos de los procesos de liberación de transmisores, y este proyecto intenta apoyar esa idea.

En este trabajo se propone el estudio de la liberación del ácido gamma amino butírico (GABA) de terminales nerviosas aisladas bajo condiciones en que las concentraciones de los iones Ca^{++} o Na^+ se encuentran elevados en las terminales.

III. SINAPTOSOMAS

Las terminales axónicas aisladas (sinaptosomas) se preparan por homogeneización de tejido nervioso y se separan por centrifugación (47,48,49). Se sabe que los sinaptosomas retienen características propias de las terminales nerviosas in vivo, entre las que podemos citar las siguientes:

1) Mantienen una morfología similar a la que tienen in situ: forma regular, presentan vesículas y mitocondrias en su interior, así como engrosamiento de la región membranal de la presinapsis (47,48). Esto demuestra que la región de la membrana que une al botón sináptico con el axón se cierra durante la homogeneización para formar estructuras selladas de forma casi esférica.

2) Conservan la capacidad de consumir oxígeno ($\sim 60 \mu\text{mol/h}/100 \text{ mg}$ de proteína), el cual se incrementa casi al doble cuando los sinaptosomas se estimulan con Veratrina -que induce despolarización de estas estructuras y, por lo tanto, mayor actividad metabólica (49).

3) Pueden transformar glucosa hasta CO_2 (47).

4) Se ha demostrado que los sinaptosomas pueden acumular neurotransmisores a través de un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de Na^+ (47,49) y que liberan tanto los neuro-

transmisores exógenos acumulados como los endógenos cuando se someten a tratamientos que incrementan la $[Ca^{++}]_i$. Esta liberación es antagonizada por inhibidores del transporte de Ca^{++} inducido por despolarización, de la misma manera que se ha observado en preparaciones más completas del SN como rebanadas de cerebro o placa neuromuscular (65,66,67,68,69,28).

5) Conservan un potencial de membrana dependiente de la $[K^+]_e$ (50).

6) Se ha demostrado la integridad de la membrana sinaptosomal a través de medir la actividad de la deshidrogenasa láctica (47,50), NADPH-citocromo C reductasa (50) y acetil-colina-transferasa (49) en la suspensión de sinaptosomas; esta actividad se incrementa cuando se rompen las membranas con detergente. También se probó la actividad de la ATPasa Na^+-K^+ y la ATPasa Mg^{++} , así como la de la acetilcolinesterasa (47,49).

Bradford (51) ha reportado que los sinaptosomas mantienen buena respiración, retención de K^+ , ATP y fosfocreatina dentro de un lapso de 3 horas si el medio de suspensión contiene glucosa (la funcionalidad se mantiene aún mejor si los sinaptosomas se agrupan formando una cama). Aunque se puede aumentar su respiración por estimulación eléctrica aún 24 horas después de su obtención, los aminoácidos transmisores comienzan a perderse en grado considerable a los 45 minutos de incubación.

IV. G A B A

De entre los neurotransmisores se eligió el GABA debido a

su abundancia en el cerebro. Se ha estimado que un tercio de las sinapsis del cerebro lo emplean como transmisor. El GABA es un aminoácido que se produce casi exclusivamente en el SNC y no se incorpora a las proteínas. En el SNC el GABA funciona como un neurotransmisor inhibitor (14).

V. L I P O S O M A S

Los liposomas son vesículas artificiales de lípidos. Dependiendo del método utilizado para su preparación pueden estar formados por una (unilamelares) o varias (multilamelares) bicapas concéntricas entre las cuales queda atrapada una parte de la solución en la que son preparados (52) y pueden ser de varias formas y tamaños.

Se ha observado que el contenido atrapado por los liposomas puede transferirse a diversos tipos celulares mediante endocitosis o fusión (52).

Las neuronas no llevan a cabo endocitosis, por lo que aquí se describirán solamente las evidencias que apoyan la existencia de un proceso de fusión entre liposomas y células no fagocíticas.

Varios trabajos reportan que se observan los efectos de AMP cíclico y actinomicina D en el citoplasma de células cultivadas y se ha detectado autorradiográficamente una distribución uniforme de inulina en eritrocitos después de que estas células fueron incubadas en presencia de liposomas que contenían cada una de las sustancias mencionadas (52). También se demostró por histoquímica la presencia de liposomas con peroxidasa en el interior de fibroblastos

que se incubaron con liposomas multilamelares que contenían la enzima. Por otro lado, se han obtenido micrografías electrónicas que muestran parches en la membrana de eritrocitos que, después de haberse incubado con liposomas multilamelares, se sometieron a la técnica de criofractura (52).

Estas, además de otras evidencias (52), sugieren que las células incubadas en presencia de liposomas pueden recibir el contenido de los mismos mediante la fusión de sus membranas. En base a ello, los liposomas han sido en varias áreas científicas como herramientas o como elementos de estudio. En biología celular han tenido las siguientes aplicaciones: (52)

- 1) Actuar como modelos en el estudio de fenómenos fisiológicos de fusión y adsorción.
- 2) Promover fusión célula-célula.
- 3) Transferir moléculas hidrosolubles impermeantes al interior celular.

Debido a que no son inmunogénicos ni tóxicos, y son biodegradables, se ha intentado usarlos clínicamente como introductores de medicamentos a seres vivos (53).

Algunos autores han utilizado liposomas para alterar el contenido iónico en células de la médula adrenal (27) o en unión neuromuscular de rana (20) para observar sus efectos sobre la neurosecreción. El uso de liposomas para este fin tiene la conveniencia de poder alterar el contenido iónico de las células o de las terminales nerviosas en forma muy específica, evitando la presencia de dichos iones en el medio en forma libre y, por lo tanto, sus efectos sobre los fenómenos en estudio.

De los diferentes liposomas que pueden prepararse, los multilamelares tienen la desventaja de que al fusionarse solo liberan el volumen contenido entre sus dos membranas mas externas hacia el interior de las células, permaneciendo el volumen restante encapsulado y, por lo tanto, inactivo. En cuanto a los liposomas unilamelares grandes, que pueden transferir mayor volumen, alteran más drásticamente la distribución lipídica y proteica en la membrana celular y podrían llegar a afectar el sistema responsable de la liberación de neurotransmisores. Considerando lo anterior, en este estudio se utilizaron liposomas unilamelares pequeños.

VI. IONOFOROS Y FORMADORES DE CANALES

Debemos mencionar que existen otros medios para introducir iones a las células; uno es a través de ionóforos, y otro por formadores de canales. Tanto los ionóforos como los formadores de canales son moléculas que se asocian a la membrana y facilitan el paso de iones a través de ella en la dirección que marca el gradiente de concentración que presenta un ión a ambos lados de la misma.

Un ionóforo es una molécula que se disuelve en los lípidos de la membrana y se difunde a través de ella. Debido a que sus características fisico-químicas le permiten asociar un ión, lo pueden transportar a través de la membrana (54). Se clasifican como neutrales cuando no tienen carga propia, y como carboxílicos cuando tienen un grupo carboxilo disociado a pH 7.

Un formador de canal no difunde, sino que queda fijo en la membrana, quedando uno de sus extremos en contacto con el medio externo y otro con el medio interno a la membrana. Más precisamente,

dos o más de estas moléculas parecen agruparse y dejar entre ellas un espacio acuoso que permite el paso de iones a uno u otro lado de la membrana.

La diferencia en los mecanismos de funcionamiento de ambos tipos de moléculas da como resultado que los formadores de canales sean más eficientes en la facilitación del paso de iones ya que no requieren difundirse como los ionóforos (54). Los formadores de canales que se conocen permiten el paso a iones monovalentes y, muy lentamente a los divalentes. Ciertos ionóforos transportan sólo iones monovalentes; otros transportan casi exclusivamente iones divalentes. El grado de especificidad que posee cada uno para los iones correspondientes es muy variable.

La utilización de estas moléculas para modificar específicamente la concentración de iones en las terminales nerviosas parece limitada debido a que:

1) Para modificar la concentración interna de varios iones en una célula por medio de estas moléculas, se deberían utilizar diferentes ionóforos o formadores de canales, lo cual haría difícil el estudio de la cinética de los eventos de interés ya que la velocidad a la cual los diferentes ionóforos o formadores de canales modifican la concentración interna celular es muy variable.

2) En el caso de usar ionóforos:

A) Los ionóforos carboxílicos tienen la desventaja de que necesariamente median el intercambio del ión que quiere introducirse por protones u otros iones internos a través de la membrana aún sin inducir una modificación eléctrica neta en ella. Ello implica que la modificación fisiológica en la célula no solo estaría dada

por la entrada del ión que facilita el ionóforo, sino además por la depleción del ión interno que salga a cambio del externo; lo que impediría relacionar directamente al ión con el efecto observado.

B) El uso de ionóforos implica la presencia continua de un ión dado en el medio de incubación. El efecto que este ión tuviera fisiológicamente sería variable de acuerdo a la permeabilidad que para esta especie ionica presente la membrana misma en reposo.

3) En el caso de usar formadores de canal o ionóforos neutrales, el único requisito a cumplir es el de usar una concentración externa elevada del ión que se quiere introducir, para dirigir el transporte sólo hacia el interior celular. A este respecto, se tendrían problemas con la elevación de la concentración externa de K^+ en las terminales ya que dicha elevación produce eflujo de neurotransmisores (22). El K^+ es un ión que se pretende usar en etapas posteriores del proyecto como control para conocer la especificidad del incremento de la concentración interna del ión monovalente Na^+ sobre la liberación de neurotransmisores. Además, sólo existen ionóforos neutrales con especificidad para iones monovalentes, y los formadores de canales transportan cationes divalentes muy lentamente.

4) Por otro lado, en etapas posteriores del proyecto, se deberán introducir moléculas a las terminales nerviosas ya sea para cuantificar la $[Ca^{++}]_i$ (Arsenazo III) o para disminuir la $[Ca^{++}]_i$ (ácido etilenglicol-tetraacético, EGTA), y debe mantenerse, hasta donde sea posible, la estandarización del sistema usado.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

1.- Preparación de Sinaptosomas

Entre los métodos de obtención de sinaptosomas, uno muy utilizado es el descrito por Hajos (48). Este método, con pequeñas variantes fué el que se usó en los experimentos. El proceso consiste en homogeneizar el cerebro completo de ratas Wistar (entre 180 y 220 g.) en 10 ml. de sacarosa 0.32M en un homogeneizador con mazo de teflón. El homogeneizado se centrifuga a 1100 x g durante 10 minutos en una centrífuga Beckman modelo J 2- 2 l. Se deshecha el precipitado (que contiene núcleos, mielina, y fragmentos grandes de células rotas) y se centrifuga el sobrenadante a 8320 x g durante 25 minutos. El precipitado de esta centrifugación se resuspende en 5 ml. de sacarosa 0.32 M, y 5 ml. de esa suspensión se colocan sobre 20 ml. de sacarosa 0.8 M evitando que se mezclen. Este gradiente se centrifuga a 7470 x g durante 25 min. En esta centrifugación se separan 3 fracciones. La fracción superior (sacarosa 0.32 M) contiene principalmente axones mielinizados; la segunda (sacarosa 0.8 M) contiene aproximadamente 89% de sinaptosomas, 9% de mitocondrias, 1% de axones mielinizados, y 1% de partículas no identificadas; la tercera fracción (pastilla) contiene principalmente mitocondrias (48). Se extrae la segunda fracción con una pipeta Pasteur y se diluye hasta una concentración de 0.32 M con agua bidestilada fría; ésta se agrega en forma lenta y con agitación continua para evitar que los sinaptosomas sufran un choque osmótico. La suspensión de sinaptosomas se centrifuga a 18100 x g para obtener una pastilla final.

II. Acumulación de GABA - ³H por Sinaptosomas

La pastilla de sinaptosomas se resuspende en 10 ml de Ringer-Krebs conteniendo (mM) NaCl, 115; KCl, 3; NaH²PO⁴, 1.2; MgSO⁴, 1.2; NaHCO³, 25; glucosa, 10; CaCl², 2; y ácido aminooxiacético 0.1 (para evitar la degradación del GABA (56)). El pH del medio se ajusta a 7.4 gaseándolo con una mezcla oxígeno 95%-CO² (5%). 10 ml de la suspensión (~0.5 mg. de proteína/ml.) se incuban en agitación a 37^o C durante 3 min. Se agrega 1 μ Ci de una solución de GABA-³H (0.4 μ M en el volumen final de incubación). Esta suspensión se incubaba a 37^oC durante 10 min. y se centrifuga después a 18100 x g para recuperar los sinaptosomas en una pastilla libre de radiactividad externa. El precipitado se resuspende en 1.5 ml de glucosa 0.32 M. (34)

III. Preparación de Liposomas

Los liposomas unilamelares pequeños se prepararon de acuerdo a Covarrubias (57) de la siguiente manera:

-Se prepara una mezcla de fosfatidil colina (PC) y fosfatidil serina (PS) 3:1 (p/p) (40 mg) en cloroformo.

-Se agitan durante 5 min. en un tubo de ensayo.

-Se elimina el cloroformo evaporándolo con nitrógeno, haciendo girar el tubo lo más horizontalmente posible para que los lípidos secos formen una capa delgada que cubra sus paredes (De aquí en adelante, el proceso se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos).

- Se agrega 1 ml de la solución que se quiere que sea atrapada durante la formación de los liposomas (glucosa 0.32 M, CaCl₂ 60 mM/glucosa 140 mM, ó NaCl 140 mM/glucosa 40² mM).
- Se agregan 2 μ Ci de Inulina-¹⁴C para rastrear la eficiencia del atrapamiento del medio por los liposomas, así como su fusión a sinaptosomas.
- Se agita el tubo durante 5-10 min hasta desprender todo el lípido de las paredes (se han formado liposomas multilamelares).
- La suspensión se sonica en un baño de ultrasonido Cole Parmer 50/60 Hz, en frío, durante 10 min. repitiéndose este paso cuantas veces sea necesario hasta lograr que la solución esté transparente (lo que indica que la mayor parte de los liposomas multilamelares se han transformado en unilamelares pequeños).
- La suspensión se centrifuga a 100 000 x g para eliminar posibles liposomas multilamelares.
- El sobrenadante se hace pasar por una columna de Sephadex G 50-150 equilibrada con glucosa 0.32 M a un flujo de 1 ml/min. para eliminar el medio externo.
- Se escogen las fracciones eluidas que poseen mayor densidad óptica determinada por la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro Zeiss.

IV. Cuantificación del Volumen Atrapado por Liposomas Durante su Formación

Para cuantificar la eficiencia de atrapamiento de las soluciones a ensayar por los liposomas se agregaron a dichas soluciones 2 μ Ci de Inulina-¹⁴C. Se tomaron muestras de la suspensión por duplicado antes y después del paso por la columna de Sephadex, y se calculó el porcentaje retenido después de la cromatografía con respecto al valor inicial.

V. Fusión Sinaptosomas-Liposomas

Para la fusión entre los sinaptosomas y los liposomas, alícuotas de 0.5 ml de la suspensión final de sinaptosomas cargados con GABA- ^3H (~ 1.7 mg. de proteína) se mezclan con 1.5 ml de la suspensión de liposomas (~ 12.6 mg. de lípidos) ó glucosa 0.32 M (en el caso del control), y se añade una alícuota de LaCl_3 para dar una concentración final de $400 \mu\text{M}$ en la mezcla. El La^{+++} se utiliza como catalizador de la fusión y es importante que se añada al final, ya que si se agrega antes se propicia una aglutinación de los sinaptosomas ó bien, demasiada fusión liposoma-liposoma. La suspensión total se incubaba a 37°C durante 2 minutos.

VI. Cuantificación de la Fusión Sinaptosomas-Liposomas

Para cuantificar el porcentaje de contenido liposomal que ha sido descargado a los sinaptosomas, se sigue el procedimiento de fusión mencionado anteriormente, utilizando liposomas cargados con diferentes iones y con Inulina- ^{14}C . Se toman muestras por triplicado del medio de incubación y se filtran y lavan con 2 ml de glucosa 0.32 M para eliminar liposomas no fusionados. Se cuantifica la radiactividad retenida en los filtros y se calcula el porcentaje de radiactividad total de los liposomas que se queda en la fracción sinaptosomal filtrada. Se corre un control para cuantificar la adsorción de liposomas con radiactividad al filtro; éste consiste de una incubación de los liposomas sin sinaptosomas, completando el volumen equivalente con glucosa 0.32 M. Se filtran alícuotas por duplicado a los mismos tiempos y se determina la radiactividad en los filtros.

VII. Liberación de GABA-³H por Sinaptosomas

Con objeto de observar los efectos de los diferentes iones sobre la liberación de neurotransmisor por los sinaptosomas, se rastreó dicha liberación durante 14 minutos. Se tomó una muestra inicial de 150 μ l de la mezcla sinaptosomas-liposomas- $^{3+}$ y se cambia la temperatura de la incubación a 30°C para disminuir la velocidad de liberación del neurotransmisor, tomando muestras cada 2 minutos. Todas las muestras se filtraron por medio de la aplicación de vacío (15 mm Hg/cm² durante 15 seg), lavando inmediatamente con 2 ml de glucosa 0.32 M para eliminar radiactividad externa a los sinaptosomas. Los filtros (Bio-Rad de fibra de vidrio) se colocaron en viales que contenían detergente (Dodécil sulfato de sodio al 1% con EDTA -ácido etilen dinitrilo tetraacético - 20mM y ajustando el pH a 8 con NaOH) y se meten a una estufa a 70°C durante 20 min. para romper las membranas sinaptosomales y, ya fríos los viales, se les agregan 10 ml de Tritosol (58) para cuantificar la radiactividad de cada filtro. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman L S 7000 (6 Packard Tri-Carb 2425).

VIII. Funcionalidad de los Sinaptosomas Después de su Fusión a Liposomas

Con objeto de saber si los sinaptosomas mantienen sus características funcionales después de la fusión a liposomas, se hicieron los siguientes experimentos:

A) Liberación de GABA- ^3H por sinaptosomas (S) y Sinaptosomas Fusionados a Liposomas de Glucosa (S-LG) por Diferentes Agentes Despolarizantes.

A los sinaptosomas previamente cargados con GABA- ^3H , se les fusionó como va se ha descrito, con liposomas conteniendo glucosa 0.32 M. Alícuotas de la suspensión sinaptosomas-liposomas se colocaron en una caja de vacío que sostiene 8 filtros, y el medio se eliminó por succión: las muestras se lavaron 3 veces por filtración con 2 ml de la solución Ringer-Krebs ya descrita que contenía EGTA 1mM (ácido etilen-glicol tetra-acético). Estos lavados permiten la obtención de una línea basal de liberación de neurotransmisor constante. Una vez alcanzada la línea basal de liberación, las muestras recibieron un pulso de 30 seg. con la misma solución Ringer-Krebs (línea basal) ó con el medio conteniendo KCl 50 mM (reduciendo el NaCl), Veratrina (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ó el ionóforo para calcio A 23187 (10 μM). La radiactividad en los filtros y en los filtrados se cuantificó en tritosol.

B) Liberación de GABA- ^3H por S, S-LG, S-LCa (Sinaptosomas Fusionados a Liposomas de CaCl_2) y S-LEGTA (Sinaptosomas Fusionados a Liposomas de EGTA)

Se compararon las características de liberación basal e inducida por KCl 50 mM en S, S-LG, S-LCa, y S-LEGTA. El procedimiento fué similar al descrito en el inciso anterior. En este caso, el tratamiento: 2 ml de: a) Ringer-Krebs ó b) Ringer-Krebs con KCl 50 mM se aplica durante 30 seg en 3 ocasiones a los filtros, y se recogen por separado los perfusados de cada tratamiento. Se cuantificó la radiactividad liberada (lavados) y retenida (filtro) por los sinaptosomas como va se mencionó.

IX. Determinación de Lípidos en Liposomas

La cantidad de lípidos en las muestras de liposomas se cuantificó en base a fosfato orgánico. La técnica utilizada es la descrita por Ames (59).

- A 20 μ l de muestra se agregan 50 μ l de $Mg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ al 10% en alcohol etílico absoluto.
- La mezcla se evapora a sequedad en flama fuerte con agitación rápida hasta que el vapor café desaparezca (se deja enfriar el tubo).
- Se agregan 0.3 ml de HCl 1 N y se calienta en baño de H_2O hirviendo durante 15 min. (tapando el tubo con una canica) para hidrolizar hasta fosfato inorgánico cualquier pirofosfato formado en la incineración.
- La curva patrón se prepara con KH_2PO_4 en un rango entre 0 y 10 μ g llevados a un volumen final de 300 μ l con HCl 1 N.
- Se agregan 0.7 ml de mezcla ácido ascórbico - molibdato* a cada tubo.
- Se colocan los tubos a 45°C durante 20 min, y se lee su densidad óptica a 820 nm en un espectrofotómetro Zeiss

* Una parte de ácido ascórbico al 10% (p/v) en H_2O con 6 partes de Heptamolibdato de amonio $\cdot H_2O$ en H_2SO_4 1 N al 42%

(Se preparan soluciones estándar de PC y PS 3:1 en H_2O y se cuantifica el rendimiento de fosfato por mg de fosfolípido)

X. DETERMINACION DE PROTEINAS

El contenido de proteína presente en la suspensión de sinaptosomas se cuantificó por el método de Lowry (60).

La fosfatidil colina (L- α - fosfatidil colina tipo V-E), la fosfatidil serina (extracto cerebral de cerebro bovino tipo III), y la Veratrina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri). El GABA -³H y la Inulina - ¹⁴C se obtuvieron de New England Nuclear (Boston Massachusetts). El ionóforo de Ca⁺⁺ A 23187 se obtuvo de Calbiochem-Behring Corporation (La Jolla, California).

R E S U L T A D O S

I. Atrapamiento del Medio por Liposomas

La Tabla I muestra los porcentajes de atrapamiento del medio por liposomas preparados en diferentes soluciones. Se puede observar que en el caso de los liposomas de glucosa (L_G) el porcentaje de atrapamiento del medio es bastante uniforme, manteniéndose cerca del 3% del volumen inicial.

Por otro lado, el valor de atrapamiento de los liposomas de NaCl (L_{Na}) en dos casos se aproximan al valor de L_G (3%); sin embargo, en uno de los experimentos se llega a atrapar el 13%. Con lo que respecta a los liposomas de $CaCl_2$ (L_{Ca}), los valores obtenidos para los tres experimentos son muy diferentes.

II. Fusión Sinaptosomas - Liposomas

En la tabla I se encuentran los resultados obtenidos para la asociación de contenido liposomal a los sinaptosomas ("FUSION") durante los dos primeros minutos de incubación. Se expresan en igual forma que los resultados de atrapamiento.

Nuevamente se observa que en el caso de L_G la asociación a sinaptosomas es bastante uniforme. De los datos de L_{Ca} dos se encuentran a los valores de L_G : sin embargo, un dato se aleja bastante, en tanto que para L_{Na} se tienen solamente dos datos y muy diferentes entre sí. La variabilidad de los resultados es mayor para L_{Ca} y L_{Na} que para L_G : sin embargo, se mantienen dentro del

	Liposomas Glucosa	Liposomas CaCl ₂	Liposomas NaCl
A) % de Atrapa- miento de medio por liposomas	2.9 ± 0.53 (8)	6.18 / 2.9; 6.2 9.5 / (3)	6.3 / 2.6; 13.3 3.1 / (3)
B) % de Fusión Liposomas- -Sinaptosomas	14.03 ± 1.87 (8)	12.36 / 14.21; 13.1 7.7 / (3)	10.0 / 6.5; 13.5 / (2)

Tabla I.- A) Porcentaje de atrapamiento de medio por liposomas preparados en diferentes soluciones.

B) Asociación de contenido liposomal a sinaptosomas a los dos minutos de incubación.

En ambos casos se expresan el promedio y el error estandard de varios experimentos cuyo número se expresa entre paréntesis; para un número de experimentos igual ó menor a 3, se expresan además los valores individuales de los mismos.

mismo orden de magnitud.

III. Efecto de la Fusión de LG Sobre la Funcionalidad de Sinaptosomas

En la figura 1 se puede observar la liberación de GABA-³H espontánea e inducida por diferentes medios tanto en sinaptosomas solos (S) como en sinaptosomas fusionados a LG (S-LG). Se puede ver que la fusión de LG a sinaptosomas previamente cargados con GABA-³H no modifica la línea basal de liberación del neurotransmisor. Además, cuando se estudió la liberación de GABA-³H dependiente de Ca⁺⁺ e inducida por KCl, Veratrina, ó el ionóforo A 23187, los valores obtenidos tanto para los sinaptosomas control como para S-LG son semejantes.

IV. Efecto de la Fusión Entre Sinaptosomas y LG, LCa, ó LNa Sobre la Liberación Espontánea de GABA-³H

En la figura 2 se observa la cinética de liberación espontánea de GABA-³H por S y S-LG durante 14 minutos después de iniciada la fusión. Se observa que a los 14 minutos la retención de GABA-³H por S es de aproximadamente 91%, mientras que el retenido por S-LG al mismo tiempo es de 87%.

Contrastando con esa diferencia mínima de liberación entre S y S-LG, en la figura 3 se muestran las liberaciones espontáneas para S y S-LCa. A los 14 minutos, S-LCa retiene únicamente ~65% de la radiactividad original de la preparación, resultando en

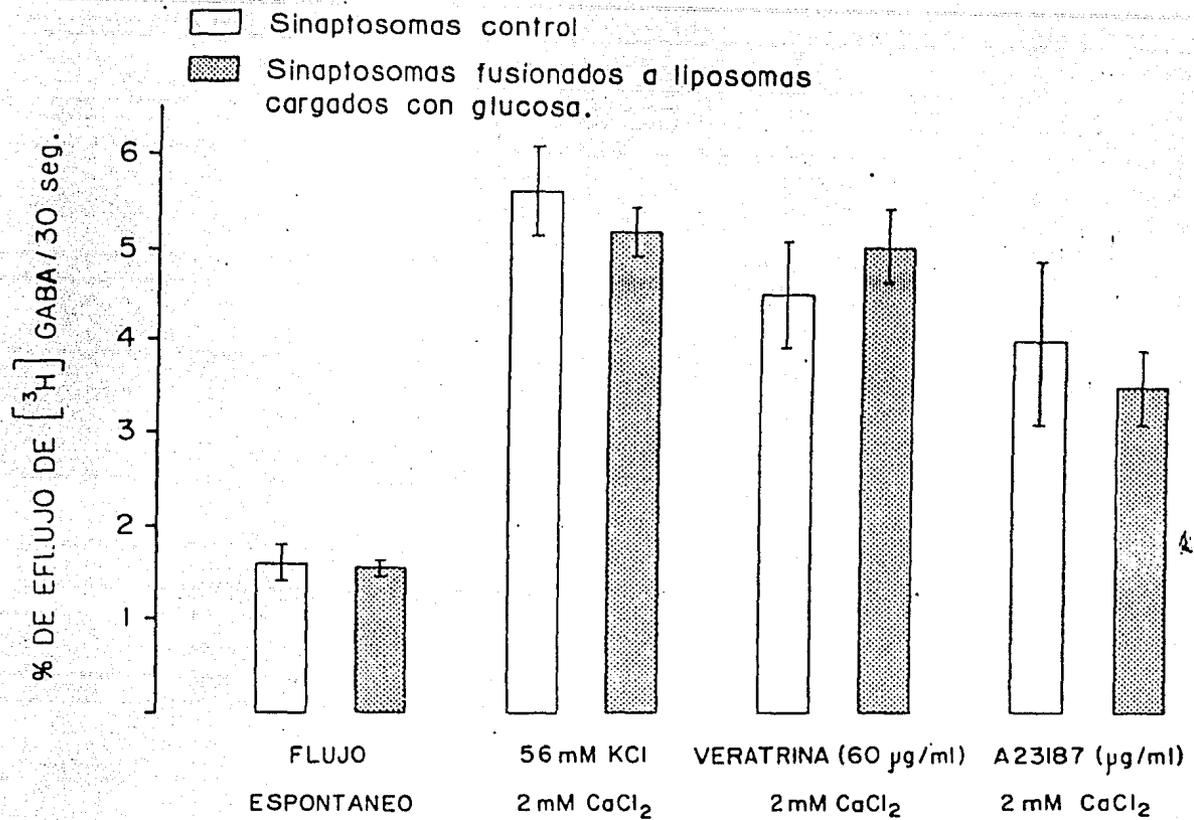


Figura 1.- Efecto de la fusión de sinaptosomas a liposomas cargados con glucosa sobre la liberación espontánea y la liberación dependiente de calcio de GABA- ³H inducida por KCl 56 mM, Veratrina ó el ionóforo de calcio A 23187. Cada barra representa el porcentaje de GABA- ³H liberado por la preparación al someterse al medio correspondiente durante 30 seg. Los valores son promedio ± E.E. de 3 experimentos.

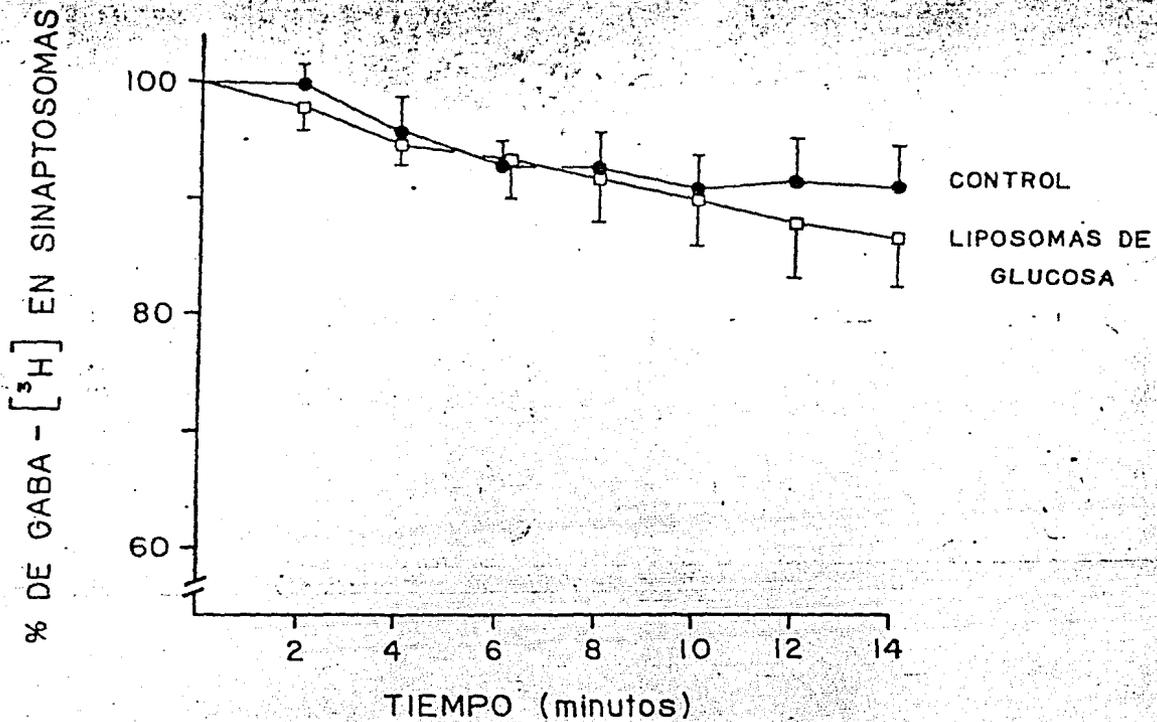


Figura 2.- Curso temporal de la liberación espontánea de GABA-³H por sinaptosomas control (S) y sinaptosomas fusionados a liposomas de glucosa (S-LG). Los resultados expresan el porcentaje de GABA-³H presente en los sinaptosomas a los tiempos indicados. Los valores representan el promedio \pm E.E. de 11 y 10 experimentos para S y S-LG respectivamente, realizados por duplicado. (ver valores de significancia en la página 52)

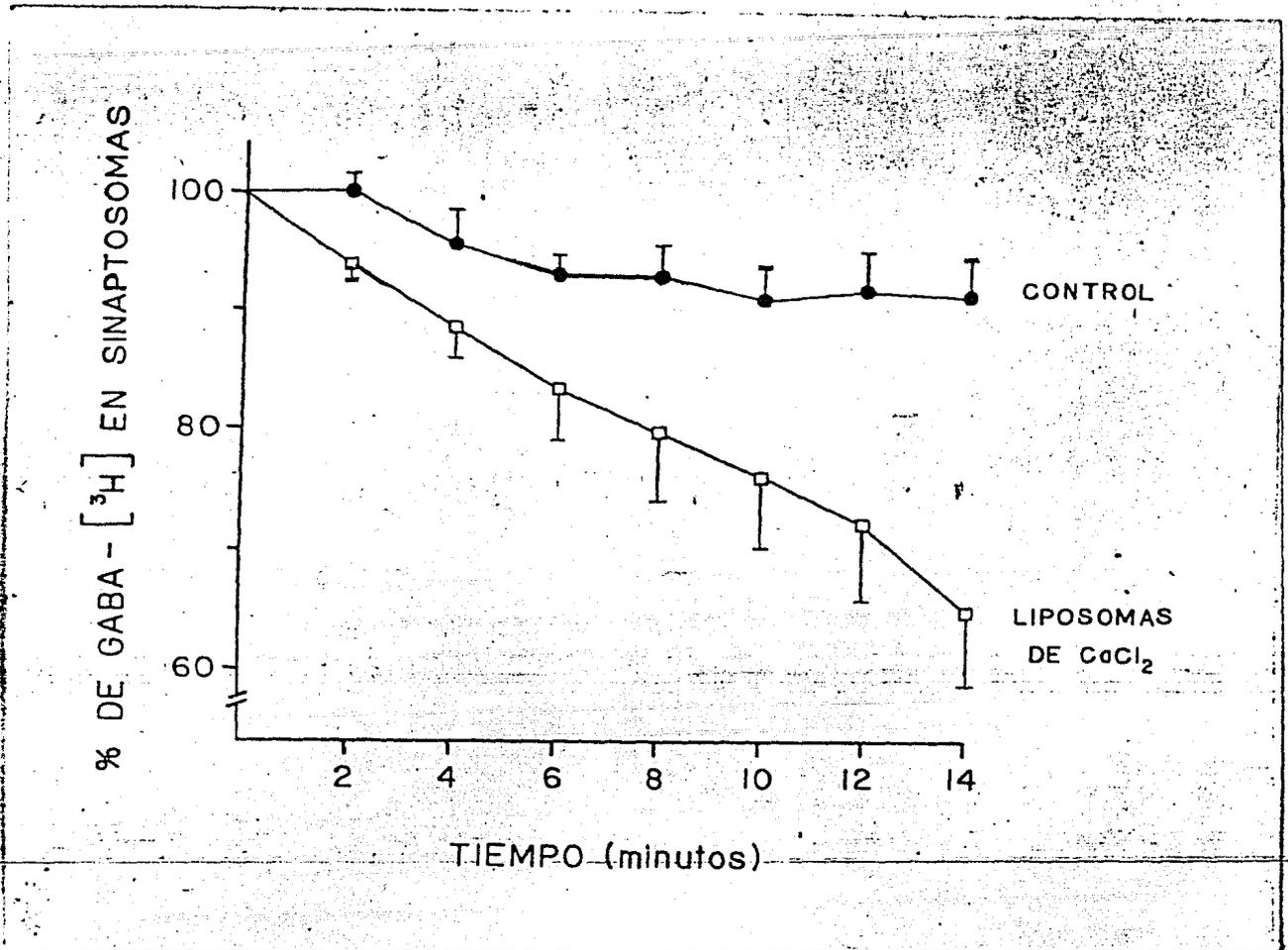


Figura 3.- Curso temporal de la liberación espontánea de GABA-³H por sinaptosomas control (S) y sinaptosomas fusionados a liposomas de CaCl₂ (S-^LCa). Los resultados expresan el porcentaje de GABA-³H presente en los sinaptosomas a los tiempos indicados. Los valores representan el promedio \pm E.E. de 11 y 6 experimentos para S y S-^LCa respectivamente, realizados por duplicado. (ver valores de significancia en la página 52)

un 26% de liberación mayor que en S y 22% mayor que S-LG. Tanto en S como en S-LG y S-LCa se puede observar un curso temporal de liberación uniforme, que indica que en todos los casos el factor responsable de la liberación actúa, desde el momento en que se inicia la incubación de fusión, en forma constante.

En el caso de S-LNa (figura 4), la retención de GABA-³H a los 14 minutos es de ~81% que, comparada con la liberación de S-LG de los mismos días de efectuado el experimento, liberan 12% más. El curso temporal de la liberación del neurotransmisor por S-LNa tampoco muestra grandes variaciones.

En la figura 5 se pueden comparar directamente las liberaciones netas de GABA-³H por S, S-LG, y S-LCa. Mientras S-LG solo libera un 44% más de GABA-³H que S, S-LCa libera un 288% más que el mismo control (ó 169% más que S-LG).

(Aunque en esta figura no se incluyen los resultados de S-LNa, debido a que el número de experimentos que de éste se tienen es menor que el de S-LG ó S-LCa, dicho sistema libera un 171% más que S-LG para el mismo día de efectuado el experimento)

V. Liberaciones Basales e Inducidas en S, S-LG, S-LCa, y S-LEGTA

En la figura 6 se pueden apreciar las diferencias en liberación espontánea e inducida, en sinaptosomas sometidos a diferentes condiciones. Se observa que la liberación basal es muy similar (~ 2.5%) tanto en S, como en S-LG y S-LEGTA, aunque en S-LCa es un poco más alta en todos los pulsos. La liberación inducida

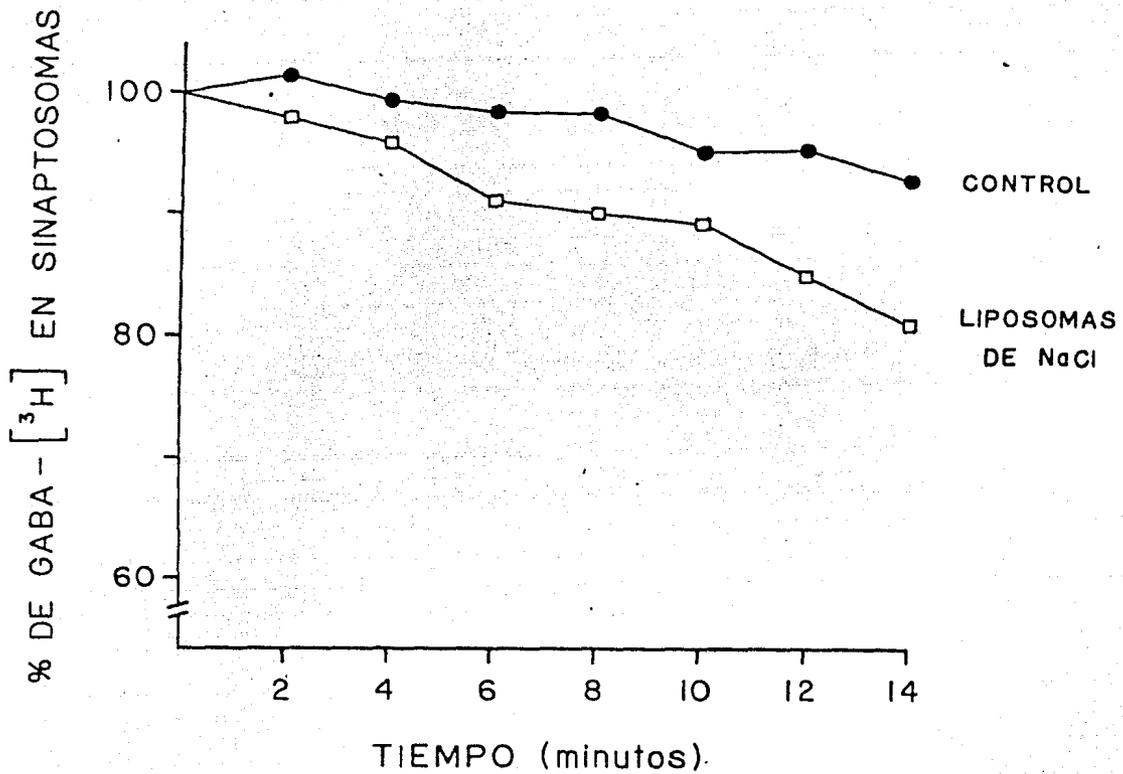
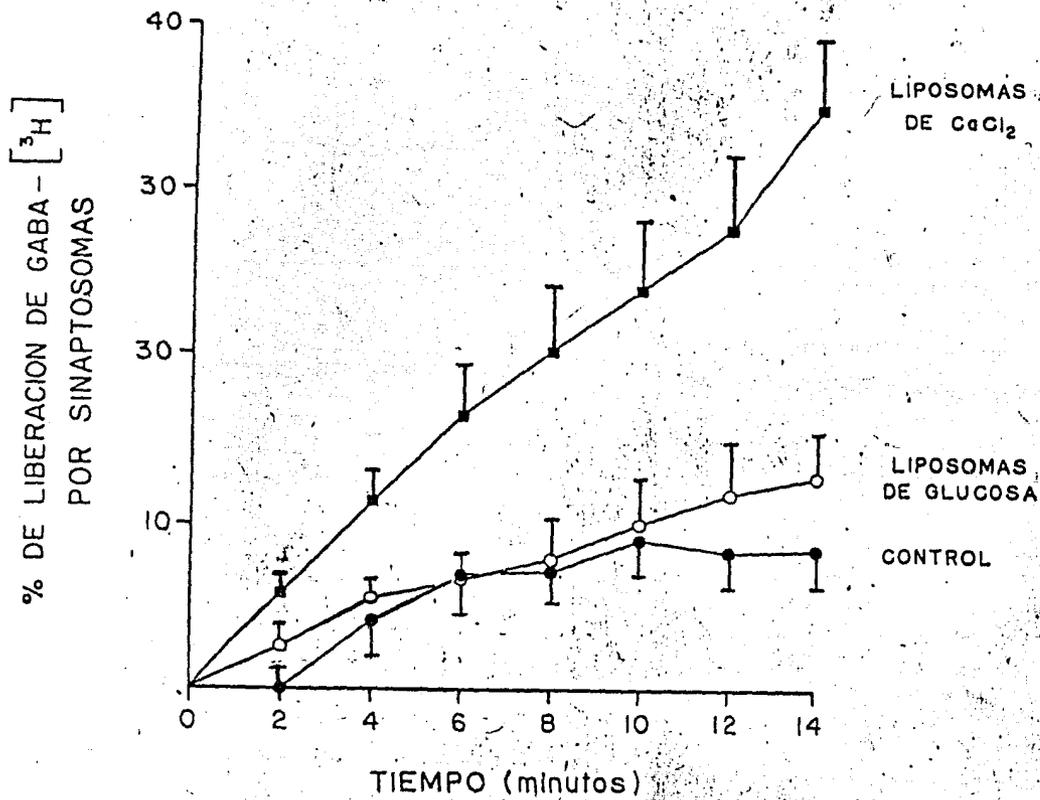


Figura 4.- Curso temporal de la liberación espontánea de GABA-³H por sinaptosomas control (S) y sinaptosomas fusionados a liposomas de NaCl (S-LNa). Los resultados expresan el porcentaje de GABA-³H presente en los sinaptosomas a los tiempos indicados. Los valores representan el promedio \pm E.E. de 2 experimentos realizados por duplicado.



Tiempo (minutos)	Significancia, por prueba de t. Valores de p para:	
	S vs. S-LG	S-LG vs. S-L _{Ca}
2	> 0.2	< 0.2
4	>> 0.6	< 0.05
6	>> 0.9	< 0.05
8	> 0.8	< 0.1
10	> 0.8	< 0.05
12	> 0.5	= 0.05
14	> 0.3	< 0.01

Figura 5.- Resumen comparativo de las curvas de liberación neta de GABA-³H por sinaptosomas control (S), sinaptosomas fusionados a liposomas de glucosa (S-LG), y sinaptosomas fusionados a liposomas de CaCl₂ (S-L_{Ca}). Los resultados expresan el porcentaje de GABA-³H liberado al medio por los sinaptosomas a los tiempos indicados.

Los valores representan el promedio E.E. de 11, 10 y 6 experimentos para S, S-LG y S-L_{Ca} respectivamente, realizados por duplicado. La tabla anexa muestra los valores de significancia obtenida por la prueba de t cuando se compararon los datos de S contra los de S-LG o los de S-LG contra los de S-L_{Ca} para sus tiempos correspondientes.

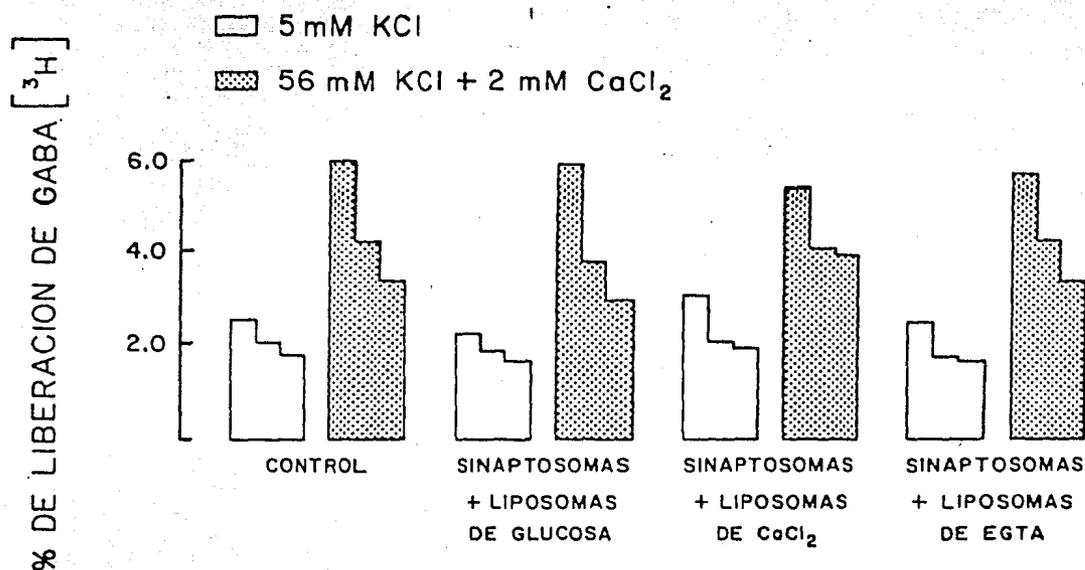


Figura 6.- Porcentajes de liberación basal e inducida de GABA-³H en sinaptosomas. Las ordenadas muestran el porcentaje de GABA-³H liberado por sinaptosomas control, sinaptosomas fusionados a liposomas de glucosa, sinaptosomas fusionados a liposomas de CaCl₂, sinaptosomas fusionados a liposomas de EGTA, después de ser sometidos a 3 lavados de 30 seg. con 2 ml. de medio Ringer-Krebs conteniendo KCl 5 mM (liberación basal -barras blancas) ó KCl 56 mM + 2 mM de CaCl₂ (liberación inducida -barras punteadas). Los valores representan el promedio de 3 experimentos.

también es muy similar en S, S-^LG, y S-^LEGTA, y ligeramente más baja en S-^LCa.

D I S C U S I O N

En este trabajo se ha demostrado que es posible inducir la liberación de neurotransmisor previamente acumulado por sinaptosomas a través de la fusión de éstos a liposomas que contienen CaCl_2 o NaCl , y que los sinaptosomas así tratados conservan sus características funcionales relacionadas a la neurosecreción.

Aparentemente estos resultados no están dados por las diferencias de atrapamiento del medio por los diferentes liposomas o por el diferente grado de fusión de los distintos liposomas a los sinaptosomas.

En relación al volumen de medio atrapado por los liposomas unilamelares pequeños, es de $\sim 23 \mu\text{l}/40 \text{ mg PC}$ (20) o de 1% (61); por lo que los valores de estos experimentos, aún los más bajos ($20 \mu\text{l}/40 \text{ mg PL}$ equivalentes a un 2%) se pueden considerar dentro del rango reportado en la literatura. Con respecto a la estabilidad de las vesículas, Rasgado (62) menciona que liposomas preparados en forma similar a la utilizada en nuestro estudio, aunque de diferente composición lipídica (fosfatidil colina, estearilamina y colesterol 4:1:3) pierden el 17% de su contenido después de 5 horas de su preparación. Grosland (63) menciona que una hora después de su preparación los liposomas preparados con PC mantienen el 100% de su conte-

nido, aunque a las 2 horas pierden ya un 10%. Puesto que aún no tenemos el dato preciso, asumimos que nuestros liposomas se comportan en forma similar debido a que los porcentajes mínimos de captación sí corresponden a los normalmente obtenidos por otros autores.

En relación a la diferencia en el porcentaje de atrapamiento de medio por los liposomas en diferentes soluciones, es notable la variación individual que se presenta en L_{Na} y especialmente en L_{Ca} . Esto podría ser explicado por el hecho de que tanto L_{Na} como L_{Ca} tardaban más tiempo en sonicarse que L_G (comparense un mínimo de 2.5 hrs para L_{Ca} , o 40 min. para L_{Na} contra 15 min. para L_G). Seguramente, como reporta Pagano (52), los iones (especialmente el Ca^{++}) tienden a inducir la formación de láminas de lípidos e impiden la formación de vesículas pequeñas. Ello implicaría que aún con una excelente sonicación no se garantizaría la formación de vesículas tan pequeñas como en el caso de la glucosa y, teniendo una mayor relación volumen/área de superficie, pueden tener mayor porcentaje de captación; aunque esto no parece ofrecer una explicación a las variaciones individuales entre liposomas de igual contenido.

En los datos de fusión de los diferentes tipos de liposomas a los sinaptosomas se observó también que existe alta variación, principalmente en los de L_{Na} y L_{Ca} y muy poco para L_G . Aunque no se pudo encontrar relación alguna entre el porcentaje de atrapamiento por liposomas y el porcentaje de fusión, es obvio que debe haberla, ya que la diferencia de atrapamiento, cualquiera que sea su causa, produce una diferencia en las condiciones reales para cada uno de los sistemas trabajados ($S-L_G$, $S-L_{Na}$, $S-L_{Ca}$).

Es importante tener en cuenta que la técnica radiométrica utilizada para la detección de la fusión impone ciertas limitaciones. Por un lado, esta técnica no puede discriminar entre el volumen de liposomas que se ha fusionado realmente a los sinaptosomas y el que se halla simplemente adsorbido al exterior de su membrana. Ello cobra mayor importancia ante el reporte de Szoka (64) en el cual se menciona que una gran parte de la interacción liposoma-célula es precisamente adsorción. Por otro lado, existe ruido experimental dado por la adsorción de liposomas a los filtros. El valor de esta adsorción fué muy variable aunque independiente del contenido de los liposomas.

En relación a este punto, Rasgado (62) reporta una fusión liposoma-eritrocito en la que parece no haber tanta variación como la que existe en nuestros resultados. Probablemente esto se debe a que él realizó los lavados de las células fusionadas por medio de centrifugación, lo que elimina el factor de adsorción de liposomas a los filtros que observamos en nuestros resultados.

Como existe la posibilidad de que los liposomas con diferentes contenidos se fusionen en distinta proporción a los sinaptosomas, es obvio que se requiere cuantificar las fusiones de una manera más precisa.

Debido a que los liposomas son un sistema que va a modificar la composición de la membrana del sinaptosoma, era importante saber si esa modificación no producía algún efecto sobre las propiedades de neurosecreción. Los resultados indican claramente que S-LG funciona de igual manera que S en los procesos de liberación, tanto basal como estimulada por diversos factores despolarizantes, al menos pocos minutos después de la fusión. Es evidente,

sin embargo, que aunque tiende a verse una ligera diferencia en el comportamiento de $S-LCa$, ello no se observa en el caso de $S-LEGTA$ (el cual debería haber disminuído la liberación inducida con respecto al control). Los mínimos efectos observados sobre la liberación basal e inducida en estas fusiones se deben probablemente a que a los 2 min. la fusión no se ha realizado en proporción suficiente para producir efectos notables. Aunque no se tiene el mismo control al finalizar el período total de incubación de 14 min., el control que se muestra en la figura 2 es suficiente para afirmar que, en este tiempo, la liberación espontánea de $GABA-^3H$ no se modifica significativamente debido a la fusión per se. De esta forma, el incremento en la liberación de $GABA-^3H$ observado en $S-LCa$ y $S-LNa$ (figuras 3,4 y 5) puede ser explicado en base a una real transferencia de los iones a los sinaptosomas durante la fusión.

De esta forma, parece confirmarse la evidencia ya clásica (6, 13, 28) de la influencia del incremento en la $[Ca^{++}]_i$ en la liberación de neurotransmisores y, por lo tanto, la funcionalidad del sistema utilizado.

Rahamimoff (20) demostró que liposomas que contienen Ca^{++} producen un incremento en la liberación cuántica en la unión neuromuscular de rana. No se puede hacer una comparación cuantitativa ya que, aunque los liposomas que usan presentan un atrapamiento (23 μl /40 mg de PC) similar al de los experimentos aquí presentados (20 μl /40 mg de PL), no se presentaron los datos de fusión. Sin embargo, es interesante hacer notar que Rahamimoff usa una $[Ca^{++}]$ de 25 mM en LCa , en tanto que en este estudio se utilizó una concentración de 60 mM. Posiblemente exista una mayor transferencia de contenido de liposomas en el caso de la unión neuromuscular de la rana, pero no se

nuede descartar una posible cooperación de los liposomas en la post sinapsis.

En relación a esto, Rasgado (62) reporta que liposomas de fosfatidil colina, estearilamina y colesterol 4:1:3 conteniendo CaCl_2 6 mM en medio libre de sodio son capaces de inducir un 30% de incremento en la liberación basal de GABA- ^3H de sinaptosomas 15 minutos después de iniciada la fusión; aún cuando la relación sinaptosomas/liposomas fué ligeramente mayor de la utilizada aquí. El hecho de que el efecto se observe a tan baja concentración de Ca^{++} no es de extrañarnos debido a que en experimentos no reportados aquí, nosotros observamos el incremento en la liberación de GABA- ^3H inducida por liposomas con CaCl_2 aún con una relación liposomas/sinaptosomas 10 veces menor que la indicada para los experimentos aquí reportados. Sin embargo, el porcentaje de liberación reportado por Rasgado está sobreestimado debido a la forma de expresión de sus resultados.

Crosland (63) reporta un 30% de incremento en la liberación de acetilcolina de sinaptosomas fusionados a liposomas de PC conteniendo CaCl_2 113 mM después de incubar la mezcla 15 minutos. El método de preparación de liposomas es diferente al usado aquí, y como no reporta cantidad de lípidos en la mezcla sinaptosomas/liposomas, no se puede hacer comparación. No obstante, en cuanto a la liberación del neurotransmisor, sí parece correlacionar bien con los datos aquí expresados.

Considerando estos datos, se puede sugerir que la introducción de Ca^{++} a los sinaptosomas por medio de los liposomas efectivamente resulta en un aumento en su liberación de transmisores.

Con respecto a los resultados obtenidos para ${}^L\text{Na}$, se observa que su efecto en la liberación de GABA- ${}^3\text{H}$ no es tan claro como el efecto producido por ${}^L\text{Ca}$ cuando se compara con el promedio de $\text{S-}{}^L\text{G}$ totales. En este caso, $\text{S-}{}^L\text{Na}$ libera 111% más neurotransmisor que el control, pero solamente 46% más que $\text{S-}{}^L\text{G}$ (figura 5), que es aproximadamente la cuarta parte del efecto inducido por ${}^L\text{Ca}$. Obviamente no podía esperarse un efecto cuantitativo similar del Ca^{++} y del Na^+ sobre la neuroliberación, dado que sus mecanismos de acción son diferentes; el Ca^{++} actuando directamente sobre los sistemas de liberación, mientras el Na^+ necesita llegar hasta las estructuras que almacenan Ca^{++} en el interior de la terminal, inducir la liberación de este último, el cual deberá posteriormente llegar a los sistemas de liberación de la membrana de la terminal.

Rahamimoff (20) ha reportado un claro efecto de ${}^L\text{Na}$ sobre la neurosecreción en placa neuromuscular. También en este caso usan una menor concentración de Na^+ (116 mM) a la utilizada en este estudio (140 mM). Al parecer, como ocurre para el caso del calcio, los liposomas requieren una mayor concentración iónica para inducir efectos de liberación en sinaptosomas que en unión neuromuscular de rana.

El tiempo en que se detecta el efecto, tanto de ${}^L\text{Ca}$ como de ${}^L\text{Na}$ sobre la liberación de neurotransmisores en estas preparaciones es aparentemente muy variable. En la unión neuromuscular de la rana la respuesta se observa en segundos (20); en sinaptosomas toma varios minutos el poder discernir con claridad el efecto que ejercen los iones sobre la liberación como muestran nuestros datos y los de Crosland (63) (lo mismo ocurre en preparaciones de células de la médula adrenal, en las que Gutman (26) reporta un efecto por

L_{Ca} y L_{Na} a los 20 minutos de incubación). Esta diferencia no se debe tanto a un diferente comportamiento de las preparaciones mencionadas, sino más bien al grado de sensibilidad de los sistemas de detección utilizados. En la unión neuromuscular de la rana, la terminal nerviosa está unida a músculo, el cual responde a concentraciones de neurotransmisor mucho menores a las detectables por métodos químicos; además de que el detector está conectado a un amplificador de señales. En los sinaptosomas, aún cuando el efecto del ión sea inmediato, no se puede detectar adecuadamente hasta que se libera la suficiente cantidad de radiactividad detectable. En este último caso, el hecho de que a los 14 minutos de incubación continúe la liberación de GABA- 3H inducida por iones, lleva a pensar que el proceso de fusión no se completa a los dos minutos de incubación, sino que continúa realizándose y que podría no llegar a ser amortiguado completamente por la actividad de los sistemas intrasinaptosomales amortiguadores de Ca^{++} .

La fusión podría explicarse como una lenta pero constante internalización de las vesículas asociadas a las células, forma en que Szoka (64) asume que los factores de control de crecimiento, citotóxicos o componentes virales se introducen experimentalmente a las células por medio de liposomas. Algo interesante es que Szoka parece tener argumentos para asumir que una gran parte de la asociación liposoma-célula es simplemente adsorción. No obstante, los efectos fisiológicos reportados por Rahamimoff (20), Gutman (26), Crossland (63), y los presentados aquí, muestran que debe haber transferencia de los contenidos liposomales a las células en determinada proporción.

Un factor que podría estar involucrado en la liberación de GABA-³H observada en S-LCa y S-LNa sería la presencia de los iones liberados al medio de incubación (antes de la fusión) por ruptura de los liposomas. Sin embargo, es altamente conocido que los iones Ca^{++} , para poder entrar a la terminal nerviosa e inducir la neurosecreción, requieren la apertura de los canales de Ca^{++} (específicos y dependientes de voltaje), y que la entrada espontánea de Ca^{++} no estimula la liberación de neurotransmisores. También se ha descrito que desde el exterior de la membrana los iones Na^+ no incrementan la neurosecreción, sino que es necesario un incremento en la $[Na^+]_i$ (13).

Se ha reportado (61) que la penetración de sustancias a diversos sistemas biológicos por medio de liposomas no se hace a la velocidad o en la cantidad que se esperaría si el contenido liposomal fuese liberado al medio y luego difundiera a la célula. Aparentemente, los liposomas actúan en una forma más activa en la introducción de sustancias a las células, aunque el mecanismo de transferencia aún no se conoce.

C O N C L U S I O N E S

El papel del calcio en la neurosecreción está ampliamente documentado; sin embargo, el papel del sodio no ha sido suficientemente estudiado. Nuestros datos apoyan la idea de que un incremento en la concentración de sodio interno puede inducir la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas.

En base a los resultados obtenidos, resulta claro que⁴ el sistema de introducción de iones a los sinaptosomas por medio de liposomas es adecuado para el estudio del control iónico de la neurotransmisión. Este trabajo demuestra que la liberación de neurotransmisores puede inducirse en sinaptosomas tanto por su fusión a liposomas conteniendo calcio, como a liposomas conteniendo sodio.

Un problema importante a resolver es la cuantificación de la fusión de los diferentes tipos de liposomas a los sinaptosomas. Como ya se indicó anteriormente, la técnica radiométrica aquí utilizada no permite afirmar que el grado de asociación entre los diferentes tipos de liposomas y los sinaptosomas sea semejante. Por lo que se hace necesario un conocimiento cuantitativo exacto del mismo.

Con el fin de definir este punto se ha empezado a montar en el laboratorio una técnica más sensible para cuantificar la fusión por medio de un compuesto fluorescente. Una vez resuelto este problema, se procederá a probar el efecto en la liberación de GABA-³H por

sinaptosomas fusionados a liposomas con una concentración de sodio más elevada, así como a liposomas con otros iones monovalentes y divalentes para comparar el grado de especificidad del sistema de neurosecreción por los iones mono- y divalentes. Posteriormente se investigará si el efecto del ión sodio es mediado por calcio intraterminal; y de ser así, a localizar la fuente de calcio endógeno, siendo la mitocondria el candidato inicial.

REFERENCIAS

1. Stebbins G.L., (1978) Procesos de la evolución orgánica. Prentice/Hall Internacional. España. 167-185
2. Smith H., (1960) Evolution of chordate structure. Holt Rinehart and Winston. New York. 447-492
3. Beltrán T., Rioja T., Alcaráz J., Ruiz M., Miranda F., y Larios I., (1970) Biología. E.C.I.A.L.S.A. México. 283-309
4. Abercrombie M., Hickman C., y Johnson M., (1966) A dictionary of biology. Aldine Publishing Co. Chicago. 28-29, 46-47
5. Hubel D.H., (1979) El cerebro. Investigación y Ciencia (38) 8-19
6. Cotman C.W., y McGaugh J.L., (1980) Behavioural neuroscience. Academic Press Inc. New York.
7. Price C.J., y Reed J.E., (1972) Histología. Ed. Herrero Hnos. México. 89-104
8. Ham A.W., (1974) Tratado de histología. Ed. Interamericana. México. 435-490
9. Steves C.F., (1979) La neurona. Investigación y Ciencia (38) 22-34
10. Selkurt E.E., (1975) Fisiología. Ed. El Ateneo. Buenos Aires 34-53
11. Kuffler S.W., y Nicholls J.G., (1976) From neuron to brain, a cellular approach to the function of the nervous system. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts.
12. Keynes R.D., (1979) Ion channels in the nerve membrane. Sci. Am. 240. (3) 126-135
13. Miles F.A., (1980) Excitable cells. William Heinemann Medical Books Ltd. London. 103-112
14. Iversen L.L., (1979) Química del cerebro. Investigación y Ciencia (38) 86-97

15. Blaustein M.P., Ratzlaff R.W., y Kendrick N.K., (1978) The regulation of intracellular calcium in presynaptic terminals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 307 195-212
16. Birks. R.I., y Cohen M.W., (1968) The action of the sodium pump inhibitors on neuromuscular transmission. Proc. Roy. Soc. B. 170 381-399
17. Birks R.I., y Cohen M.W., (1968) The influence of internal sodium on the behaviour of motor nerve endings. Proc. Roy. Soc. B. 170 401-421
18. Jansson S.E., Albuquerque E.X., y Daly J., (1974) The pharmacology of Batrachotoxin VI. Effects on the mammalian motor nerve terminals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 189 525-537
19. Barenholtz Y., Erulkar S.D., Meiri H., y Rahamimoff R., (1978) Increase in quantal transmitter release by calcium and sodium containing phosphatidilcholine liposomes. Proc. Physiol. Soc.
20. Rahamimoff R., Meiri., Erulkar S.D., y Barenholtz Y., (1978) Changes in transmitter release induced by ion containing liposomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 (1) 5214-5216
21. Meiri H., Erulkar S.D., Lerman T., y Rahamimoff R., (1981) The action of the sodium ionophore, Monesin, on transmitter release at the frog neuromuscular junction. Brain Res. 204 204-208
22. Havcock, J.W., Levy V.B., Denner L., y Cotman C.W., (1978) Effect of elevated K on the release of neurotransmitters from cortical synaptosomes, efflux or secretion? J. Neurochem. 30 1113-1125
23. Sandoval M.E., (1981) On the role of mitochondria in neurotransmitter release. de: Regulatory mechanisms of synaptic transmission. Ed. por Tapia R., y Cotman C.W., Plenum Publishing Co. New York.
24. Sandoval M.E., (1980) Sodium dependent efflux of 3H - GABA from synaptosomes probably related to mitochondrial calcium mobilization. J. Neurochem. 35 (4) 915-921

25. Vizi E.S., (1972) Stimulation by inhibition of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++})$ -activated ATPase of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. J. Physiol. 226 95-117
26. Gutman Y., Lichtenberg D., Cohen J., y Boonyaviroj P., (1979) Increased catecholamine release from adrenal medulla by liposomes loaded with sodium or calcium ions. Biochem. Pharmacol. 28 1209-1211
27. Carafoli E., y Crompton M., (1978) The regulation of intracellular calcium by mitochondria. Ann. N.Y. Acad. Sci. 307 269-284
28. Katz B., y Miledi R., (1970) Further study of the role of calcium in synaptic transmission. J. Physiol. 207 789-801
29. Rahamimoff H., y Spanier R., () Sodium dependent calcium uptake in membrane vesicles derived from rat brain synaptosomes. FEBS Let. 104 (1)
30. Alnaes E., y Rahamimoff R., (1975) On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. J. Physiol. 248 285-308
31. Blaustein M., y Wiesmann W., (1970) Effect of sodium ions on calcium movements in isolated synaptic terminals. Proc. Nat. Acad. Sci. 66 (3) 664-671
32. Baker P.F., Meves H., y Ridway R., (1973) Calcium entry in response to maintained depolarization of squid axons. J. Physiol. (London) 231 527-548
33. Kostyuk P.G., (1980) Calcium ionic channels in electrically excitable membranes. Neurosc. 5 945-959
34. Grand R.J.A., y Perry S.V., (1979) Calmodulin-binding proteins from brain and other tissues. Biochem. J. 183 285-295
35. Means A.R., y Dedman J.R., (1980) Calmodulin- an intracellular calcium receptor. Nature 285 73-77
36. Schweitzer E.S., y Blaustein M.P., (1980) Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. Free calcium levels measured with Arsenazo III. Biochem. Biophys. Acta 600 912-921

37. Lehninger A.L., Reynafarie B., Vercesi A., y Tew W.P., (1978) Transport and accumulation of calcium in mitochondria, Ann. N.Y. Acad. Sci. 307 160-176
38. Crompton M., Heid I., Baschera C., y Carafoli E., (1979) The resolution of calcium fluxes in heart and liver mitochondria using the lanthanide series. FEBS Let. 104 (2) 352-354
39. Crompton M., Capano M., y Carafoli E., (1976) The sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria. (a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium) Eur. J. Biochem. 69 453-462
40. Carafoli E., Tiozzo R., Lugli G., Crovetti F., y Kratzing G., (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Mol. Cell. Cardiol. 6 361-371
41. Crompton M., y Heid I., (1978) The cycling of calcium, sodium and protons, across the inner membrane of cardiac mitochondria Eur. J. Biochem. 91 599-608
42. Affolter H., y Carafoli E., (1980) The Ca^{++} - Na^{+} antiporter operates electroneutrally. Biochem. Biophys. Res. Comm. 95 (1) 193-196
43. Nicholls D.G., y Akerman K.E.O., (1981) Biochemical approaches to the study of cytosolic calcium regulation in nerve endings. Phil. Trans. Soc. Lond. B 000, 000-000
44. Sandoval M.E., (1980) Studies on the relationships between Ca^{++} efflux from mitochondria and the release of aminoacid neurotransmitters. Brain. Res. 181 357-367
45. Atwood H.L., Swenarchuk L.E., y Gruenwald C.R., (1975) Long term synaptic facilitation durin sodium accumulation in nerve terminals. Brain Res. 100 198-204
46. Charlton M.P., y Atwood H.L., (1977) Modulation of transmitter release by intracellular sodium in squid giant synapse. Brain Res. 134 367-371
47. Tamir H.M., Rapport M., y Róitzin L., (1974) Preparation of synaptosomes and vesicles with sodium diatrizoate. J. Neurochem. 23 943-949
48. Hajos F., (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. 93 485-489

49. Dodd P.R., Hardy J.A., Oakley A.E., Edwardson J.A., Perry E.K., y Delaunoy J.P., (1981) A rapid method for preparing synaptosomes: comparison with alternative procedures. Brain Res. 226 107-118
50. Hargittai P., Agoston D., y Nagy Á., (1982) Comparative biochemical and biophysical studies on rat brain synaptosomes. FEBS Let. 137 (1) 67-70
51. Bradford H.F., Jones D.G., Ward H.K., y Booher J., (1975) Biochemical and morphological studies on the short and long term survival of isolated nerve-endings. Brain Res. 90 245-259.
52. Pagano R.E., Weinstein J.N., (1978) Interaction of liposomes with mammalian cells. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7 435-468
53. Juliano R.L., (1981) Liposomes as a drug delivery system. Trends Pharmacol. Sci. (febrero) 39-41
54. Gomez-Puyou A., y Gomez-Lojero C., (1977) The use of ionophores and channel formers in the study of the function of biological membranes. de: Current Topics in Bioenergetics Vol. 6 Academic Press. New York 221-257
55. Pfeiffer D.R., Taylor R.W., y Lardy H.A., (1978) Ionophore A 23187; cation binding and transport properties. Ann. N.Y. Acad. Sci. 307 (4) 402-421
56. Tapia R., (1975) Biochemical pharmacology of GABA in CNS (introducción de: Handbook of psychopharmacology 4 Ed. por Iversen L.L., Iversen S.D., y Snyder S.H., New York)
57. Covarrubias M., y Tapia R., (1982) A procedure for detecting changes in the internal Ca^{++} concentration in isolated nerve endings using the metallochromic dye Arsenazo III. Neurosci. 7 1641-1646
58. Fricke U., (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on tritón-X-100. Anal. Biochem. 63 555-558

59. Ames B.N., y Dubin D.T., (1960) The role of polyamines in neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 235 (3) 769-775
60. Lowry H.O., Rosenbrough N.J., Farr A.L., y Randall ., (1975) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 265-275
61. Blumenthal R., Ralston G., Dragsten P., Lesserman L.D., y Weinstein J.N., (1982) Lipid vesicle-cell interactions: analysis of a model for transfer of contents from adsorbed vesicles to cells. Membr. Biochem. 4 (4) 283-303
62. Rasgado H.F., (1979) Estudios sobre fusión membranal en sistemas modelo, 1.- Fusión de liposomas a eritrocitos. 2.- Fusión de liposomas a sinaptosomas. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
63. Crosland R.D., Martin J.V., y McClure W.O., (1983) Effect of liposomes containing various divalent cations on the release of acetylcholine from synaptosomes. J. Neurochem. 40 (3) 681-687
64. Szoka F., Jacobson K., Derzko Z., y Papahadjopoulos D., (1980) Fluorescence studies on the mechanism of liposome-cell interactions in vitro. Biochim. Biophys. Acta 600 1-18
65. Redburn D.A., Shelton D., y Cotman C.W., (1976) Calcium dependent release of exogenously loaded γ -amino [^{14}C] butyric acid from synaptosomes: time course stimulation by potassium, veratridine and calcium ionophore A 23187. J. Neurochem. 26 297-303
66. Sandoval M.E., Horch P., y Cotman C.W., (1978) Evaluation of glutamate as a hippocampal neurotransmitter: glutamate uptake and release from synaptosomes. Brain Res. 142 285-289.
- 67 Minchin M.C.W., (1980) The role of Ca^{+2} in the protoveratrine-induced release of γ -aminobutyrate from rat brain slices. Biochem. J. 190 333-339

68. Dingledine R., y Somjen G., (1981) Calcium dependance of synaptic transmission in the hippocampal slice. Brain Res. 207 218-222
69. Miledi R., (1973) Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. Proc. R. Soc. B. 183 421-425