



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

*LIBERACION DE <sup>3</sup>H-NA INDUCIDA POR  
ACETATO DE SODIO EN REBANADAS  
DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.*

**T E S I S**

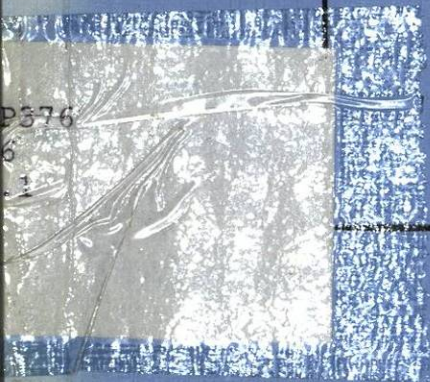
QUE PRESENTA

*Oscar Rodriguez Cortes*

PARA OBTENER EL TITULO DE  
**LICENCIATURA COMO QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

ASESORADO POR  
DR. SERGIO SANCHEZ ARMASS ACUÑA

NOVIEMBRE - 1995



T  
QP376  
R6  
C.1



1080076940

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

***LIBERACION DE <sup>3</sup>H-NA INDUCIDA POR ACETATO DE SODIO EN  
REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.***

**TESIS  
QUE PRESENTA**

**OSCAR RODRIGUEZ CORTES**

**PARA OBTENER**

**EL TITULO DE LICENCIATURA COMO QUIMICO  
FARMACOBIOLOGO**

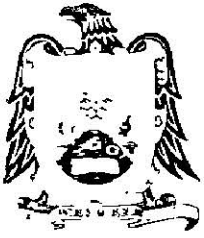
**ASESORADO POR**

**DR. SERGIO SANCHEZ-ARMASS ACUÑA**

**NOVIEMBRE, 1995**

X  
137  
6





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6      Teléfono 13-62-04, Fax: 13-07-12  
San Luis Potosí, S. L. P.

Mayo 22 de 1995.

**SR. OSCAR RODRIGUEZ CORTES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto me permito informar a usted, que el H. Consejo Técnico Consultivo, en sesión ordinaria de fecha 24 de noviembre de 1994, tuvo a bien aprobar el tema de Tesis Profesional titulada: "Liberación de 3H-Noradrenalina Inducida por acetato de Sodio en rebanadas de corteza cerebral de ratas", trabajo a desarrollar en el Laboratorio de Fisiología Neuronal, del Depto. de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina, y asesorado por el Dr. en C. Sergio Sánchez Armass.

Sin otro particular, me es grato reiterarle mi atenta y distinguida consideración.

**"SIEMPRE AUTÓNOMA. POR MI PATRIA EDUCARE."**

**ING. ROGERIO A. COLUNGA KEYNA**  
**SECRETARIO DE LA FACULTAD**



**FACULTAD DE**  
**CIENCIAS QUÍMICAS**  
**SECRETARIA**

phf.

**ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA NEURONAL DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**AGRADECIMIENTOS:**

**Este trabajo fué apoyado parcialmente por los Convenios CONACYT 3699-N y FAI-UASLP (C95-FAI-01-8.8) a SSA.**

## **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>GENERALIDADES</b>	
<b>CAPITULO I EL CEREBRO</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO II EXCITABILIDAD CELULAR Y LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES</b>	<b>5</b>
<b>CAPITULO III REGULACION DEL pH INTRACELULAR</b>	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>15</b>
<b>METODOS Y MATERIALES</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>18</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>21</b>
<b>FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>23</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>29</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>33</b>



## RESUMEN

Durante condiciones de hipoxia, el citosol de las neuronas se acidifica y potencialmente pueden liberar en forma masiva neurotransmisores que produzcan efectos excitotóxicos en el cerebro.

El propósito de este trabajo fué estudiar la influencia de la acidificación del citosol sobre la liberación basal de un neurotransmisor, la  $^3\text{H}$ -Noradrenalina. Con este propósito, se cargaron rebanadas de corteza cerebral de rata con  $^3\text{H}$ -NA y se superfundieron con soluciones Ringer de diversa composición. También se analizaron por cromatografía de intercambio iónico el % de NA intacta y oxidada presente en las fracciones colectadas en un medio de alto  $\text{K}^+$  y de acetato de sodio pH 6. Los principales resultados obtenidos fueron:

1.- Las rebanadas de corteza cerebral de rata superfundidas con solución Ringer con acetato de sodio, EGTA, DMI y Pargilina a pH 6, incrementan la liberación basal de  $^3\text{H}$ -NA, en forma independiente de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

2.- Es razonable asumir que la liberación de  $^3\text{H}$ -NA es inducida por la acidificación citosólica generada por la combinación de factores acidificantes, de acetato de sodio a pH<sub>i</sub> 6.

3.- La mayor fracción ( $83.3 \pm 6.95$  %,  $n=9$ ) del  $^3\text{H}$  liberado por la superfusión con SR-acetato-EGTA-pH6, se encuentra unido a NA no metabolizada.

4.- La liberación de  $^3\text{H}$ -NA evocada por la carga ácida es inhibida totalmente en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas, sugiriendo que la  $^3\text{H}$ -NA liberada por la superfusión con SR-acetato-pH6 procede de las vesículas sinápticas y no del citosol.

5.- En las rebanadas pretratadas con reserpina, la  $^3\text{H}$ -NA capturada y atrapada en el citosol se encuentra como NA intacta en un  $64.2 \pm 11.3$  %,  $n=4$  y como NA oxidada en un  $31.5 \pm 10.6$  %,  $n=4$ .

Los resultados obtenidos sugieren que a altas concentraciones el  $\text{H}^+$  (  $\text{pH}_i < 6$  ) es capaz de substituir al  $\text{Ca}^{2+}$  en uno o más sitios de la cadena de eventos de la exocitosis. El  $\text{H}^+$  podría substituir al  $\text{Ca}^{2+}$  de manera similar a como lo hacen los iones  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ .

## GENERALIDADES

### CAPITULO I

#### EL CEREBRO

Como lecturas generales sobre la anatomía y fisiología de las células nerviosas y del cerebro se pueden consultar las obras de Kandel y Schwartz, 1991 y Pasantes et al. 1991. En organismos superiores, las bases principales de los ciclos de vigilia-sueño, conciencia, lenguaje, pensamiento, recuerdo, motivación y emociones, son efectuadas en el cerebro.

Este órgano, junto con la médula espinal y la retina conforman el sistema nervioso central (SNC). El cerebro está recubierto por las meninges, una triple capa de tejido conectivo elástico (duramadre, aracnoides y piamadre) que son irrigadas por capilares sanguíneas.

El cerebro, se localiza en la cavidad craneal y estructuralmente se divide en 2 hemisferios, derecho e izquierdo que están unidos por comisuras interhemisféricas. A su vez estos hemisferios se dividen en 4 lóbulos que dependiendo de su orientación son denominados como frontal, parietal, occipital y temporal.

Este órgano esta constituido por una masa de tejido, integrada por 2 tipos de células, las células gliales y las neuronas.

#### GLIA

Las células gliales son células que carecen de axón, no forman sinápsis, ni generan señales eléctricas y se localizan entre las neuronas. Se clasifican en astrocitos, microglía, oligodendrocitos, células ependimarias y células de Schwann.

Entre sus principales funciones se encuentran, el soporte y aislamiento de las neurona, la eliminación de neuronas muertas, la mielinización de axones y funciones tróficas o de nutrición.

En el cerebro humano se presentan en mayor proporción que las neuronas, aproximadamente  $11 \times 10^{12}$  a  $15 \times 10^{12}$  células (de 10 a 50 veces más que las neuronas), debido a que estas células pueden dividirse a diferencia de las neuronas y mantener una cifra celular de forma constante.

## **NEURONAS**

Santiago Ramón y Cajal un histologo español, determinó la individualidad del segundo grupo de células funcionales, las neuronas, considerándolas como las células anatomo-funcionales del sistema nervioso. En el cerebro, sin considerar el cerebelo, se reportan aproximadamente  $10 \times 10^{10}$  neuronas y su clasificación actualmente es elaborada de acuerdo a las diferencias morfológicas entre unas y otras células (Paton, 1976).

Entre las características estructurales que las conforman encontramos:

a).- Cuerpo celular o soma, que desarrolla a través de sus organelos la síntesis de macromoléculas.

b).- Dendritas, son ramificaciones que emergen del Soma conocidas también como receptores dendríticos, que reciben señales nerviosas de otras terminales neuronales.

c).- El axón, es una estructura que emerge del cuerpo celular y que contacta a otras neuronas o células efectoras. Al ramificarse el axón, concluye en terminales nerviosas, conocidas como varicosidades que tienen contacto con otras células, permitiendo la transmisión de la información.

En algunas neuronas el axón se encuentra rodeado de una vaina denominada mielina, constituida por lípidos, que funciona como aislante eléctrico. La mielina se interrumpe cada 1.5 a 2 mm por los nódulos de Ravier, exponiendo segmentos de la membrana plasmática. En axones mielinizados la velocidad de conducción es más rápida en comparación con los axones sin mielina.

## CAPITULO II

### EXCITABILIDAD CELULAR Y LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES

#### POTENCIAL DE MEMBRANA

La bicapa de lípidos de la membrana plasmática en la célula, mantiene cargas eléctricas a través de la membrana, establecidas por las especies iónicas que existen tanto en el interior como el exterior de la célula.

De las 4 especies iónicas más abundantes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y aniones orgánicos impermeables, estos últimos y el ion  $\text{K}^+$  se encuentran en mayor porcentaje dentro de la célula, en cambio los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  se encuentran más concentrados en el medio extracelular.

El potencial generado por la separación de carga a través de la membrana plasmática es varias decenas de milivoltios más negativo que el espacio extracelular y bajo condiciones donde no se presenta un estado de excitación sobre la célula, el potencial de membrana es considerado como "potencial de reposo" y es característico para cada tipo celular.

En células neuronales el potencial de reposo medido con microelectrodos, tiene un valor de  $-70\text{mV}$ , establecido por los aniones impermeables y refleja el grado de permeabilidad de la membrana a los iones  $\text{K}^+$  sobre los iones  $\text{Na}^+$ . En estas condiciones el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  presentan una mayor permeabilidad, difundiéndose de forma pasiva a través de la membrana plasmática y a favor de su gradiente electroquímico.

A su vez, la participación de la ATPasa de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  mantiene los gradientes iónicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (y por lo tanto la diferencia de potencial a través de la membrana), al compensar los flujos pasivos de estos iones al intercambiar 3  $\text{Na}^+$  intracelulares por 2  $\text{K}^+$  extracelulares.

#### POTENCIAL DE ACCION

Para que la célula manifieste un potencial de acción (cambio repentino transitorio y auto-regenerable, del potencial de membrana desde  $-70\text{mV}$  a  $50\text{mV}$ ) la despolarización de la membrana debe alcanzar un potencial denominado umbral. Este potencial es indispensable para que se manifieste el efecto máximo del potencial de acción y dependerá de la duración e intensidad del estímulo. En el umbral la conductancia del  $\text{Na}^+$  es favorecida y un mayor número de canales de  $\text{Na}^+$  son abiertos, aumentando la corriente para este ion y presentándose un

período rápido de despolarización.

El influjo de  $\text{Na}^+$ , carga positivamente el espacio intracelular y el potencial de membrana disminuye hasta alcanzar un potencial cercano a el potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$  (+55 mV). El canal de  $\text{Na}^+$  presenta el fenómeno de inactivación que reduce el influjo de  $\text{Na}^+$  en función del tiempo y del voltaje.

Alcanzado el efecto máximo del potencial de acción, la célula recupera gradualmente sus condiciones de reposo al presentarse una etapa de repolarización en la membrana, evocada por un eflujo de  $\text{K}^+$  a favor de su gradiente electroquímico, al abrirse canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje.

Posteriormente se manifiesta un período de hiperpolarización donde el potencial de membrana es más negativo que el potencial de reposo, cercano al potencial de equilibrio para el  $\text{K}^+$  de -75mV.

Un segundo estímulo depolarizante sobre la membrana e inmediatamente después de un potencial de acción no manifiesta respuesta para generar un nuevo potencial de acción, al no alcanzar el potencial umbral, a este período se le conoce como refractario absoluto. Después de este período es posible la manifestación de potenciales con grandes depolarizaciones pero con amplitud menor a el potencial de acción normal conocido como período refractario relativo. Ambos períodos refractarios son consecuencia del grado de inactivación de canales de  $\text{Na}^+$  durante el potencial de acción.

En las terminales nerviosas la conductancia a  $\text{Na}^+$  favorece la conductancia del  $\text{Ca}^{2+}$  al activar canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , participando en mecanismos posteriores que involucran a el  $\text{Ca}^{2+}$  en la liberación de neurotransmisores provenientes de almacenes citosólicos.

El potencial de acción, se presenta con una duración de 1 a 2 ms y una amplitud dependiente únicamente de la concentración del  $\text{Na}^+$  extracelular. Sin embargo, la propagación del potencial de acción a la largo del axón hasta las terminales nerviosas se efectúa sin gran decremento, de forma progresiva y regenerativa, dependiendo únicamente de las dimensiones y el diámetro del axón.

## **TRANSMISION SINAPTICA**

Charles Sherrington llamó sinápsis a la región donde la terminal presináptica transmite información a la terminal postsináptica. Entre esos dos elementos existe un espacio que se conoce como hendidura sináptica. En 1905 Sherrington postuló que estos sitios debían existir, al observar un retardo en la

respuesta reflejo del músculo en comparación con la velocidad de conducción.

Estudios posteriores efectuados por microscopía electrónica establecieron que a través de la sinápsis se llevaba a cabo la transferencia de información de una célula a otra o a una célula efectora postsináptica. A su vez, permitieron la diferenciación de 2 tipos de sinápsis, que de acuerdo a sus características se denominaron como sinápsis eléctricas y químicas.

La transmisión de la señal de la presinápsis a la postsinápsis en una sinápsis eléctrica se lleva a cabo por flujos de corriente iónica a través de puentes que intercomunican a ambas células. Estos puentes están formados por proteínas denominadas conexones, que permiten el paso de la transmisión en forma bidireccional. Este tipo de sinápsis presentan espacios sinápticos muy estrechos aproximadamente menores a 4 nm o 40 Å.

En una sinápsis química la información se transmite unidireccionalmente, mediante moléculas que son liberadas del componente presináptico y que al interactuar con receptores de la membrana postsináptica inducen cambios en el potencial de membrana.

En las células postsinápticas, al conformarse el complejo neurotransmisor-receptor se genera un cambio del potencial de membrana que puede ser excitatorio (potencial postsináptico excitatorio, EPSP) o inhibitorio (potencial postsináptico inhibitorio, IPSP).

A diferencia de las sinápsis eléctricas, las químicas tienen un espacio sináptico aproximadamente de 30 nm, por lo tanto existe un retardo sináptico de 20 a 50 ms, debido al tiempo requerido para que se realice la exocitosis del neurotransmisor.

## VESICULAS SINÁPTICAS

En el año de 1955 estudios en terminales sinápticas elaborados por Robertis y Bennett por microscopía electrónica, identificaron la presencia de organelos con la función de depósitos o almacenes citosólicos que contienen sustancias químicas activas, llamándolas vesículas sinápticas.

Los primeros adelantos que caracterizaron a estas vesículas, fueron elaborados por Robertis y Pellegrino de Irandi en 1961, describiendo la consistencia densa del núcleo vesicular y reafirmando la hipótesis de van Euler y Hillarp en 1956, de que la característica densa del núcleo dependía de la presencia de neurotransmisores.

Los investigadores Crillo y Palay reconocieron la heterogeneidad de estas vesículas, reportando 3 diferentes tipos clasificadas por su diámetro, algunas de 85 nm y las 2 últimas menores de 50 nm, diferenciadas por su tamaño en vesículas pequeñas y grandes.

Otros investigadores determinaron los constituyentes de estos almacenes. Smith en 1972 y en 1976 Lagercrant reportan la presencia de NA, ATP, Dopamina-β-hidroxilasa (soluble y en la membrana vesicular), cromogranina A y otras cromograninas, en vesículas grandes. En cambio en las vesículas pequeñas, se identificaron NA, Dopamina-β-hidroxilasa y ATP (Paton, 1976).

Las vesículas sinápticas tanto pequeñas como las de alta densidad poseen proteínas características como :

a) La sinaptotagmina, que promueve la activación de los procesos de acoplamiento entre las membranas plasmática y vesicular, la fusión entre ellas y la endocitosis. Esta proteína presenta 2 sitios que posiblemente estén implicados en la asociación con el  $Ca^{2+}$ .

Como no se ha observado in vitro las propiedades de fusión de esta proteína, se postuló que la sinaptotagmina probablemente interactúa con otras proteínas para llevar a cabo los procesos que encadenen la exocitosis y posteriormente la endocitosis. Posiblemente el acoplamiento vesicular a la membrana es favorecida con la interacción de la sintaxina a el sensor de  $Ca^{2+}$ . Con las neurexinas proteínas membranales se modula la liberación de neurotransmisores de las vesículas sinápticas.

La interacción con la proteína AP-2 Clatrina citosólica posiblemente vinculada con el segundo dominio C2 participa en los procesos de endocitosis (J. Troy Littleton y H. J. Bellen, 1995; Sundhof and Jahn, 1991; Trimble et al, 1991).

b) La sinapsina, que regula la relación entre los elementos del citoesqueleto presináptico y la membrana de las vesículas presinápticas, modulando la disponibilidad de las vesículas para su liberación por exocitosis (Sundhof and Jahn, 1991; Trimble et al, 1991).

c) La sinaptobrevina y la sinaptofisinas, probablemente participan en el proceso de fusión entre vesículas sinápticas y la membrana plasmática, pero aún no se conoce con claridad en que paso molecular están involucradas.

## **EXOCITOSIS**

Para sustancias almacenadas en vesículas sinápticas (principalmente neurotransmisores y otros componentes) su liberación al espacio extracelular se efectúa por procesos de exocitosis.

Estudios electromicroscópicos sobre el proceso de exocitosis, detectaron que la liberación de los componentes vesiculares se efectúa en forma de cuantos, siendo liberados al medio extracelular de la terminal nerviosa a través de un proceso del todo o nada y representando el contenido liberado de una sola vesícula.

Experimentos desarrollados en axones depolarizados de calamar gigante por Katz y Miledi, refirieron que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  no participan de forma directa en la cadena de reacciones que involucra la liberación de neurotransmisores por exocitosis, al bloquear canales dependientes de voltaje para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , por TEA y la TTX respectivamente. Sin embargo, experimentos efectuados por Castillo y Katz, dedujeron que en la manifestación de la exocitosis, era involucrada la participación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Kandel, 1985)

La depolarización eléctrica de la membrana plasmática conduce a la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y por lo tanto a un incremento en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Bajo estas condiciones, el  $\text{Ca}^{2+}$  al difundir al espacio intracelular de la terminal nerviosa presináptica (Orrego y Sanchez-Armass, 1981) participa en la liberación de neurotransmisores de vesículas cercanas a la membrana plasmática. Por lo tanto la liberación del neurotransmisor es directamente proporcional al incremento del voltaje, ya que con forme aumenta el voltaje un mayor número de canales sensibles a voltaje es abierto.

Al difundir el  $\text{Ca}^{2+}$  por el citoesqueleto, activa una proteína, posiblemente se trate de la CAM Kinasa II, que fosforila a la sinapsina (proteína membranal de vesículas sinápticas). Esta última es involucrada en la despolimerización de la actina permitiendo la difusión de las vesículas sinápticas más alejadas de la membrana plasmática.

Las vesículas sinápticas son dirigidas a regiones electrodensas de la membrana plasmática que permiten la interacción principalmente entre las sinaptobrevinas y las sinaptofisinas, dando lugar al proceso de fusión entre las vesículas y la membrana plasmática.

Estudios efectuados por Orrego y Sanchez-Armass (1981) reportaron que la liberación de  $^3\text{H-NA}$  evocada por depolarizaciones eléctricas muestra una saturación respecto al  $\text{Ca}^{2+}$ , que es descrita por la ecuación de Michaelis-Menten y un  $\text{Km}$  para el  $\text{Ca}^{2+}$  de  $300 \mu\text{M}$ . Vargas y Orrego en 1975 determinaron por estudios en rebanadas neocorticales, que el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  que participa en la liberación de neurotransmisores ( Ach, NA, DA, 5HT ) por estímulos depolarizantes de  $\text{K}^+$ , no se presenta para sustancias no neurotransmisoras.



Para evitar el incremento en la superficie membranal plasmática al ser fusionadas las membranas vesiculares por exocitosis, se efectúa la endocitosis, un reciclamiento de las vesículas sináptica al espacio intracelular.

## RECAPTURA DE NEUROTRANSMISORES

El transporte de neurotransmisores del espacio extracelular al citosol o viceversa (efecto bidireccional) es efectuado por un transporte dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que requiere de energía obtenida por el gradiente de  $\text{Na}^+$  (Paton, 1976).

El neurotransmisor en el espacio intracelular es almacenado en vesículas sinápticas a través de un transporte dependiente de un gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  (fuerza impulsora de la acumulación de neurotransmisores), de la participación ATPasa dependiente de  $\text{H}^+$  expresadas en la membrana vesicular (que mantienen un gradiente de  $\text{H}^+$  a través de la membrana) y de una proteína acarreadora de catecolaminas (Beer et al, 1982).

Bajo estas determinaciones, tanto el acarreador como la catecolamina son desprotonados favoreciendo su transporte al formar un complejo acarreador-neurotransmisor. El neurotransmisor transportado intramembranalmente es liberado, almacenado y protonado nuevamente en espacio intravesicular.

## NORADRENALINA

La NA es un compuesto catecolamínico, que posee un grupo catecol y un grupo monoamínico. Es poco lipofílico, posee pKa's de 8.8 para su grupo fenólico y 9.8 para su grupo básico amínico.

Su síntesis se efectúa a partir de la oxidación de la tirosina a DOPA por una enzima hidroxilasa, requiriendo de  $\text{Fe}^{2+}$  y tetrahidroferina como cofactor. Por acción de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, la DOPA es descarboxilada a dopamina, su cofactor es el fosfato de piridoxal. Este último compuesto (dopamina) es oxidado por una  $\beta$ -oxidasa de dopamina a noradrenalina, enzima vesicular dependiente de ácido ascórbico y del ión cúprico. La noradrenalina a su vez es metabolizada a adrenalina por la enzima fenil-etanol-amina N-metil transferasa.

La degradación metabólica de la NA es efectuada por la participación de la enzima mitocondrial conocida como MAO, expresada en su membrana y clasificada de acuerdo al tipo de sustrato de preferencia, al tipo de inhibidor específico, a su distribución en el tejido, a sus propiedades inmunológicas, a la

secuencia de aminoácidos y su nucleótido. Esta enzima desamina los grupos amínicos de la NA a sus aldehídos correspondientes, transformándolos inmediatamente a ácidos o alcoholes.

La COMT, una enzima distribuida en todos los tejidos animales, efectúa la metilación de los grupos ácido o alcohol correspondiente.

Algunos compuestos químicos como el EDTA y los pirofosfatos de sodio aumentan la acumulación de NA por ser agentes quelantes del  $\text{Ca}^{2+}$ ; la cocaína, los antidepresivos tricíclicos, los agentes bloqueadores de receptores adrenérgicos y los inhibidores de la MAO inhiben su almacenaje (Paton, 1976). De los inhibidores de la MAO, la pargilina es un bloqueador irreversible (Goodman y Gillman, 1991).

## CAPITULO III

### REGULACION DEL pH INTRACELULAR

Las células además de mantener gradientes electroquímicos para varios iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ), también mantienen las concentraciones extra e intracelulares de  $\text{H}^+$  fuera del equilibrio termodinámico.

Los cambios en el  $\text{pH}_i$ , darán lugar a la manifestación de algunos procesos celulares, como pueden ser la modulación de canales iónicos y de algunas reacciones enzimáticas, la diferenciación celular, la generación de la síntesis de proteínas, la actividad de algunas hormonas, la liberación de neurotransmisores, la participación de algunos procesos como la fertilización, la contracción del tejido muscular entre otros. Bajo esta consideración, la célula activa mecanismos que permiten alcanzar condiciones normales de forma rápida a través de amortiguación fisicoquímica, del consumo celular de ácidos no volátiles, transferencia ácida o básica entre el citosol y los organelos.

La célula posee una variedad de sistemas de transporte específicos que se expresan a nivel de membrana plasmática y en las membranas de organelos intracelulares y que regulan la concentración de  $\text{H}^+$  en el citosol: A) El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Este mecanismo de intercambio depende de los gradientes electroquímicos de ambas especies iónicas, a lo cual la relación entre la concentración de  $\text{Na}^+$  con respecto a la extrusión ácida sigue una relación cinética de Michaelis-Menten. Además de regular el  $\text{pH}_i$ , manifiesta funciones en el control del volumen celular, el transporte de sales y de ácidos-bases equivalentes (Tonnessen et al.; 1990). B) Sistemas de transporte de  $\text{HCO}_3^-$ , que pueden ser dependientes o independientes de  $\text{Na}^+$ . Estos transportadores mueven  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$ . C)  $\text{H}^+$ -ATPasa. De este tipo de enzimas encontramos a las ATPasas de tipo  $\text{E}_1\text{E}_2$  localizadas en la membrana luminal de células epiteliales gástricas,  $\text{F}_0\text{F}_1$  mitocondriales y las tipo V expresadas en las membranas de endosomas, lisosomas, vesículas sinápticas, plasmática y otras membranas internas.

A nivel de la membrana plasmática la enzima tipo V, una enzima electrogénica independiente de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , desempeña un papel primordial en la regulación del  $\text{pH}_i$  extruyendo  $\text{H}^+$  en compañía de  $\text{Cl}^-$  modificando el potencial de membrana (Swallow, Grinstein y Rotstein; 1989).

A nivel de membrana vesicular la ATPasa- $\text{H}^+$  constituye el 20% de las proteínas expresada y es conformada por 4 subunidades hidrofóbicas. Su actividad es abolida por carbonatos, bafilomicina y por temperaturas bajas ( $4^\circ\text{C}$ ) (Y. Mariyama y M. Futal, 1990).

## **REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL COMO MODELO EXPERIMENTAL**

El transporte de catecolaminas a los espacios extracelular, intracelulares e intravesiculares, es estudiado *in vivo* (bajo condiciones experimentales controladas) en tejidos aislados.

Una rebanada de tejido posee accesibilidad en soluciones fisiológicas, para ser manipulada y lubricada. A su vez, este tipo de preparaciones permite evaluar la participación de componentes (iones principalmente) que participan en procesos celulares como la liberación neurotransmisores (McIlwain, 1975).

## ANTECEDENTES

### EFFECTO DEL pH EN LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES

Modificaciones en el  $pH_o$  y en el  $pH_i$  modulan la liberación de neurotransmisores, como lo muestran trabajos efectuados en placa neuromuscular sobre la liberación de acetilcolina. En este tipo de experimentos, se muestra que a  $pH_o$  de 6 la amplitud de los potenciales sinápticos excitatorios es menor que a  $pH_o$  de 7.4, mostrando que el promedio de cuantos liberados esta en función del pH. Sin embargo, la frecuencia en los potenciales de placa en miniatura se ve aumentada con la acidificación del medio extracelular de manera independiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular. Los autores sugieren que el  $H^+$  podría liberar  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares. Bajo estas condiciones, se incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$ , promoviendo la liberación de neurotransmisores (Nachshen y Landau, 1975).

Trabajos efectuados por Nachshen y Blaustein (1987) determinaron que el  $H^+$  bloquea el influjo de  $Ca^{2+}$ -dependiente de voltaje. Este efecto se debe a que el  $H^+$  presenta afinidad por un sitio en el canal de  $Ca^{2+}$ . Estos autores propusieron que se trata de un grupo ácido en el canal del  $Ca^{2+}$  por el cual compiten el  $Ca^{2+}$  y el  $H^+$ . Este sitio posee un  $pK_a$  aproximado de 6 (Nachshen y Blaustein, 1979).

Estudios efectuados en músculo esquelético de rana reportan que la acidificación del  $pH_i$  induce un decremento en la amplitud de la conductancia de  $K^+$  a través de canales de  $K^+$  dependientes de ATP. Sugiriendo que el  $H^+$  bloquea el canal e inhibe la unión del ATP (Davies et al., 1992).

En sinaptosomas, la liberación de dopamina basal, muestra una dependencia respecto del  $pH_o$  y el  $pH_i$ , mostrando un incremento de esta liberación por acidificación del medio extracelular en presencia de acetato y en forma independiente de  $Ca^{2+}$ . La conclusión de los experimentos arriba mencionados es que el  $H^+$  compite por el  $Ca^{2+}$  por sitios de la cadena de reacciones que involucran la liberación de neurotransmisores (Nachshen y Drapeau, 1988).

En cuerpos carotideos, el  $pH_o$  ácido y la incubación con medios ricos en acetato, evocan un aumento en la liberación basal de dopamina (Rigual et al., 1991).

El tono vascular es efectuado por cambios en el  $pH_i$ , generados por acidificaciones en el  $pH_o$  o por adiciones de ácidos o bases debiles. Acidificaciones del  $pH_o$  promueven la relajación del músculo liso vascular, el efecto contrario se obtiene a pH alcalino (Austin y Wray, 1993).

## OBJETIVO

El propósito de este trabajo fué analizar la influencia de la acidificación del citosol sobre la liberación basal de  $^3\text{H-NA}$  en rebanadas de corteza cerebral. Para determinar si el  $\text{pH}_i$  modula la liberación de transmisores dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , o si por si mismo el  $\text{H}^+$  es capaz de substituir al  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de exocitosis, de manera semejante a como lo hacen los iones  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$  en diferentes condiciones.

## METODOS Y MATERIALES

### OBTENCION DE REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

Se sacrificaron por decapitación ratas de aproximadamente 150 g de peso, se disecciona el cerebro eliminando el cerebelo. Se obtuvieron rebanadas de corteza cerebral de 300  $\mu\text{m}$  de espesor, de acuerdo a la técnica de McIlwain (1975), mediante el uso de guía de vidrio y navaja. La rebanada se transfiere a un matraz Erlenmeyer con 2 ml de la SR (ver sección de soluciones) que contenía 14  $\mu\text{l}$  de  $^3\text{H-NA}$  (11.4  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ ), y se incubó por 30 min. a 37°C, con el propósito de que la  $^3\text{H-NA}$  se acumule en las vesículas sinápticas. Al término de la incubación la preparación se monta en un electrodo de transferencia rápida tipo McIlwain y se colocó en una cámara de superfusión discontinua a 37°C, que contenía 5 ml de SR (Orrego 1974). Cada 2 min la solución de superfusión se aspiró en tubos de ensayo separados y el fluido de la cámara se reemplazó 5 ml de solución fresca precalentada a 37°C. Al término del experimento la rebanada se transfiere a una caja de Petri con SR, se transfiere a un homogeneizador que contiene 5 ml de agua. La radioactividad presente en el homogeneizado y en cada una de las fracciones colectadas se midió en un contador de centelleo líquido (0.1 ml del homogenado y 1 ml de cada fracción).

El eflujo se expresó como el coeficiente fraccional de velocidad  $f$  ( $\text{min}^{-1}$ ) o sea, la fracción de radiactividad liberada por minuto respecto de la radioactividad presente en la rebanada a un tiempo dado (ecuación 1).

$$f (\text{min}^{-1}) = [L_t] / [R_h + L_t] * T \quad ( 1 )$$

Donde  $T$  = duración del período de colección,  $L_t$  = cpm liberadas al tiempo  $t$  de superfusión,  $R_h$  = cpm presentes en el homogenado al final del experimento,  $[R_h + L_t]$  = cpm presentes en la rebanada al tiempo  $t$  ( $\Sigma$  cpm liberadas en cada fracción desde el final del experimento hasta el tiempo  $t$ ).

### SOLUCIONES FISIOLÓGICAS Y REACTIVOS

Solución Ringer (SR) mM: NaCl, 127; KCl, 4;  $\text{MgCl}_2$ , 1.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.25;  $\text{NaHCO}_3$ , 18;  $\text{CaCl}_2$ , 1.0; Ac. ascorbico, 1.0; Glucosa, 10, pH 7.4. SR- $\text{Ca}^{2+}$  libre: no incluye  $\text{CaCl}_2$  en la solución. SR- $\text{K}^+$  (Alto potasio): contiene NaCl 91 y 40 de KCl. SR-acetato: NaCl, 85;  $\text{NaHCO}_3$ , 10; acetato de sodio 50.

Para calcular la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  que a la altura de la Ciudad de San Luis Potosí (1870 msnm) de un pH de 7.4 al burbujearse con una mezcla de 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de  $\text{O}_2$ , se consideró el coeficiente de solubilidad del  $\text{CO}_2$  a 37°C y

la presión parcial del  $\text{CO}_2$  existente. La concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , se calculó mediante la ecuación de Henderson-Haselbach considerando para el  $\text{H}_2\text{CO}_3$  un  $\text{pK}_a = 6.098$  a  $37^\circ\text{C}$  y a una fuerza iónica de  $0.1 \text{ M}$ .

Excepto la SR de incubación con  $^3\text{H-NA}$ , todas las soluciones contenían  $20 \mu\text{M}$  de DMI (inhibidor del sistema de transporte de catecolaminas) y  $10 \mu\text{M}$  de pargilina (inhibidor irreversible de la enzima mitocondrial MAO). El pH se ajustó por burbujeo constante con carbogeno 95/5( $\text{O}_2/\text{CO}_2$ ) por 30 min.

**Solución de Centelleo.** Para cada litro de solución, se emplearon (ml): M-flúor, 26.6; tolueno, 633.3; arkopal M-100M, 340. El M-flúor contiene 100 g de PPO y 2 g de BIS-MSB por litro de tolueno. Reserpina: Se preparo una solución stock de 20 mg/ml en DMSO.

## **CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO**

La separación cromatografica de  $^3\text{H-NA}$ -intacta y  $^3\text{H-NA}$  oxidada (desaminada) se efectuó en columnas (puntas de micropipeta Gilson de 5 ml) que contienen 4.5 cm de resina Dowex-50W, malla 50-100 (Sigma Chemical Company, San Luis Missouri), pretratada de acuerdo a Orrego y Saldate (1976). Las fracciones eluidas se colectaron en un colector de fracciones Ultrorac II 2070 LKB.

Para los experimentos de análisis cromatográfico, la rebanada se transfirió de la cámara de superfusión a una caja de Petri con SR y posteriormente se homogeneizó en 2 ml de TCA a  $4^\circ\text{C}$  a 900 rpm con 8 golpes y el homogenado se centrifugó por 1.5 min a 13000 rpm en una microfuga Bekman. Tanto el pH del sobrenadante de la rebanada como el de fracción colectada correspondiente a la meseta de liberación inducida en SR-Acetato-pH6-EGTA, se ajustó a 6 utilizando como indicador el colorante púrpura de bromocresol al 1 % ( $\text{pK}_a = 6.3$  viraje de amarillo a violeta). Las columnas se cargaron con alicuotas de  $500 \mu\text{l}$  del sobrenadante (pH6) y con  $1,500 \mu\text{l}$  de la fracción de acetato (pH6). La elución se inició 5 min después de terminar de cargar las columnas. Se colectaron fracciones cada 7 min (aproximadamente 3 ml). Se eluyeron 8 fracciones con ácido acético  $0.1 \text{ M}$ , 12 fracciones con HCl y 4 fracciones con NaCl  $1 \text{ M}$ . Se transfirieron alicuotas de 1 ml de cada fracción recolectada a viales que contenían 9 ml de líquido de centelleo para determinar la radiactividad eluida.

## **ESTADISTICA**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  una desviación estandar de n experimentos, cada uno efectuado en una rebanada proveniente de una rata.



## RESULTADOS

Con el propósito de contar con una referencia de liberación por exocitosis, una vez que se obtiene una velocidad de liberación basal constante, se aplica un pulso despolarizante de  $K^+$  40 mM, que evoca un aumento en la liberación de  $^3H$ -NA de  $0.021 \text{ min}^{-1}$  (Fig 1A, B y C).

Para aplicar una carga ácida intracelular a las células de la rebanada cerebral, se recurre a la técnica del pulso de acetato (Boron y Ross, 1981) que ha sido ampliamente utilizada tanto en células aisladas como en suspensión (McIlwain, 1975). Con el propósito de imponer una carga ácida permanente, el pH de la solución de acetato se ajusta a pH 6. La superfusión de la rebanada con SR-acetato-pH 6 (Fig. 1A) promueve un aumento en la liberación basal de  $^3H$ -NA de  $\Delta = 0.018 \text{ min}^{-1}$ , que alcanza un breve plateau aproximadamente a los 14 min de superfusión y que posteriormente decae aún en la presencia del medio con acetato.

Si la  $^3H$ -NA fuera preferencialmente extruida a través del sistema de transporte de catecolaminas o por difusión de la forma desaminada, la adición de inhibidores de estos sistemas reducirían el efecto de la solución de SR-acetato-pH 6. El resultado de un experimento de ese tipo se muestra en la Fig. 1B, donde claramente se aprecia que el aumento en la liberación de  $^3H$ -NA inducido por SR-acetato pH 6 es insensible a la presencia de 20  $\mu\text{M}$  DMI y 10  $\mu\text{M}$  pargilina. Este resultado sugiere que la liberación de  $^3H$ -NA, se realiza por exocitosis.

Para analizar si el efecto de la liberación de  $^3H$ -NA bajo condiciones de SR-acetato-pH 6 requiere del  $Ca^{2+}$ , después del pulso de  $K^+$ , se emplea una solución SR-libre de  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  contaminante entre 10 y 20  $\mu\text{M}$ ). El incremento en la liberación de  $^3H$ -NA inducido por la SR-acetato pH 6 libre de  $Ca^{2+}$ , es muy similar a la obtenido en la presencia de  $Ca^{2+}$  (Comparar Fig. 1A vs Fig. 1C y Tabla I), resultado que implica una independencia de  $Ca^{2+}$ , del efecto de la solución de acetato.

Con el propósito de asegurar que el  $Ca^{2+}$  en el espacio extracelular de la rebanada sea tan bajo como el de la SR libre de  $Ca^{2+}$ , se superfunden preparaciones durante 26 min (Fig. 2A) después del pulso de  $K^+$  y preparaciones con períodos de 90 min (Fig. 2B) con SR libre de  $Ca^{2+}$  en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de EGTA (SR-EGTA) ( $Ca^{2+}$  libre del orden nM,  $K_d \text{ EGTA-Ca}^{2+} = 27.79 \text{ nM}$  a  $37^\circ\text{C}$  y 0.1 M de fuerza iónica) antes de cambiar a la solución de SR-acetato-pH 6-EGTA. La superfusión con SR-EGTA durante 26 o 90 min, antes del cambio a la SR-acetato-pH 6-EGTA no reduce el incremento en la velocidad de liberación de  $^3H$ -NA, sino que se observa un aumento en la velocidad de liberación de 7.5 a 54.8 % respecto a los medios con  $Ca^{2+}$  1 mM (Tabla I).

Los experimentos descritos anteriormente muestran que SR-acetato-pH 6 incrementa la liberación de NA por un mecanismo que no involucra al transportador de catecolaminas-sensible a DMI, ni la difusión de NA-oxidada, y que es independiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, aún queda por dilucidar que fracción del  $^3\text{H}$ -liberado corresponde a NA intacta y cual a NA-desaminada.

La Figs. 3A y B muestran el análisis por cromatografía de intercambio iónico del  $^3\text{H}$ -liberado en un experimento semejante al de la Fig. 2B. La fracción colectada en la meseta del efecto inducido por RS-acetato-pH6-EGTA contiene preferencialmente  $^3\text{H}$ -NA-intacta ( $^3\text{H}$ -NA-intacta  $83.3 \pm 6.9$ ,  $n = 9$ ;  $^3\text{H}$ -NA-desaminada  $10.0 \pm 5.6$ ,  $n = 9$ ) al igual que el contenido en la rebanada analizada al mismo tiempo ( $^3\text{H}$ -NA-intacta  $86 \pm 3 \%$ ,  $n = 8$ ;  $^3\text{H}$ -NA-desaminada  $10.3 \pm 2.5 \%$ ,  $n = 8$ ). Estos valores son semejantes a los obtenidos en el caso del  $^3\text{H}$ -liberado por  $40 \text{ mM K}^+$ , la fracción colectada correspondiente a el pico de liberación contiene  $86.4 \pm 5.3 \%$  de  $^3\text{H}$ -NA-intacta y solamente  $8.7 \pm 6 \%$  como  $^3\text{H}$ -NA-desaminada.

Con el propósito de determinar si la  $^3\text{H}$ -NA liberada por la SR-acetato-pH 6 proviene de vesículas sinápticas o del citosol, 18 hrs antes del sacrificio se administra a las ratas por vía intraperitoneal reserpina ( $20 \text{ mg/Kg}$  de peso corporal). La reserpina depleta las vesículas sinápticas de NA endógena al inhibir al sistema de transporte de las vesículas sinápticas, de manera que la  $^3\text{H}$ -NA captada durante el período de incubación se encuentra preferencialmente en el citosol en forma no oxidada cuando se emplean inhibidores de la MAO (Vargas et al., 1977)

Este tipo de experimento se muestra en la Fig 4A, en la que se observa que el pulso de  $\text{K}^+$  evoca sólo un pequeño incremento (promedio  $0.0020 \pm 0.0011 \text{ min}^{-1}$ ,  $n = 7$ ) en la liberación de  $^3\text{H}$ -NA (comparar con Fig. 1). En la rebanada reserpinizada la solución SR-acetato-pH 6-EGTA no induce aumentos en la liberación de  $^3\text{H}$ -NA ( $0.001 \pm 0.0008$ ,  $n = 7$  y Tabla I). El análisis cromatográfico del  $^3\text{H}$ -remanente en la rebanada reserpinizada durante la superfusión con la solución de SR-acetato-pH 6-EGTA (Fig 4B) revela una mayor proporción de  $^3\text{H}$ -NA-intacta ( $64.2 \pm 11.2 \%$ ,  $n = 4$ ) que de  $^3\text{H}$ -NA-desaminada ( $31.5 \pm 10.63$ ,  $n = 4$ ).

Estos experimentos indican que la solución de acetato no libera  $^3\text{H}$ -NA que se encuentre soluble en el citosol, sino que requiere forzosamente que la  $^3\text{H}$ -NA se localice en las vesículas sinápticas, condición que sugiere que la acidificación intracelular (generada por la solución con acetato) libera a la  $^3\text{H}$ -NA mediante exocitosis. Esta conclusión implica que el  $\text{H}^+$ , al igual que el  $\text{Sr}^{2+}$ , el  $\text{Ba}^{2+}$  y el  $\text{Mn}^{2+}$ , son capaces de substituir al calcio en el proceso de exocitosis.

Con el propósito de analizar por separado el efecto del acetato y del  $\text{pH}_i$  ácido, la rebanada se superfundió con SR-acetato-pH 7.4 (Fig 5A) ó con SR-pH 6 (Fig 5B). La solución de acetato-pH 7.4 no evoca un aumento en la velocidad de liberación pero sí el pulso de  $\text{K}^+$ , lo que demuestra que la rebanada mantenía intacto el mecanismo de liberación por exocitosis. La solución Ringer pH 6 induce sólo un pequeño ( $0.004 \text{ min}^{-1}$ ) y lento incremento en la liberación basal de  $^3\text{H-NA}$ . Presumiblemente estas dos condiciones por separado no logran acidificar suficientemente el  $\text{pH}_i$ . Estos resultados se pueden deber a varias razones entre las que podrían destacar el tiempo requerido para equilibrar el espacio extracelular de las rebanadas y la participación de la células gliales para regular el pH intersticial.

## DISCUSION

Nuestro conocimiento sobre los mecanismos que regulan la liberación de neurotransmisores por exocitosis es aun incompleto. Durante la despolarización, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la terminal nerviosa y promueve la liberación del neurotransmisor. Al difundir el  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, promueve la fosforilación de sinapsina I, lo cual permite la despolimerización de actina y la movilización de vesículas sinápticas hacia la membrana plasmática (Llinas et. al. 1991). La fusión probablemente resulta de la participación de otras proteínas como la sinaptobrevina que también puede ser activada por el calcio citosólico (Link et. al. 1992).

Una función directa de la fosforilación en el proceso de exocitosis parece poco probable, porque el curso temporal de la fosforilación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de las proteínas de las terminales nerviosas es lenta (segundos) (Wang et. al. 1988) si se compara con el evento de liberación (milisegundos) (Augustine et. al., 1987; Smith and Augustine, 1988; Tuner and Golding, 1989). La participación de la fosforilación también es improbable porque el  $\text{Ba}^{2+}$  y el  $\text{Sr}^{2+}$  promueven la liberación de neurotransmisores (Zengel and Magleby, 1980; Augustine and Eckert, 1984; Drapeau and Blaustein, 1983) y glutamato (Sihra et.al., 1993), aunque el  $\text{Ba}^{2+}$  no sustituye al  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos dependientes de calmodulina (Richardt et. al. 1986; Robinson and Dunkley, 1983).

Debido a que no es técnicamente posible medir el  $\text{pH}_i$  en rebanadas de cerebro, asumimos que el  $\text{pH}_i$  cambia a valores más ácidos cuando se usa el método bien establecido del pulso de acetato (Roos y Boron, 1981).

La superfusión con SR-acetato-pH6 calcio libre (en la presencia de DMI y pargilina) indujo un aumento de 5 veces en el eflujo basal de  $^3\text{H-NA}$  (Fig. 1C y Tabla I). Sin embargo la superfusión con SR-acetato-pH 7.4 calcio libre o con SR-pH 6 calcio libre no induce aumentos en la liberación de  $^3\text{H-NA}$  (Fig. 5A y B). Este resultado puede ser debido a la falla de estos últimos procedimientos para inducir una carga ácida mantenida de una magnitud suficiente ( $\text{pH}_i < 6$ ), probablemente por la barrera difusional que representa el espacio extracelular de la preparación utilizada.

Nuestra observación de la estimulación de la liberación basal por el acetato a pH6 (acidificación intracelular) en forma independiente del calcio externo concuerda (Fig. 1C y Fig. 2A y 2B), con estudios en la placa neuromuscular de rata (Hubbard et.al, 1968) y sinaptosomas (Drapeau y Nachshen, 1988) sin embargo en el cuerpo carotideo la solución de acetato de sodio promueve la liberación de dopamina en forma dependiente de calcio (Rigual et. al., 1991). Esta discrepancia puede reflejar diferencias en el mecanismo de exocitosis.

Dado que el grado de estimulación de la liberación basal no se modificó por 80 minutos de superfusión en SR-EGTA antes de la carga ácida, condición experimental que promueve la depresión de calcio de los almacenes intracelulares en varios tipos de preparaciones, es probable que el aumento observado promovido por la acidificación citosólica sea independiente del  $Ca^{2+}_i$  (Fig.2 A y B, Tabla I). Para responder a esta pregunta será necesario re-estudiar este aspecto en sinaptosomas donde se puede medir tanto los cambios en el  $pH_i$  como en el  $Ca^{2+}_i$ .

La liberación exocitósica de neurotransmisores requiere de la integridad de las vesículas sinápticas, la inhibición de la liberación promovida por cargas ácidas en presencia de reserpina (Fig. 4, Tabla I) fuertemente sugiere que la noradrenalina liberada por la carga ácida procede de las vesículas sinápticas a través del mecanismo de exocitosis.

Esta posibilidad esta reforzada por el análisis de  $^3H$ -NA (Fig.3 A y B) no metabolizada e intacta presente en las fracciones colectadas de la superfusión con SR-acetato-pH6-EGTA o remanentes en la rebanada, que demuestran que la mayor fracción del  $^3H$  se encuentra unido a NA intacta ( $83.3 \pm 6.9\%$   $n=9$  y  $86 \pm 3\%$   $n=8$  respectivamente).

Nuestros datos surgieron de los iones  $H^+$  a altas concentraciones intracelulares pueden sustituir a los iones  $Ca^{2+}$  en la liberación exocitósica de  $^3H$ -NA, mediante un mecanismo similar al del  $Ba^{2+}$ . Es poco probable que el  $H^+$  sea capaz de sustituir al  $Ca^{2+}$  en la fosforilación de proteínas, pero es factible que se pueda unir con menor afinidad que el  $Ca^{2+}$  a las proteínas blanco involucradas en el anclaje y/o fusión de las vesículas sinápticas.

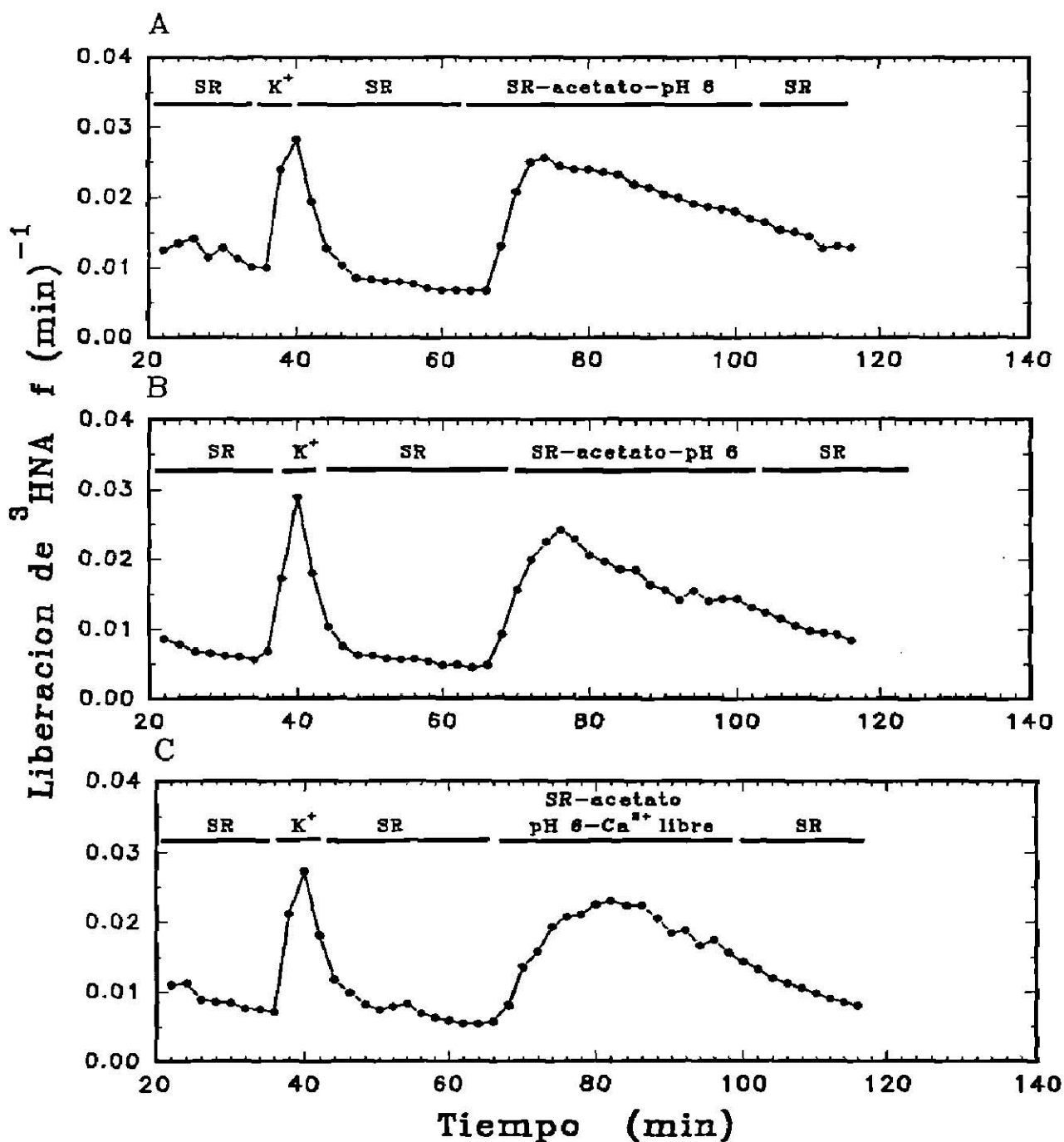


Fig.1. El estado funcional de las rebanadas se evaluó promoviendo la liberación por excocitosis de <sup>3</sup>H-NA mediante 2 min de despolarización con K<sup>+</sup> 40 mM, aplicado cuando se ha alcanzado una velocidad de liberación basal. (A) La solución de SR-acetato-pH6 también induce eflujo de <sup>3</sup>H-NA con una cinética mas lenta, pero con una magnitud semejante a la promovida por el pulso de K<sup>+</sup>. (B) El incremento en el eflujo de <sup>3</sup>H-NA evocado por la superfusión en SR-acetato-pH 6, no se reduce por la adición de DMI (20 μM) y pargilina (10 μM) al medio de superfusión, ni como se muestra en (C) por la superfusión en medios libres de Ca<sup>2+</sup>

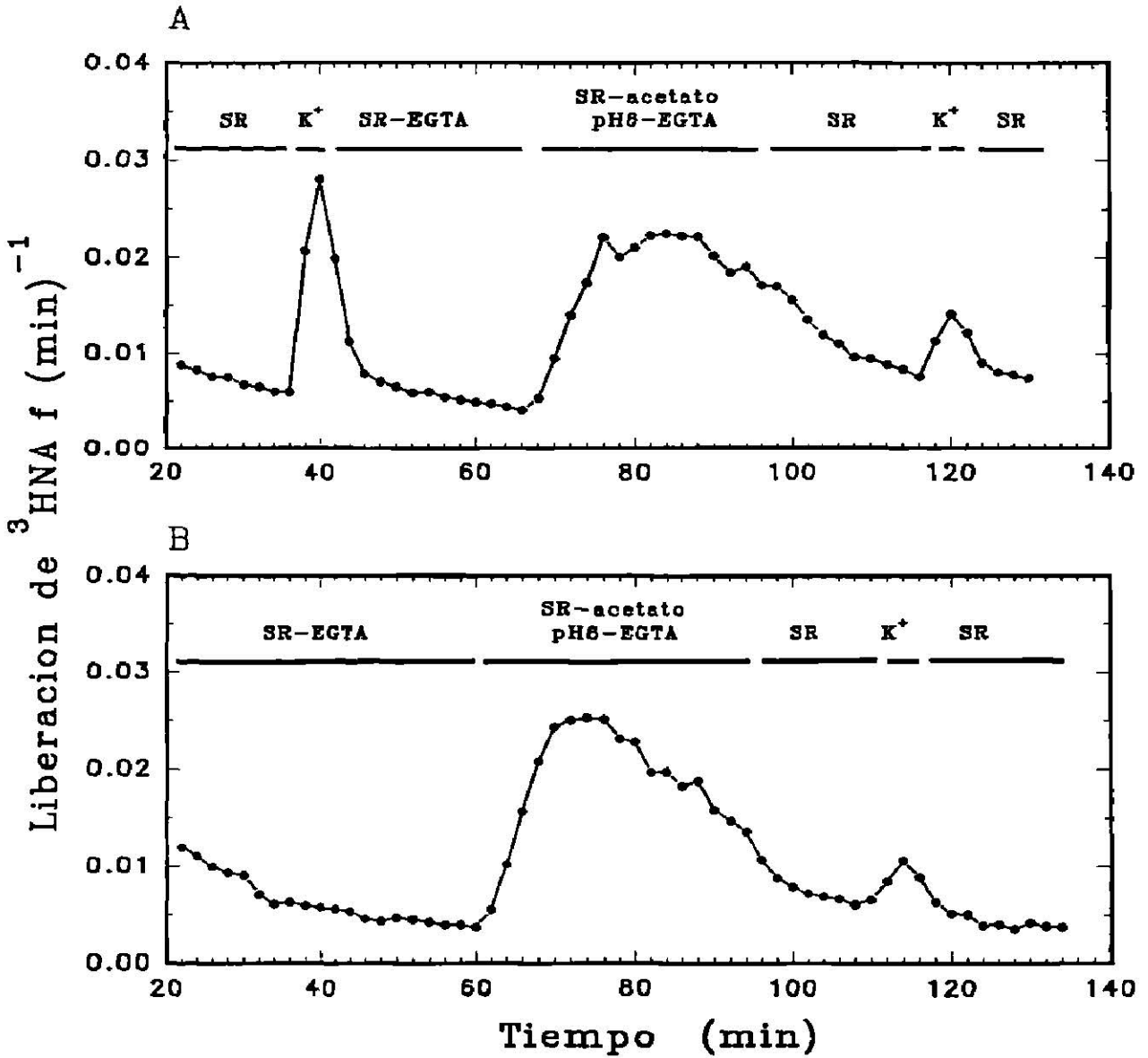


Fig.2. La superfusión en SR-EGTA durante 26 (A) u 90 (B) min antes del cambio a la solución SR-acetato-pH6-EGTA, no reduce el incremento en la liberación de <sup>3</sup>H-NA generada por esta solución. Comparar con la Fig. 1B y C. Las soluciones empleadas contenían DMI y pargilina.

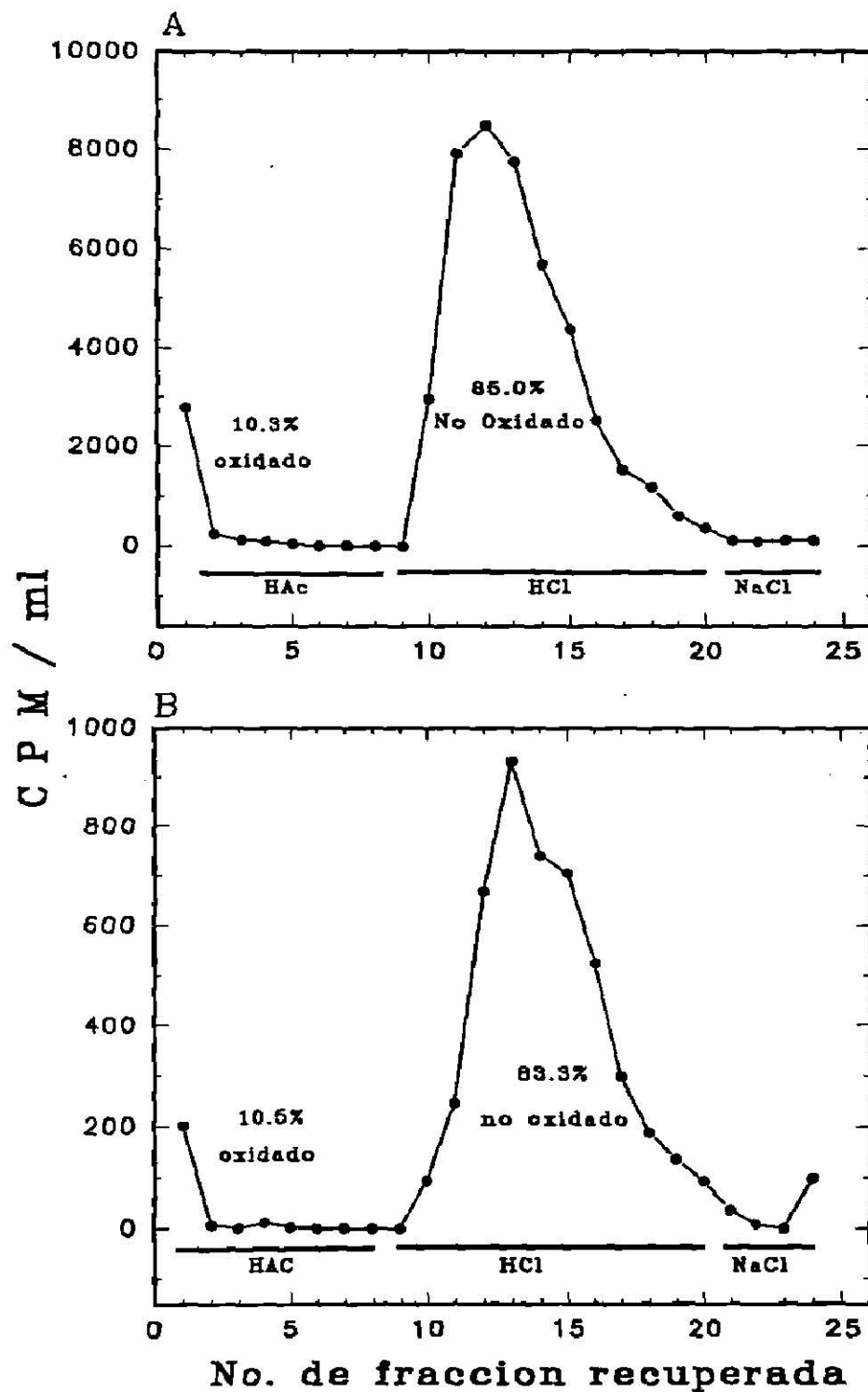


Fig.3. Perfil de elusión del contenido de  $^3\text{H}$ -NA intacta y de  $^3\text{H}$ -NA oxidada remanente en la rebanada (A) y presente en la fracción colectada (B) correspondiente al efecto máximo de la superfusión con SR-acetato-pH 6-EGTA. Nótese que en ambos casos la  $^3\text{H}$ -NA intacta es la forma predominante.



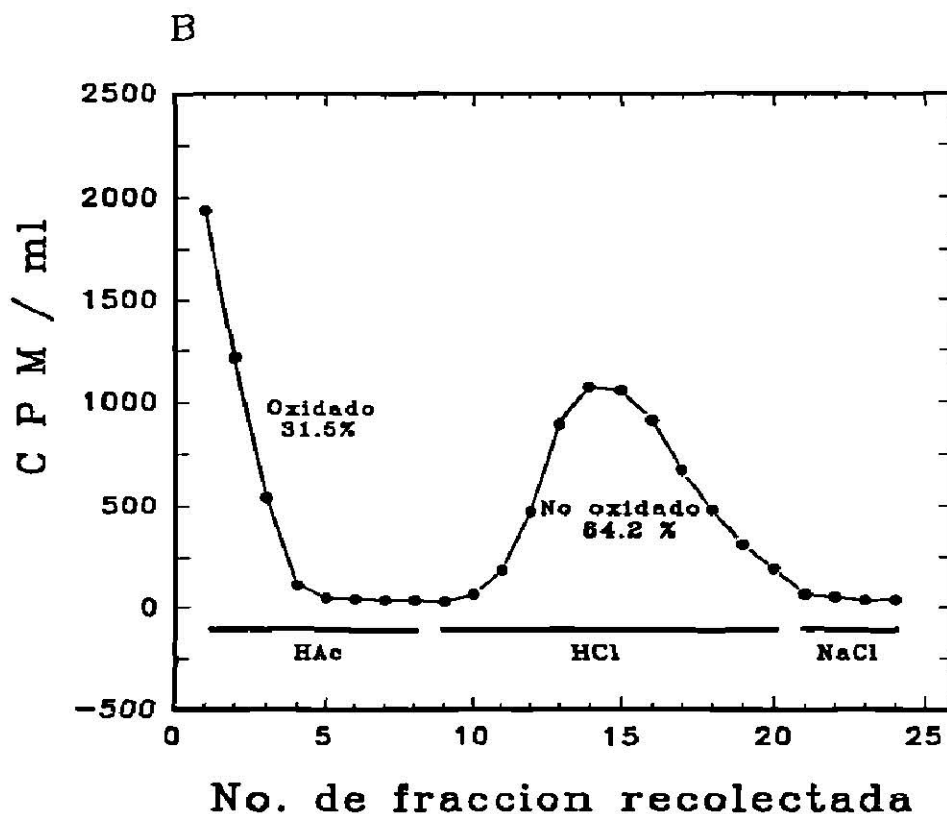
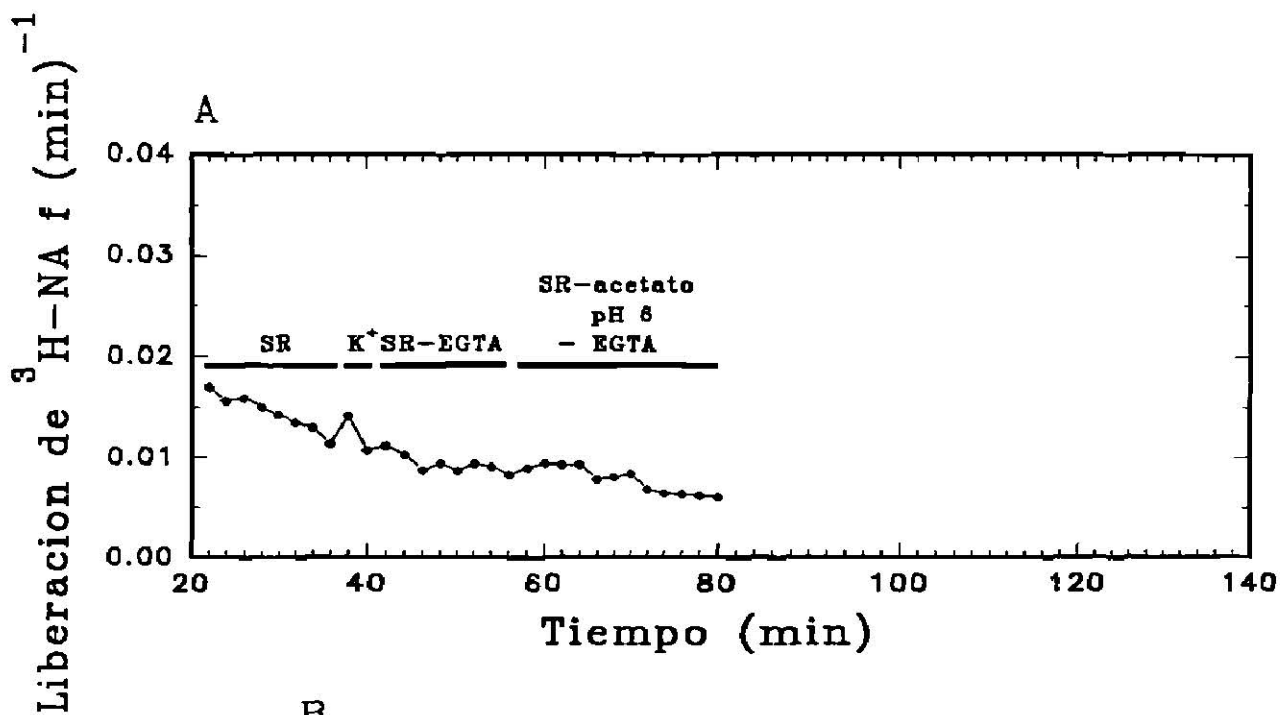


Fig.4. (A) Rebanadas provenientes de ratas tratadas por 18 hrs con reserpina, muestran una reducción de la liberación de  $^3\text{H-NA}$  inducida por despolarización y por SR-acetato-pH 6-EGTA. (B) El análisis cromatográfico de la  $^3\text{H-NA}$  presente en la rebanada al tiempo correspondiente al máximo efecto de la superfusión con SR-acetato-pH 6-EGTA, reveló como se esperaba un aumento de la fracción oxidada de la  $^3\text{H-NA}$  y la presencia de  $^3\text{H-NA}$  no-metabolizada soluble en el citosol, que sin embargo no es liberada (ver Fig. 4A)

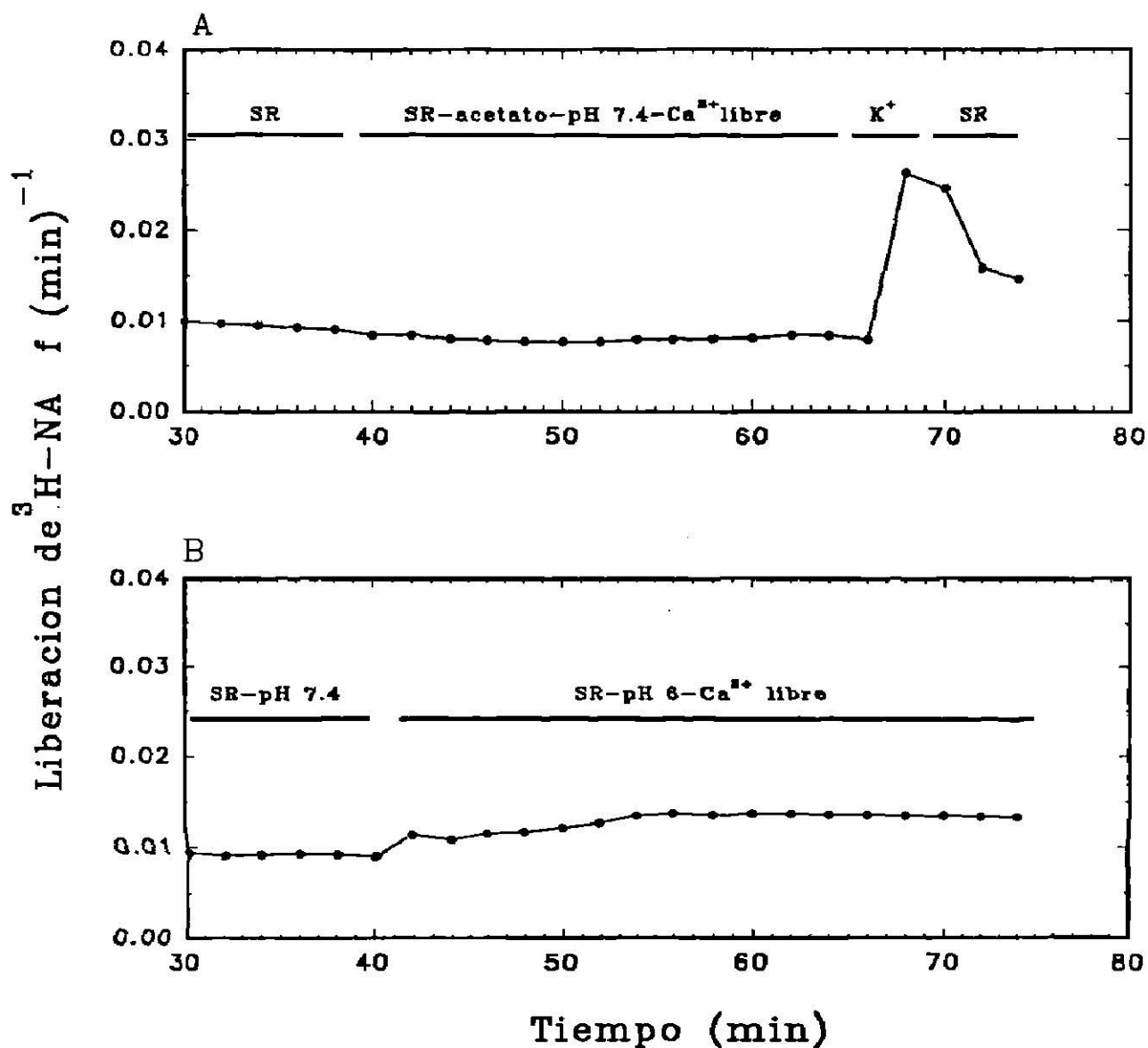


Fig.5. (A) La superfusión en SR-acetato-pH 7.4 durante 28 min no induce cambios en la velocidad de liberación de <sup>3</sup>H-NA, sin embargo el pulso de K<sup>+</sup> evoca la repuesta esperada. (B) La acidificación del medio de superfusión (pH 6) en la ausencia de acetato, genera sólo un lento y ligero aumento en la velocidad de liberación de <sup>3</sup>H-NA, que alcanza una meseta a los 20 min. de superfusión. Las soluciones empleadas contenían DMI y pargilina

**TABLA I**

**Incrementos en la liberación de  $^3\text{H-NA}$  [ $\Delta f(\text{min}^{-1})$ ] inducida por SR-acetato-pH 6 en varias condiciones.**

Condición	1	2	3	4	5
Media	0.0133	0.0134	0.0143	0.0206	0.001
SD	0.003	0.0022	0.003	0.0043	0.0008
n	5	13	6	14	7

Todas las soluciones contienen  $20 \mu\text{M}$  DMI y  $10 \mu\text{M}$  de paragilina. 1 = SR-acetato-pH 6; 2 = SR-acetato-pH 6-libre de calcio; 3 = Superfusión durante 26 min en SR-EGTA antes del cambio a SR-acetato-pH 6-EGTA, 4 = Tiempo total de 90 min en SR-EGTA (30 min de incubación + 60 min de superfusión en SR-EGTA) antes del cambio a SR-acetato-pH 6-EGTA, 5 = Rebanadas reserpinizadas superfundidas con SR-EGTA durante 26 min antes de cambiar a SR-acetato-pH 6-EGTA.

## REFERENCIAS

Augustine, G.J., M.P., Charlton y S.J., Smith, "Calcium action in synaptic transmitter release", *Ann. Rev. Neurosci*, **10**, pp 633-693, ( 1987 ).

Augustine, G.J. y R. Eckert., "Divalent cations differentially support transmitter release at the squid giant synapse", *J. Physiol. Lond*, **346**, pp 257-271, ( 1984 )

Austin, C., y S., Wray., "Extracellular pH signals affect rat vascular tone by rapid transduction into intracellular pH changes", *Journal of Physiology*, **466**, pp 1-8, ( 1993 ).

Beer, M.F., E.C., Sally, R.G., Johnson y A., Scarpas., "H<sup>+</sup>-ATPase and catecholamine transport in chromaffin granules", *Transport ATPases*, **402**, pp 116-133, ( 1982 ).

Davies, N.W., N.B., Standen y P.R., Stanfield., "The effect of intracellular pH on ATP-dependent potassium channels of frog skeletal muscle", *Journal of Physiology*, **445**, pp 549-568, ( 1992 ).

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

Goodman y Gilman, *Bases farmacológicas de la terapéutica*, 207-213, Ed. Med. Panamericana, Buenos Aires, ( 1991 ).

Hubbard, J.O., S.F. Jones, y E.M. Landau., "On the mechanism by which calcium and magnesium effect spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve terminals", *Journal of Physiology*, **194**, pp 335-380, ( 1968 ).

Kandel E.R., J.H., Schwartz y T.M., Jessell, *Principles of neural science*, Ed. Elsevier, New York, ( 1991 ).

Karin, N.M., T.J., Krakower y S.K., Creed w abell., "Intracellular distribution of monoamine oxidasa A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord", *Brain research*, **612**, pp 221-230, ( 1993 ).

Link, E., L., Edelman, J.H., Chou, T., Binz, S., Yamasaki, U., Eisel, M., Baument, T.C., Sudhof, H., Niemann y R., Jahn, "Tetanus toxin action: Inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **189**, pp 1017-1023, ( 1992 ).

Llinas, R., J.A., Gruner, M., Sugimori, T.L., McGuinness y P., Greengard "Regulation by synapsin I and  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein Kinase II of transmitter release in squid giant synapse", *Journal physiology*, **436**, pp 257-282, ( 1991 ).

Mcllwain, H., *Practical Neurochemistry*, Churchill Livington, pp. 105-159, ( 1975 ).

Moriyama, Y. y M., Fusal., " $H^{+}$ -ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles", *Biochemical and biophysical research communications*, **173**, No 1, pp 443-448, ( 1990 ).

Nachshen, D.A. y E.M., Landau., "The interaction of pH and divalent cations at the neuromuscular junction", *Journal of Physiology*, **251**, pp 775-790, ( 1975 ).

Nachshen, D.A., y M. P., Blaustein., "The influx of calcium, strontium, and barium in presynaptic nerve endings", *Journal. Gen. Physiology.*, **79**, pp 1065-1087, ( 1979 ).

Nachshen, D.A., y M. P., Drapeau., "The regulation of cytosolic pH in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain", *Journal Gen. Physiology*, **91**, pp 289-303, ( 1988 ).

Nelson N., "Structure and pharmacology of the proton-ATPases", Elsevier science publishers Ltd. **12**, pp 71-75, ( 1991 ).

Orrego, F., y S., Sánchez-Armass., "Electrically induced release of  $^3H$ -Noradrenaline from rain brain cortex slices: A kinetic analysis of the dependence on extracellular calcium". *Pharmacol. Res. Comm.*, **13**, pp 949-954, ( 1981 ).

Pasantes H., J., Sanchez y R., Tapia., *Neurobiología celular*, 1st. Ed., Fondo de cultura económica, México, SEP, D.F., ( 1991 ).

Paton, D. M., *The mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of catecholamines*, Raves Press, New York, ( 1976 ).

Richardt, G., G., Federolf y Habermann., "Affinity of heavy metal ions to intracellular  $Ca^{2+}$ -binding proteins", *Biochem. Pharmacol.*, **35**, pp 1331-1335, ( 1986 ).

Rigual, R., J.R., López-López y C., Gonzalez., "Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high  $P_{CO_2}$  stimulation of de cat carotid body", *J. Physiology*, **433**, pp 519-531, ( 1991 ).

Robinson, P.J., y P.R., Dunkley., "Depolarization-dependent protein phosphorylation in rat cortical synaptosomes: the effect of calcium, strontium, and barium", *Neurosci. Lett*, **43**, pp 85-90, ( 1983 ).

Roos, A., y W. F., Boron., Intracellular pH, *Physiol. Rev.*, No 61, pp 296-434, ( 1981 ).

Saldade, M.C. y F., Orrego., "Electrically induced release of  $^3\text{H}$ -Dopamine from slices obtained from different rat brain cortex regions. Evidence for a widespread dopaminergic innervation of the neocortex", *Brain research*, 130, pp 483-494, ( 1977 ).

Sihra, T.S. y R.A., Nichols., "Mechanisms in the regulation of neurotransmitter release from brain nerve terminals: current hypotheses", *Neurochem. Research*, 18, No 1, pp 47-58, ( 1993 ).

Smith, S.J. y G.J., Augustine., "Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release", *Trend. Neurosci*, 11, pp 458-464, ( 1988 ).

Sundhof, T.C. y R., Jahn., Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling, *Neuron*, 6, pp 665-677, ( 1991 ).

Swallow, C.J., S., Grinstein y O.D. Rotstein., "A vacuolar tipe  $\text{H}^+$ -ATPasa regulates cytoplasmic pH in murine macrophages", *Journal of Biological Chemistry*, 265, pp 7645-7654, ( 1989 ).

Szelenyi, I., Inhibitors of monoamine oxidase B, pp 125-143, ( 1993 ).

Tonnessen, T.I., K., Sandvig y S. Olsnes., "Role of  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality", *The american physiological society*, 258, No 27, pp C1117-C1126 ( 1990 ).

Trimble, W.S., M., Linial y R.H. Schellear., Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal, *Ann Rev Neurosci*, No 14, pp 93-122, ( 1991 ).

Troy Littleton J. y H. J. Bellen., "Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a  $\text{Ca}^{2+}$ - dependent manner", *TINS*, 18, No 4, pp 177-183, ( 1995 ).

Turner, T.J. y S.M., Goldin., "Multiple components of synaptosomes  $^3\text{H}$ -aminobutyric acid rease resolved by a rapid superfusion system", *Biochem*, 28, pp 586-593, ( 1989 ).

Vargas, O., M.C., Doria de Lorenzo, C., Saldade, y F. Orrego., "Potassium-induce release of  $^3\text{H}$ -gaba and of  $^3\text{H}$ -noradrenaline from normal and reserpineze rat brain cortex slices. Differences in calcium-dependence and in sencibility to potassium ions", *J. Neurochem*, 28, pp 165-170, ( 1977 ).

Vargas, O., y F., Orrego., "Elevated extracellular potassium as a stimulus for releasing <sup>3</sup>H-norepinephrine and <sup>14</sup>C- $\alpha$ -aminoisobutyrate from neocortical slices. Specificity and calcium dependency of the process", J. Neurochem. 26, pp 31-34, ( 1976 ).

Wang, J.K.T., S.I., Walaas y P., Greengard., "Protein phosphorylation in nerve terminals: comparison of calcium/calmodulin-dependent and calcium/diacylglycerol-dependent systems", J. Neurosci., 8, pp 281-288, ( 1988 ).

Zengel, J.E., J.L., Magleby, J.P., Horn, D.A., McAfee y P.J., Yarowsky., "Facilitation, augmentation and potentiation of synaptic transmission at the superior cervical ganglion of the rabbit", J. Gen. Physiol, 76, pp 213-231, ( 1980 ).

## ABREVIATURAS

Ach	=	Acetilcolina
ATP	=	Adenosin trifosfato
Bis-MSB	=	p-bis(o-metilestearil) benceno
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	=	Calcio intracelular
Ca <sup>2+</sup> <sub>o</sub>	=	Calcio extracelular
COMT	=	Catecol-ortometiltransferasa
DA	=	Dopamina
DMI	=	Desmetilimipramina
DMSO	=	Dimetilsulfoxido
EGTA	=	Acido etilenglicol aminoeter tetracético
HAC	=	Acido acético
HEPES	=	N-( 2 hidroxietil- piperazina-N'- 2 ácido etanosulfónico )
5-HT	=	5-Hidroxitriptamina o serotonina
MAO	=	Monoamino oxidasa
MES	=	2-(N-Morfolino) ácido etanolsulfónico
NaOAc	=	Acetato de sodio
NA	=	Noradrenalina
<sup>3</sup> H-NA	=	Noradrenalina tritiada
pH <sub>i</sub>	=	pH intracelular
pH <sub>o</sub>	=	pH extracelular
PPO	=	2,5 difeniloxazol
TCA	=	Acido Tricloro acético
TEA	=	Tetraetil amonio
TTX	=	Tetradotoxina



