



**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL SISTEMA GABAERGICO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**en cumplimiento parcial de los requisitos**

**para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias**

**con mención en Biología.**

**Facultad de Ciencias**

**por**

**NESTOR ANTONIO LAGOS WILSON**

**Diciembre, 1986**



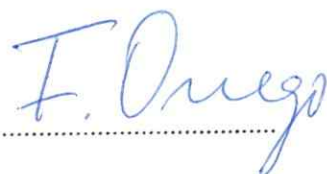
**Profesor Patrocinante: Fernando Orrego V.**

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

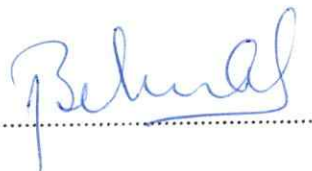
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato  
**NESTOR ANTONIO LAGOS WILSON**  
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología.

Director de Tesis  
Dr. Fernando Orrego V.

  
.....

Comisión Informante de Tesis  
Dr. Jorge Belmar

  
.....

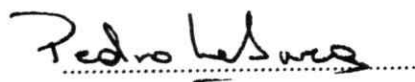
Dra. Cecilia Hidalgo

  
.....

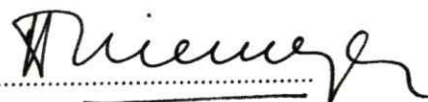
Dr. Nibaldo Inestroza

.....

Dr. Pedro Labarca

  
.....

Dr. Hermann Niemeyer F. (Presidente)

  
.....

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE  
NEUROQUIMICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y  
BIOFISICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD  
DE CHILE, BAJO LA DIRECCION DEL PROFESOR FERNANDO  
ORREGO YICUÑA.

Deseo agradecer en forma especial a:

Dra. Rosa Deves A., por el apoyo y estímulo permanente que me brindó en el transcurso de la realización de esta Tesis.

Dr. Carlos Muñoz A., por la realización de controles a Microscopía Electrónica que se presentan en esta Tesis.

Dr. Milton de la Fuente, por enseñarme el radioanálisis de  $[H^3]$  ouabaina.

Sra. Yolanda Moutolin , Secretaria del Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, por su trabajo en la escritura y presentación de esta Tesis.

Sr. Patricio Cancino, Ayudante técnico del laboratorio, por la cooperación permanente en la preparación del material necesario para la realización de los experimentos.

Programa CHI 83/002 y CHI 84/003 de PNUD/UNESCO y al DIB, Universidad de Chile, por otorgarme el apoyo financiero necesario para el desarrollo de esta Tesis.

A todos los Profesores y Alumnos del programa de Doctorado, los cuales permiten , en un esfuerzo conjunto extraordinario la existencia y desarrollo de este programa de postgrado en la Universidad de Chile.

MUCHAS GRACIAS

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE MICROFOTOGRAFIAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XXI
1. INTRODUCCION.....	1
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	17
2.1. Animales.....	17
2.2. Métodos.....	17
2.2.1. Obtención del tejido.....	17
2.2.2. Preparación de membranas utilizadas en el ensayo de liga- men al receptor GABA <sub>A</sub> .....	18
2.2.3. Extracción de fracciones subcelulares.....	18
2.2.3.1. <i>Extracción de membranas sinápticas de cerebro total con detergente Triton X-100</i> .....	18
2.2.3.2. <i>Extracción del detergente Triton X-100 de sobre- nadante de membranas sinápticas</i> .....	19
2.2.3.3. <i>Extracción de membranas sinápticas con ácido tricloroacético (TCA)</i> .....	20
2.2.3.4. <i>Extracción de fracciones vesiculares en caliente</i> .....	20

2.2.3.5. <i>Extracción de vesículas sinápticas en acetona ácida</i> .....	20
2.2.4. Fraccionamiento de extractos obtenidos a partir de fracciones subcelulares.....	21
2.2.4.1. <i>Cromatografía líquida en columnas de gel Sephadex 6-10</i> .....	21
2.2.4.2. <i>Cromatografía en papel ascendente</i> .....	22
2.2.4.3. <i>Electroforesis a alto voltaje (EAV)</i> .....	23
2.2.5. Marcación de vesículas sinápticas (VS) con [ $H^3$ ]-noradrenalina en corteza cerebral .....	23
2.2.6. Fraccionamiento y purificación de vesículas sinápticas.....	24
2.2.6.1. <i>Centrifugación Diferencial</i> .....	25
2.2.6.2. <i>Filtración en gel Sepharose 4B - Concanavalina A y Sepharose 4B</i> .....	25
2.2.6.3. <i>Filtración en gel Sephacryl 5-1000</i> .....	32
2.2.6.4. <i>Centrifugación en gradientes isoosmóticas de Percoll</i> .....	33
2.2.7. METODOS DE ENSAYOS.....	34
2.2.7.1. Ensayo de unión al receptor GABA <sub>A</sub> .....	34
<i>a. Técnica por centrifugación</i> .....	34
<i>b. Técnica por filtración</i> .....	35
2.2.7.2. Ensayo de unión de [ $H^3$ ]- Ouabaína a (Na <sup>+</sup> - K <sup>+</sup> ) ATPasa.....	37
2.2.7.3. Ensayo de captación de [ $H^3$ ]- GABA por fracción de VS obtenidas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores.....	38

2.2.7.4.	Determinación de proteínas.....	39
	<i>a. Reacción con azul de Coomasie G - 250</i> <i>(Bradford, 1976).....</i>	39
	<i>b. Método de Lowry y col. (1951).....</i>	39
2.2.8.	Microscopía Electrónica.....	39
2.3.	Reactivos.....	40
2.4.	Expresión de resultados y estadísticas.....	42
3.	RESULTADOS.....	43
3.1.	INVESTIGACION DE PRESENCIA DE MODULADORES ENDOGENOS PARA EL RECEPTOR DE GABA <sub>A</sub> .....	43
3.1.1.	En preparaciones de membranas sinápticas de cerebro total....	43
3.1.1.1.	<i>Fraccionamiento por filtración en Sephadex G-10</i> <i>de extracto de membranas obtenidas según el método</i> <i>de Yoneda y Kuriyama (1980).....</i>	43
3.1.1.2.	<i>Fraccionamiento por filtración en Sephadex G-10</i> <i>de extracto de membranas tratadas con</i> <i>ácido tricloroacético (TCA).....</i>	46
3.1.2.	En preparaciones de membranas sinápticas de corteza cerebral.....	49
3.1.2.1.	<i>Pruebas de la existencia de un inhibidor endógeno de la</i> <i>unión de [H<sup>3</sup>]-GABA ,presente en extracto de membrana</i> <i>obtenido de acuerdo al método descrito por Toffano</i> <i>y colaboradores .....</i>	49

3.1.2.2.	<i>Fraccionamiento en Sephadex G-10 del extracto de membranas obtenidas según el método de Toffano y col. Medición de ligamen de substancia endógena en dos preparaciones de membranas.....</i>	51
3.1.3.	<i>En preparaciones de vesículas sinápticas.....</i>	54
3.1.3.1.	<i>Fraccionamiento en Sephadex G-10 de extracto de vesículas sinápticas de corteza obtenidas según método de Hata y colaboradores .....</i>	54
3.1.3.2.	<i>Fraccionamiento por cromatografía en papel de extracto de vesículas sinápticas de corteza obtenidas según método de Hata y colaboradores .....</i>	57
3.1.3.3.	<i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas de corteza (EVS) obtenidas por el método Hata y colaboradores .....</i>	57
3.1.3.4.	<i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de Seidler y colaboradores .....</i>	60
3.1.3.5.	<i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de De Lorenzo y Freedman.....</i>	60
3.1.3.6.	<i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de Médula Espinal.....</i>	65



3.1.3.7. <i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de Cerebelo</i> .....	65
3.1.3.8. <i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de Hipotálamo</i> .....	68
3.1.3.9. <i>Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de Cuerpo Estriado</i> .....	75
3.1.4. Especificidad de unión al receptor GABA <sub>A</sub> , presente en membranas sinápticas preparadas según método de Horng y Wong (1979).....	75
3.1.4.1. <i>Efecto de péptidos neuroactivos en la unión al receptor GABA<sub>A</sub></i> .....	75
3.2. PURIFICACION DE FRACCIONES VESICULARES OBTENIDAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA QUE CONTIENEN GABA ENDOGENO...	79
3.2.1. Obtención de fracciones vesiculares por filtración en gel.....	79
3.2.1.1. <i>Fraccionamiento de vesículas sinápticas preparadas de acuerdo al métodos de Hata y colaboradores en gel de Sepharose 4B</i> .....	79
3.2.1.2. <i>Fraccionamiento a 6° C de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en Sepharose 4B-concanavalina A</i> .....	82
3.2.1.3. <i>Fraccionamiento a temperatura ambiente de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en Sepharose 4B-concanavalina A</i> .....	83
3.2.1.4. <i>Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B</i> .....	88

3.2.1.5.	<i>Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B. Preparación hecha en presencia de [H<sup>3</sup>]-GABA.....</i>	91
3.2.1.6.	<i>Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman en Sepharose 4B.....</i>	94
3.2.1.7.	<i>Microscopía electrónica de fracción particulada eluída de columna Sepharose 4B.....</i>	97
3.2.1.8.	<i>Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en Sephacryl S-1000.....</i>	98
3.2.2.	<i>Obtención de fracciones vesiculares por separación en gradientes isoosmóticas de Percoll.....</i>	106
3.2.2.1.	<i>Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en gradiente de Percoll.....</i>	106
3.3.	<b>ESTUDIOS FUNCIONALES DE FRACCION VESICULAR EN RELACION AL MECANISMO DE CAPTACION DE [H<sup>3</sup>]-GABA.....</b>	109
3.3.1.	<i>Captación de [H<sup>3</sup>]-GABA en el tiempo por vesículas sinápticas. Efecto de ATP (Tris).....</i>	109
3.3.2.	<i>Captación de [H<sup>3</sup>]-GABA: Efecto de Na<sup>+</sup> y ATP (Na<sup>+</sup>).....</i>	109
3.3.3.	<i>Efecto de la concentración de ión Cl<sup>-</sup> en la captación de [H<sup>3</sup>]-GABA.....</i>	112
3.3.4.	<i>Captación de [H<sup>3</sup>]-GABA en el tiempo en presencia de KCl 120 mM.....</i>	115
3.3.5.	<i>Captación de [H<sup>3</sup>]-GABA a 0 min y a 7 min en presencia de ATP (K<sup>+</sup>), ATP (Na<sup>+</sup>), ATP (Tris) y Na<sup>+</sup>.....</i>	115

4.	DISCUSION.....	123
4.1.	Investigación de presencia de moduladores endógenos para el receptor GABA <sub>A</sub> .....	123
4.1.1.	<i>En preparaciones de membranas sinápticas</i> .....	124
4.1.2.	<i>En preparaciones de vesículas sinápticas</i> .....	130
4.1.3.	<i>Efecto de peptidos neuroactivos en el ligamen del receptor GABA<sub>A</sub></i> .....	131
4.2.	Presencia de GABA endógeno en vesículas sinápticas.....	134
4.3.	Estudios de captación de [H <sup>3</sup> ] - GABA por una fracción de vesículas sinápticas.....	152
4.4.	Conclusiones .....	157
5.	REFERENCIAS.....	158

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla I	Efecto inhibitor de extracto de membranas de corteza en la unión específica de $[H^3]$ - GABA a dos preparaciones de membranas sinápticas.....	50
Tabla II	Efecto de péptidos neuroactivos en la unión al receptor $GABA_A$ .....	78

## LISTA DE MICROFOTOGRAFIAS

	Pág.
Microfotografía 1    Microscopía electrónica de fracción particulada eluida de columna de Sepharose 4B.....	99
Microfotografía 2    Microscopía electrónica de fracción particulada eluida de columna de Sepharose 4B (Mayor amplificación).....	101

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por Hata y col.....	27
Figura 2	Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por Seidler y col.....	29
Figura 3	Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por De Lorenzo y Freedman.....	31
Figura 4	Perfil de elución en Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total.....	44
Figura 5	Perfil de elución en Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total obtenido con TCA.....	47

Figura 6	Fraccionamiento en Sephadex G-10 de extracto de membranas obtenidas según el método de Toffano y colaboradores. Medición de unión de substancia endógena en dos preparaciones de membranas.....	52
Figura 7	Fraccionamiento en Sephadex G-10 de EYS de corteza preparada de acuerdo al método de Hata y colaboradores.....	55
Figura 8	Fraccionamiento por cromatografía en papel de EYS de corteza según método de Hata y colaboradores.....	58
Figura 9	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS de corteza obtenidas por el método de Hata y colaboradores.....	61
Figura 10	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS de corteza obtenidas por el método de Seidler y colaboradores.....	63
Figura 11	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS de corteza obtenidas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman.....	66
Figura 12	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de vesículas sinápticas crudas de Médula Espinal.....	69

Figura 13	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas crudas de cerebelo.....	71
Figura 14	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS crudas de Hipotálamo.....	73
Figura 15	Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS crudas de Cuerpo Estriado.....	76
Figura 16	Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores.....	80
Figura 17	Fraccionamiento de VS por filtración en Sepharose 4B-concanavalina A a 6° C.....	84
Figura 18	Fraccionamiento de VS por filtración en Sepharose 4B-concanavalina A a temperatura ambiente.....	86
Figura 19	Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores.....	89
Figura 20	Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B. Preparación de VS hecha en presencia de [H <sup>3</sup> ]-GABA.....	92



Figura 21	Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS de corteza preparadas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman.....	95
Figura 22	Cromatografía en Sephacryl S-1000 de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores.....	104
Figura 23	Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en gradiente de Percoll.....	107
Figura 24	Captación de $[H^3]$ - GABA en el tiempo. Efecto de ATP(Tris).....	110
Figura 25	Captación de $[H^3]$ -GABA: Efecto de $Na^+$ y ATP( $Na^+$ ).....	113
Figura 26	Efecto de la concentración del ión $Cl^-$ en la captación de $[H^3]$ -GABA.....	116
Figura 27	Captación de $[H^3]$ - GABA en el tiempo, en presencia de KCl 120 mM: Efecto de ATP( $K^+$ ).....	118
Figura 28	Captación de $[H^3]$ -GABA a 0 min y 7 min en presencia de ATP( $K^+$ ), ATP( $Na^+$ ), ATP(Tris) y $Na^+$ .....	120

## ABREVIATURAS

ACh	:	Acetilcolina
ATPase	:	ATP- fosfohidrolasa
ACTH	:	Adrenocorticotrofina
BSA	:	Albúmina sérica de bovino
CCK-8	:	Colecistoquinina-octapéptido
Ci	:	Curie
EAV	:	Electroforesis a alto voltaje
EDTA	:	Acido etilendiaminotetracético
e.e.m.	:	error estándar de la media
EVS	:	Extracto de vesículas sinápticas
GABA	:	Acido gama- aminobutírico
(g)	:	Gas
GRIF	:	Factor inhibidor de la unión de GABA
LH-RH	:	Factor liberador de hormona luteinizante
Muscimol	:	5-aminometil-3-isoxazolo]
NA	:	Noradrenalina
NT	:	Neurotransmisor (es)
PVP	:	Polivinil pirrolidona
Receptor GABA <sub>A</sub>	:	Receptor A de GABA
SNC	:	Sistema Nervioso Central
TCA	:	Acido tricloroacético
TRH	:	Factor liberador de Tirotrófina

TRIS : Tris (hidroximetil) - aminometano  
V/cm : Volt/centímetro (s)  
VS : Vesículas sinápticas

## RESUMEN

El objetivo de esta Tesis estuvo dirigido a responder las siguientes interrogantes:

1. ¿Existe en el sistema nervioso central (SNC) de rata otra sustancia endógena, aparte de GABA, que sea capaz de interactuar con el receptor GABA<sub>A</sub>?
2. ¿Se encuentra esta sustancia en vesículas sinápticas?
3. ¿Se encuentra GABA en vesículas sinápticas, en forma similar como lo están los neurotransmisores bien establecidos, o sólo está presente en forma soluble en el citoplasma de las neuronas inhibitoras?
4. ¿Cuáles son las características del sistema de captación y almacenamiento de GABA en vesículas sinápticas?

Para cumplir con este propósito se investigó la posible existencia de una sustancia endógena que siendo diferente del GABA se una al receptor GABA<sub>A</sub> presente en cerebro de rata. Para ello se utilizaron extractos provenientes de membranas sinápticas de cerebro completo y de corteza cerebral de rata, así como también de vesículas sinápticas aisladas de: corteza cerebral, cuerpo estriado, hipotálamo, cerebelo y médula espinal.

Los extractos fueron sometidos a fraccionamientos por filtración en gel Sephadex G-10; cromatografía en papel y electroforesis a alto voltaje. El GABA endógeno y el material endógeno tipo GABA se cuantificó por la habilidad que presentaban para desplazar [<sup>3</sup>H]-GABA o [<sup>3</sup>H]-muscimol,

de los receptores de GABA presentes en una preparación de membranas sinápticas. Con este radioanálisis, fácilmente se pudieron detectar 5 pmoles de GABA/ml.

Se realizó un gran número de diferentes experimentos, en algunos de los cuales se repitieron exactamente los procedimientos descritos en la literatura para la purificación de moduladores endógenos postulados, encontrándose como único ligando endógeno a GABA, tanto en los extractos de membranas sinápticas como en los obtenidos de vesículas sinápticas.

Ninguno de los siguientes péptidos produjo efectos significativos sobre la unión de [ $^3$ H]-GABA: substancia P, neurotensina, colecistoquinina-octapéptido, somatostatina, factor liberador de tirotrópina, factor liberador de hormona luteinizante, metionina encefalina (todas a  $10^{-5}$  M) angiotensina II ( $10^{-4}$  M), hormona adrenocorticotrópica ( $3 \times 10^{-7}$  M), incluyendo al polianión poli-L-lisina y al polianión poli-L-glutamato (ambos 30  $\mu$ g/ml). El estudio del efecto de péptidos sobre la unión de [ $^3$ H]-GABA fue interesante investigarlo debido a que la somatostatina y la colecistoquinina parecieran ser cotransmisores con GABA en algunas neuronas centrales (Somogyi y col., *J. Neuroscience*. 4, 2590-2603; 1984).

Para cuantificar el contenido de GABA endógeno presente en vesículas sinápticas, estas se purificaron por tres métodos diferentes descritos en la literatura (Hata y col., 1976, *J. Neurochem.* 27, 139-144; Seidler y col., 1977, *Life Sci.* 21, 1075-1086; De Lorenzo y Freedman, 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 183-192).

Se continuó la purificación de las vesículas sinópticas a partir de estas preparaciones aplicando como principio de separación el fraccionamiento por filtración en gel, cromatografía en columnas de Sepharose 4B, Sepharose 4B-concanavalina A y Sephacryl S-1000.

Para seguir el fraccionamiento y comprobar la pureza de las fracciones aisladas se midieron marcadores bioquímicos como: el contenido de [ $H^3$ ]-noradrenalina (NA) en vesículas noradrenérgicas (marcador de compartimiento vesicular) y unión de [ $H^3$ ]-ouabaína a  $Na^+ - K^+$  ATPasa (marcador de membrana plasmática). Además se realizaron controles en microscopía electrónica para determinar la homogeneidad y pureza de las vesículas sinápticas aisladas.

Al utilizar los dos primeros procedimientos de purificación de vesículas nombrados anteriormente, se obtuvieron vesículas sinápticas que presentaban un alto contenido de GABA (15 nmoles/mg de proteína y 7,3 nmoles/mg de proteína, respectivamente), pero también, estas fracciones vesiculares presentaban, a juzgar por la unión de [ $H^3$ ]-ouabaína cierta contaminación con fragmentos de membranas plasmáticas. Estas preparaciones no sirvieron para realizar una estimación precisa del contenido de GABA dentro de una vesícula sináptica. Sin embargo, partiendo de la preparación de vesículas sinápticas descrita por De Lorenzo y Freedman (1978), se pudieron obtener vesículas sinápticas de una pureza mayor que 95%, de acuerdo a la unión de [ $H^3$ ]-ouabaína y a controles de microscopía electrónica.

Esta fracción de vesículas sinápticas que presenta una alta pureza, permitió determinar una concentración intravesicular de GABA igual a 0,07 M en corteza cerebral de rata, lo que corresponde a 420 moléculas de GABA en cada vesícula GABAérgica.

Por filtración en gel de Sephacryl S-1000 se obtuvo una fracción particulada, bien separada de la contaminación de membrana plasmática, que presentó un alto contenido de GABA endógeno. El GABA endógeno intravesicular estimado correspondió a 2.560 moléculas de GABA por vesícula, lo que permitió determinar una concentración de 0,4 M GABA, hasta ahora la concentración de GABA más alta determinada en una preparación de terminales del SNC.

También mediante gradientes isoosmóticos de Percoll autoformadas, se obtuvo una fracción particulada que presentó GABA endógeno, la cual sedimentó junto a la [ $H^3$ ]-NA. Esta fracción se logra separar muy bien de la mayor proporción de membranas plasmáticas reselladas, las cuales sedimentan en la porción más densa del gradiente y de las fracciones de material soluble que aparecen en la zona de menor densidad en la superficie del gradiente. La concentración intravesicular de GABA calculada, fue 0,09 M, lo que corresponde a 572 moléculas de GABA/vesícula.

No existen pruebas experimentales en la literatura que den cuenta de una alta concentración intravesicular de GABA. Siendo estos resultados los primeros en comunicar el contenido de GABA endógeno intravesicular,

lo que se corresponde bien con la función de neurotransmisor que se le ha asignado.

Para estudiar las características del mecanismo involucrado en la captación y almacenamiento de GABA por vesículas sinápticas, se utilizó la preparación descrita por Seidler y col. (1977). Esta preparación permitió obtener una fracción particulada en un período muy corto de tiempo (1,5 hora), utilizando un procedimiento de ruptura mecánica en medio isoosmótico de la membrana sináptica, a diferencia de los procedimientos que utilizan lisis hipoosmótica del sinaptosoma para la obtención de vesículas sinápticas.

Los estudios de captación de [ $^3\text{H}$ ]-GABA realizados en esta preparación demostraron que, la captación de [ $^3\text{H}$ ]-GABA alcanzaba el equilibrio a los 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , era independiente de ATP, dependiente de  $\text{Na}^+$  y estimulada por el ión  $\text{Cl}^-$ . Estos resultados corresponden más bien a una captación dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  asociada a membranas plasmáticas, que a una captación por vesícula sinápticas, la cual es dependiente de ATP, pero independiente de  $\text{Na}^+$ .



## ABSTRACT

The aim of this Thesis was to answer the following questions:

1. Aside from GABA, are other endogenous substances that are able to interact with the GABA<sub>A</sub> receptor, present in the rat central nervous system (CNS)?
2. If so, is such a substance located in synaptic vesicles?
3. Is GABA located inside synaptic vesicles, in the same way as the well established neurotransmitters are, or is it only present in the soluble cytoplasm of inhibitory neurons?
4. What are the characteristics of the GABA uptake and storage systems present in synaptic vesicles?

To fulfill these aims the possible existence of endogenous substances, other than GABA, that could also bind to rat brain GABA<sub>A</sub> receptors, was looked for.

This was done in extracts prepared from synaptic membranes derived from cerebral cortices or from whole rat brain, and in extracts prepared from synaptic vesicles obtained from cerebral cortex, striatum, hypothalamus, cerebellum and spinal cord. The extracts were fractionated by gel filtration on Sephadex G-10; by paper chromatography or by high voltage electrophoresis. Endogenous GABA, or GABA-like compounds, were

detected by their ability to compete with [<sup>3</sup>H]-GABA, or with [<sup>3</sup>H]-muscimol for binding to GABA<sub>A</sub> receptors. The sensitivity of this radioreceptor assay was better than 5 pmol GABA/ml.

In a very large number of different experiments performed, in many of which the procedures described in the literature for the isolation of different endogenous modulators, were followed exactly, no such endogenous ligands or modulators, aside from GABA itself, could be found in synaptic membranes or in synaptic vesicles. No effect on [<sup>3</sup>H]-GABA binding to its receptor was either found for the following peptides: substance P, neurotensin, cholecystokinin octapeptide sulfated, somatostatin, thyrotropin releasing hormone, luteinizing hormone releasing hormone, methionine enkephalin (all at 10<sup>-5</sup> M), angiotensin II (10<sup>-4</sup> M), ACTH (3 x 10<sup>-7</sup> M), poly-L-lysine and poly-L-glutamate (both at 30 µg/ml). To study the peptides effect on [<sup>3</sup>H]-GABA is of interest because somatostatin and cholecystokinin seem to be cotransmitters with GABA in some central neurons (Somogyi et al., 1984, *J. Neurosci.* 4, 2590-2603; ).

To quantify the endogenous GABA content in synaptic vesicles, these were isolated by three different procedures described in the literature (Hata et al., 1976, *J. Neurochem.* 27, 139-144; Seidler et al., 1977, *Life Sci.* 21, 1075-1086; De Lorenzo and Freedman 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 183-193).

Starting with these synaptic vesicle preparations further purification was obtained by gel filtration on columns of Sepharose 4B, Sepharose 4B-concanavalin A and Sephacryl S-1000.

Biochemical markers such as [ $^3$ H]-NA content in noradrenergic vesicles (as a vesicular marker) and [ $^3$ H]-ouabain binding to  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase (plasma membrane marker) were used to follow the fractionation procedure and to test the purity of the isolated vesicular fraction. Electron microscopy was also done to estimate the homogeneity and purity of the different synaptic vesicle fractions.

The first two vesicle isolation procedures named above, gave synaptic vesicles with a high GABA content (15 nmoles/mg protein and 7.3 moles/mg protein respectively), but also, as judged by [ $^3$ H]-ouabain binding, with some contamination by plasma membrane fragments. This did not allow a precise estimation of the GABA content of each synaptic vesicle. However, the procedure of De Lorenzo and Freedman gave synaptic vesicles of a purity higher than 95%, according to [ $^3$ H]-ouabain binding and electron microscopy.

This high purity synaptic vesicle fraction allowed me to estimate that the intravesicular concentration of GABA in rat brain cortex was 0.07 M. This is equivalent to 420 GABA molecules in each GABAergic vesicle.

By gel filtration on a Sephacryl S-1000 column a particulate fraction with a high endogenous GABA content, well separated from plasma membrane contamination was obtained. Intravesicular endogenous

GABA was estimated as 2,560 molecules of GABA/vesicle, that corresponds to 0.4 M GABA. To the best of my knowledge this is the highest GABA concentration reported in a preparation originating from CNS neuron terminals.

Furthermore, using self-forming isoosmotic Percoll gradients, a GABA-containing particulate fraction which sedimented together with [ $^3\text{H}$ ] NA was obtained. This fraction was well separated from most of the resealed plasma membrane, which sedimented to the denser portion of the gradient, and from the soluble material, which appeared in the lower density fraction on the top of the gradient. The intravesicular concentration of GABA was estimated as 0.09 M, that corresponds to 572 molecules of GABA/vesicle.

There is no experimental evidence in the literature for high concentrations of intravesicular GABA. Thus, these results are the first report of a GABA concentration in synaptic vesicles that is commensurate with a classical transmitter role for it.

To study the characteristics of the mechanism involved in the uptake and storage of GABA by synaptic vesicles, the preparation described by Siedler et al., (1977) was used. This preparation allowed to obtain a particulate fraction in a very short time (1.5 hr), and in which the synaptosomes were not disrupted by hypoosmotic lysis, but by mechanical rupture in a isotonic medium.

The [ $^3\text{H}$ ]-GABA uptake reached equilibrium at 5 min at 37° C. This uptake was ATP-independent,  $\text{Na}^+$ -dependent and stimulated by  $\text{Cl}^-$  ions. These results correspond to  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  dependent uptake by synaptic plasma membrane, rather than uptake into synaptic vesicles, which is dependent on ATP, but not on sodium ion.

## INTRODUCCION

El estudio de la neurotransmisión sináptica ha motivado a los investigadores durante las últimas décadas porque presenta un problema biológico que puede ser enfrentado simultáneamente por técnicas diferentes. Así la microscopía de luz y la microscopía electrónica nos han revelado las estructuras que participan en la transmisión, además de la ubicación de los componentes que participan. Registros electrofisiológicos nos muestran los cambios de potencial a través de la membrana, su conducta dinámica y últimamente los estudios bioquímicos están intentando dilucidar y entender el fenómeno a nivel molecular.

Un importante aporte en la comprensión de los mecanismos de la transmisión química lo realizaron en el campo de la electrofisiología Fatt y Katz (1952). Los datos experimentales permitieron relacionar la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la sinápsis neuromuscular, con "paquetes discretos", los cuales se podían registrar y a los que denominaron potenciales de placa en miniatura.

Casi simultáneamente, la microscopía electrónica había llegado a un desarrollo tal que permitió ver la ultraestructura de la sinapsis. Se encontró así que los terminales nerviosos contenían un gran número de vesículas cuyo diámetro promedio era de 50 nm (Sjostrand, 1953; Palay y Palade, 1954; De Robertis y Bennet, 1955).

El descubrimiento de las vesículas sinópticas junto a la prueba experimental de la naturaleza cuántica en la liberación del neurotransmisor, llevó ya en 1956 a Del Castillo y Katz a postular que el neurotransmisor debería encontrarse dentro de las vesículas, las cuales liberarían su contenido a la hendidura sinóptica a través de un mecanismo secretor (Del Castillo y Katz, 1956).

Diez años más tarde, la aplicación de técnicas de fraccionamiento subcelular en cerebro permitió el aislamiento de terminales nerviosos (Gray y Whittaker, 1962) y vesículas sinápticas (Whittaker y col., 1963, 1964; De Robertis y col., 1963) además de demostrar la presencia de acetilcolina (ACh) dentro de las vesículas.

El contenido de ACh en las vesículas originalmente estimado fue de 1000-2000 moléculas de ACh por vesícula (Whittaker y Sheridan, 1965). Esta estimación se correlacionó bien con estudios posteriores hechos en vesículas aisladas de ganglio cervical superior que permitieron determinar alrededor de 1600 moléculas de ACh por vesícula (Wilson y col., 1973).

El número de moléculas de ACh por vesícula determinado a partir de datos electrofisiológicos del contenido de los "paquetes liberados" en la sinapsis neuromuscular, al estimular eléctricamente el nervio, confirmaron las estimaciones hechas por los estudios bioquímicos señalados en el párrafo anterior.

Así Katz y Miledi 1972 y Anderson y Stevens, 1973 determinaron entre 1000 - 2000 moléculas de ACh por vesícula colinérgica. Otros autores han determinado aproximadamente 6000 moléculas de ACh por vesícula (Fletcher y Forrester, 1975; Kuffler y Yoshikami, 1975; Hartzell y col., 1976).

Sobre la base de estos antecedentes, la explicación más simple para la transmisión cuántica de ACh, debe considerar la secreción simultánea de paquetes multimoleculares, denominados cuantos, hacia la hendidura sináptica. Un cuanto estaría formado por un número determinado de moléculas de ACh y éstas estarían comprendidas en el contenido de una vesícula sináptica (Torri-Tarelli y col., 1985; Haimann y col., 1985).

El concepto de almacenamiento y liberación del neurotransmisor es una adaptación del de secreción celular. En esta concepción las vesículas sinápticas son el sitio de almacenamiento para el neurotransmisor y la fuente de liberación cuando la neurona es estimulada. Hoy esto se conoce como la hipótesis vesicular de almacenamiento y liberación del neurotransmisor (Ceccarelli y Hurlbut, 1980; Zimmermann, 1979; Whittaker, 1985).

Existen algunos autores que argumentan que, el modelo excitotónico de la liberación del neurotransmisor no explica satisfactoriamente el comportamiento de algunos neurotransmisores (ACh y dopamina) en las distintas compartimentaciones en que se detectan en los terminales nerviosos (Birks, 1974; Birks y Fitch, 1974; Björklund y Lindvall, 1975; Nieouillon y col., 1977).



Cuestionan la existencia de un paralelismo entre la abundancia de vesículas sinápticas en el terminal nervioso y los niveles de neurotransmisores que se han alterado. Pruebas experimentales demuestran que en ciertos regímenes experimentales las moléculas recientemente sintetizadas son las que se utilizan primero, dando como resultado una liberación preferencial (Collier, 1969; Potter, 1970; Kopin y col., 1968; Tauc y col., 1974) esto, según los autores no puede ser explicado por la hipótesis vesicular. Estos críticos de la hipótesis vesicular proponen como una alternativa, la hipótesis no vesicular de la liberación del neurotransmisor (Israel y col., 1979; Dunant e Israel, 1979; Tauc, 1982), en ella postulan la presencia en la membrana presináptica de "poros", "operador" o "vesigate" (Israel y col., 1979; Tauc, 1982) regulados por voltaje que permitirían la liberación de neurotransmisores solubles desde el citoplasma del terminal presináptico, en vez de asociados a vesículas sinápticas. Sandoval y col. (1978), demostraron en una preparación de sinaptosomas obtenidos de hipocampo, liberación de ácido glutámico citosólico dependiente de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, no existen en la literatura antecedentes similares que apoyen una liberación de GABA no vesicular como la ya descrita para acetilcolina, dopamina, noradrenalina y ácido glutámico (Birks y col., 1974; Björklund y Lindvall, 1975; Kopin y col., 1968; Sandoval y col., 1978).

Aunque está bien establecido que la comunicación interneuronal es predominantemente un proceso químico (Krnjevic, 1974) aún no se conoce la naturaleza química de los neurotransmisores que operan en gran parte del sistema nervioso central (SNC). De hecho,

hoy se postulan más de 30 sustancias de distinta naturaleza como neurotransmisores (Iversen, 1979). Cada uno de estos presentan efectos característicos sobre la neurona postsináptica, los cuales pueden ser de naturaleza excitadora o inhibidora. Sólo ACh (Hebb, 1970), noradrenalina (NA) (Baldessarini y Kopin, 1967), 5-hidroxitriptamina (5-HT) (McIlwain y Snyder, 1970), dopamina (D.A.) (Thierry y col., 1973), algunos péptidos (White y col., 1985) y ácido glutámico (Watkins y Evans, 1981; Naito y Ueda, 1985; 1983; Riveros y col., 1986) son clasificados sin ambigüedad como neurotransmisores.

Debido al importante efecto que producen algunos aminoácidos en la función neuronal estos han empezado a considerarse como presuntos neurotransmisores (Roberts, 1960; Krnjevic y Phillis, 1963; Curtis y Johnston, 1970a; Fonnum, 1977; De Feudis y Mandel, 1981; Fonnum, 1984).

Los aminoácidos ácidos como glutámico y aspártico ejercen un fuerte efecto excitador en todas las neuronas del SNC de mamíferos, en forma similar a como lo haría el neurotransmisor excitador natural (Krnjevic y Phillis, 1963; Krnjevic, 1974; Paul, 1981; Watkins y Evans, 1981; Bowman y Kimelberg, 1984).

En cambio, aminoácidos neutros como el ácido gamma-amino-butírico (GABA), glicina,  $\beta$ -alanina y taurina inhiben la función neuronal (Dreifuss y col., 1969; Curtis y col., 1970; Aprison and Nadi, 1977; Pycock y Kerwin, 1981; Okamoto y col., 1983; Okamoto y col., 1983).

Los efectos electrofisiológicos del neurotransmisor inhibitor natural que sería preponderante en las zonas altas del SNC como son cerebelo, corteza, hipotálamo, tálamo, hipocampo y cuerpo estriado son muy bien imitados por GABA (Dreifuss y col., 1969). La inhibición postsináptica en médula espinal y bulbo raquídeo es imitado por glicina (Wermen y cols., 1968).

Los principales argumentos que se han formulado para postular a GABA como neurotransmisor del SNC son los siguientes:

- 1.- Su presencia en el SNC (Awopara y col., 1950; Roberts y Frankel, 1950; Roberts , 1974; 1976).
- 2.- La identidad de acción con el neurotransmisor inhibitor natural en corteza cerebral, núcleo de Deiters y otras estructuras (Dreifuss y col., 1969; Galindo, 1969; Curtis y col., 1970 ; Curtis y col., 1970 ).
- 3.- El efecto antagónico que producen bicuculina y picrotoxina a la inhibición producida por GABA y por el neurotransmisor inhibitor natural (Galindo, 1969; Curtis y col., 1970 ).
- 4.- Liberación de GABA desde la corteza cerebral in vivo, como consecuencia de la estimulación fisiológica de la misma (Iversen y col., 1971).

- 5.- Liberación de GABA dependiente de  $\text{Co}^{++}$  extracelular de rebanados neocorticales estimulados eléctricamente in vitro (Valdés y Orrego, 1978; Szerb, 1979).
- 6.- La enzima que sintetiza GABA (L-glutamato 1-carboxilasa; E.C. 4.1.1. 15), se encuentra ampliamente distribuida en el SNC. (Roberts y col., 1950; Roberts, 1974) y en algunas zonas concentrada en los terminales axónicos presinápticos (Fonnum, 1968; Fonnum, 1977; Ribak y col., 1978; Freund y col., 1983; Somogyi y col., 1984).
- 7.- Visualización de GABA por técnicas de inmunocitoquímica en terminales nerviosos (Storm-Mathisen y col., 1983; Somogyi y col., 1984; Seguela y col., 1985; Ribak, 1985; Nishimura y col., 1986).
- 8.- La existencia de un sistema de transporte de alta afinidad para GABA en los terminales axónicos presinápticos. Probablemente sea éste el principal mecanismo de inactivación de su efecto inhibitor (Iversen y Johnston, 1971; Iversen y Kelly, 1975; Johnston, 1976; Kanter, 1978; Ramsay y col., 1980; Pastuszko y col., 1981; 1982; Erecinka y col., 1986).
- 9.- Presencia de receptores post-sinápticos de alta afinidad para GABA en diferentes áreas del cerebro (Zukin y col., 1974; Simantov y col., 1976; Enna y col., 1975; Enna y Snyder, 1975; Kingsbury y col., 1980; Kurioka y col., 1981).

10.- Solubilización de un complejo macromolecular receptor GABA-Benzodiazepino-ionóforo para  $\text{Cl}^-$  a partir de preparación de membranas de cerebro total (Aono y Ogasawara, 1980; Schoch y col., 1984; Schoch y col., 1985; Kardos y col., 1985).

Existe acuerdo que GABA es un neurotransmisor inhibitor en la sinapsis neuromuscular en crustáceos (Takeuchi, 1976; Otsuka, 1976; Atwood, 1976).

Ya que los axones en el SNC presentan las mismas propiedades biofísicas que los axones periféricos (Jankowska y Roberts, 1972; Ranck, 1975) y que la ultraestructura y función de la zona presináptica a nivel central es equivalente a la que se encuentra en la periferia (Eccles, 1964; Peters y col., 1970), parece lógico postular un mecanismo similar de almacenamiento y liberación a través de vesículas para GABA a nivel del SNC.

Desde el comienzo del estudio de GABA como substancia inhibitora central ha persistido la interrogante: ¿existe otra substancia endógena inhibitora que interaccione con el receptor de GABA? (Florey, 1960).

En los últimos años algunos autores (Toffano y col., 1978), han presentado pruebas que le permitirían postular un modulador endógeno para el receptor  $\text{GABA}_A$  postsináptico. Este modulador ha sido denominado GABAmulina y correspondería a una proteína ácida, termoestable.

Yoneda y Kuriyama (1980) han comunicado la presencia de un ligando endógeno para el receptor de GABA que no sería GABA, al cual denominan factor inhibidor de la unión de GABA (GRIF). Estos autores postulan que podría ser liberado por estimulación del terminal axónico presináptico. El significado e importancia de estos hallazgos no está claro, ya que el 85% del inhibidor endógeno del receptor de GABA que se encuentra fuertemente unido a preparaciones crudas de membranas sinápticas de corteza cerebral de rata es GABA. Es importante destacar que otros grupos (Maurer, 1979; Napias y col., 1980; Gardner y col., 1981), no han podido confirmar dichos resultados en forma clara.

De acuerdo con la hipótesis vesicular de almacenamiento y liberación del neurotransmisor, si se intentara dar una definición de neurotransmisor, ella debiera contener las siguientes características fundamentales: Las moléculas del neurotransmisor deberían encontrarse intraneuronalmente, contenidas en vesículas sinápticas; su liberación se produciría por exocitosis como respuesta secundaria al aumento de calcio iónico citoplasmático, fenómeno que en condiciones fisiológicas estaría precedido por un cambio de potencial eléctrico de membrana. Por último este neurotransmisor liberado se uniría a un receptor presente en la célula adyacente (postsináptica), cuya actividad sería modificada de alguna manera (Orrego, 1979).

El hecho de que el neurotransmisor se encuentre en vesículas sinápticas, es uno de los tres criterios primarios postulados para identificar una sustancia como neurotransmisor (Orrego, 1979).

Es posible que en condiciones fisiológicas, otras sustancias con actividad biológica coexistan en la misma vesícula en que se encuentra el neurotransmisor. Estas sustancias son definidas como cotransmisores, ya que son liberadas junto con el transmisor a través del mismo mecanismo y producen algún efecto sobre el receptor postsináptico, normalmente menor que el del neurotransmisor. Estos cotransmisores pueden provenir de vías biosintéticas de menor importancia que finalizan en un producto que es captado y almacenado por los mecanismos de captación presentes en la vesícula sináptica. Ejemplos de este tipo pueden ser tiramina, octopamina, feniletanolamina y otras aminas presentes en pequeñas cantidades en el sistema nervioso central de mamíferos (Orrego, 1979).

Glias y neuronas poseen una gran variedad de sustancias, entre ellas algunos aminoácidos ácidos y neutros (Drummond y Phillips, 1977) que presentan capacidad de influenciar la actividad neuronal cuando se aplican extracelularmente. Estas sustancias generalmente no se encuentran asociadas a vesículas sinápticas y se les ha denominado moduladores. Un ejemplo de modulador podría ser el neuropéptido tipo vasopresina, recientemente descrito en neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso periférico (Hanley y col., 1984). Se ha postulado que este péptido se liberaría junto con noradrenalina desde terminales nerviosos periféricos, produciendo efecto en "receptores a vasopresina" presentes en el tejido periférico innervado por fibras simpáticas, a estos receptores los han denominado receptores al péptido tipo vasopresina (Hanley y col., 1984; Michell y Bone, 1985). También podría interactuar con receptores a

vasopresina- $V_1$ , que se sabe existen en el ganglio simpático y que se encuentran acoplados a fosfolipasa C (Bone y col., 1984; Bone y Michell, 1985). Estos receptores están presentes en las neuronas principales del ganglio, donde ellos modulan la magnitud de los potenciales postsinápticos excitadores rápidos producidos por la estimulación preganglionar; las bases iónicas de esta inhibición aun no están establecidas (Kiraly y col., 1986).

Substancias presentes en vesículas sinápticas liberadas junto al neurotransmisor pero que no presentan efecto sobre la actividad neuronal, como son la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa y las cromograninas liberadas del terminal nervioso noradrenérgico deben considerarse como moléculas asociadas al neurotransmisor (Smith, 1973).

Se ha demostrado la presencia de diferentes péptidos en neuronas que presentan neurotransmisores clásicos (Lundberg y Hökfelt, 1983). También, se han descrito neuronas GABAérgicas en el SNC que, además de GABA presentan en: el cerebelo, motilina (Chan-Palay y col., 1981), en el núcleo reticular del tálamo, somatostatina (Dertel y col., 1983), en corteza visual e hipocampo somatostatina y colecistoquinina (Somogyi y col., 1984) y en corteza cerebral, pervalbúmina (Celio, 1986). Si estas moléculas, algunas de ellas postuladas como neurotransmisores son o no liberadas junto a GABA no se sabe, tampoco se ha descrito su significado funcional en relación a la acción de GABA como neurotransmisor.



En otras situaciones donde péptidos neuroactivos coexisten con otros neurotransmisores, existen pruebas experimentales de algunas interacciones a niveles pre y postsinápticos. Por ejemplo un péptido modula la liberación de dopamina en cuerpo estriado (Starr, 1982), la liberación de CCK es modulada por dopamina en cuerpo estriado (Meyer y Krauss, 1983). Se ha propuesto que la sustancia P actúa a nivel presináptico en médula espinal donde atenuaría la inhibición de liberación de serotonina por serotonina (Mitchell y Fleetwood-Walker, 1981).

También, se han descrito interacciones a nivel de receptores postsinápticos como el caso de serotonina/sustancia P (Agnati y col., 1983) y de CCK/dopamina (Fuxe y col., 1981). Sin embargo, en todos estos casos no ha sido posible demostrar la exacta ubicación en el terminal nervioso, de estas otras sustancias asociadas a neurotransmisores clásicos y tampoco se ha demostrado la exacta correlación temporal de coliberación desde los terminales nerviosos.

Siendo estos criterios necesarios para poder intentar clasificarlos, en algunas de las categorías mencionadas anteriormente, no es posible hacerlo hasta que estas interrogantes sean respondidas en el transcurso del desarrollo de la neuroquímica y se defina con mayor exactitud la función de estas sustancias en la transmisión sináptica.

Los criterios clásicos consideran que la ubicación de los neurotransmisores es a nivel presináptico. Siendo esto verdad, el desarrollo de la neuroquímica ha permitido demostrar que en la región presináptica existe un gran número de moléculas que no son neurotransmisores, lo que sugiere como necesidad dar una ubicación más específica para ellos.

El concepto funcional de la vesícula sináptica, como se indica al comienzo, se derivó en forma independiente de estudios morfológicos (De Robertis y Bennett, 1955), fisiológicos (Fatt y Katz, 1952) y posteriormente refinados por estudios bioquímicos directos en preparaciones de partículas aisladas (Whittaker y col., 1964). Estos estudios permiten ahora utilizar un criterio más discriminativo para intentar darles una ubicación a nivel presináptico.

En cada caso que se ha estudiado adecuadamente, las vesículas sinápticas aisladas han demostrado contener en alta concentración el neurotransmisor en cuestión (Whittaker y Sheridan, 1965; Négy y col., 1976; Riveros y col., 1986), manteniéndolo protegido de la degradación enzimática extravesicular.

Además de estos roles de concentración y protección, las vesículas sinápticas también formarían parte de un mecanismo de amplificación de señal en el cual un potencial de acción en el axón induciría una liberación del contenido de muchas vesículas dependiendo del

tamaño del axón presináptico y de los característicos de la estimulación. Por ejemplo en terminales de neurona motora, Eccles (1964) estima sobre 300 las vesículas liberadas por exocitosis, cuando se estimula el nervio en condiciones fisiológicas, en cambio Haimann y col. (1985), también en preparación neuromuscular determina un número de 800.000 vesículas liberadas cuando se estimula el nervio en forma intensa en presencia de ouabaína.

Cragg (1967), ha descrito el área motora y visual de corteza cerebral, determinando que los terminales axónicos en corteza son de menor tamaño que los descritos en preparaciones neuromusculares. Es importante destacar que en las sinapsis del SNC no participa todo el terminal, pues esta se realiza en "zonas activas", las cuales son pequeñas en relación al terminal presináptico y aunque esta es una de las semejanzas con las sinapsis del sistema periférico y la neuromuscular, la densidad de sinapsis centrales son varios órdenes de magnitud mayor que la densidad observada en el sistema periférico (Cragg, 1967).

La liberación por exocitosis constituye un mecanismo eficiente para liberar simultáneamente un gran número de moléculas polares, las cuales se vierten a la hendidura sináptica (medio extracelular), permitiéndose así la interacción con el receptor postsináptico y la transmisión química.

Un mecanismo de liberación en el cual participan las vesículas sinápticas se ha demostrado sin ambigüedad sólo para un número limitado de neurotransmisores (De Potter y col., 1969; Geffen y col., 1969; Gewirtz

y Kopin, 1970; Smith y col., 1970; Ceccorelli y col., 1973; Zimmermon y Whittaker, 1974; Torri-Torelli y col., 1985).

Aunque se presume que GABA se encontraría almacenado en vesículas sinápticas, en forma similar a como lo están las catecolaminas, serotonina y ACh, no se han podido aún encontrar pruebas directas que lo demuestren sin ambigüedad. Utilizando los métodos clásicos de fraccionamiento celular no ha sido posible demostrar la presencia de GABA en vesículas sinápticas (Whittaker, 1965; Mangon y Whittaker, 1966; Rassin y col., 1972; De Belleroch y Bradford, 1973; Zisapel y Zurgil, 1978.) Un hallazgo positivo reforzaría en forma importante su postulación como neurotransmisor inhibitor del SNC.

De lo anteriormente expuesto es posible visualizar algunos aspectos importantes que parecen interesantes analizar e intentar resolverlos. Aunque el papel de GABA en la inhibición neuronal está bien establecido todavía existen preguntas que no tienen una respuesta.

Con estas ideas en mente, enumeraré las interrogantes que se intentan responder en esta tesis:

- 1.- ¿Existe en el SNC de rata otra substancia, aparte de GABA, que sea capaz de interactuar con el receptor A de GABA? (Receptor GABA<sub>A</sub>).
- 2.- ¿Se encuentra esta substancia en vesículas sinápticas?
- 3.- ¿Se encuentra GABA en vesículas sinápticas, en forma similar a otros neurotransmisores descritos o sólo está presente en forma soluble en el citoplasma de las neuronas inhibitoras?

- 4.- Si GABA se encuentra en vesículas sinápticas, ¿cuáles son algunos de las características de transporte y almacenamiento de GABA en ellas?

El intentar dar una respuesta a estos interrogantes es importante, pues para el caso de GABA, al responderlos afirmativamente se reforzaría fuertemente su postulación como neurotransmisor, además que al demostrar su presencia en vesículas sinápticas se estaría reafirmando el rol funcional que se asigna a esta estructura en la hipótesis vesicular. Con esto también se estaría demostrando que GABA cumple con los tres criterios primarios que debe reunir una substancia para ser considerada neurotransmisor, postulados por Orrego (1979).

El hecho de encontrar otra substancia en vesículas sinápticas, aparte de GABA, que sea neurotransmisor inhibitor en el SNC, tiene particular relevancia, ya que hasta ahora es GABA la substancia que se postule como el responsable mayor de esta función en el SNC de mamíferos.

2.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

### 2.1. Animales:

Se utilizaron ratas albinas adultas cepa Sprague-Dawley que tuvieron un rango de peso entre 200 a 250 g., obtenidas del vivero del Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, las cuales habían sido alimentadas con dieta artificial para rata (concentrado) y agua a libre disposición.

### 2.2. Métodos.

#### 2.2.1. Obtención del tejido:

El tejido se obtuvo por disección de cerebro total, los cuales a su vez provenían de ratas que fueron decapitadas. La disección se practicó sobre una superficie de vidrio refrigerada, mantenida a 4° C. El tejido disecado se mantuvo hasta el momento de su homogeneización en sacarosa 0,32 M fría (0° -4° C) Posteriormente por diferencia de pesada se obtuvo la cantidad de tejido fresco.

#### 2.2.2. Preparación de membranas utilizadas en el ensayo de unión al receptor GABA<sub>A</sub>.

Membranas sinápticas crudas se prepararon a partir de cerebro total de ratas Sprague Dawley, básicamente como lo indica

Enna y colaboradores (1977) y modificado por Horng y Wong (1979).

Se decapitaron las ratas, se extrajo el cerebro y se homogeneizaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem en relación a su peso/volumen de 1:10 en sacarosa 0,32 M.

Se centrifugó a 1.085 x g durante 10 minutos, se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 20.000 x g durante 20 minutos. El sedimento así obtenido se resuspendió en tampón tris-citrato 10 mM, pH 7,1 y se lavó dos veces centrifugando cada vez a 48.200 x g durante 10 minutos. El sedimento lavado se resuspendió en tampón Tris citrato 50 mM, pH 7,1 llevando a una concentración final de proteínas 0,8-1 mg/ml, se repartió en alícuotas de 30 ml y se guardó a - 20° C, hasta el momento de utilizar.

### 2.2.3. Extracción de fracciones subcelulares.

#### 2.2.3.1. *Extracción de membranas sinápticas de cerebro total con detergente Triton X-100.*

Alícuotas de membranas sinápticas congeladas a -20°C, se descongelaron y se centrifugaron a 48.200 x g durante 10 minutos. El sedimento así obtenido se resuspendió en tampón Tris-citrato 50 mM, pH 7,1 y Triton X-100 al 0,050% concentración final, según

recomienda Horng y Wong (1979). Se incubó a 37°C durante 30 minutos con agitación lenta. Una vez transcurrido los 30 minutos se centrifugó a 48.200 x g durante 10 minutos eliminándose el sobrenadante. El sedimento obtenido se lavó 3 veces con tampón tris- citrato 25 mM pH 7,1. Por último se resuspendió el sedimento final en tampón Tris-citrato 100 mM pH 7,1. Alícuotas de 500 ul de esta preparación fueron utilizadas en el radioanálisis para [ $^3\text{H}$ ]-GABA y [ $^3\text{H}$ ] Muscimol.

#### 2.2.3.2. *Extracción del detergente Triton X-100 de sobrenadante de membranas sinápticas.*

Para la extracción de Tritón X-100 se utilizó el método descrito por Aberts y Herrick (1971) adaptado por Mather y Tamplin (1979), para material biológico que contienen proteínas.

El sobrenadante de membranas sinápticas tratadas con Triton X-100 se extrajo con un volumen igual de alcohol isoamílico, dejando decantar durante 1 hora, se removió la fase superior y se repitió nuevamente la extracción, quedándose con la fase acuosa. Posteriormente se liofilizó, concentrándose en el volumen mínimo.

#### 2.2.3.3. *Extracción de membranas sinápticas con ácido tricloroacético (TCA).*

Fracción de membranas sinápticas se extraen con TCA al 4% como describe Kekiuchi y colaboradores (1981). Brevemente, se



congelaron las membranas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (durante 40 minutos), se mezcló con TCA al 4% ( $0^{\circ}\text{-}4^{\circ}\text{C}$ ), se homogeneizaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem (16 excursiones), se centrifugó a  $31.000 \times g$  durante 15 minutos, el sobrenadante se extrajo 3 veces con éter etílico, se guardó la fase acuosa, se burbujeó con  $\text{N}_2$  (g), posteriormente se liofilizó.

#### 2.2.3.4. *Extracción de fracciones vesiculares en caliente.*

Alícuotas de VS o fracciones enriquecidas en VS, se extrajeron en forma rutinaria calentando en baño de agua a ebullición, durante 7 minutos. Posteriormente los tubos fueron transferidos a una mezcla de agua con hielo, una vez fríos se centrifugaron a  $92.000 \times g$  durante 30 minutos. Se separó un sobrenadante límpido que fue el que se sometió a análisis e investigación según se indica en cada experimento.

#### 2.2.3.5. *Extracción de vesículas sinápticas en Acetona ácida.*

El sedimento de VS o fracción rica en VS se resuspendió en un volumen de Acetona : HCl 1N (100 : 3) y se mantuvo a  $0^{\circ}\text{-}4^{\circ}$  durante una hora. Se centrifugó a  $105.000 \times g$  durante 40 minutos. El sobrenadante obtenido, fue extraído con 1/5 de su volumen en éter de

petróleo. Se centrifugó a 500 x g durante 3 minutos y se guardó la fase superior. La extracción con éter de petróleo se repitió 4 veces. Posteriormente se burbujeó con  $N_2$  (g) hasta llegar a sequedad. El sedimento se resuspendió al mínimo volumen según fuera necesario para continuar su análisis.

#### 2.2.4. Fraccionamiento de extractos obtenidos a partir de fracciones subcelulares.

##### 2.2.4.1. *Cromatografía líquida en columnas de gel Sephadex G-10.*

Gel de Sephadex G-10, previamente hidratado en agua bidestilada, hervida y filtrada, y al cual se le ha extraído las partículas finas, se agregó a una columna de vidrio Pharmacia K15/90, formando un lecho homogéneo de dimensiones variables según se indica en cada experimento. La columna se equilibró durante la noche y se le midió su volumen vacío ( $V_0$ ) con azul dextrano antes de usarla con muestra.

Todos los tampones y soluciones se prepararon con agua bidestilada, hervida y filtrada en forma rutinaria.

Se eluyó con una velocidad de flujo de 0,3 ml/min y se recolectaron fracciones de 2,8 ml (o como se indica en cada experimento). Todo este proceso se realizó en cámara fría a una temperatura de 6°C.

Sephadex G-10, presenta un límite de exclusión a moléculas que tienen un peso molecular mayor que 700 dalton según indican sus fabricantes.

#### 2.2.4.2. *Cromatografía en papel ascendente.*

Tiras de papel Whatman N° 1, de 2 cm de ancho, se utilizaron como fase estacionaria para desarrollar la cromatografía. Como fase móvil se utilizó una mezcla n-butanol, ácido acético glacial, y agua (razón V/V; 8:1:10) según se recomienda en Leggett Bailey (1962a) y Synge (1951). La separación se realizó en atmósfera saturada en mezcla de fase móvil, a temperatura ambiente. La corrida duró 16 horas. Una vez terminada, se secó la tira de papel con aire tibio y se cortó en pedazos de 2x2 cm o como se indica en cada experimento. Cada uno de estos pedazos se eluyeron durante la noche en 1 ml de HCl 0,1 N.

Finalmente el eluido se neutralizó con 0,1 ml de Na OH 1N y 0,9 ml de tampón tris-citrato 0,2 M, pH 7,1.

#### 2.2.4.3. *Electroforesis a alta voltaje (EAV).*

En una cámara de lucita, refrigerada mediante agua, con dos compartimentos que contienen cada uno un electrodo de platino, sumergidos en ácido fórmico al 8%, pH 1,9., se coloca una tira de papel Whatman 3 MM (4,5 cm de ancho y 28 cm de largo) humedecida con ácido fórmico al 8%. Esta comunica ambos compartimentos manteniendo sus extremos sumergidos en el ácido fórmico, el resto de la tira se encuentra aislada en Versol.

La muestra se aplicó en el origen que se encuentra en el compartimento donde está el polo (+) (Leggett Bailey 1962b). Luego se aplicó una diferencia de potencial igual a 29 V/cm durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo la tira se secó con aire tibio y se cortó en pedazos separados cada 1 cm o como se indica en cada experimento. Se dejó eluir durante la noche en agua bidestilada, hervida y filtrada.

#### 2.2.5. Marcación de vesículas sinápticas con [ $H^3$ ]-NA en corteza cerebral.

La marcación de VS con [ $H^3$ ]-NA se realizó como esta descrita por Vargas y Orrego (1976).

Rebanadas de corteza cerebral de rata de 250  $\mu$ m de grosor se incubaron con 0,1  $\mu$ M [ $H^3$ ]-NA (2.5  $\mu$ Ci) a 37°C durante 30 minutos, en un volumen final de 1,2 ml de líquido céfaloraquídeo artificial

gaseado con  $\text{CO}_2$  5% en  $\text{O}_2$  (g), (glucosa 10 mM, Na Cl 124mM, K Cl 5mM,  $\text{K H}_2 \text{PO}_4$  1,24mM, Na H  $\text{CO}_3$  26mM, Ca  $\text{Cl}_2$  1mM y Mg  $\text{Cl}_2$  1,3mM). La captación se realizó en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y  $\text{O}_2$  95% en un baño de incubación Dubnoff con una frecuencia de agitación de 100 ciclos por minuto

Al cabo de 30 minutos las rebanadas se lavaron rápidamente en medio de incubación y luego con sacarosa 0,32 M, para dejarlas en sacarosa 0,32 M fría y homogeneizar junto al resto de corteza disecada la que se utilizó para posterior fraccionamiento y purificación de VS

#### 2.2.6. Fraccionamiento y purificación de vesículas sinápticas.

Con el objetivo de purificar VS del S.N.C. de rata se intentaron diferentes metódicas que permitían preferencialmente, en un tiempo corto y a bajas temperaturas, la obtención de fracciones vesiculares lo más puras posible, para utilizar en su posterior análisis.

Para cumplir con este objetivo se utilizaron principalmente técnicos de:

- Centrifugación diferencial
- Cromatografía líquida, filtración en gel: Sepharose 4B-Concanavalina A, Sepharose 4B, Sephacryl S-1000.
- Centrifugación en gradientes isoosmóticos de Percoll.

#### 2.2.6.1. *Centrifugación Diferencial.*

Para separar las partículas y fracciones subcelulares del homogeneizado de acuerdo a su velocidad de sedimentación, se sometió éste a centrifugación diferencial.

El esquema de trabajo utilizado corresponde básicamente a preparaciones descritas en la literatura y que han sido utilizadas en preparaciones de estudio de VS

Estas preparaciones son las descritas por:

- Hata y Colaboradores 1976.
- Seidler y Colaboradores 1977.
- De Lorenzo y Freedman 1978.

#### 2.2.6.2. *Filtración en gel Sepharose 4B -Concanavalina A y Sepharose 4B.*

Figura 1.- Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por Hata y colaboradores.

El homogenizado fue sometido a centrifugación diferencial para obtener un sedimento 1 ( $P_1$ ), en el cual sedimentan restos celulares y núcleos. El sobrenadante obtenido ( $S_1$ ) se somete a una segunda centrifugación para obtener un sedimento 2 ( $P_2$ ), el cual contiene principalmente sinaptosomas, mitocondrias y restos de mielina. Este sedimento 2 ( $P_2$ ) se sometió a un shock osmótico (3 ml de  $H_2O$ /gr de tej. húmedo) en frío. Se centrifuga y se guarda el sobrenadante 3 ( $S_3$ ) a  $0^\circ - 4^\circ C$ .

El sedimento 3 ( $P_3$ ) así obtenido, se le somete a un segundo shock osmótico de iguales características al anterior y se centrifuga.

El sobrenadante 3' ( $S_3'$ ) se junta con el sobrenadante 3 ( $S_3$ ) y se sedimentan. El sedimento 4 ( $P_4$ ) corresponde a una fracción enriquecida en VS. Esta fracción es la utilizada para posterior análisis y purificación, según se indica en cada experimento.

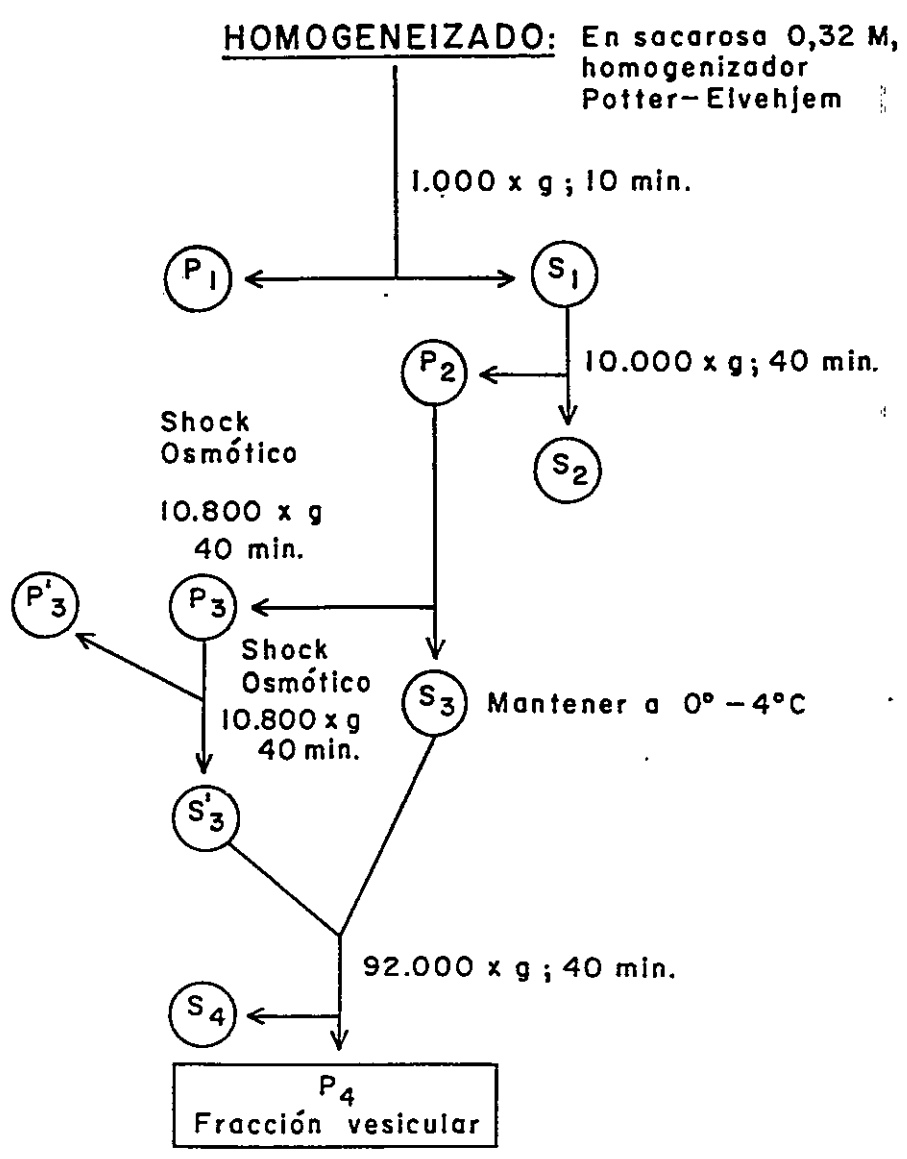


Figura 1 : Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por Hata y colaboradores.



Figura 2.- Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por Seidler y colaboradores.

El homogenizado obtenido vigorosamente por el uso de un homogenizador cónico vidrio-vidrio, se somete a centrifugación diferencial, obteniéndose un primer sedimento ( $P_1$ ) en el cual se encuentran restos celulares y núcleos primordialmente. El sobrenadante 1 ( $S_1$ ) se centrifuga eliminando así en el sedimento 2 ( $P_2$ ), las mitocondrias, sinaptosomas no rotos y restos de membranas reselladas de gran tamaño.

El sobrenadante 2 ( $S_2$ ) se centrifuga a alta velocidad para sedimentar en  $P_3$  una fracción microsomal rica en VS. Esta fracción es la utilizada para posterior análisis y purificación, según se indica en cada experimento.

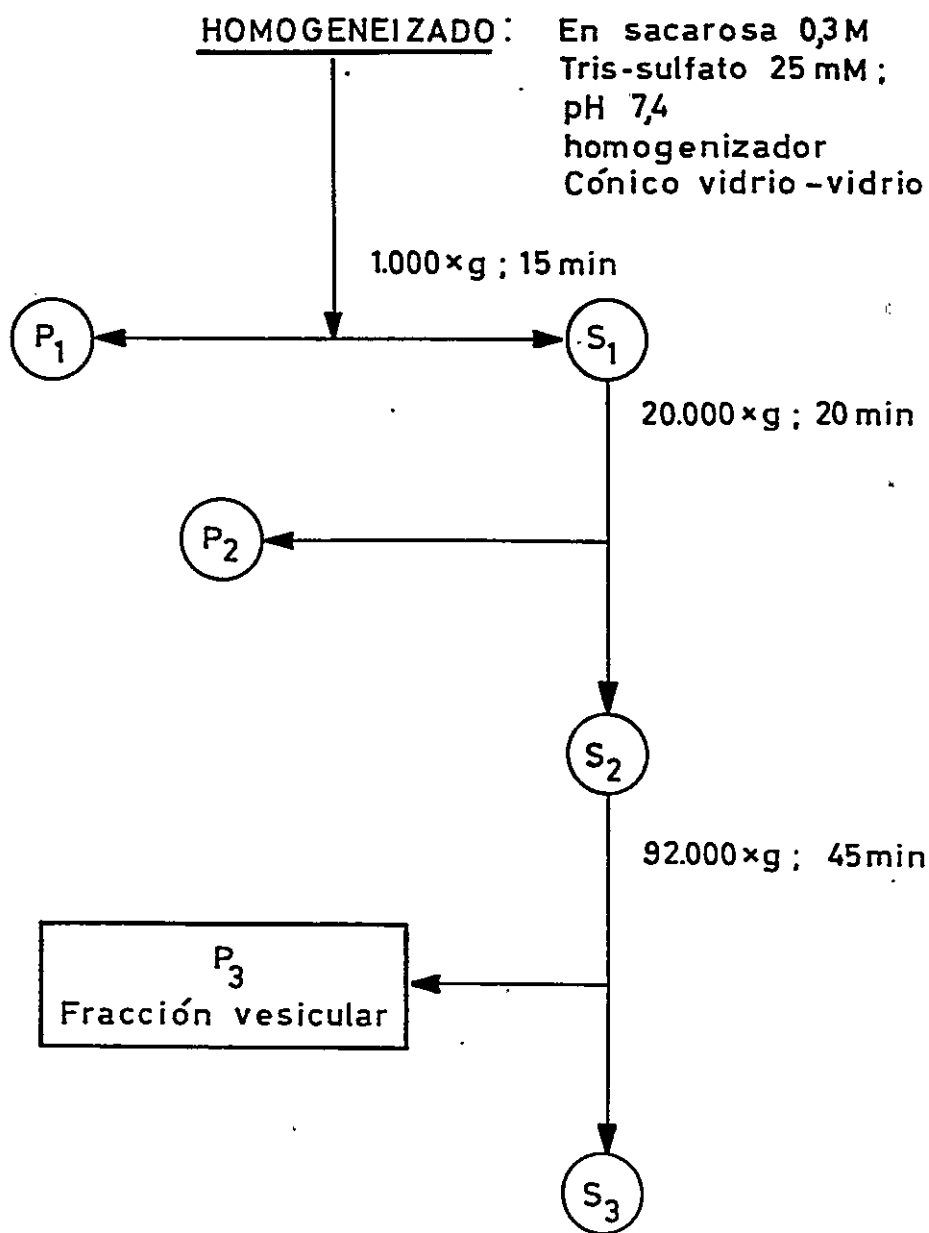


Figura 2 : Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por Seidler y colaboradores.

Figura 3.- Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por De Lorenzo y Freedman.

Se homogeniza el tejido en sacarosa 0,32 M en un homogenizador Potter-Elvehjem que se mantiene en mezcla hielo-agua. Este homogenizado se centrifuga obteniéndose un sobrenadante 1 ( $S_1$ ). En el sedimento 1 ( $P_1$ ) se eliminan restos celulares y núcleos. El sobrenadante 1 ( $S_1$ ) se centrifuga para obtener un sedimento 2 ( $P_2$ ), fracción rica en sinaptosomas y mitocondrias. Se lava este sedimento 2 ( $P_2$ ) con sacarosa 0,32 M (igual volumen a sobrenadante 2) y se vuelve a centrifugar, obteniéndose así un sedimento 2 lavado ( $P_2$ ). Este se somete a un shock osmótico en agua bidestilada llevando con 1/10 de su volumen a concentración final 165 mM KCl, 10 mM Tris-citrato pH 6,5, todo esto en menos de 4 min. Se centrifuga y se obtiene un sobrenadante 3 ( $S_3$ ) el cual se centrifuga para obtener un sobrenadante 4 ( $S_4$ ) rico en vesículas sinápticas (prácticamente VS puras), las cuales se sedimentan para obtener un sedimento 5 ( $P_5$ ) Este es el utilizado para posterior análisis.

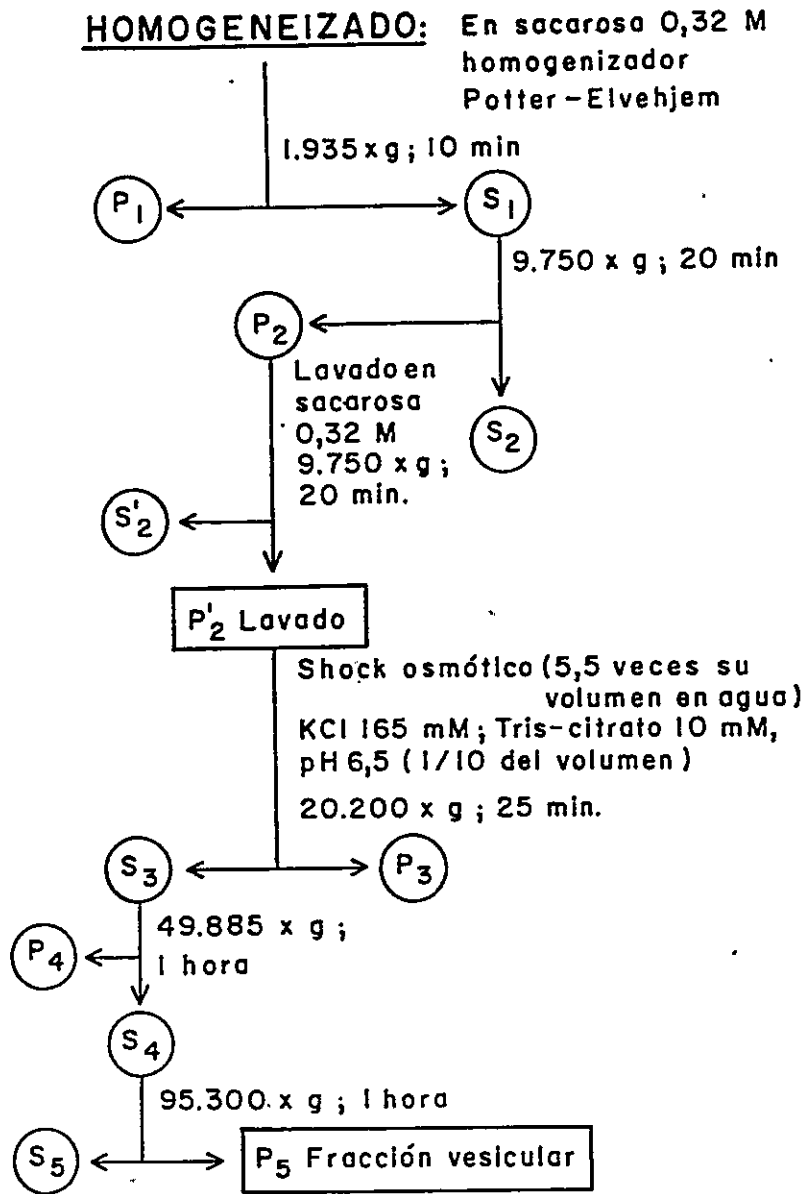


Figura 3 : Esquema de la purificación de vesículas sinápticas mediante fraccionamiento subcelular utilizando el método descrito por De Lorenzo y Freedman.

Columnas de vidrio de 1 cm de diámetro y 15 cm de largo se utilizaron como soporte del gel.

El gel previamente humedecido, hinchado, desaireado y sin elementos finos se depositó en la columna, formando un lecho de 1 cm de diámetro y de 10-12 cm de alto (según se indica en cada experimento).

Una vez equilibrada se le determinó el volumen vacío con azul dextrano.

El límite de exclusión de esta resina corresponde a proteínas que presentan un peso molecular mayor que  $20 \times 10^6$  y de polisacáridos con pesos moleculares sobre  $5 \times 10^6$ .

Posteriormente se aplicó la muestra de VS preparadas de acuerdo a las preparaciones anteriormente nombradas (Métodos, sección 2.2.6.1).

Las características de la elución se encuentran descritas en cada experimento, en la figura correspondiente.

### 2.2.6.3. *Filtración en gel Sephadryl S-1000.*

Columnas de vidrio Pharmacia K 15/90 se utilizan como soporte del gel.

La resina previamente hidratada, desaireada y sin elementos finos se depositó en la columna formando un lecho de 1,5 cm de diámetro y 76 cm de alto.

Una vez equilibrada se le determinó el volumen vacío ( $V_0$ ) con esporas de *Bacillus Subtilis*.

El límite de exclusión de esta resina corresponde a partículas cuyos tamaños son mayores que 300-400 nm.

Estas columnas se utilizan para purificar fracciones de VS preparadas de acuerdo a los métodos ya nombrados en Métodos, sección 2.2.6.1. Las características de la elución se encuentran descritas en la figura correspondiente.

#### 2.2.6.4. *Centrifugación en gradientes isoosmóticos de Percoll.*

Las fracciones de VS obtenidas por centrifugación diferencial (Métodos, sección 2.2.6.1.) se resuspendieron en 2,0 ml de Sacarosa, 0,25 M tamponada a pH 7,4 en presencia de EDTA 0,1 mM. Una alícuota de esta suspensión (1,0 ml) se aplicó en un tubo de policarbonato de 10 ml (Arthur H. Thomas CO., Phila, P.A) que contenía 8 ml de Percoll al 15% en Sacarosa 0,25 M tamponada a pH 7,4 en presencia de EDTA 0,1 mM (como se indica en cada experimento). La

cantidad de proteínas en la muestra aplicada por tubo, no fue mayor que 0,4 mg de proteína total.

Se centrifugó a 58.000 x g durante 30 minutos en un rotor 40 de ángulo fijo en una ultracentrífuga Beckman L. Terminada la corrida se colectaron 8 fracciones de 1 ml, partiendo desde el fondo utilizando una bomba peristáltica para propósitos múltiples. Desaga. La densidad de cada fracción fue determinada por refractometría.

## 2.2.7. MÉTODOS DE ENSAYO.

### 2.2.7.1. Ensayo de unión al receptor GABA<sub>A</sub>.

#### *a.- Técnica por centrifugación.-*

La unión de [ $^3\text{H}$ ]-GABA y de [ $^3\text{H}$ ]-muscimol a membranas sinápticas de cerebro total (Método, sección, 2.2.2.) tratadas con Triton X-100 según recomiendan Horng y Wong (1979) (Métodos, sección, 2.2.3.1.), se determinó por la técnica de centrifugación como indica Enna y Colaboradores (1977).

Básicamente, alícuotas de membranas sinápticas (0,6 - 1,0 mg de proteínas) se incubaron por triplicado a 0° - 4°C durante 5 minutos en 1 ml volumen final, en presencia de tampón Tris-citrato 50 mM pH 7,1 y [ $^3\text{H}$ ] GABA 13 nM o [ $^3\text{H}$ ] Muscimol 3 nM.

La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 mM

GABA frío y corresponde a valores menores de un 20% de la unión total para  $[H^3]$ -GABA 13 nM.

Después de la incubación, la reacción se detuvo por centrifugación a 48.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó por succión y el sedimento se lavó rápida y superficialmente con 15 ml de agua bidestilada (0°-4° C). Se secaron las paredes del tubo y el sedimento se solubilizó con 1 ml de Protosol (New England Nuclear Corp.) durante la noche a temperatura ambiente.

El solubilizado se depositó en un frasco de conteo líquido que contenía mezcla de M-Fluor concentrado, posteriormente se lavó el tubo de incubación dos veces con 5 ml de Tolueno puro, agregándolos al frasco de conteo y se cuantificó la radiactividad unida, en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300, con una eficiencia de 55% para tritio.

#### *b.- Técnica por filtración.*

La unión de  $[H^3]$ -Muscimol a membranas sinápticas (Método, sección, 2.2.2.) tratadas con Triton X-100 al 0,05% según recomiendan Horng y Wong (1979) (Métodos, sección, 2.2.3.1.) se determinó utilizando la técnica por filtración como indican Williams y Risley, (1979).

Alícuotas de membranas sinápticas (0,35 - 0,4 mg de



proteínas) se incubaron por triplicado a 0°-4°C (mezcla hielo-agua) durante 30 minutos en tubos de vidrio, en presencia de tampón Tris-citrato 50 mM pH 7,1 y [ $H^3$ ] Muscimol 3 nM en un volumen final de 1 ml.

La unión inespecífica se determinó en presencia de GABA frío 10 mM y corresponde a valores menores que un 5% de la unión total para [ $H^3$ ]-muscimol 3 nM.

Después de la incubación se vació el incubado sobre filtros de fibra de vidrio (Reeve Angel 934 AH o Whatman GF/B) los cuales han sido previamente humedecidos con una solución 0,1 mM de GABA frío en tampón Tris-citrato 50 mM pH 7,1.

Se lavó el tubo de incubación con 1,5 ml de tampón Tris-citrato 50 mM pH 7,1 frío y luego se lavó el filtro tres veces con 1,5 ml de tampón frío, mientras se aplicaba vacío. Se secaron los filtros y se cuantificó la radiactividad retenida por el filtro, en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300, con un 55% de eficiencia para tritio.

Usando cualquiera de las dos técnicas para el ensayo de unión como método de detección y cuantificación de GABA no marcado, fácilmente se pudo detectar hasta 5 pmol/ml. Esta sensibilidad es comparable a la descrita por Gardner y colaboradores (1981), y Yamamoto y colaboradores (1985) usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### 2.2.7.2. Ensayo de unión de [ $H^3$ ]-ouabaína a ( $Na^+ - K^+$ )ATPasa.

La unión de [ $H^3$ ]-ouabaína a diferentes fracciones subcelulares y especialmente a preparaciones ricas en vesículas sinépticas, se realizó como indica Hansen (1976), con algunas modificaciones.

Alícuotas de fracciones subcelulares o de VS (50 - 200  $\mu$ g de proteínas) se incubaron durante 30 minutos a 37° C, en presencia de 3 mM  $Mg Cl_2$ , fosfato-Tris 3 mM pH 7,4, saponina 0,15 mg/ml, [ $H^3$ ] ouabaina 100 nM y tampón Tris-sulfato 50 mM pH 7,4 en un volumen final de 750  $\mu$ l.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se filtró en vacío, 700  $\mu$ l del incubado en filtros de nitrocelulosa (Sartorius, SM 11306, de 23 mm de diámetro y poro de 0,45  $\mu$ m), previamente estos filtros se habían humedecido con ouabaina 0,1 mM, Tris-sulfato 50 mM pH 7,4.

Se lavó 3 veces con 2,5 ml de tampon Tris-sulfato 50 mM pH 7,4 frio.

Se secaron los filtros y se cuantificó la radiactividad retenida en ellos en un contador de centelleo líquido, Tracor Analytic Delta 300, con un 55% de eficiencia para tritio.

La unión inespecífica se determinó en presencia de

ouobaína 1 mM, los valores obtenidos fueron siempre menores que un 5% de la unión total, correspondiéndose con los controles de retención de radiactividad por los filtros de nitrocelulosa solos, utilizados como controles.

2.2.7.3. Ensayo de captación de  $[H^3]$ -GABA por fracción de VS obtenidas de acuerdo al método de Seidler y col.

Alicuotas de 0,2 ml de vesículas sinápticas resuspendidas en tampón fosfato 130 mM pH 7,0 preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores 1977, equivalentes a 180 mg de tejido original se incubaron a 37° C durante diferentes tiempos en un volumen final de 1,7 ml, en presencia de 0,17 ml de  $3,3 \times 10^{-4}$  M ó  $10^{-3}$  M de  $[H^3]$ -GABA (según se indica en cada experimento cuya actividad específica era de 36 Ci/mmol), tampón fosfato 130 mM pH 7,0 (llevado a pH 7,0 con K OH).

Para estudiar la captación de  $[H^3]$ -GABA en presencia de ATP, se agregó a la mezcla de incubación 0,17 ml de ATP 10 mM (forma de ATP, como se indica en cada experimento) y 0,17 ml de  $MgSO_4$  10 mM.

Al término de la incubación se agregó 5 ml de tampón fosfato 130 mM pH 7,0 frío (0° - 4° C), vertiéndose inmediatamente el contenido del incubado sobre filtros de nitrato de celulosa (Sartorius SM 113 06 de 23 mm de diámetro y poro 0,45  $\mu m$ ) previamente humedecidos en tampón fosfato 130 mM pH 7,0 y GABA 0,1 mM. Luego

se lavó dos veces con 1,7 ml de tampón fosfato 130 mM pH 7,0 frío. Los filtros se secaron con lámpara infrarrojo durante 5 a 10 minutos, colocándose posteriormente en un frasco con mezcla de centelleo líquido. Se cuenta la radioactividad retenida por el filtro en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300, con una eficiencia de 50% para tritio.

#### 2.2.7.4. Determinación de Proteínas.

Las proteínas fueron determinadas por dos métodos, según se indica en cada experimento en la figura correspondiente.

a.- Reacción con azul de Coomassie G-250 tal como describe Bradford (1976), usando albúmina de suero de bovino como patrón. El cálculo de las proteínas se realizó haciendo una interpolación en una gráfica estandar hecha con albúmina de suero bovino cuyas concentraciones variaban entre 0 y 10  $\mu$ g.

b.- Método de Lowry y Colaboradores (1951), utilizando albúmina de suero de bovino como patrón.

#### 2.2.8. Microscopía Electrónica.

Las fracciones vesiculares se sedimentaron, los sedimentos obtenidos fueron fijados durante 3 horas en glutaraldehído al 4% en tampón fosfato, refijados en tetróxido de Osmio al 2% durante una

hora, luego incluidos en Araldita 502 y polimerizados en estufa a 40° y 60° C.

Los cortes se efectuaron con un ultramicrotomo Reichert O.M.U.-2 en secciones ultrafinas de 600 a 800 Å montadas en grillas de barras cuadrangulares de 200 mallas y contrastados con sales de uranilo y citrato de plomo.

El material fue observado y fotografiado en un Microscopio Philips E.M. 300.

### 2.3. Reactivos.

#### Reactivos inorgánicos:

Merck:

Sacarosa

Glucosa

K Cl

Na Cl

Ca Cl<sub>2</sub>

Mg Cl<sub>2</sub>

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>

Cu SO<sub>4</sub>

Na OH

K OH

Sigma:

Tris-base

Triton X-100

Azul dextrano

Azul de coomasie G-250

Na H CO<sub>3</sub>

HCl

H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

Reactivos orgánicos:

Merck:

Acido acético glacial

Alcohol isoamílico

Eter de Petróleo

n-butanol

Acetona

Acido cítrico

Acido fórmico

Esso:

Varsol

Tolueno

Sigma:

EDTA

Albúmina de suero de  
bovino

Ouabaína

Mann Research Lab.

GABA

Isótopos radiactivos:

New England Nuclear:

(2 - 3 - <sup>3</sup>H) GABA (36 Ci/mmol)

L-(7 - <sup>3</sup>H)-Noradrenalina (18,8 Ci/mmol)

[<sup>3</sup>H (G)]-Ouabaína (20,9 Ci/mmol) gentileza Dr. M. De la

Fuente

Amersham:

[H<sup>3</sup>] Muscimol (19 Ci/mmol).

Otros:

Pharmacie Fine Chemicals:

Sepharose 4B-Concanavalina A

Sepharose 4B

Sephacryl S-1000

Percoll.

#### 2.4. Expresión de resultados y estadística.

Cada experimento corresponde a resultados cuyos valores son el promedio de triplicados  $\pm$  error estándar de la media (e.e.m.)

Estos experimentos fueron repetidos en condiciones exactamente iguales a lo menos 3 veces por separado, obteniéndose siempre la misma distribución, migración, y elución que se observa en los gráficos que se muestran.

### 3.

## RESULTADOS

#### 3.1. INVESTIGACION DE PRESENCIA DE MODULADORES ENDOGENOS PARA EL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>.

##### 3.1.1. En preparaciones de membranas sinápticas de cerebro total.

##### 3.1.1.1. *Fraccionamiento por filtración en Sephadex G-10 de extracto de membranas obtenidas según el método de Yoneda y Kuriyama (1980).*

En la Fig. 4 se observa el fraccionamiento por filtración en gel Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total obtenidas de acuerdo al método descrito por Yoneda y Kuriyama (1980). Previamente este extracto se sometió a un tratamiento con alcohol isoamílico para eliminar el tritón X-100.

Junto a la muestra se aplicó el equivalente a 0,1 p mol de [<sup>3</sup>H] GABA como marcador interno en la elución de la columna.

A cada fracción se le determinó la radiactividad de [<sup>3</sup>H]-GABA, utilizado como marcador interno y ligando endógeno para el receptor de GABA presente en membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979).

Como podemos observar en la Fig. 4 aparece un solo pico de



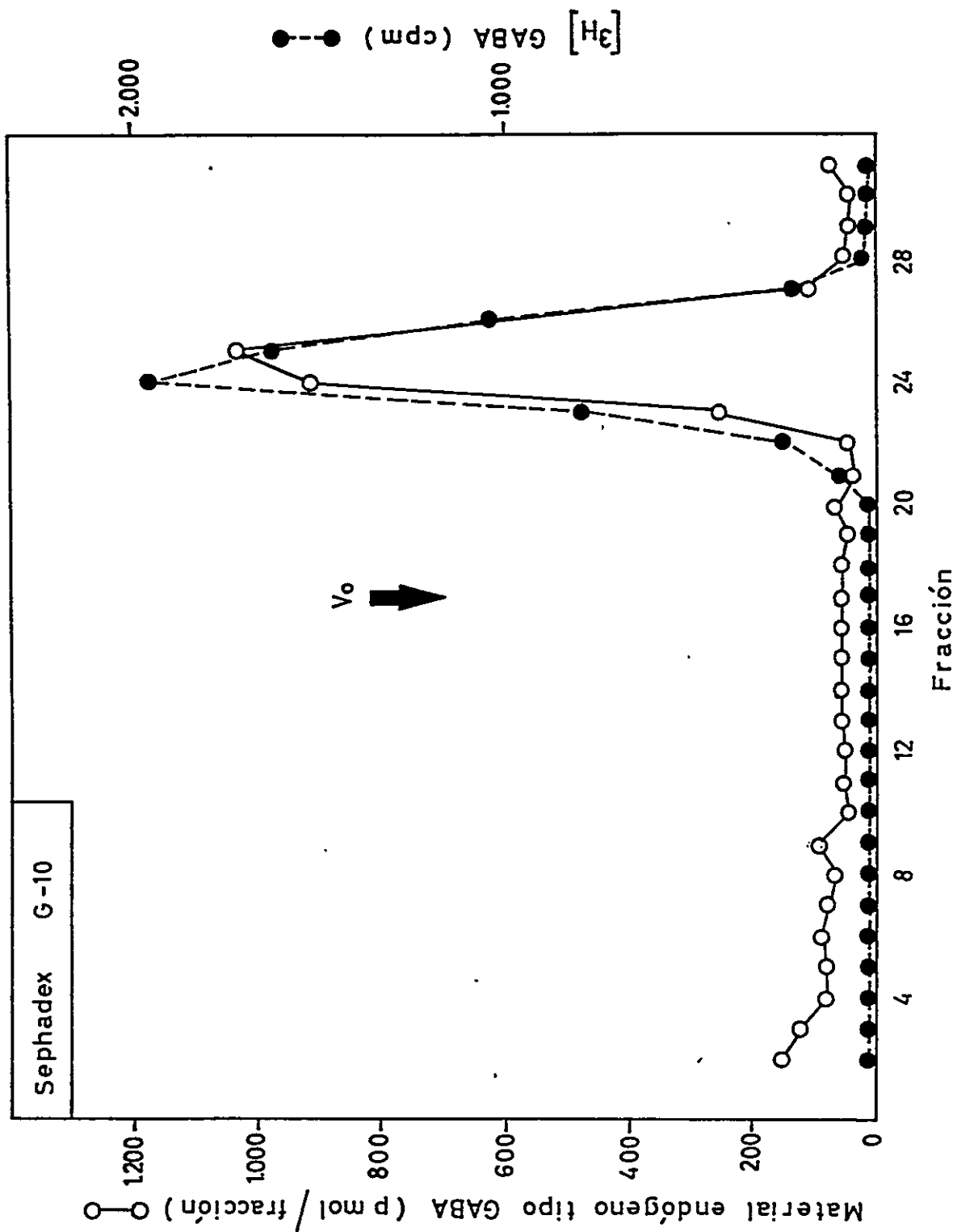


Figura 4: Perfil de elución en Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total.

Figura 4.- Perfil de elución en Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total.

2 ml de extracto inhibidor del ligamen de [ $^3\text{H}$ ] GABA, obtenido de acuerdo al método descrito por Yoneda y Kuriyama (1980), previamente extraído dos veces con alcohol isoamílico para eliminar el Tritón X-100 (Métodos, sección 2.2.3.2.), provenientes de 6,5 g de tejido fresco se aplicaron junto a 0,15 pmol de [ $^3\text{H}$ ]-GABA como marcador interno a una columna de Sephadex G-10 de 1,5 x 71 cm, eluyéndose con agua bidestilada y estéril a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se recolectaron fracciones de 2,5 ml.

Previamente se determinó el volumen vacío ( $V_0$ ) con azul dextrano.

A cada fracción se le determinó la radiactividad de [ $^3\text{H}$ ]-GABA, utilizado como marcador interno y unión de material endógeno capaz de desplazar [ $^3\text{H}$ ]-muscimol 3 nM (Método, sección 2.2.7.1.b).

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado cuyo error estándar de la media (e.e.m.) es menor que el 5%.

materia endógeno que es capaz de desplazar  $[H^3]$ -Muscimol 3 nM (agonista de GABA) desde el sitio de unión para GABA y que corresponde a las fracciones número 23 al 28. Este ligando endógeno eluye conjuntamente con las fracciones de elución de  $[H^3]$ -GABA que se utilizó como marcador interno.

### 3.1.1.2. *Fraccionamiento por filtración en Sephadex G-10 de extracto de membranas tratadas con ácido tricloroacético (TCA)*

Membranas sinápticas crudas de cerebro total se extraen con TCA al 4%. Al sobrenadante así obtenido, se le extrae el TCA, se liofiliza y se neutraliza, luego se aplica junto a 0,1 p mol de  $[H^3]$ -GABA como marcador interno a una columna de Sephadex G-10.

En la Fig. 5 se observa el fraccionamiento por filtración en gel de este extracto siguiendo su elución por absorbancia a 280 nm, midiendo radiactividad de  $[H^3]$ -GABA y ligando endógeno para el receptor de GABA presente en membranas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979).

El perfil de elución muestra la presencia de fracciones que absorben a 280 nm. Estos péptidos son inactivos como ligando del receptor para GABA sin embargo, aparece un solo pico entre las fracciones 47 y 52 que no presenta absorción a 280 nm y que es capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA. Este pico de material endógeno eluye en las

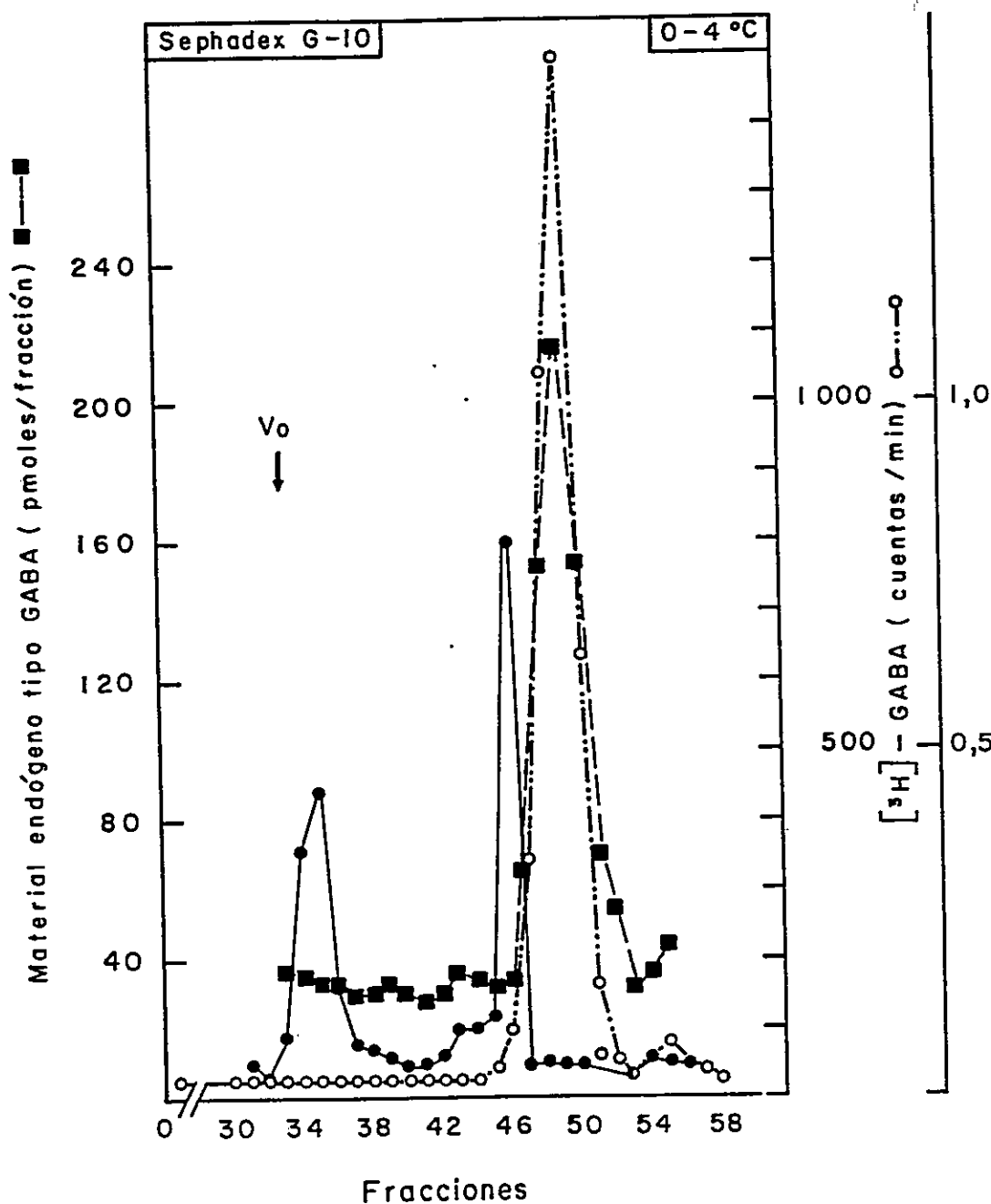


Figura 5 : Perfil de elución en Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total obtenido con TCA.

Figura 5.- Perfil de elución en Sephadex G-10 de extracto de membranas sinápticas de cerebro total obtenido con TCA.

1,5 ml de sobrenadante de membranas sinápticas de cerebro total extraídas con TCA (Métodos, sección 2.2.3.3.) provenientes de 1,5 g de tejido fresco se aplicaron junto a 0,1 pmol de [ $^3\text{H}$ ]-GABA (marcador interno), a una columna Sephadex G-10 de 1,5 x 80 cm. Se eluye con agua bidestilada a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se recolectan 60 fracciones de 1,3 ml, a cada una de las cuales se les determinó su absorción a 280 nm. Radiactividad a [ $^3\text{H}$ ]-GABA, utilizado como marcador interno y unión al receptor  $\text{GABA}_A$ , midiendo la capacidad de desplazar [ $^3\text{H}$ ]-GABA 13 nM. (Métodos, sección 2.2.7.1.a.)

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores de un 4%.

fracciones correspondientes donde eluye el  $[H^3]$ -GABA utilizado como marcador interno.

3.1.2. En preparaciones de membranas sinápticas de corteza cerebral.

3.1.2.1. *Pruebas que demuestran la presencia de inhibidor endógeno de la unión de  $[H^3]$ -GABA en extracto de membrana obtenida de acuerdo al método descrito por Toffano y colaboradores.*

Alícuotas de extracto de membranas tipo A de corteza cerebral obtenidas según describe Toffano y Colaboradores (1978), se prueban en su capacidad de desplazar  $[H^3]$ -GABA 15 nM a membranas sinápticas tipo B y a membranas sinápticas preparadas según el método de Horng y Wong (1979).

En la Tabla I se presenta el porcentaje de inhibición de la unión específica de  $[H^3]$ -GABA 15 nM producido por diferentes alícuotas del extracto de membranas tipo A. Se puede observar que a medida que se aumenta el volumen de la alícuota, aumenta la inhibición. En ambas preparaciones de membranas se observa inhibiciones a la unión específica, llegando a un  $76,6\% \pm 1,6$  utilizando las membranas tipo B y a un  $89,9 \pm 4,3\%$  cuando se usan las membranas preparadas según el método de Horng y Wong.

**Tabla I.-** Efecto inhibitor de extracto de membranas de corteza en la unión específica de [ $H^3$ ]-GABA a dos preparaciones de membranas sinépticas.

Extracto de membranas sinépticas de corteza $\mu$ l agregado/ml	unión específica de [ $H^3$ ]-GABA 15 nM (% de inhibición $\pm$ e. e. m.)	
	unión a memb. tipo B de Toffano y col. (1978).	unión a memb. método Horng y Wong (1978).
10	26,0 $\pm$ 1,6	23,2 $\pm$ 0,6
30	29,1 $\pm$ 0,5	34,7 $\pm$ 1,5
100	48,5 $\pm$ 3,2	76,3 $\pm$ 0,5
300	72,2 $\pm$ 2,1	88,3 $\pm$ 0,1
500	76,6 $\pm$ 1,8	89,8 $\pm$ 4,3

Alícuotas de sobrenadante de membranas tipo A obtenidas según preparación de Toffano y colaboradores (1978) se prueban en su capacidad para desplazar [ $H^3$ ]-GABA 15 nM en un volumen de 1 ml en presencia de tampón Tris-citrato 50 mM, pH 7,1 a membranas tipo B (Métodos, sección 2.2.7.1.a) y a membranas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.). La concentración de proteínas utilizada de membranas tipo B fue de 0,65 mg/ml y membranas tipo Horng y Wong fue de 0,8 mg/ml.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado  $\pm$  e.e.m.

3.1.2.2. *Fraccionamiento en Sephadex G-10 de extracto de membrana obtenidas según el método de Toffano y Colaboradores.*

*Medición de unión de substancia endógena en dos preparaciones de membranas.*

En la Fig. 6 se observa el fraccionamiento por filtración en gel Sephadex G-10 de extracto de membranas tipo A preparadas de acuerdo al método de Toffano y Colaboradores (1978).

El perfil de elución obtenido al medir la absorbancia a 280 nm, nos muestra la presencia de péptidos que son inactivos en la capacidad de desplazar  $[H^3]$ -GABA.

El material endógeno capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA de su sitio de ligamen aparece distribuido en un solo pico entre las fracciones 47 y 52 eluyendo en forma conjunta con el  $[H^3]$ -GABA aplicado como marcador interno y no presenta absorción a 280 nm.

No se observa diferencia en la detección de ligando endógeno al utilizar membranas tipo B y a utilizar las membranas de acuerdo a la preparación de Horng y Wong (1979), indicando además que dos preparaciones distintas de membranas detectan sólo a GABA como ligando.



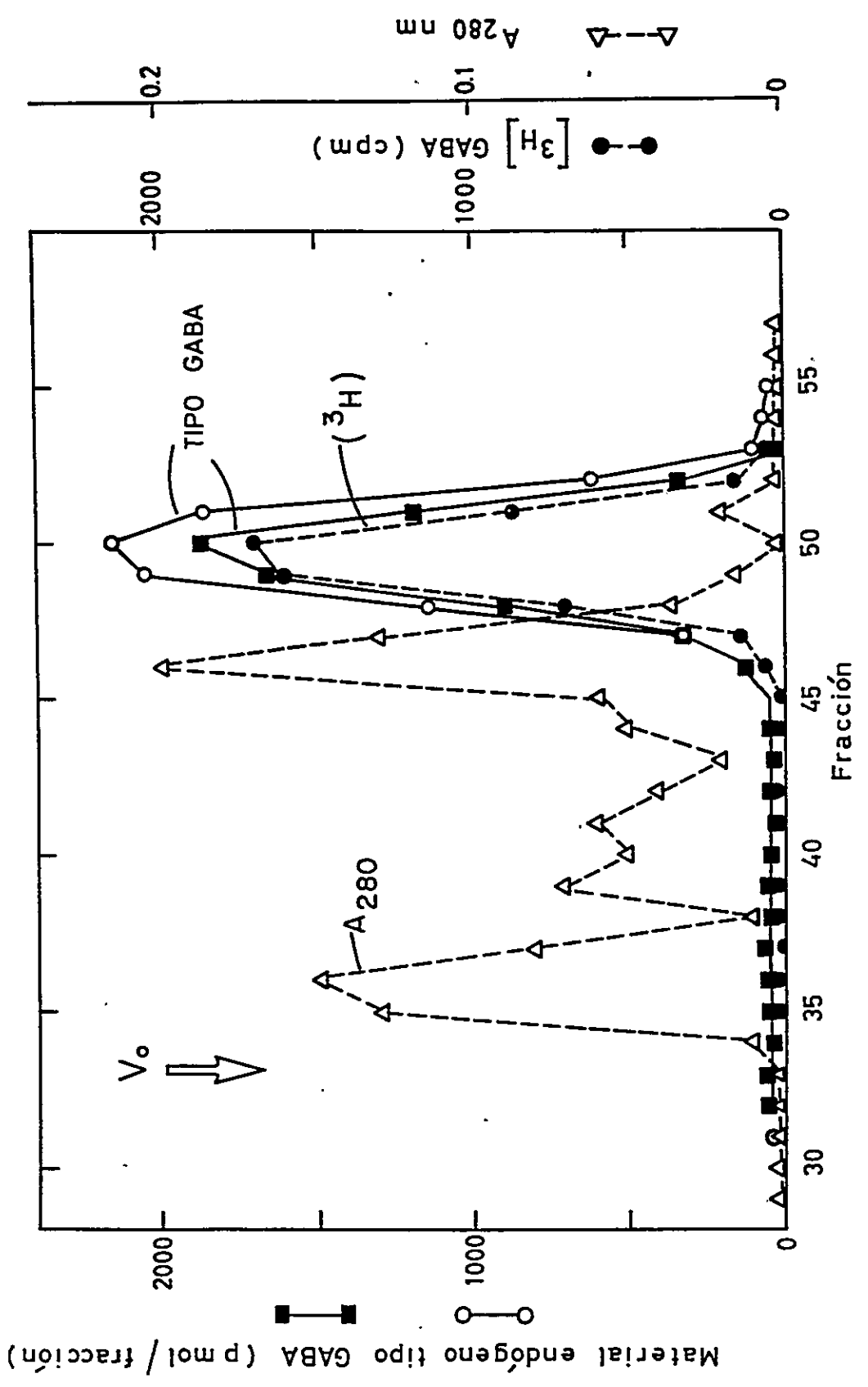


Figura 6: Fraccionamiento en Sephadex G-10 de extracto de membranas obtenidas según el método de Toffano y col. Medición de ligamen de sustancia endógena en dos preparaciones de membranas.

Figura 6.- Fraccionamiento en Sephadex G-10 de extracto de membranas obtenidas según el método de Toffano y colaboradores. Medición de unión de sustancia endógena en dos preparaciones de membranas.

Se preparó inhibidor endógeno a partir de 7,5 g de corteza fresca como describe Toffano y colaboradores (1978) en presencia de Bacitracina 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y EDTA 1 mM. 3,5 ml del extracto liofilizado y resuspendido en agua bidestilada y estéril se aplicó junto a 0,1 pmol de  $[\text{H}^3]$ -GABA a una columna Sephadex G-10 de 1,5 x 80 cm. Velocidad de flujo 0,3 ml/min. Se recolectaron 60 fracciones de 1,3 ml. A cada fracción se le determinó Absorbancia a 280 nm. radiactividad a  $[\text{H}^3]$ -GABA y ligando endógeno capaz de desplazar  $[\text{H}^3]$ -GABA del sitio de ligamen presente en membranas del tipo B según método Toffano y colaboradores (cuadrados llenos) y en membranas preparadas según método de Horng y Wong (círculos vacíos).

Los resultados se presentan como el promedio de valores por triplicado con e.e.m. menor que 2%.

### 3.1.3 En preparación de vesículas sinápticas.

#### 3.1.3.1. *Fraccionamiento en Sephadex 6-10 de extracto de vesículas sinápticas (EVS) de corteza obtenidas según método de Hata y Colaboradores.*

Extracto de vesículas sinápticas se aplica junto a 0,1 p mol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) , a una columna de Sephadex 6-10 (Fig. 7).

Podemos observar que aparece un solo pico de material endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM y este coeluye con las fracciones donde se detecta [ $H^3$ ]-GABA como marcador interno.

Extrayendo las vesículas sinápticas en caliente, como se describe en Métodos, sección 2.2.3.4. o haciendo la extracción con acetona ácida (Métodos , sección 2.2.3.5. ) se obtienen idénticos resultados, ambos métodos de extracción producen igual cantidad de ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA

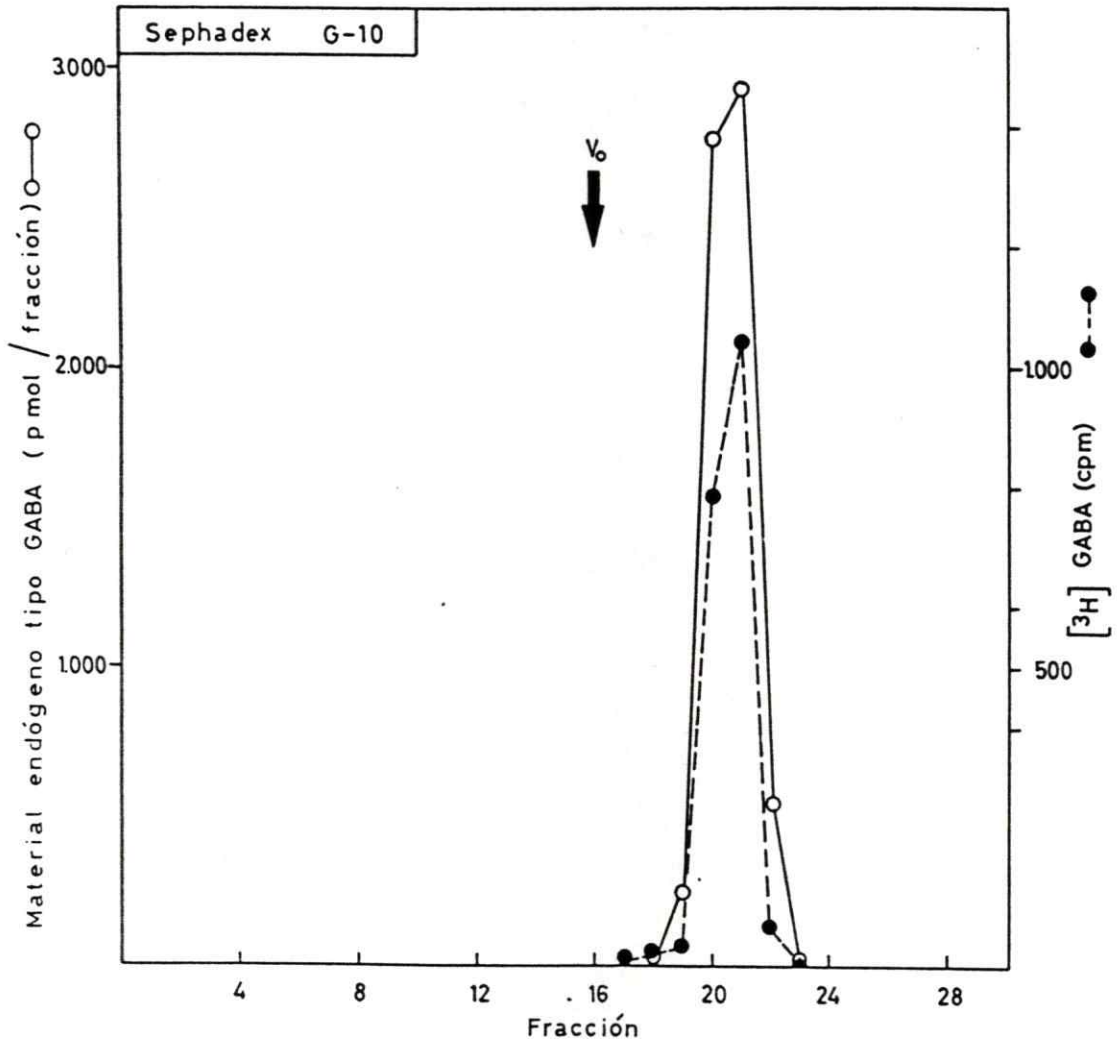


Figura 7 : Fraccionamiento en Sephadex G-10 de EVS de corteza preparada de acuerdo al método de Hata y colaboradores.

Figura 7.- Fraccionamiento en Sephadex G-10 de EYS de corteza preparadas de acuerdo al método de Hata y col.

1,5 ml de EYS extraído en caliente de vesículas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Hata y col., (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 0,5 g de tejido fresco se aplicaron junto a 0,1 pmol de [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno a una columna Sephadex G-10 de 1,5 x 71 cm. Se eluye con agua, a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se recolectaron 30 fracciones de 2,8 ml, a cada fracción se le determina ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA del receptor presente en membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Horny y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.)

El volumen vacío ( $V_0$ ) se determinó previamente con azul dextrano.

Los resultados se presentan como el promedio de valores por triplicado que presentan e.e.m. menores al 2%.

3.1.3.2. *Fraccionamiento por cromatografía en papel de extracto de vesículas sinápticas de corteza obtenidas según método de Hata y Colaboredores.*

En la Fig. 8 se observa la separación obtenida en esta cromatografía ascendente del EVS. Aparece un solo pico de ligando endógeno capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA y este pico de material endógeno presenta una migración exactamente igual a la que realizan los 0,5 p mol de  $[H^3]$ -GABA utilizado como marcador interno de la separación.

Esta técnica separa muy bien aminoácidos como GABA (Rf: 0,288) de B-alanina (Rf: 0,207) o glicina (Rf: 0,134) que no son separados en otras técnicas utilizadas. Por lo tanto el desplazamiento de  $[H^3]$ -GABA del sitio de unión observado, corresponde a GABA endógeno presente en esta preparación de VS y que compite con el  $[H^3]$ -GABA 13 nM utilizado en el ensayo de unión.

3.1.3.3. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de Hata y Colaboredores.*

En la Fig. 9 podemos observar la separación lograda por electroforesis a alto voltaje que nos muestra un solo pico de material endógeno capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA 13 nM, el cual se encuentra distribuido entre las fracciones 15 y 16 correspondiéndose con la

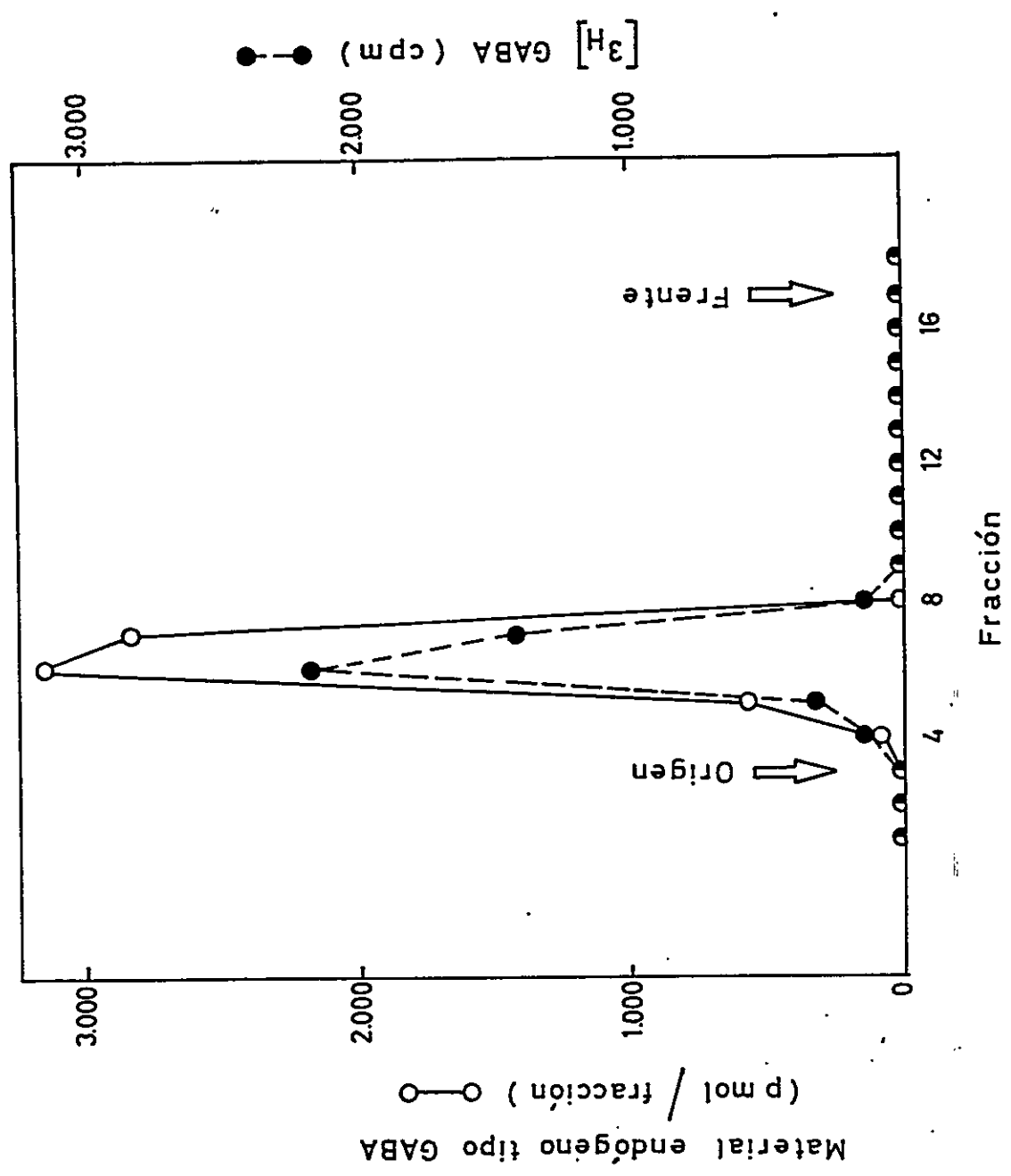


Figura 8 : Fraccionamiento en cromatografía en papel de EVS de corteza según método de Hata y colaboradores .

Figure 8.- Fraccionamiento por cromatografía en papel de EVS de corteza preparadas según método de Hata y col.

25  $\mu$ l de EVS liofilizado, extraído en caliente de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y col. (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.), provenientes de 0,15 g de tejido fresco se aplican junto a 0,5 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) a una tira de papel Whatman N° 1 de 2 cm de ancho. Se somete a separación durante 16 hrs. en cromatografía ascendente utilizando como fase móvil una mezcla formada por n-butanol-ácido acético glacial-agua (6:1:10, en volumen). Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se seca la tira de papel, se corta en pedazos de 2 x 2 cm y se dejan eluir durante la noche en 1 ml de HCl 0,1 N. Se neutraliza el eluido con 0,1 ml de NaOH 1N y 0,9 ml de Tampón Tris-citrato 0,2 M, pH 7,1.

A cada fracción se le mide radiactividad de [ $H^3$ ]-GABA y ligando capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM del receptor de GABA presente en membranas sinápticas preparadas de acuerdo a Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores por triplicado con e.e.m. menores al 5%.



migración de 0,1 p mol de [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno. No aparecen otras fracciones que sean capaces de interactuar con el receptor de GABA.

En cuanto a la separación de amino ácidos, esta técnica da excelente resolución de GABA en relación a ornitina, prolina y taurina, separación parcial de glicina y no discrimina B alanina la cual comigra con GABA.

#### 3.1.3.4. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de Seidler y Colaboradores.*

Extractos de vesículas sinápticas aplicadas junto a 0,1 p mol de [ $H^3$ ] GABA se separan por electroforesis a alto voltaje.

Como se observa en la Fig. 10 el perfil de elución, sólo muestra que aparece en la fracción 14 y 15 material endógeno que desplaza [ $H^3$ ]-muscimol de su sitio de unión.

La migración presentada por este material endógeno, se corresponde exactamente con la distribución de [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno.

#### 3.1.3.5. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método DeLorenzo y Freedman.*

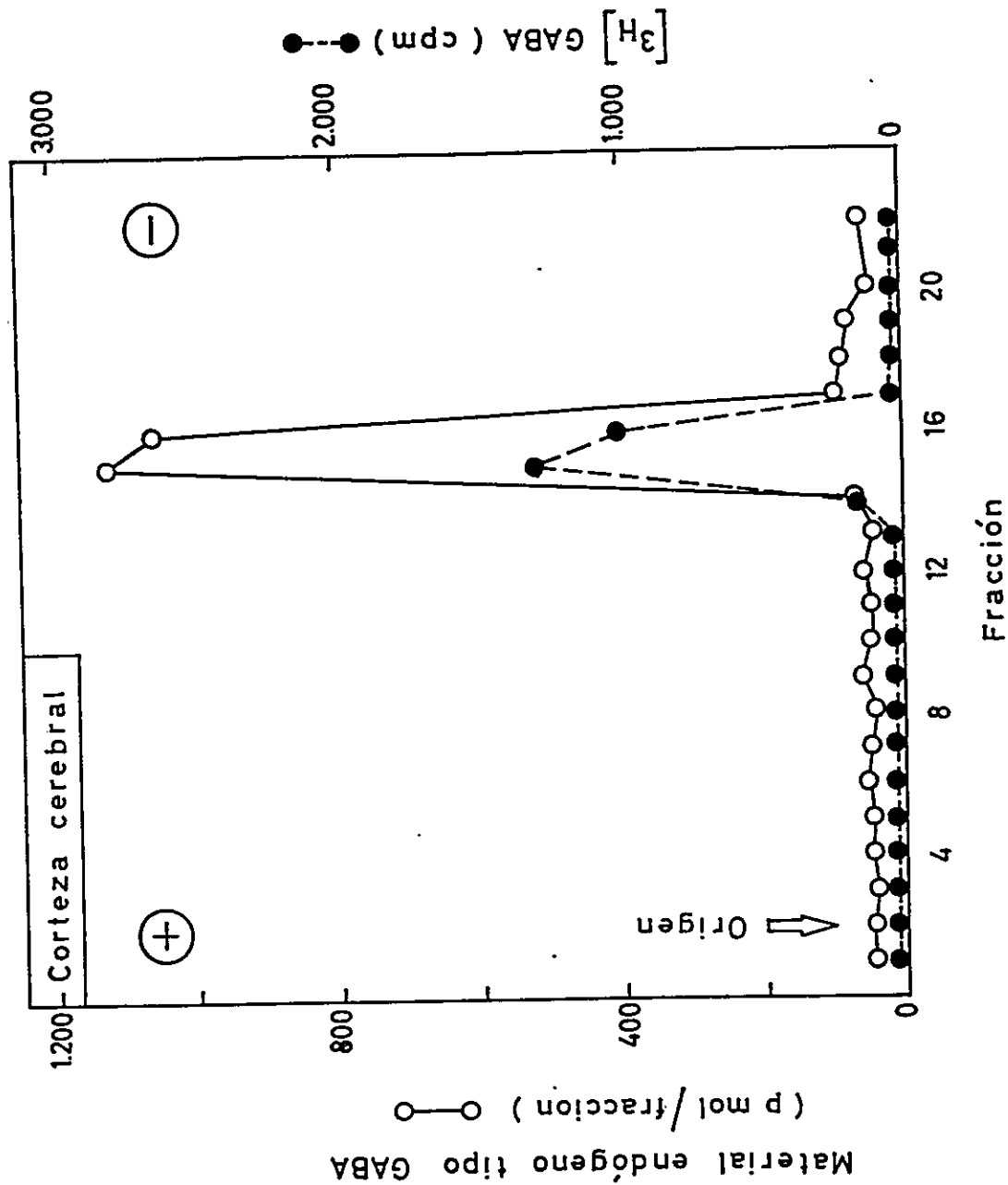


Figura 9 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de Hata y colaboradores .

Figura 9.- Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de EYS de corteza obtenidas por el método de Hata y colaboradores.

10  $\mu$ l de EYS liofilizado, extraído en caliente de VS de corteza preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.), provenientes de 60 mg de tejido fresco original, se aplicaron junto a 0,1 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) a una tira de papel Whatman 3 MM de 28 cm de largo. La separación se efectúa aplicando una diferencia de potencial de 29 v/cm durante 30 min.

Después de secar la tira se corta en pedazos a intervalos de 1 cm y se eluyen con agua bidestilada estéril durante la noche. A cada fracción se le mide la radiactividad de [ $H^3$ ]-GABA y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM del receptor de GABA presente en membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979) Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores por triplicado que presentan e.e.m. menores que un 2%.

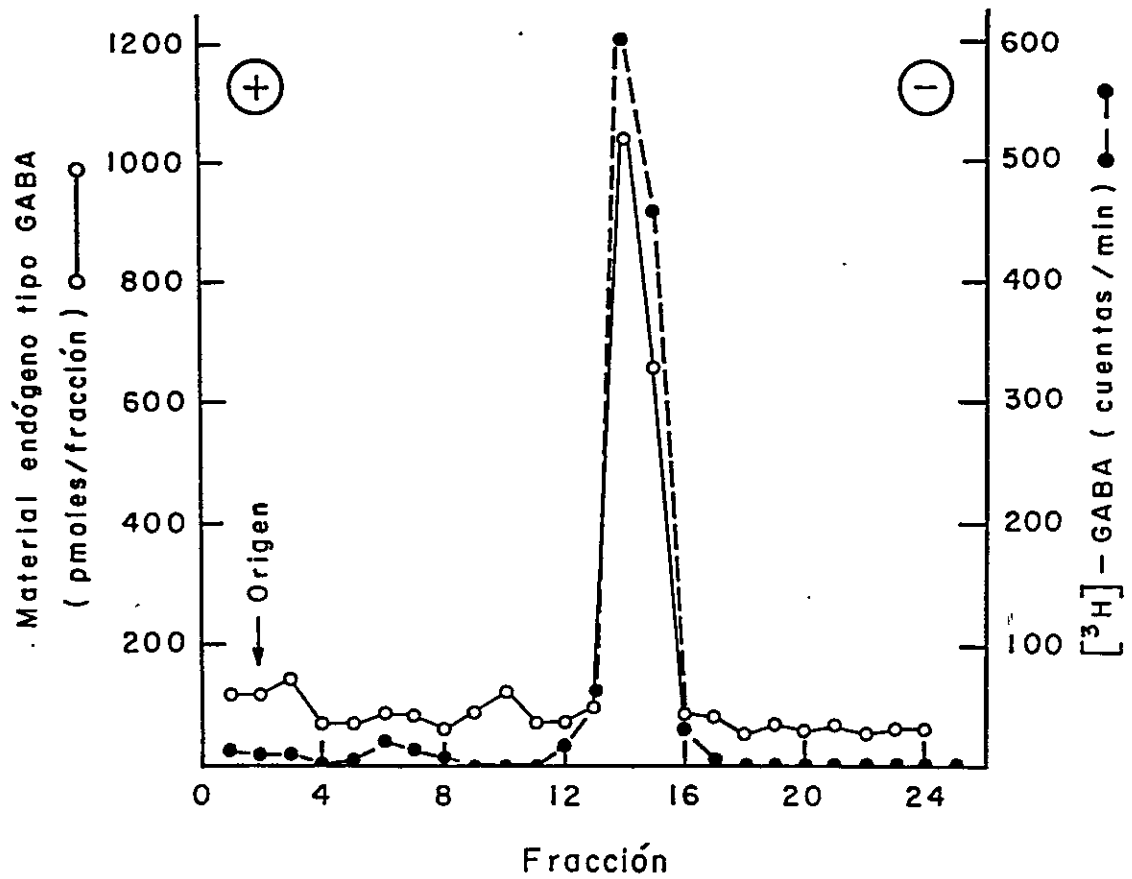


Figura 10 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de Seidler y colaboradores.

Figura 10.- Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas por el método de Seidler y colaboradores.

20  $\mu$ l de EVS liofilizado y resuspendido en ácido fórmico al 8%, obtenido de VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.) se aplicaron junto a 0,1 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) en una tira de papel Whatman 3 MM. La separación se efectúa aplicando una diferencia de potencial de 29 v/cm durante 30 min.

Después de secar la tira se corta en pedazos a intervalos de 1 cm. y se eluyen con agua bidestilada y estéril durante la noche. A cada fracción se le mide radiactividad a [ $H^3$ ]-GABA y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-Muscimol 3 nM desde el receptor de GABA presente en membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores por triplicado que presentan e.e.m. menores que un 2%.

Los 20  $\mu$ l de EVS de corteza corresponden a 25 mg de tejido fresco.

En la Fig. 11 se observa la separación obtenida de extracto de vesículas sinápticas que se aplicó junto a 0,1 p mol de  $[H^3]$ -GABA.

La graficación de esta migración nos muestra la presencia de un pico único de material endógeno capaz de desplazar  $[H^3]$ -Muscimol (3 nM). Este material endógeno sólo se encuentra distribuido en una fracción correspondiéndose en forma exacta con la migración de  $[H^3]$ -GABA utilizado como marcador interno.

### 3.1.3.6. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de médula espinal.*

Extracto de vesículas sinápticas obtenidas de acuerdo al método de Hata y Colaboradores (1976) se aplican junto a 0,5 p mol de  $[H^3]$ -GABA (marcador interno) sobre una tira de papel Whatman 3 MM y se someten a una separación por electroforesis a alto voltaje.

En la Fig. 12 se observa la separación obtenida mostrando un solo pico de material endógeno en esta preparación de médula capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA 13nM, distribuyéndose en una sola fracción que corresponde a la misma migración de  $[H^3]$ -GABA utilizado como marcador interno.

### 3.1.3.7. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas crudas de cerebela.*

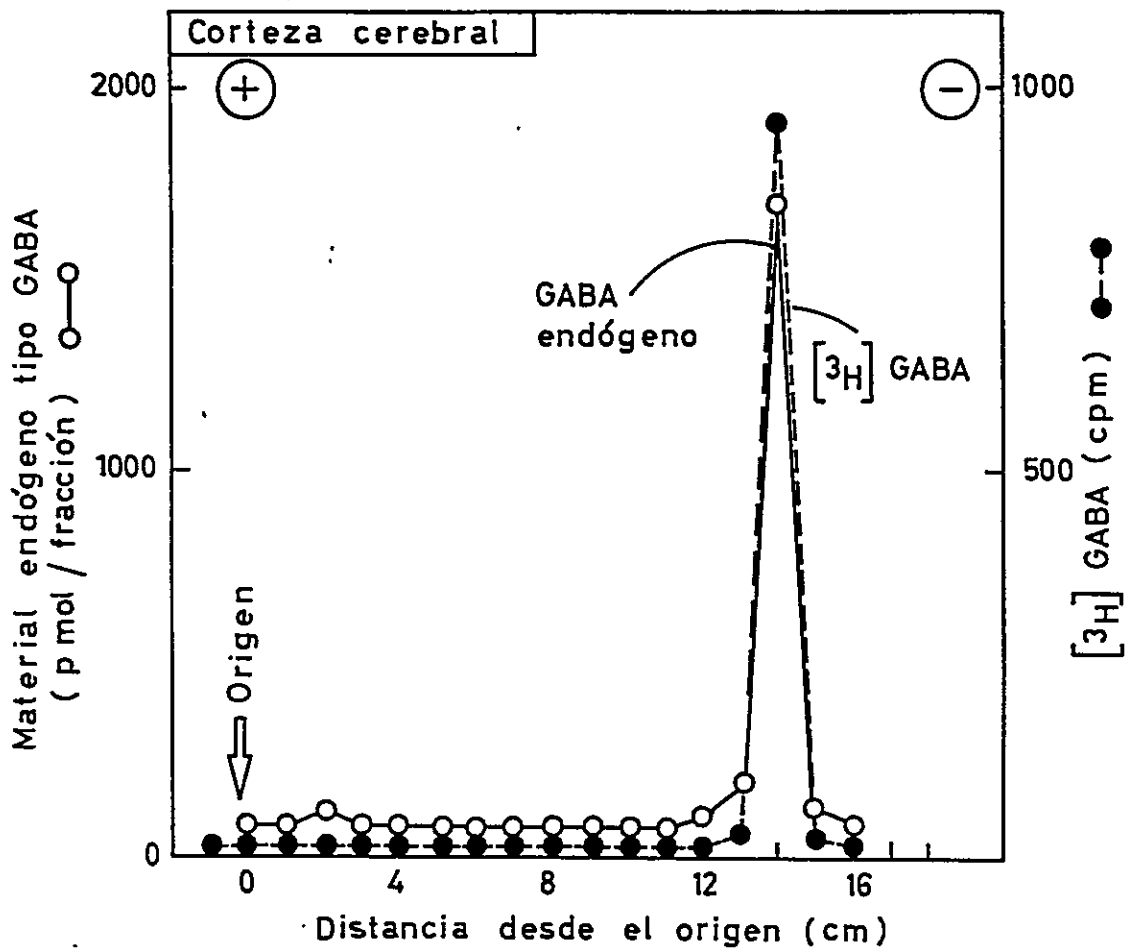


Figura 11 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS de corteza obtenidas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman.

Figura 11.- Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas de corteza obtenidas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman.

200  $\mu$ l de EVS liofilizado y resuspendido en ácido fórmico al 8%, obtenido de V.S. preparadas de acuerdo al método descrito por De Lorenzo y Freedman (1978) (Métodos, sección 2.2.6.1.), se aplicaron junto a 0,1 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) en una tira de papel Whatman 3MM. La separación se efectúa aplicando una diferencia de potencial de 29 v/cm durante 30 min. Después de secar la tira se corta en pedazos a intervalos de 1 cm y se eluyen en agua bidestilada y estéril durante la noche. A cada fracción se le mide la radiactividad de [ $H^3$ ]-GABA y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-Muscimol 3 nM del receptor para GABA presente en las membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método descrito por Horng y Wong (1979). (Métodos, sección 2.2.2.).

Los 200  $\mu$ l de EVS equivalen a 50 mg de tejido fresco.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores que un 2%.



Extracto de vesículas sinápticas obtenidas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976), se aplican junto a 0,5 p mol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) sobre una tira de papel Whatman 3 MM y se someten a una separación por electroforesis a alto voltaje.

En la Fig. 13, se observa la separación obtenida, mostrando un solo pico de material endógeno en esta preparación de cerebelo capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM, distribuyéndose en una sola fracción que se corresponde exactamente con la migración presentada por los 0,5 p mol de [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno.

### 3.1.3.8. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas crudas de hipotálamo.*

EVS obtenido de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) se aplican junto a 0.5 p mol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) sobre una tira de papel Whatman 3 MM y se someten a una separación por electroforesis a alto voltaje.

En la Fig. 14 se muestra la separación lograda, donde aparece un solo pico de material endógeno presente en esta preparación de hipotálamo capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM, su distribución corresponde exactamente a la migración que presenta el marcador interno.

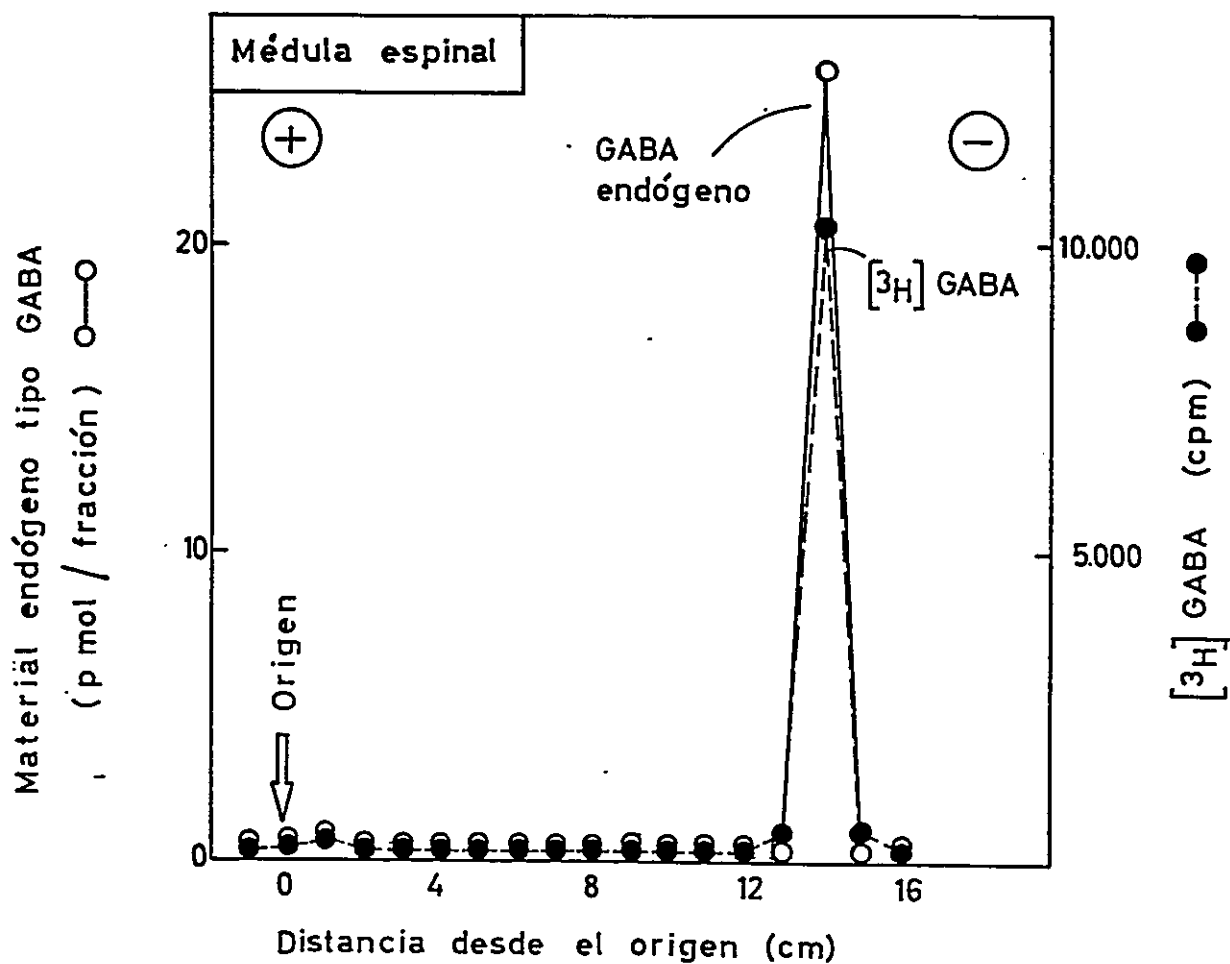


Figura 12 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de vesículas sinápticas crudas de Médula Espinal.

Figura 12- Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de vesículas sinápticas crudas de médula espinal.

5  $\mu$ l de EYS liofilizado, obtenido de médula espinal de acuerdo a la preparación descrita por Hata y colaboradores (1979) (Métodos, sección 2.2.6.1.), provenientes del equivalente a 150 mg de tejido fresco, se aplicaron junto a 0,5 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) en una tira de papel Whatman 3 MM. La separación se realiza aplicando diferencia de potencial de 29 V/cm durante 30 min. Después de secar la tira se corta en pedazos a intervalos de 1 cm y se eluyen en agua bidestilada y estéril durante la noche. A cada fracción se le mide radiactividad a [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM del receptor para GABA presente en las membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presenta e.e.m. menores que un 2%.

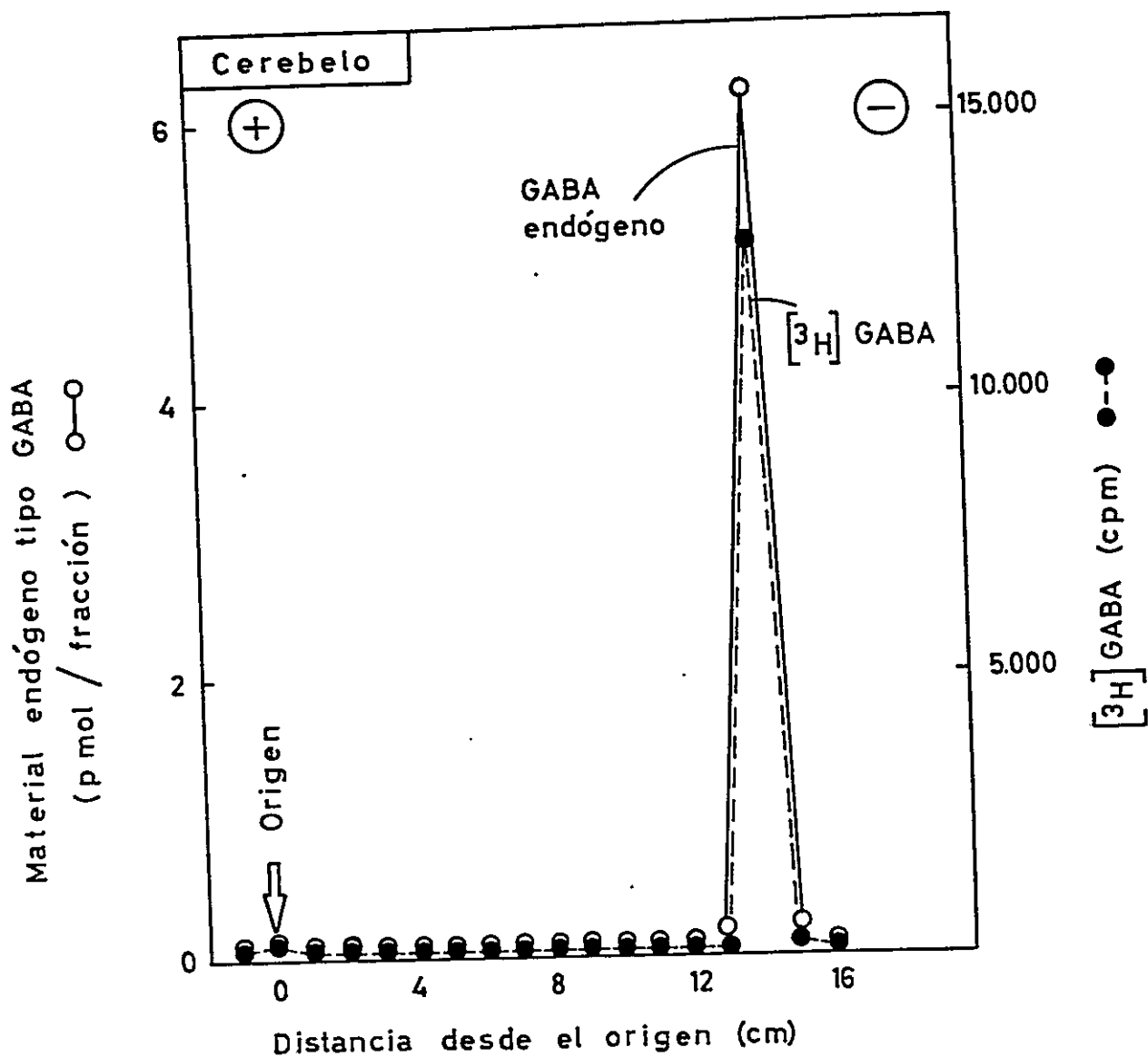


Figura 13 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas crudas de cerebelo.

Figura 13.- Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de extracto de vesículas sinápticas crudas de Cerebelo.

5  $\mu$ l de EVS liofilizado, resuspendido en ácido fórmico al 8% obtenido de VS de cerebelo preparadas por el método descrito por Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.), provenientes de 10,3 mg de tejido fresco, se aplicaron junto a 0,5 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) en una tira de papel Whatman 3MM. La separación se realiza aplicando una diferencia de potencial de 29 V/cm durante 30 min. Después de secar la tira, esta se corta en pedazos a intervalos de 1 cm y se eluyen en agua bidestilada y estéril durante la noche. A cada fracción se le mide la radioactividad a [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM del receptor de GABA presente en membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método descrito por Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores que un 2%.

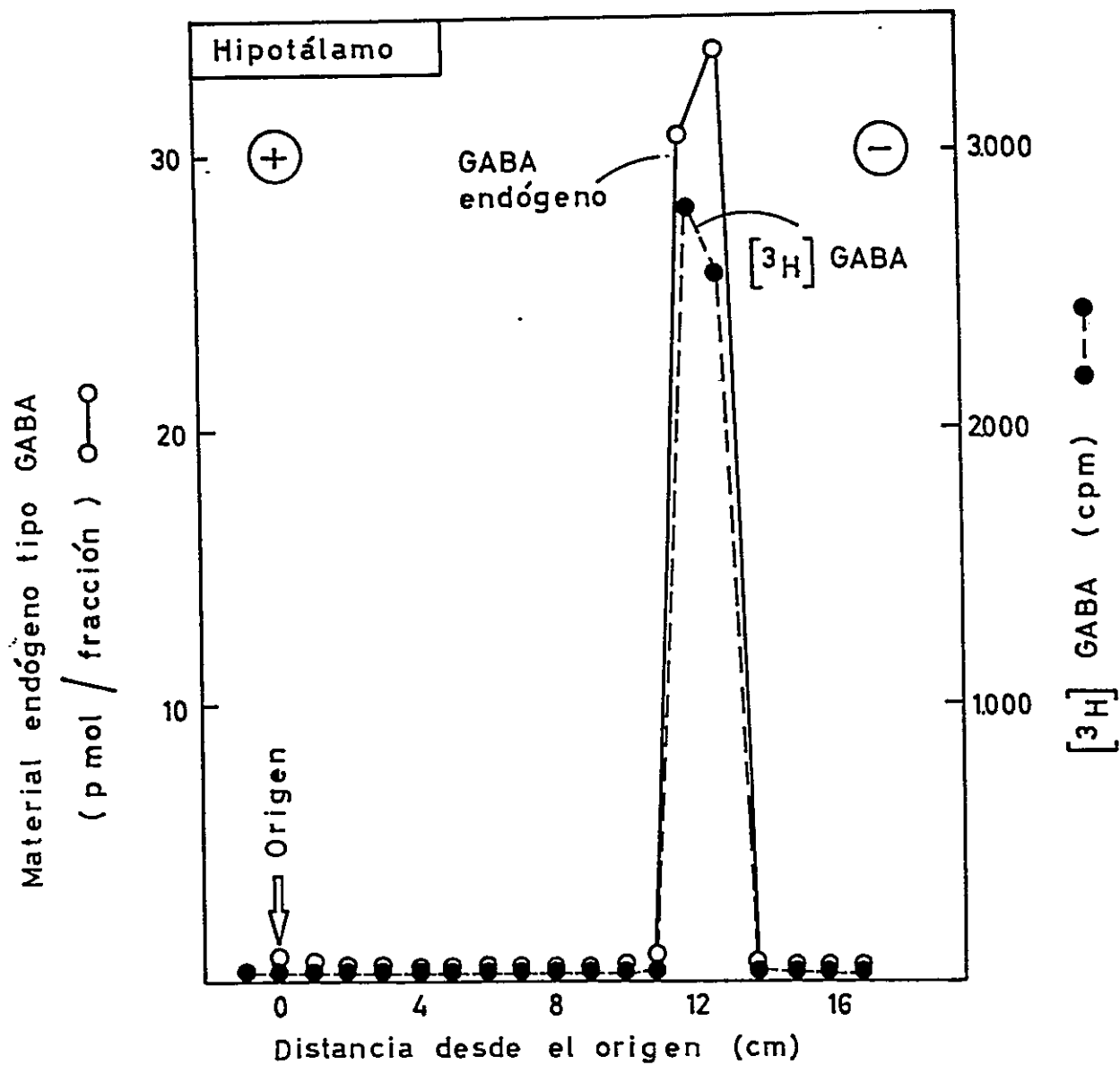


Figura 14 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de Hipotálamo.

Figura 14.- Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS crudas de Hipotálamo.

10  $\mu$ l de EYS liofilizado obtenido de VS de Hipotálamo preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes del equivalente a 4,4 mg de tejido fresco, se aplicaron junto a 0,5 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) a una tira de papel Whatman 3MM. La separación se realiza aplicando una diferencia de potencial de 29 V/cm durante 30 min. Después de secar la tira, esta se corta en pedazos a intervalos de 0,5 cm y se eluyen en agua bidestilada y estéril durante la noche. A cada fracción se le mide la radiactividad a [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM del receptor a GABA presente en las membranas sinápticas preparadas según método de Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores que el 2%.

3.1.3.9. *Fraccionamiento por electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de cuerpo estriado.*

EVS obtenido de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) se aplican junto a 0,1 p mol de  $[H^3]$ -GABA (marcador interno) sobre una tira de papel Whatman 3 MM y se somete a una separación por electroforesis a alto voltaje. En la Fig. 15 se muestra la separación obtenida donde la totalidad del material endógeno capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA aparece en una sola fracción a 14 cm desde el origen, presentando una migración que corresponde exactamente a la realizada por los 0,1 p mol de  $[H^3]$ -GABA utilizado como marcador interno de migración.

3.1.4. Especificidad de unión al receptor  $GABA_A$ , presente en membranas sinápticas preparadas según el método de Horng y Wong (1979).

3.1.4.1. *Efecto de péptidos neuroactivos en la unión al receptor  $GABA_A$ .*

La Tabla II nos muestra un gran número de péptidos descritos como biológicamente activos, además del polication poli-L-Lisina y el polianion poli-L-glutamato los cuales también se probaron en su capacidad de afectar la unión específica de  $[H^3]$ -GABA a membranas sinápticas.



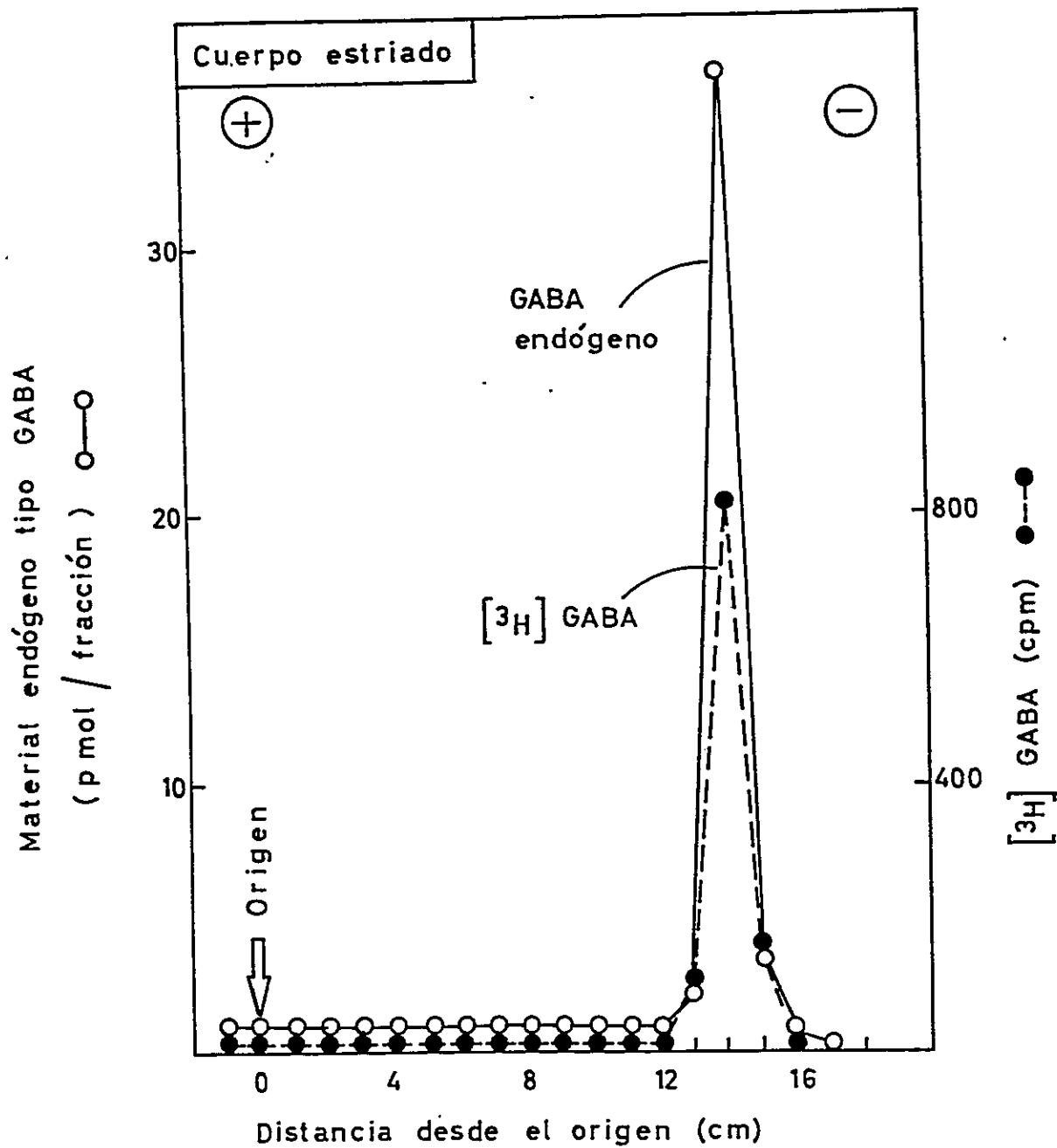


Figura 15 : Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EVS crudas de Cuerpo Estriado.

Figura 15.- Fraccionamiento por Electroforesis a alto voltaje de EYS crudas de Cuerpo Estriado.

10  $\mu$ l de EYS liofilizado resuspendido en ácido fórmico al 8%, obtenido de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes del equivalente a 5 mg de tejido fresco, se aplicaron junto a 0,1 pmol de [ $H^3$ ]-GABA (marcador interno) en una tira de papel Whatman 3MM. La separación se efectúa aplicando una diferencia de potencial de 29 V/cm durante 30 min. Después de secar la tira, esta se corta en pedazos a intervalos de 0,5 cm y se eluyen en agua bidestilada y estéril durante la noche. A cada fracción se le mide la radiactividad a [ $H^3$ ]-GABA utilizado como marcador interno y ligando endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA 13 nM del receptor a GABA presente en las membranas sinápticas preparadas según Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.).

Los resultados se presentan como promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores que un 2%.

**Tabla II.-** Efecto de péptidos neuroactivos en la unión al receptor GABA<sub>A</sub>.

Substancia	Concentración M	unión específica de [ <sup>3</sup> H] GABA (% del control ± S.D.)
Substancia P	10 <sup>-5</sup>	94.2 ± 0.2
Neurotensina	10 <sup>-5</sup>	94.4 ± 2.9
CCK-8	10 <sup>-5</sup>	93.3 ± 4.4
Angiotensina II	10 <sup>-4</sup>	103.2 ± 1
Somatostatina	10 <sup>-5</sup>	89.8 ± 3.5
TRH	10 <sup>-5</sup>	90.3 ± 0.7
ACTH	3,3 × 10 <sup>-7</sup>	88.5 ± 1.7
LH-RH	10 <sup>-5</sup>	89.3 ± 4.9
Met-encefalina	10 <sup>-5</sup>	95.1 ± 1.1
Poli-L-lisina	(30 µg/ml)	100.3 ± 1.02
Poli-L-glutamato	(30 µg/ml)	103.1 ± 0.2

Membranas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Horng y Wong (1979) (Métodos, sección 2.2.2.) se incuban con [<sup>3</sup>H]-GABA 13 nM en tampón Tris-citrato 50 mM, pH 7,1 en presencia del péptido a la concentración indicada en la Tabla II, en un volumen final de 1 ml.

El ensayo de unión se realizó utilizando la técnica por centrifugación (Métodos, sección 2.2.7.1.a.).

Los resultados corresponden a promedios ± e.e.m. de valores en triplicado.

Los resultados muestran claramente que la incubación del receptor de GABA con cada uno de estos péptidos a las concentraciones indicadas, en todos los casos no produce inhibición significativa la unión específica de  $[H^3]$ -GABA.

### 3.2. PURIFICACION DE FRACCIONES VESICULARES OBTENIDAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA QUE CONTIENEN GABA ENDOGENO.

#### 3.2.1. Obtención de fracciones vesiculares por filtración en gel.

##### 3.2.1.1. *Fraccionamiento de vesículas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en gel de Sepharose 4B.*

VS preparadas de acuerdo al método de Hata y col., (1976), premarcadas con  $[H^3]$ -NA se aplicaron a una columna de Sepharosa 4B. En la Fig. 16 se muestra el fraccionamiento obtenido de la columna donde las cuentas radiactivas de  $[H^3]$ -NA (marcador de VS) y el GABA endógeno aparecen en la fracción particulada que eluye en el volumen vacío ( $V_0$ ) de la columna. En esta fracción también aparece casi la totalidad de la proteína. La presencia de  $[H^3]$ -NA como marcador de VS en esta fracción particulada indica sin lugar a duda la presencia de VS, sin embargo también se encontró en esta fracción una contaminación apreciable de fragmentos de membrana plasmática, lo que se demuestra por la actividad de  $(Na^+ - K^+)ATPase$  medida que aparece en su totalidad, en esta fracción.

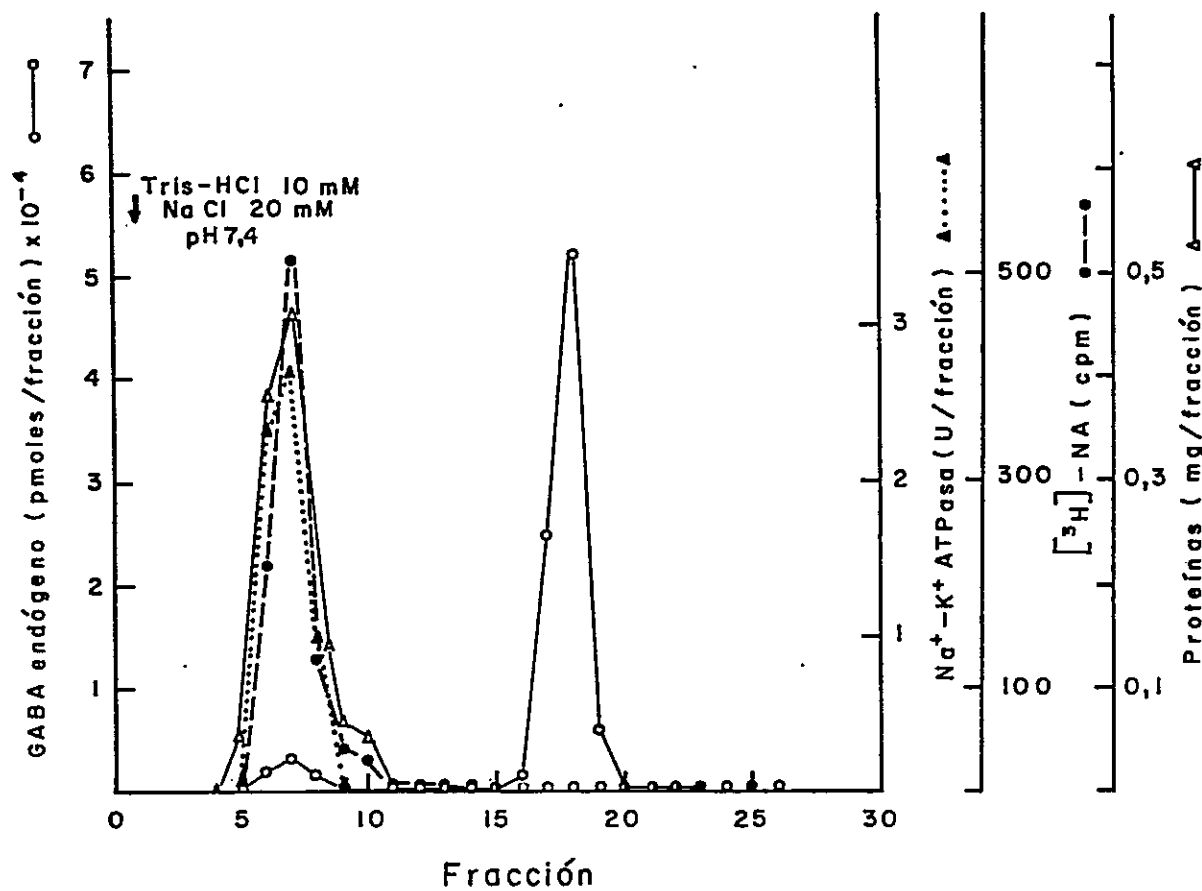


Figura 16: Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores.

Figura 16.- Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores.

0,5 ml de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 2,4 g de tejido fresco y marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA, se aplicaron a una columna de 1 x 12 cm de Sepharose 4B mantenida a 6° C. Se eluye con Na Cl 20 mM Tris-HCl 10 mM pH 7,4, recolectándose 30 fracciones de 0,6 ml. A cada fracción se le determina radiactividad a  $[H^3]$ -NA, proteínas (método Lowry y colaboradores (1951), actividad  $(Na^+-K^+)$  ATPasa (Schuurmans Steckhoven, 1976) y GABA endógeno.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores al 3%.

Esto se confirmó midiendo el ligamen específico de  $[H^3]$ -Ouabaina 100 nM, en 12 preparaciones hechas por separado, de esta fracción particulada, siendo este de  $1.310 \pm 128$  fmol de  $[H^3]$ -Ouabaina ligada/mg de proteína.

Gran cantidad de GABA endógeno aparece en la fracción soluble (fracción 16-19).

El GABA endógeno presente en la fracción particulada corresponde al 5% del GABA endógeno total presente en la muestra aplicada de esta preparación.

3.2.1.2. *Fraccionamiento a 6° C. de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en Sepharose 4B - Concanavalina A.*

En la Fig. 17 se muestra el fraccionamiento de VS de corteza cerebral marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA (marcador de VS) y purificadas de acuerdo a Hata y colaboradores en Sepharose 4B-Concanavalina A a 6° C.

Como se puede observar en el  $V_0$  de la columna, que corresponde a las fracciones que comienzan en la 5 y terminan en la 8, aparece la fracción particulada y en ella coeluyen la  $[H^3]$ -NA y el GABA endógeno. En estas fracciones eluyen también la mayor proporción de proteínas y toda la actividad  $(Na^+-K^+)ATP$ ásica (marcador de membrana plasmática).

Un gran pico de GABA endógeno soluble aparece después del correspondiente a la fracción particulada.

Elución con tampón borato a partir de la fracción 19 no eluye más material indicando que la columna de Sepharose 4B-concanavalina A corrida a 6° C no separa por cromatografía de afinidad, si no por tamaño en forma similar a como fracciona la columna de Sepharose 4B (3.2.1.1.).

El GABA endógeno presente en la fracción particulada corresponde al 10% del GABA endógeno total presente en la muestra de esta preparación.

3.2.1.3. *Fraccionamiento a temperatura ambiente de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en Sepharose 4B-Concanavalina A.*

En la Fig. 18 se muestra el fraccionamiento de VS de corteza cerebral marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA (marcador de VS) y purificadas de acuerdo a Hata y colaboradores en Sepharose 4B-Concanavalina A mantenida a temperatura ambiente.

En la fracción particulada (a continuación de  $V_0$ ) cuyo perfil se sigue, midiendo la absorbancia a 280 nm aparece un pequeño pico que corresponde a la radiactividad de  $[H^3]$ -NA y prácticamente no se observa GABA endógeno, excepto en la fracción 10 donde aparecen 407 p mol., sin embargo, en las fracciones que corresponden a la elución de



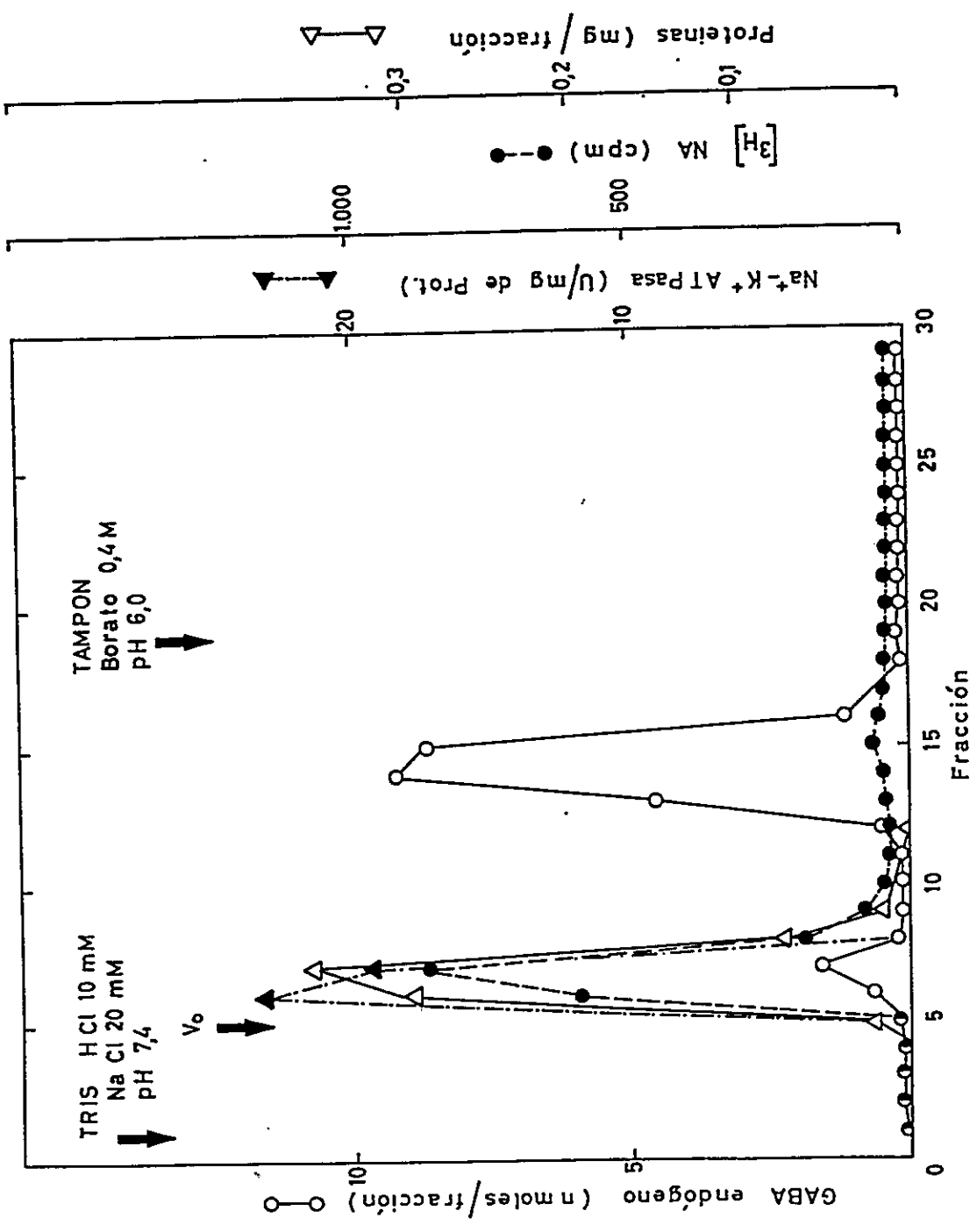


Figura 17: Fraccionamiento de VS por filtración en Sepharose 4B-  
concanavalina A a 6° C.

Figura 17.- Fraccionamiento de VS por filtración en Sepharose 4B-Concanavalina A a 6° C.

0,5 ml de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 0,5 g de tejido fresco y marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA se aplicaron a una columna de 1 x 10 ml de Sepharose 4B-Concanavalina A. mantenida a 6° C. Se eluye hasta fracción 18 con tampón Na Cl 20 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4 y desde fracción 19 a 30 con tampón borato 0,4 M pH 6,0. Se recolectaron 30 fracciones a una velocidad de flujo de 0,25 ml/min. fracción 1 - 18 tienen un volumen de 0,6 ml, fracción 19 - 30 tienen un volumen de 2 ml. A cada fracción se le determina radiactividad a  $[H^3]$ -NA, proteínas (Método Lowry y colaboradores, 1951), actividad  $(Na^+-K^+)$  ATPasa (según describe Shuurmans Steckhoven, 1976) y GABA endógeno.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores al 3%.

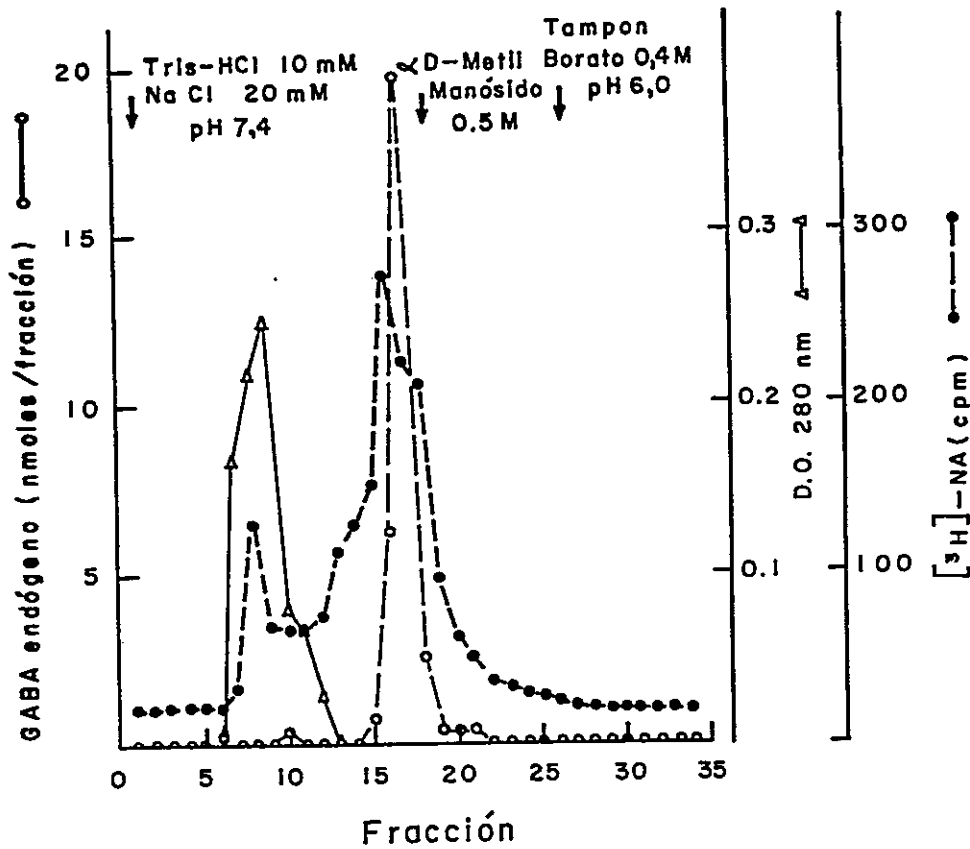


Figura 18 : Fraccionamiento de VS por filtración en Sepharose 4B-concanavalina A a temperatura ambiente.

Figura 18.- Fraccionamiento de VS por filtración en Sepharose 4B-concanavalina A a temperatura ambiente.

0,5 ml de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 0,6 g de tejido fresco y marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA se aplicaron a una columna de 1 x 10 cm de sepharose 4B-concanavalina A, mantenida a temperatura ambiente.

Se eluye hasta fracción 18 con tampón NaCl 20 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Desde fracción 19 a 26 con  $\alpha$  D-metil manósido 0,5 M y con tampón borato 0,4 M; pH 6,0 desde fracción 27 a 38. La velocidad de flujo es 0,25 ml/min, fracción 1-18 tienen un volumen de 0,6 ml, fracción 19-38 tienen un volumen de 2 ml. A cada fracción se le determina radiactividad a  $[H^3]$ -NA, absorbancia a 280 nm, actividad de  $(Na^+ - K^+)$  ATPasa y GABA endógeno.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicados que presentan e.e.m. menores al 3%.

substancias solubles aparece la mayor proporción de  $[H^3]$ -NA y todo el resto de GABA endógeno.

El perfil de elución continuo de  $[H^3]$ -NA que se observa, parece aumentar en las fracciones donde eluye lo soluble, correspondería al típico perfil relacionado con un vaciamiento del compartimiento particulado durante la corrida de la columna a temperatura ambiente.

La elución con  $\alpha$ D-metilmanósido a partir de la fracción 19 y tampón boreto a partir de la fracción 27 respectivamente, no eluyen material, indicando que la columna corrida a temperatura ambiente no separaría por cromatografía de afinidad, sino por tamaño, en forma similar a como fracciona la columna de Sepharosa 4B (3.2.1.1.), presentando un retardo en la elución de algunas fracciones.

Sólo la fracción 7 presenta actividad de  $(Na^+-K^+)ATPasa$  medible y su actividad es muy cercana a la sensibilidad del método utilizado en la medición.

#### 3.2.1.4. *Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B.*

VS marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA (marcador de VS) y obtenidas de acuerdo al método de Seidler y Colaboradores, se aplican a una columna de Sepharose 4B mantenida a 6° C.

Como podemos observar en la Fig. 19, a continuación del  $V_0$ ,

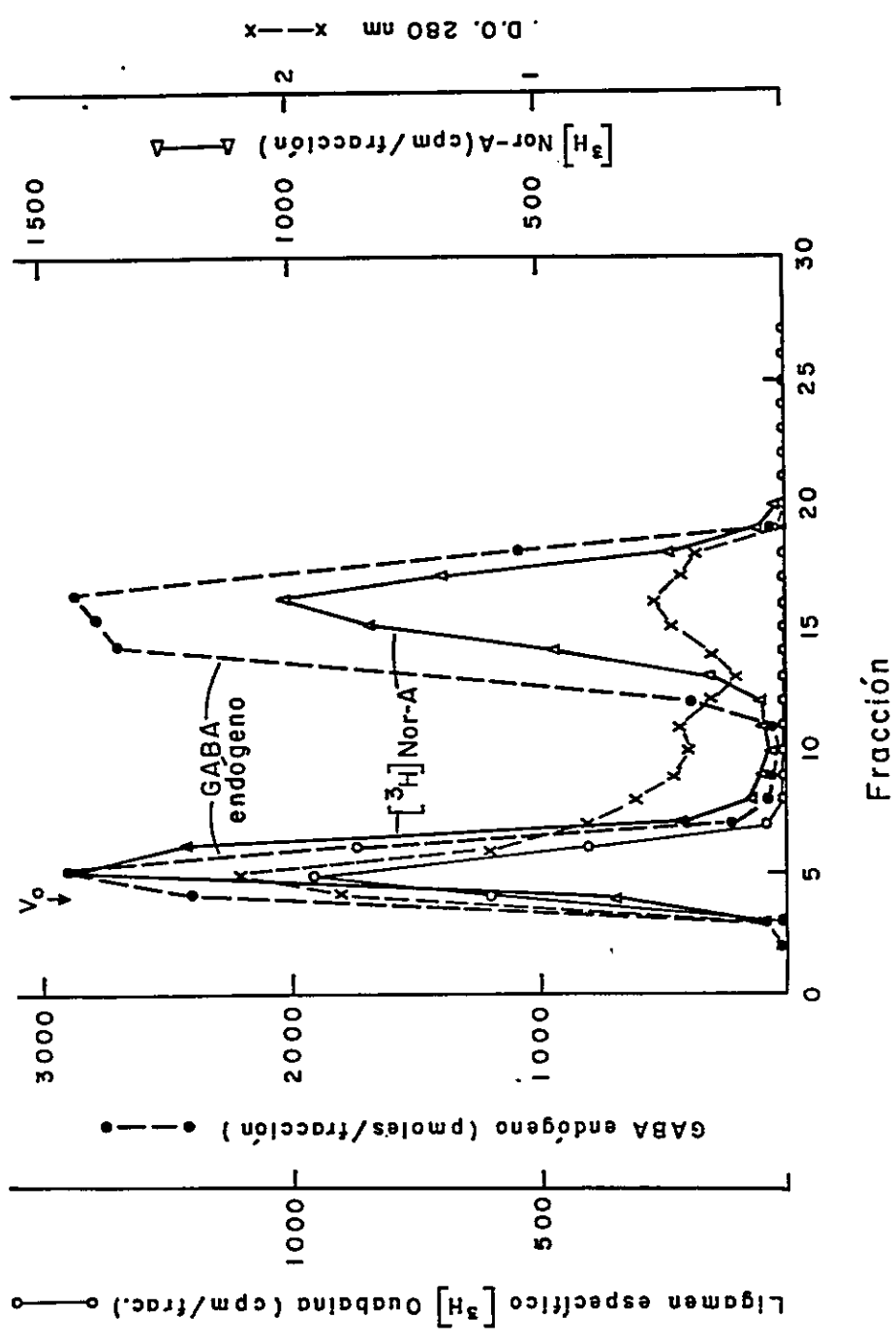


Figura 19 : Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS preparadas de acuerdo al método de Seldler y colaboradores .

Figura 19.- Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores.

0,5 ml de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 0,3 g de tejido fresco y marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA se aplicaron a una columna de 1 x 10 cm de Sepharose 4B mantenida a 6° C. Se eluye con tampón  $KH_2 PO_4$  130 mM, pH 7,0, recolectándose 30 fracciones de 0,6 ml. A cada fracción se le determina radiactividad a  $[H^3]$ -NA, absorbancia a 280 nm, unión específica a  $[H^3]$ -ouabaína 100 nM (Métodos, sección 2.2.7.2.) y GABA endógeno.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores al 3%.

aparece la fracción particulada que presenta la mayor absorbancia a 280 nm, coeluyendo en ella la fracción que une  $[H^3]$ -Ouabaina, ligando específico de alta afinidad a  $(Na^+-K^+)$  ATPasa, enzima marcador de membrana plasmática. Esta fracción particulada presenta, una unión específica a  $[H^3]$ -ouabaina 100 nM de  $122,6 \pm 10$  fmoles de  $[H^3]$ -ouabaina unida/mg de proteína. Más atrás aparece un segundo pico correspondiente a las fracciones solubles donde coeluyen el GABA endógeno y la  $[H^3]$ -NA restante.

El GABA endógeno presente en la fracción particulada corresponde al 34% del GABA endógeno total presente en la muestra de esta preparación.

La radioactividad de  $[H^3]$ -NA se distribuye en ambas fracciones, particulada y soluble en cantidades similares.

### 3.2.1.5. *Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B. Preparación hecha en presencia de $[H^3]$ -GABA.*

Corteza cerebral de rata se homogeniza en presencia de  $2\mu$  Ci de  $[H^3]$ -GABA, posteriormente se preparan VS de acuerdo al método de Seidler y colaboradores y las VS así obtenidas se aplican a una columna de Sepharose 4B mantenida a  $6^\circ C$ . Como se muestra en la Fig. 20 en el  $V_0$  aparece la fracción particulada presentando la mayor absorbancia a 280 nm y junto a ella el GABA endógeno presente correspondiendo al 27% de esta preparación. Esta cantidad se corres-



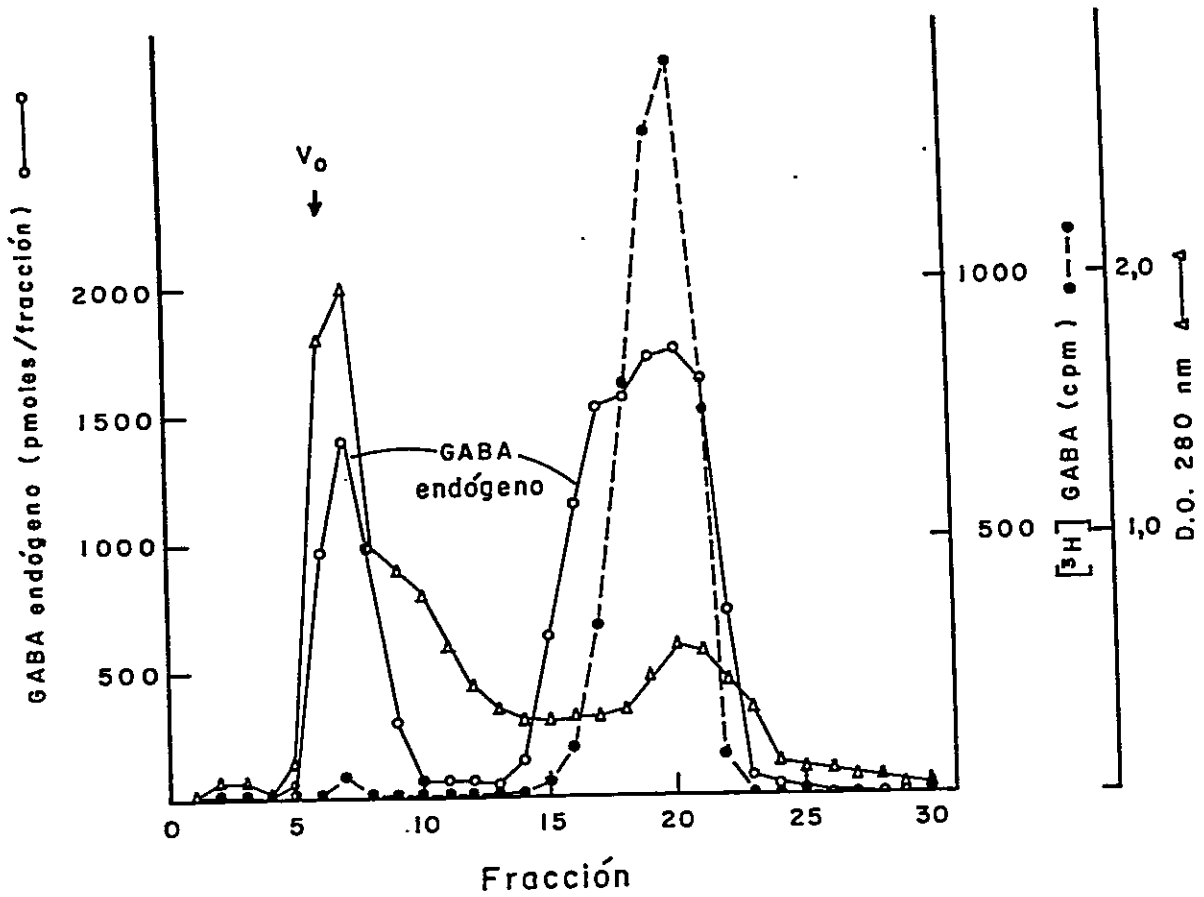


Figura 20 : Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B. Preparación de VS hecha en presencia de  $[^3\text{H}]$  GABA.

Figura 20.- Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores en Sepharose 4B. Preparación de VS hecha en presencia de  $[H^3]$ -GABA.

0,5 ml de VS preparadas de acuerdo al método de Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 1 g de tejido fresco, el cual se homogeniza en presencia de 2  $\mu$ Ci de  $[H^3]$ -GABA se aplican a una columna de 12,5 ml de Sepharose4B mantenida a 6° C.

Se eluye con tampón  $KH_2 PO_4$  130 mM, pH 7,0, recolectándose 30 fracciones de 0,6 ml. A cada fracción se le determina la absorbancia a 280 nm, radiactividad a  $[H^3]$ -GABA y GABA endógeno.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores al 3%.

ponde bien con la cantidad de GABA endógeno detectado normalmente en esta fracción, en esta preparación de VS

En las fracciones donde eluyen las sustancias solubles aparece la casi totalidad del  $[H^3]$ -GABA (99% de las cuentas totales), utilizado como marcador de captación de GABA libre por parte de la fracción particulada en la preparación de VS, indicando claramente que el GABA presente en la fracción particulada no es captado a partir del soluble durante el proceso de purificación de VS, ya que el  $[H^3]$ -GABA presente en la fracción particulada corresponde al 1% del total presente en la elución de la columna.

### 3.2.1.6. *Fraccionamiento de VS preparados de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman en Sepharose 4B.*

Como se muestra en la Fig. 21 en las fracciones que corresponden al  $V_0$  de la columna aparece la fracción particulada presentando la mayor absorbancia a 280 nm que coincide exactamente con la elución de la proteína y coeluyendo con la radiactividad a  $[H^3]$ -NA y parte del GABA endógeno. Solo la fracción 6 presenta unión específica a  $[H^3]$ -ouabaina y corresponde al total de la unión específica que presenta la muestra aplicada a la columna, indicando que la fracción de membranas con capacidad de unir  $[H^3]$ -ouabaina eluye en una sola fracción. Es importante destacar que para medir unión de  $[H^3]$ -ouabaina en esta preparación, fue necesario utilizar la totalidad de la muestra para aumentar al máximo el contenido de proteína. Esta fracción presenta una unión específica a  $[H^3]$ -ouabaina 100 nM de

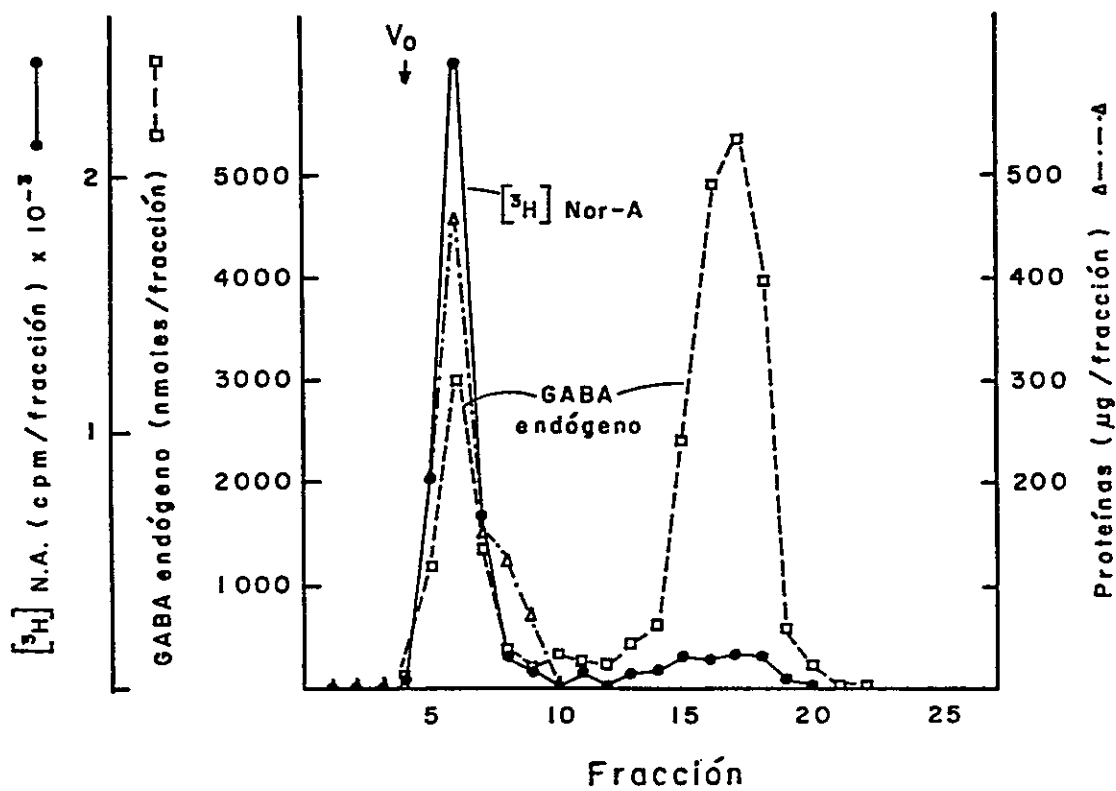


Figura 21 : Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS de corteza preparadas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman.

Figura 21.- Cromatografía en gel de Sepharose 4B de VS de corteza preparadas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman.

0,6 ml de VS preparadas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman (1978) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 3,2 g de tejido fresco y marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA, se aplicaron a una columna de 1 x 11 cm de Sepharose 4B mantenida a 6°C.

Se eluye con sacarosa 0,25 M; Tris-sulfato 50 mM, pH 7,4. Se recolectan 30 fracciones de 0,6 ml. A cada fracción se le determina, radiactividad a  $[H^3]$ -NA, absorbancia a 280 nm, proteínas según método de Bradford (1976), unión específica a  $[H^3]$ -ouabaina 100 nM y GABA endógeno según ensayo de ligamen a  $[H^3]$ -muscimol 3 nM (Métodos, sección 2.2.7.1.b.).

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presenten e.e.m. menores al 3%.

$37,2 \pm 2,6$  fpmol de  $[H^3]$ -ouabaina unida/mg de proteína correspondiéndose muy bien con la bajísima presencia de membrana plasmática resellada que se observa en estudios de microscopía electrónica hechos en la misma preparación, indicando que se ha obtenido una fracción particulada muy enriquecida en vesículas sinépticas.

Más atrás aparece un segundo pico correspondiente a las fracciones solubles donde aparece solamente GABA endógeno libre, no particulado.

El GABA endógeno presente en la fracción particulada corresponde al 26% del GABA endógeno total presente en la muestra de esta preparación de VS.

$[H^3]$ -NA sólo aparece distribuida en la fracción particulada mostrando que no hay pérdida de marcador durante la corrida de la columna.

### 3.2.1.7 *Microscopía electrónica de fracción particulada eluida de columna Sepharose 4B.*

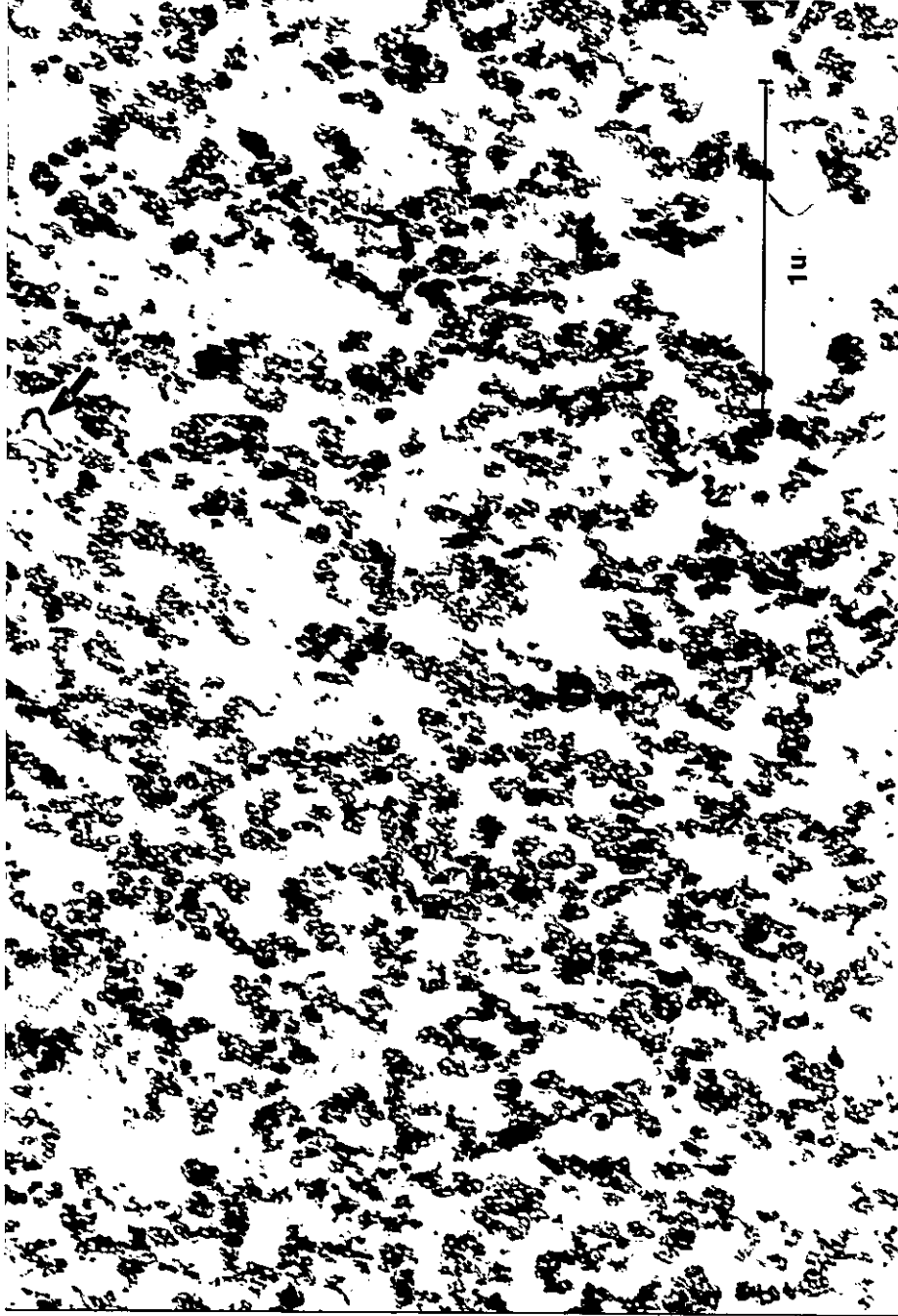
En la microfotografía 1 podemos observar una fotografía obtenida al microscopio electrónico que nos muestra la fracción particulada que eluye de una columna de Sepharose 4B cuando se ha aplicado como muestra el sedimento P5 (fracción vesicular, método de De Lorenzo y Freedman) métodos, sección 2.3.5.1., Fig. 3.

En esta visión amplia podemos observar que aparece una fracción homogénea de VS prácticamente puras. Aparecen agrupadas formando conglomerados de distintos tamaños. Muy escasa contaminación de membrana plasmática resellada se puede observar, lo que se correlaciona muy bien con los datos bioquímicos, que muestran una unión de [ $H^3$ ]-ouabaina muy baja, siendo la de esta preparación de VS la más baja obtenida. (Resultados, sección 3.2.1.6.). No se observan otras estructuras o restos de organelos en esta fracción particulada.

En la amplificación que se presenta en la microfotografía 2 de esta fracción particulada podemos ver que en estos conglomerados de VS aparecen vesículas chicas en forma esférica y ovaladas como las descritas en la literatura en S.N.C. de diferentes mamíferos, (Whittaker y col., 1964; Kadota y Kadota, 1973; Nagy y col., 1976; Uchizono y col., 1979; Navone y col., 1984) presentando dimensiones que se corresponden con las VS presente en el S.N.C. de 500 Å de diámetro las esféricas y las ovaladas de 500 Å en su diámetro mayor y 350 Å en su diámetro menor (Uchizono y colaboradores 1979).

### 3.2.1.8. *Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en Sephadryl S-1000.*

Alícuotas de vesículas sinápticas se aplican junto a [ $C^{14}$ ]-glicina a una columna de Sephadryl S-1000.



Microfotografía 1: Microscopía electrónica de fracción particulada  
eluida de columna de Sepharose 4B.

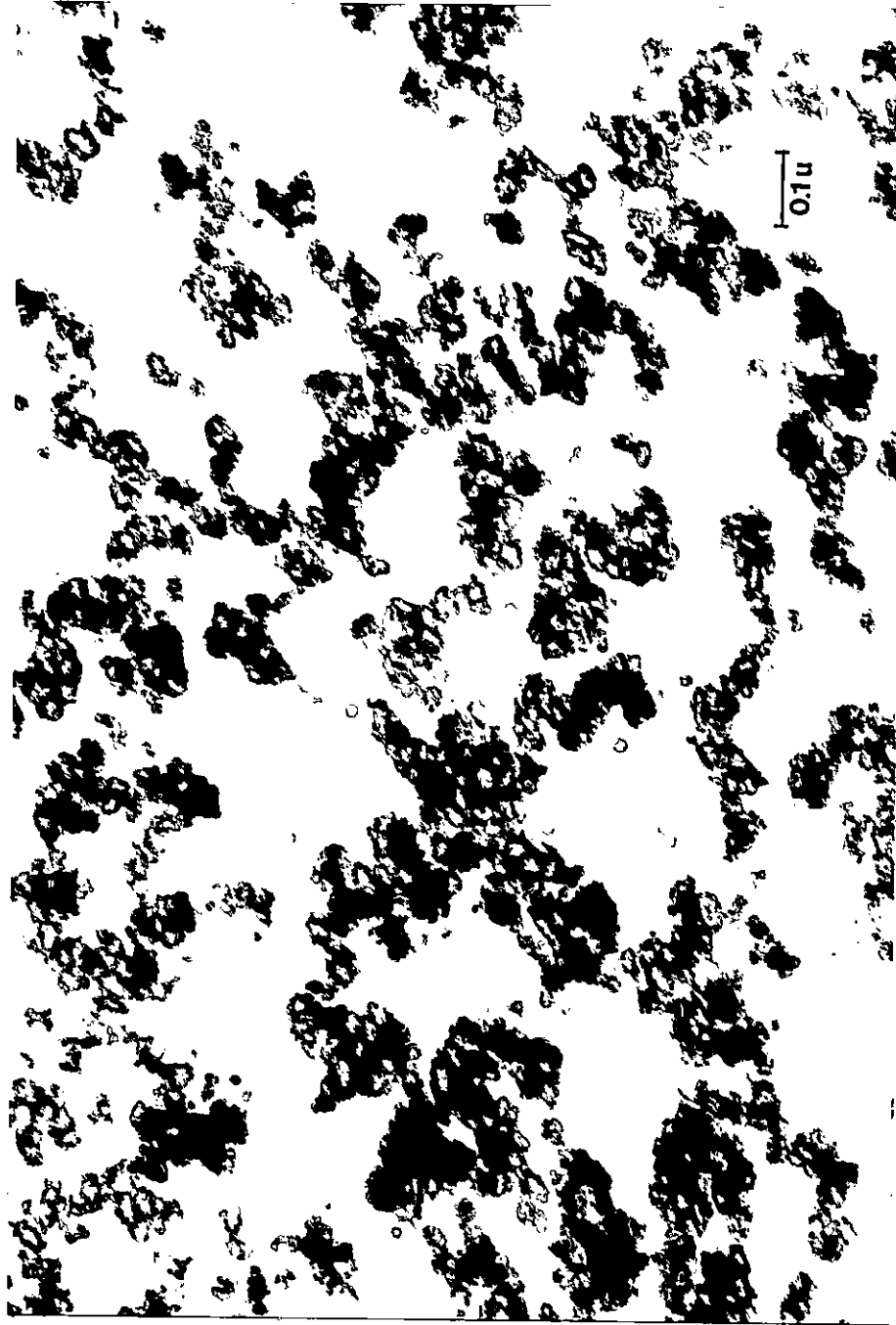


Microfotografía 1.- Microscopía electrónica de fracción particulada eluida de columna Sepharose 4B.

La fracción particulada obtenida de la elución de una columna de Sepharose 4B, a la cual se le aplicó como muestra VS prepradas de acuerdo al método de De Lorenzo y Freedman, se sedimentó a  $95.300 \times g$  durante una hora. Este sedimento se fijó durante tres horas en gluteraldehído al 4% en tampón fosfato, se refijó en tetróxido de osmio al 2% durante una hora, luego se incluyó en Araldita 502, se efectuaron cortes de 600 a 800 Å, luego se montaron en grillas de 200 mallas y se contrastó con sales de uranilo y citrato de plomo.

El material fue observado y fotografiado en un Microscopio Philip EM-300 con un aumento directo de 18.200 y aumento total de 43.680. La barra corresponde a 1 micrón.

La flecha indica la presencia de membranas plasmáticas reselladas como contaminante.



Microfotografía 2: Microscopía electrónica de fracción particulada eluída de columna de Sepharose 4B (mayor amplificación).

Microfotografía 2.- Microscopía electrónica de fracción particulada eluida de columna Sepharose 4B (mayor amplificación).

La preparación que se observó al microscopio electrónico y que se presenta en esta fotografía fue tratada exactamente como se describe en la Microfotografía 1.

La fotografía presentada corresponde a un aumento directo de 30.500 y un aumento total de 98.750.

La barra corresponde a 0,1 micrón.

Sephacryl S-1000 es una resina que fracciona partículas cuyo tamaño varían entre 30-300 nm de diámetro.

En la Fig. 22 se muestra el fraccionamiento obtenido en la columna de Sephadex S-1000, cuyo perfil de elución se sigue midiendo la absorbancia a 280 nm. Prácticamente toda la membrana plasmática eluye primero, mostrando una unión específica de [ $H^3$ ]-ouabaína que coeluye con la mayor absorbancia a 280 nm, separándose del GABA endógeno particulado presente entre las fracciones 73-77 y del soluble presente entre las fracciones 78 a 84. [ $C^{14}$ ]-glicina se utilizó como marcador interno de volúmenes de elución de aminoácidos libres. En experimentos similares se utilizó [ $H^3$ ]-GABA como marcador presentando la misma elución. El área sombreada represente el GABA endógeno no soluble, presente en pequeñas partículas que no presentan unión específica a [ $H^3$ ]-ouabaína (marcador específico de  $(Na^+-K^+)$  ATPasa). Si a toda la área sombreada se le resta el área comprendida bajo la prolongación del pico de GABA endógeno que eluye junto a los aminoácidos libres, se puede estimar en 11,9 nmoles el GABA endógeno presente en la fracción particulada.

Las proteínas medidas de acuerdo a Lowry y colaboradores presentan una distribución similar a la observada según la absorbancia a 280 nm, siendo el contenido de proteínas en las fracciones 73 a 77 de 392 ug y correspondiendo al 20% de la proteína total que eluye de la columna.

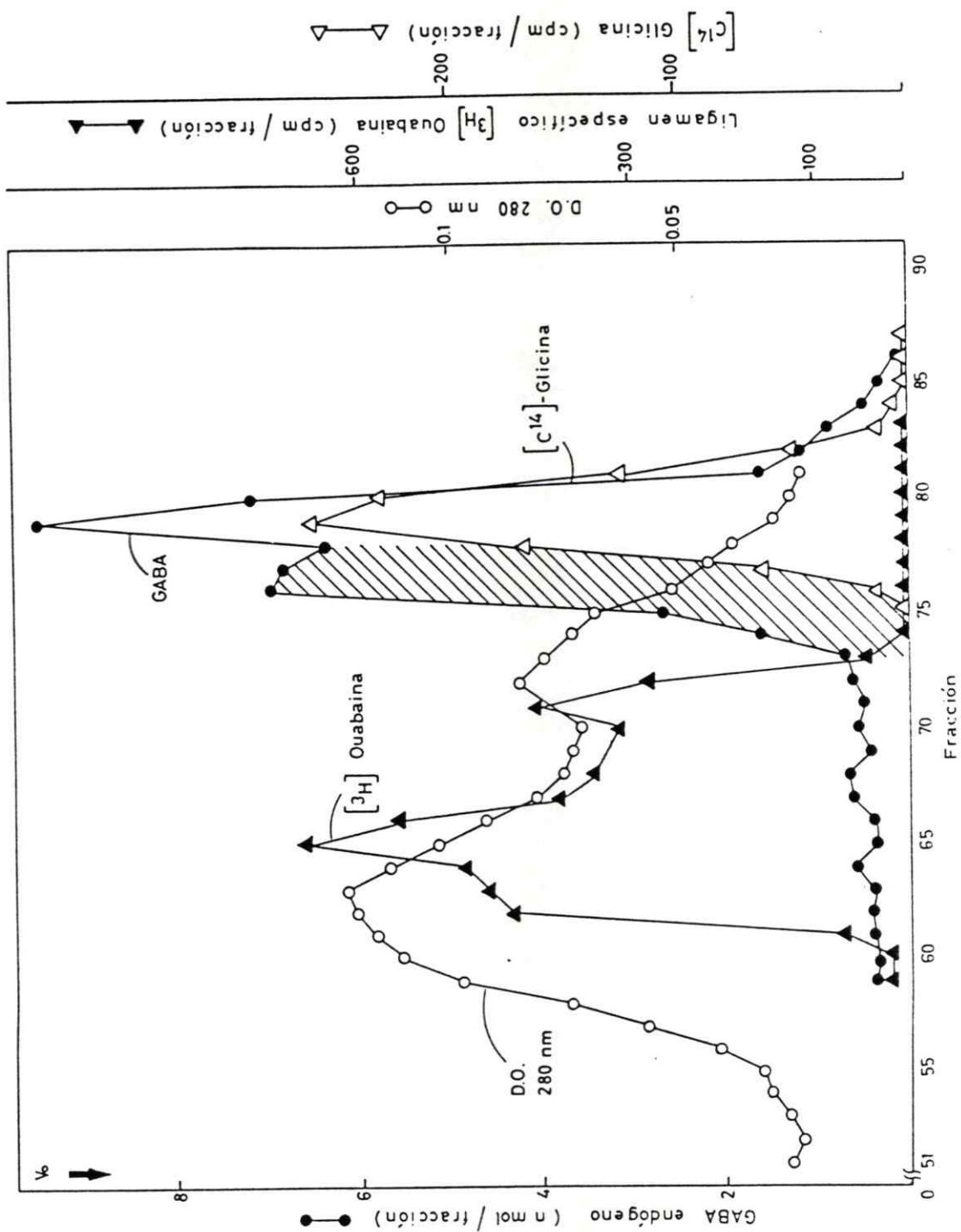


Figura 22. : Cromatografía en Sephadryl S-1000 de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores .

Figura 22.- Cromatografía en Sephacryl S-1000 de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores.

1 ml de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) provenientes de 3,8 g de tejido fresco, se aplican junto a 0,5 pmol de [ $C^{14}$ ]-glicina (marcador de elución de amino ácidos) a una columna de Sephacryl S-1000 de 1,6 x 76 cm equilibrada y eluida a 6° C con tampón Tris-sulfato 0,2 M; pH 7,4. Se recolectan 90 fracciones de 1,3 ml a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. A cada fracción se le determina absorbancia a 280 nm, ligamen específico de [ $H^3$ ]-ouabaína 100 nM, GABA endógeno y radiactividad a [ $C^{14}$ ]-Glicina.

El volumen vacío ( $V_0$ ) se determinó usando esporas de *Bacillus Subtilis* (45 ml) y el volumen total ( $V_T$ ) con agua tritiada (110 ml).

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan e.e.m. menores al 3%.

### 3.2.2. OBTENCION DE FRACCIONES VESICULARES POR SEPARACION EN GRADIENTES ISOOSMOTICAS DE PERCOLL.

En esta parte del trabajo se estudió la distribución de los marcadores vesiculares en gradientes isoosmóticos de Percoll para obtener una separación de acuerdo a su densidad real, ya que en estas condiciones no existe flujo neto de agua a través de las membranas vesiculares.

#### 3.2.2.1. *Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en gradiente de Percoll.*

Al preparar VS de acuerdo al método de Hata y colaboradores, marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA y si se separan en un gradiente isoosmótico de Percoll al 15%, la totalidad del componente de membrana plasmática sedimenta en la zona densa del gradiente donde se encuentra el mayor contenido de proteína y la unión específica a  $[H^3]$ -ouabaína (ligando específico de  $(Na^+ - K^+) ATPase$ ), mientras el GABA endógeno y la  $[H^3]$ -NA (marcador de VS) sedimentan en fracciones de densidad intermedia, muy bien separados del material soluble presente en las fracciones cercanas a la superficie del gradiente, como se muestra en la Fig. 23.

La fracción IV, que corresponde a la fracción donde sedimentan las vesículas que contienen NA presenta una unión a  $[H^3]$ -ouabaína, de  $943 \pm 37$  fmoles de  $[H^3]$ -ouabaína unida/mg de proteína,

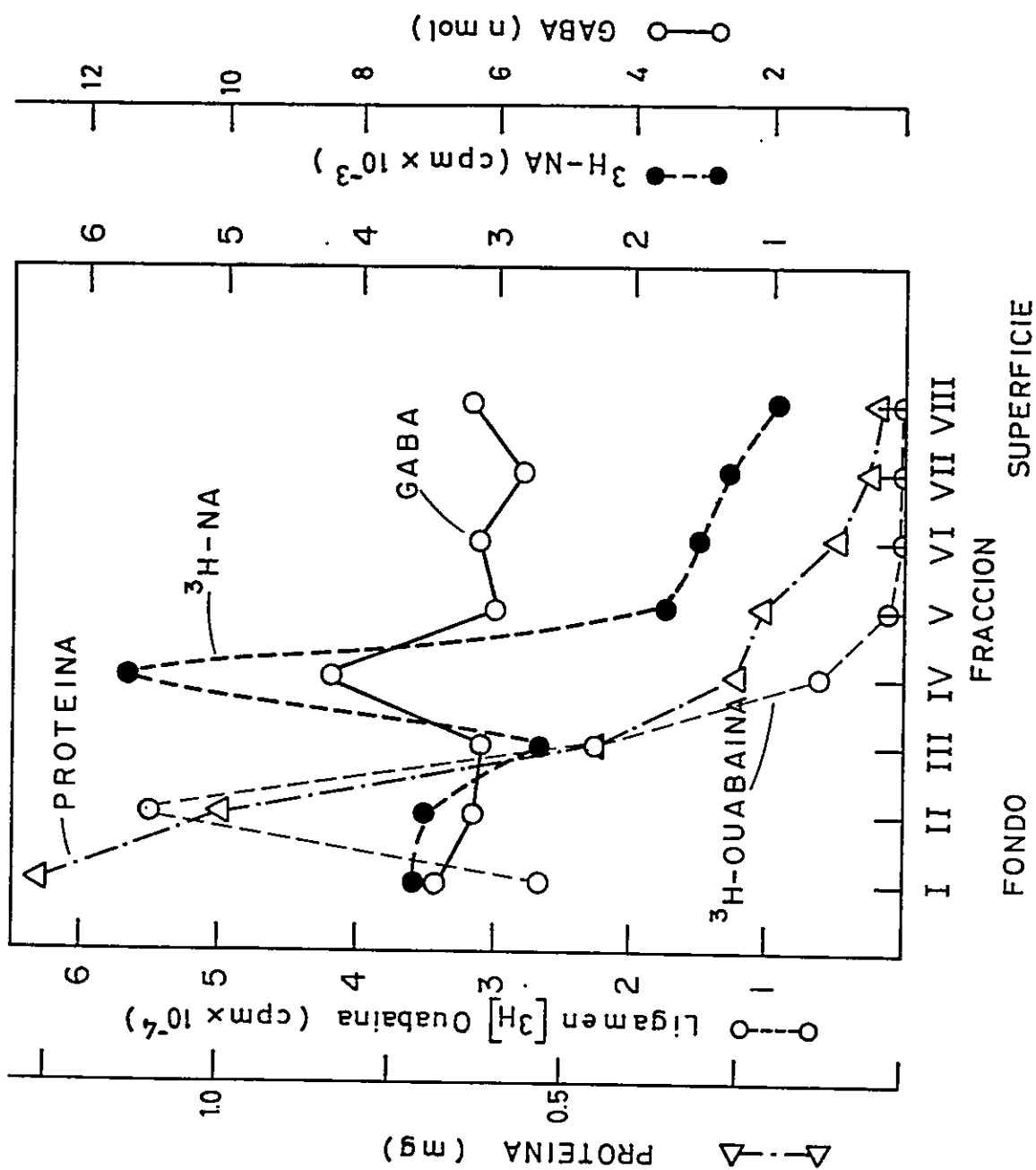


Figura 23 : Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en gradiente de Percoll .



Figura 23.- Fraccionamiento de VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores en gradiente de Percoll.

VS preparadas de acuerdo al método de Hata y colaboradores (1976) (Métodos, sección 2.2.6.1.) marcadas previamente con  $[H^3]$ -NA, provenientes de 0,5 g de tejido fresco se resuspenden en 2 ml de sacarosa 0,25 M; Tris-sulfato 20 mM, pH 7,4 y EDTA 0,1 mM. 1 ml se aplica en cada tubo de 8 ml de Percoll al 15% en sacarosa 0,25 M; Tris-sulfato 20 mM, pH 7,4 y EDTA 0,1 mM.

Se centrifuga a 58.000 x g durante 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman L. Se recolectan fracciones de 1 ml y a cada una de ellas se le determina las proteínas según el método de Bradford (1976), radiactividad a  $[H^3]$ -NA, ligamen específico de  $[H^3]$ -ouabaína 100 nM y GABA endógeno según ensayo de ligamen a  $[H^3]$ -muscimol 3 nM.

Los resultados se presentan como el promedio de valores en triplicado que presentan un e.e.m. menor que el 2%.

indicando la presencia de membrana plasmática como contaminante de esta fracción.

### 3.3. ESTUDIOS FUNCIONALES DE FRACCION VESICULAR EN RELACION AL MECANISMO DE CAPTACION DE $[H^3]$ -GABA.

#### 3.3.1 *Captación de $[H^3]$ -GABA en el tiempo por vesículas sinápticas.*

##### *Efecto de ATP(Tris).*

Vesículas sinápticas preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores, se incuban con  $[H^3]$ -GABA y  $Mg Cl_2$  en presencia o en ausencia de ATP(Tris) a  $37^\circ C$ .

Como se muestra en la Fig. 24, la acumulación de  $[H^3]$ -GABA en ausencia de ATP(Tris) aumenta gradualmente con el tiempo, hasta llegar al equilibrio a los 5 minutos y manteniéndose constante hasta los 8 minutos.

Al agregar ATP(Tris) la acumulación de  $[H^3]$ -GABA en el tiempo no presenta diferencia significativa a la observada en ausencia de ATP(Tris), mostrando que la captación obtenida es independiente de la presencia de ATP(Tris).

#### 3.3.2 *Captación de $[H^3]$ -GABA: Efecto de $Na^+$ y ATP( $Na^+$ ).*

Vesículas preparadas de acuerdo al método descrito por

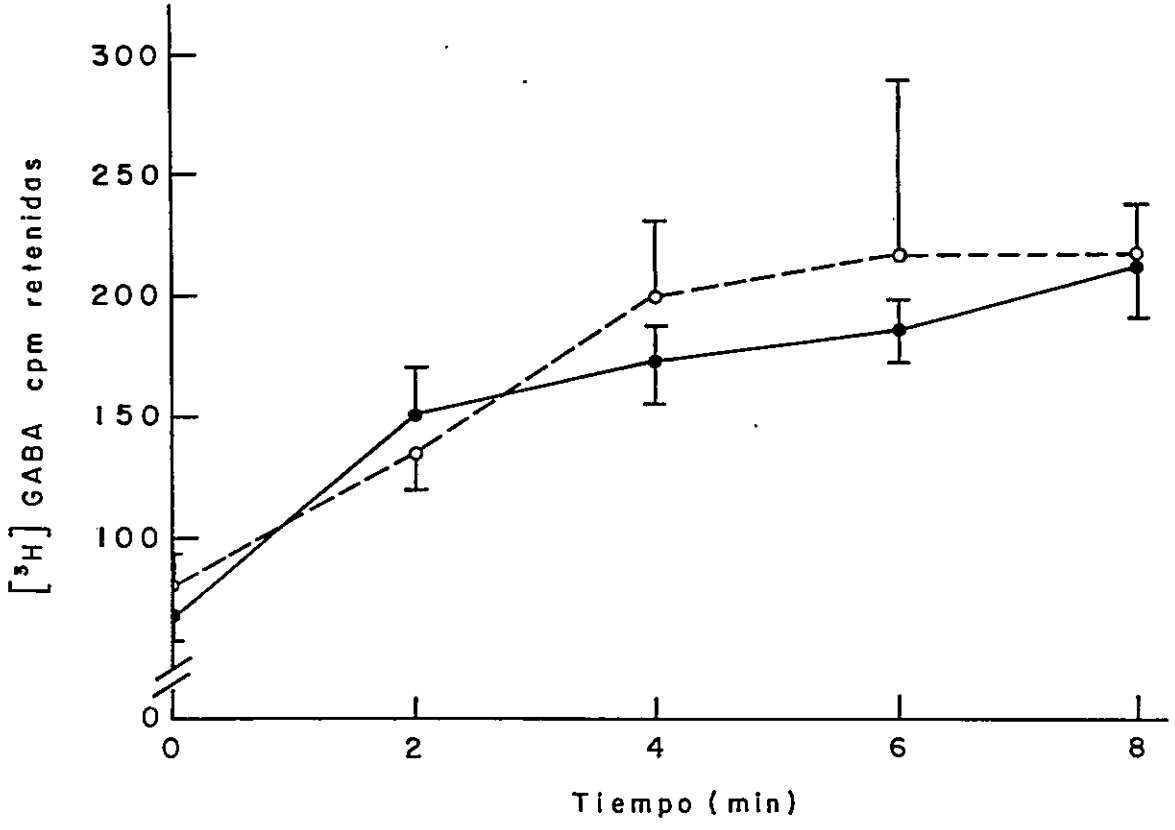


Figura 24 : Captación de [<sup>3</sup>H]-GABA en el tiempo Efecto de ATP(Tris).

Figura 24.- Captación de  $[H^3]$ -GABA en el tiempo.  
Efecto de ATP(Tris).

200  $\mu$ l de VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.), equivalentes a 180 mg de tejido original, se incuban en un volumen final de 1,7 ml con  $10^{-4}$  M de  $[H^3]$ -GABA en presencia de ATP(Tris) (círculos vacíos o) y en ausencia de ATP(Tris) (círculos llenos ●).

Se detiene la reacción con 5 ml de tampón fosfato 130 mM, pH 7 a 0-4 ° C y se filtra y se lava en filtros de nitrato de celulosa que presentan un poro de 0,45  $\mu$ m (Métodos, sección 2.2.7.3.). Los filtros secos se colocan en mezcla de centelleo y se cuenta la radiactividad retenida en el filtro.

Los resultados corresponden al promedio de valores en triplicado  $\pm$  e.e.m.

Seidler y colaboradores, se incuban a 0 minutos y a 5 minutos con [ $H^3$ ]-GABA y  $Mg Cl_2$  en presencia de  $Na^+$  4 mM y  $ATP(Na^+)$ .

En la Fig. 25, se muestra la captación de [ $H^3$ ]-GABA a 0 minuto y 5 minutos observándose que no existe diferencia entre la captación en presencia de  $Na^+$  y la que produce  $ATP(Na^+)$ , indicando que la captación observada no depende de la presencia de  $ATP$ , sino de la presencia de  $Na^+$ .

### 3.3.3. *Efecto de la concentración del ion $Cl^-$ en la captación de [ $H^3$ ]-GABA.*

Vesículas sinápticas preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores. Se incubaron a 0 minutos y a 5 minutos con [ $H^3$ ]-GABA y  $Mg SO_4$  en presencia o ausencia de  $ATP(Na^+)$ , a diferentes concentraciones de  $K Cl$ . Se mantiene la concentración de potasio constante en 130 mM. En la Fig. 26 podemos observar que la captación de [ $H^3$ ]-GABA a los 5 minutos aumenta a medida que aumenta la concentración del ion  $Cl^-$  en ausencia de  $ATP(Na^+)$  alcanzando el equilibrio a la concentración de 30 mM y manteniéndose así hasta concentraciones de 120 mM ion  $Cl^-$ .

Al agregar  $ATP(Na^+)$  el aumento de la captación es aún mayor, sin embargo, este aumento también llega a su equilibrio a los 30 mM de ion  $Cl^-$  manteniéndose así hasta los 120 mM, en forma similar a como ocurre en ausencia de  $ATP(Na^+)$ .

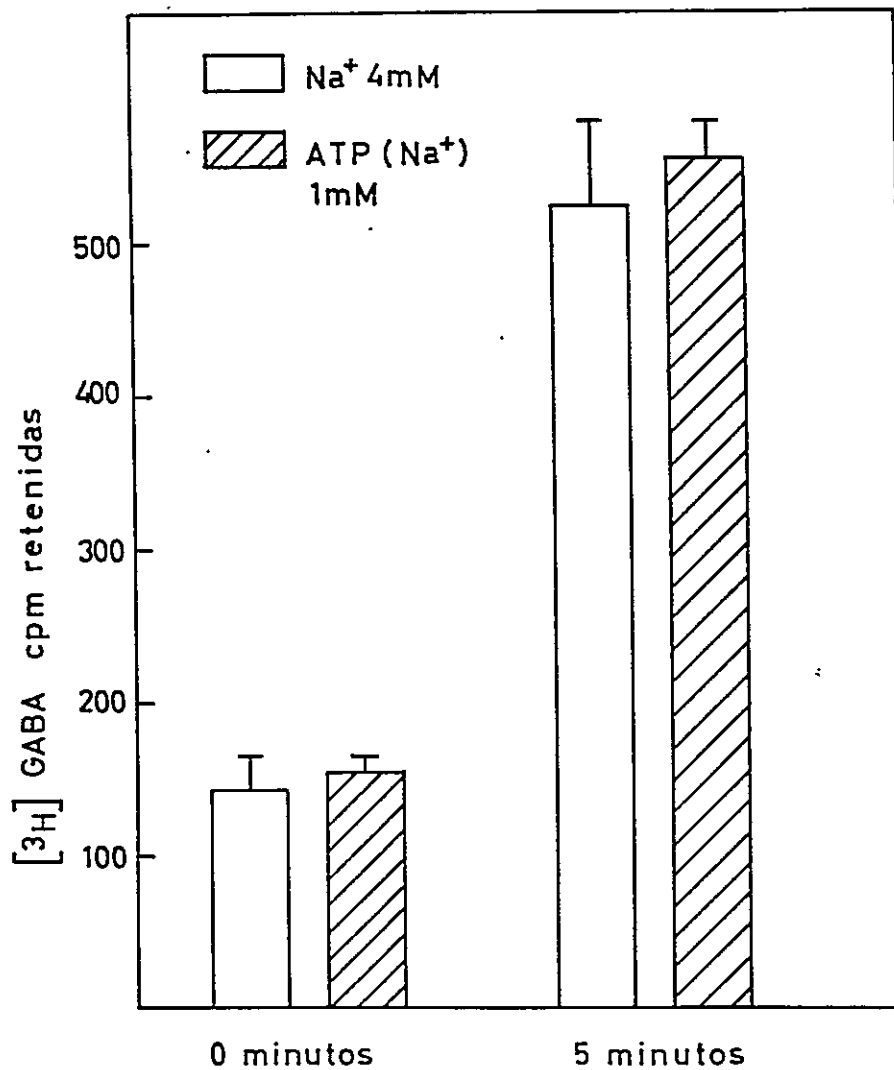


Figura .25 : Captación de  $[^3\text{H}]$ -GABA: Efecto de  $\text{Na}^+$  y ATP( $\text{Na}^+$ ).

Figura 25.- Captación de [ $H^3$ ]-GABA:  
Efecto de  $Na^+$  y ATP( $Na^+$ ).

VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.) equivalentes a 180 mg de tejido original se incuban a 0 minuto y a 5 minutos en un volumen final de 1,7 ml con  $10^{-4}$  M de [ $H^3$ ]-GABA y  $Mg Cl_2$  1 mM en presencia de  $Na Cl$  4 mM (columnas vacías) y en presencia de ATP( $Na^+$ ) 1 mM (columnas achuradas).

La reacción se detiene con 5 ml de tampón fosfato 130 mM, pH 7 a  $0^{\circ}$ - $4^{\circ}$  C y se filtra en filtros de nitrato de celulosa que presentan un poro de  $0,45 \mu m$  (Métodos, sección 2.2.7.3.). Los filtros secos se colocan en mezcla de centelleo y se cuenta la radiactividad retenida en el filtro.

Los resultados corresponden al promedio de valores en triplicado  $\pm$  e.e.m.

Los puntos obtenidos a tiempo cero se realizaron en presencia de  $\text{ATP}(\text{Na}^+)$ .

3.3.4. *Captación de  $[\text{H}^3]$ -GABA en el tiempo en presencia de K Cl 120 mM.*

*Efecto de  $\text{ATP}(\text{K}^+)$ .*

Vesículas preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores, se incuban con  $[\text{H}^3]$ -GABA, K Cl y  $\text{Mg SO}_4$  en presencia o ausencia de  $\text{ATP}(\text{K}^+)$ . Como se muestra en la Fig. 27 en ausencia de  $\text{ATP}(\text{K}^+)$  la captación de  $[\text{H}^3]$ -GABA aumenta en el tiempo hasta llegar al equilibrio a los 5 minutos. Al agregar  $\text{ATP}(\text{K}^+)$  se observa un aumento idéntico, sin variación significativa al experimento sin  $\text{ATP}(\text{K}^+)$ . Ambos aumentos de captación tienen un comportamiento similar al observado en presencia o ausencia de  $\text{ATP}(\text{Tris})$  mostrado en la Fig. 21.

3.3.5. *Captación de  $[\text{H}^3]$ -GABA a 0 min y a 7 min en presencia de  $\text{ATP}(\text{K}^+)$ ,  $\text{ATP}(\text{Na}^+)$ ,  $\text{ATP}(\text{Tris})$  y  $\text{Na}^+$ .*

VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores se incuban a tiempo cero y a 7 minutos con  $[\text{H}^3]$ -GABA,  $\text{Mg Cl}_2$  y KCl en presencia de  $\text{ATP}(\text{K}^+)$ ;  $\text{ATP}(\text{Na}^+)$ ;  $\text{ATP}(\text{Tris})$  y  $\text{Na}^+$ , cada uno de estos últimos por separado.

En la Fig. 28, podemos observar que a los 7 minutos la captación de  $[\text{H}^3]$ -GABA aumenta en todos los casos, siendo el aumento



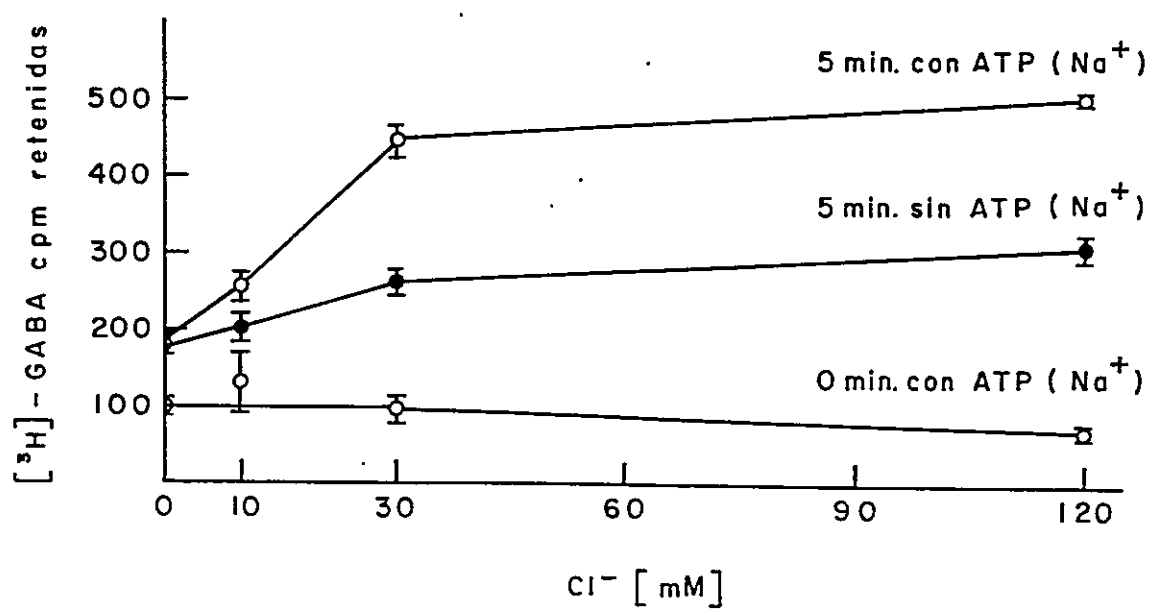


Figura 26 : Efecto de la concentración del ión  $\text{Cl}^-$  en la captación de  $[\text{H}^3]$ -GABA.

Figura 26.- Efecto de la concentración del ión  $\text{Cl}^-$  en la captación de  $[\text{H}^3]\text{-GABA}$ .

VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.) equivalentes a 180 mg de tejido original se incuban a tiempo cero minutos y a 5 minutos en un volumen final de 1,7 ml con  $3,3 \times 10^{-5}$  M de  $[\text{H}^3]\text{-GABA}$  y 1 mM  $\text{Mg SO}_4$  en presencia de 1 mM  $\text{ATP}(\text{Na}^+)$  (círculos llenos ●) y en ausencia de  $\text{ATP Na}^+$  (círculos vacíos ○) a diferentes concentraciones del ión  $\text{Cl}^-$ .

La reacción se detiene con 5 ml de tampón fosfato 130 mM, pH 7 a  $0^\circ - 4^\circ \text{C}$  y se filtra en filtros de nitrato de celulosa que presentan un poro de  $0,45 \mu\text{m}$  (Métodos, sección 2.2.7.3.). Los filtros secos se colocan en mezcla de centelleo y se cuenta la radiactividad retenida en el filtro.

Los resultados corresponden al promedio de valores en triplicado  $\pm$  e.e.m.

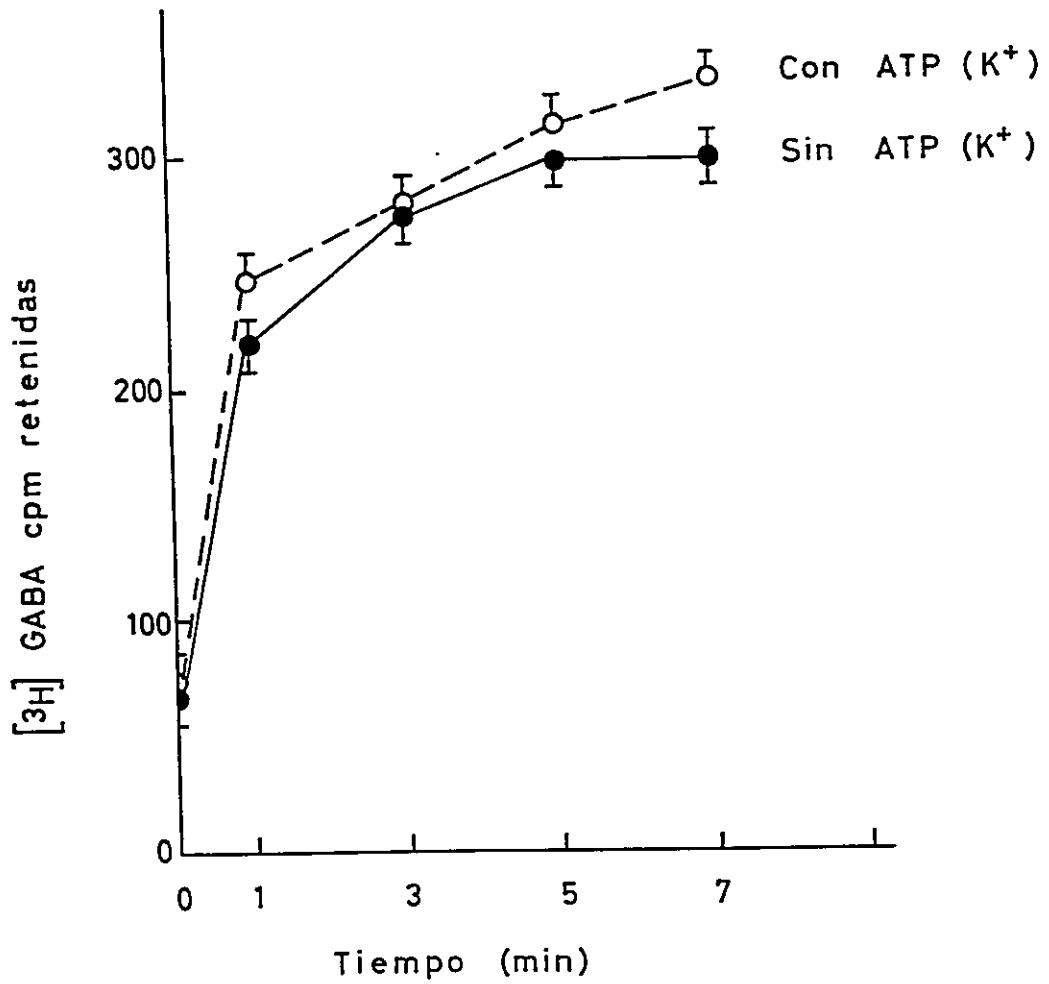


Figura 27 : Captación de [<sup>3</sup>H]-GABA en el tiempo, en presencia de KCl 120 mM: Efecto de ATP(K<sup>+</sup>).

Figura 27.- Captación de  $[H^3]$ -GABA en el tiempo, en presencia de KCl 120 mM:  
Efecto de ATP(K<sup>+</sup>).

VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1) equivalentes a 180 mg de tejido original, se incuban en un volumen final de 1,7 ml con  $3,3 \times 10^{-5}$  M  $[H^3]$ -GABA, K Cl 120 mM y 1 mM Mg SO<sub>4</sub> en presencia de ATP(K<sup>+</sup>) 1 mM (círculos vacíos o) y en ausencia de ATP(K<sup>+</sup>) (círculos llenos ●)

La reacción se detiene con 5 ml de tampón fosfato 130 mM, pH 7 a 0° - 4° C y se filtra en filtros de nitrato de celulosa que presentan un poro de 0,45 µm (Métodos, sección 2.2.7.3.). Los filtros secos se colocan en mezcla de centelleo y se cuenta la radiactividad retenida en el filtro.

Los resultados corresponden al promedio de valores en triplicados ± e.e.m.

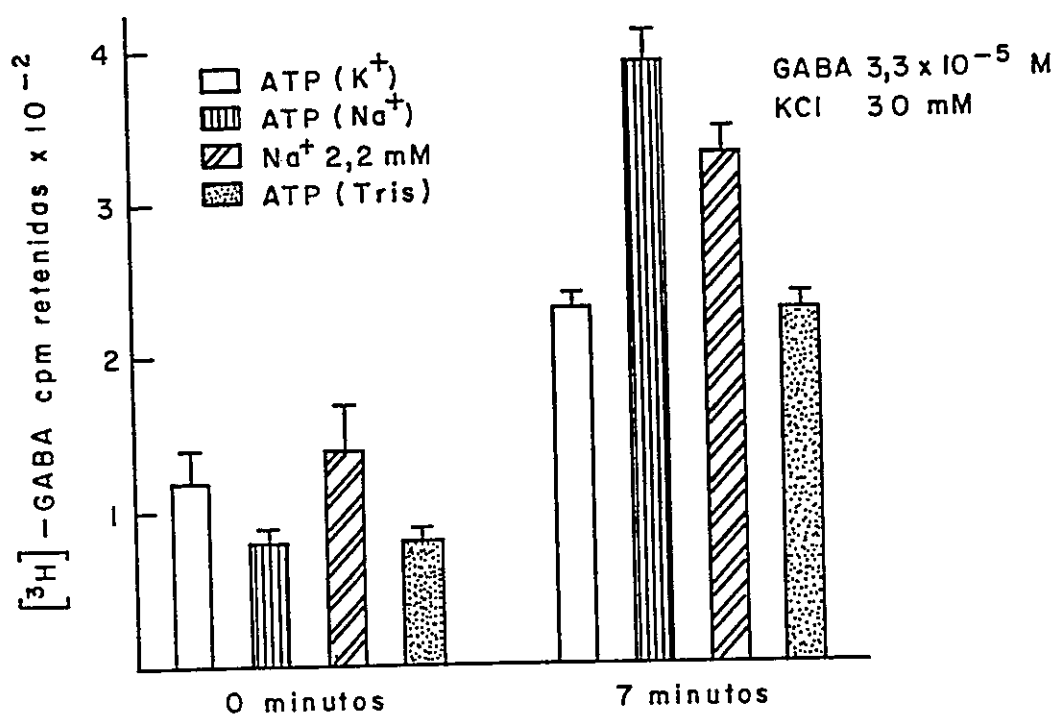


Figura 28 : Captación de  $[H^3]$ -GABA a 0 min y 7 min en presencia de ATP( $K^+$ ), ATP( $Na^+$ ), ATP(Tris) y  $Na^+$ .

Figura 2B.- Captación de [ $H^3$ ]-GABA a 0 min y 7 min en presencia de ATP( $K^+$ ), ATP( $Na^+$ ), ATP(Tris) y  $Na^+$ .

VS preparadas de acuerdo al método descrito por Seidler y colaboradores (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.) equivalentes a 180 mg de tejido original se incuban a tiempo 0 min y a 7 min. en un volumen final de 1,7 ml con  $3,3 \times 10^{-5}$  M [ $H^3$ ]-GABA, 30 mM KCl y 1 mM Mg  $Cl_2$  en presencia de 1 mM ATP( $K^+$ ) (columna vacía □); 1 mM ATP( $Na^+$ ) (columna ■); 2,2 mM  $Na^+$  (columna ▨); y 1 mM ATP(Tris) (columna ▩).

La reacción se detiene con 5 ml de tampón fosfato 130 mM, pH 7 a  $0^\circ - 4^\circ$  C y se filtra en filtros de nitrato de celulosa que presentan un poro de  $0,45 \mu m$  (Métodos, sección 2.2.7.3.). Los filtros secos se colocan en mezcla de centelleo y se cuenta la radiactividad retenida en el filtro.

Los resultados corresponden al promedio de (valores en triplicado)  $\pm$  e.e.m. de tres experimentos realizados por separados.

mayor en las fracciones de vesículas incubadas con ATP(Na<sup>+</sup>) y aquellas incubadas con Na<sup>+</sup>, este aumento corresponde a valores mayores del 230% en ambos casos con respecto a los tiempos ceros.

#### 4.

### DISCUSION

#### 4.1. INVESTIGACION DE PRESENCIA DE MODULADORES ENDOGENOS PARA EL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>.

Desde que se identificó el sitio de unión para GABA presente en el receptor GABA<sub>A</sub>, en preparaciones de membranas obtenidas del SNC de mamíferos, diferentes publicaciones se han referido a presuntos inhibidores endógenos para esta unión (Toffano y col., 1978; Guidotti y col., 1978; Costa, 1980; Yoneda y Kuriyama, 1980; Massotti y col., 1981; Guidotti y col., 1982; Wise y col., 1983). Sin embargo, existe gran controversia acerca de la existencia e identidad de tales inhibidores y del posible función artefactual que jugaría el GABA endógeno residual, presente en las preparaciones de membranas utilizadas en el radioanálisis, en la interpretación de los resultados obtenidos para este ensayo de unión (Greenlee y col., 1978; Napias y col., 1980; Gardner y col., 1981).

La presencia del neurotransmisor endógeno en las preparaciones de membranas utilizadas para el ensayo de unión, frecuentemente ha sido una fuente de problemas en los estudios de unión para GABA (Zukin y col., 1974; Enna y Snyder, 1975; Greenlee y col., 1978). Aunque este problema se puede encontrar en todos los estudios de unión de cualquier otro neurotransmisor, en los estudios relacionados con GABA adquiere singular importancia, ya que su concentración en cerebro total es 2-4  $\mu\text{mol/g}$  de tejido (Enna y Snyder, 1976), superando hasta en 3 órdenes de magnitud la de otros neurotransmisores conocidos, como lo son las catecolaminas,



cuya concentración es de 2-5 n mol/g de tejido (Holzbauer y Sherman, 1972), serotonina :1-2 n mol/g de tejido (Bogdanski y col., 1957), ACh: 15-27 n mol/g de tejido (Stavinoha y Weintraub, 1974) y péptidos neuroactivos en cantidades menores aún (Hökfelt y col., 1980).

Los resultados presentados en la sección 3.1., fueron realizados con el objetivo de detectar una substancia endógena distinta de GABA que pudiera interactuar con el receptor  $GABA_A$  e intentar clarificar su posible rol fisiológico.

Para cumplir con este propósito se buscó exhaustivamente la presencia de dicho ligando endógeno, realizando un gran número de experimentos, incluyendo fraccionamientos subcelulares (preparaciones de membranas de corteza cerebral y cerebro total, distintas preparaciones de vesículas sinápticas), en diferentes áreas del SNC (corteza cerebral, cuerpo estriado, hipotálamo, cerebelo y médula espinal), utilizando diferentes métodos de extracción de estas fracciones subcelulares, y sometiendo dichos extractos a procesos de separación basados en distintos principios como son la separación por filtración en gel Sephadex G-10, cromatografía en papel y electroforesis a alto voltaje.

#### 4.1.1. EN PREPARACIONES DE MEMBRANAS SINAPTICAS.

Como la controversia aflora fundamentalmente por ligandos endógenos extraídos de preparaciones de membranas sinápticas, se buscó en este tipo de preparaciones al ligando endógeno.

Toffano y col. (1978) habían descrito la presencia de un péptido al cual denominaron GABAmodulina cuyas características principales eran: termoestable, sensible a tripsina, no dializable, peso molecular aproximado de 16.000 dalton y que se obtenía incubando las membranas sinaptosomales a 37° C durante 30 minutos. Interesados en estos resultados, se repitieron estos experimentos tal cual los autores los habían descrito y comparamos la detección del ligando endógeno con el ensayo de ligamen utilizado en esta Tesis.

Se fraccionó en Sephadex G-10 el extracto donde debía, según los autores, encontrarse la GABAmodulina y se midió el ligamen de cada una de las fracciones eluidas utilizando las membranas de ligamen preparadas de acuerdo a los autores y las utilizadas en este estudio.

Para sorpresa nuestra, todo el material activo que fue capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA del sitio de unión, utilizando ambas preparaciones de membranas, coincidió exactamente con el marcador de  $[H^3]$ -GABA aplicado con la muestra a la columna. Es importante destacar que en este fraccionamiento aparecen varios péptidos, probablemente generados durante los 30 minutos de incubación de las membranas, que son totalmente inactivos como ligandos para el receptor  $GABA_A$ . Siendo el límite de exclusión del Sephadex G-10 para partículas esféricas cuyo tamaño corresponde a pesos moleculares sobre 700 dalton, no apareció péptido alguno en las fracciones que corresponden al volumen vacío ( $V_0$ ).

Una posible explicación para esta discrepancia de resultados

podiera ser la que sugiere Napias y col. (1980). Durante el proceso de incubación de las membranas a 37° C se estaría estimulando un proceso proteolítico que generaría fragmentos de naturaleza peptídica, que interaccionarían con el receptor GABA<sub>A</sub> inhibiendo de esa manera el ligamen de [H<sup>3</sup>]-GABA.

La comunicación de Massotti y col. (1981) donde describe una GABAmulina que es termosensible, si se compara a la termoestable descrita anteriormente por Toffano y col. (1978), es compatible con la sugerencia de un efecto producto de acción proteolítica, ya que diferentes sustancias que inhiben la unión de [H<sup>3</sup>]-GABA a su receptor son generados por pequeñas diferencias en el procedimiento experimental.

Napias y col. (1980) no encuentran evidencias para la existencia de GABAmulina de peso molecular de 15.000 dalton como la propuesta por Guidotti y col. (1978); Toffano y col. (1978); Massotti y col. (1981).

E. Costa (1980), reconoce degradación proteolítica espontánea de GABAmulina, para dar compuestos de bajo peso molecular que inhiben la unión de [H<sup>3</sup>]-GABA. Guidotti y col. (1982), describen una GABAmulina sensible a digestión enzimática.

También se analizó el extracto obtenido a partir de membranas sinápticas tratadas con Triton X-100 al 0,01 %, exactamente como lo describieron Yoneda y Kuriyama (1980). El sobrenadante donde, según los autores, se encontraba el GRIF (Factor inhibidor del receptor de GABA) se

aplicó a una columna Sephadex G-10 y se midió la unión en cada fracción, en presencia de  $[H^3]$ -muscimol. Nuevamente todo el material endógeno capaz de desplazar  $[H^3]$ -muscimol del receptor  $GABA_A$  presente en las membranas preparadas en esta Tesis, coincidió exactamente con el marcador de  $[H^3]$ -GABA aplicado a la columna.

Napias y col. 1980 presentan evidencias que el GABA endógeno es difícil de remover de las preparaciones crudas de membranas sinápticas obtenidas de corteza cerebral de rata y que el GABA endógeno presente en la preparación, explica casi en su totalidad al material endógeno que inhiben la unión de  $[H^3]$ -GABA, ya que este inhibidor endógeno es sensible en un 85% a ser destruido por enzimas que degradan GABA.

Gardner y col. (1981) determinando la concentración de GABA y la unión de  $[H^3]$ -GABA en función del número de lavados que se realizan con una preparación de membrana, demuestran también que GABA endógeno es muy resistente a ser eliminado y que valores suficientemente bajos de GABA endógeno sólo se logran en preparaciones de membranas exhaustivamente lavadas, después de varios ciclos de congelamiento y descongelamiento (5 lavados). Resultados equivalentes se obtuvieron en tratamientos con Triton X-100 a concentración final de 0,5%, sin disminuir el número de lavados. Sus resultados dan evidencias directas que apoyan los postulados de Napias y col. (1980), donde se afirma que el GABA endógeno residual debe ser considerado, antes de generar conclusiones acerca de la presencia de algún presunto inhibidor endógeno de la unión de GABA. Ambos grupos de autores consideran imperativo tener una preparación de membranas libre de GABA endógeno antes de obtener

conclusiones en relación a: número de tipos de sitios de unión (alta y baja afinidad), determinaciones de  $K_d$  y  $B_{max}$ , presencia de inhibidores endógenos de la unión y determinación de la potencia de agonistas y antagonistas competitivos.

Nuestra experiencia reveló que técnicamente el ensayo de unión de GABA es un proceso más complejo que el que generalmente se considera y que se debe tener cuidado extremo en la preparación de membranas a utilizar para el ensayo y de esa manera evitar posibles artefactos.

Gardner y col. (1981) demuestran que membranas sometidas a ciclos de congelamiento-descongelamiento y lavados durante 5 veces, al volver a incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos, presentan en el sobrenadante y en el sedimento mayor cantidad de GABA que el que tenía la preparación antes de incubar, indicando que existe una fuente de GABA endógeno, que se activa durante procesos de incubación, esto ocurre tanto en membranas tratadas como en las no tratadas con Triton. Sobre la exacta naturaleza de este proceso no se tiene una explicación clara.

Yoneda y Kuriyama (1980) incuban a  $25^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y luego centrifugan durante 20 minutos y este sobrenadante es el que usan directamente en el ensayo. Las características principales que describen para el GRIF presente en ese sobrenadante son: dializable, peso molecular menor que 500 dalton, termoestable, resistente a proteasas, origen neuronal, no es extraído con éter.

Estudios posteriores en relación a GABAmulina sólo han

continuado publicándose por los mismos autores que inicialmente lo postularon (grupo de E. Costa). Ahora la diferencia experimental para obtener la supuesta GABAmodulina incluye una homogeneización inicial de todo el tejido cerebral en presencia de ácido acético 1 M a 80° C (Guidotti y col., 1982; Wise y col., 1983).

Esta preparación de GABAmodulina purificada, es la que han continuado utilizando para poder asignarle alguna función reguladora sobre el receptor de GABA. Esta GABAmodulina produce una inhibición que es no competitiva y se necesitan concentraciones de GABA modulina que varían entre 0,5  $\mu$ M para obtener una inhibición de sólo un 50% del ligamen de [ $H^3$ ]- GABA 20 nM (Guidotti y col., 1982).

Guidotti y col. (1983) también han comunicado la purificación y caracterización de un polipéptido al cual denominan Inhibidor del ligamen de Diazepam (DBI), el cual es extraído de igual forma como la GABAmodulina (homogeneización en presencia de ácido acético 1 M a 80° C), que presenta su grupo amino terminal bloqueado en forma similar a como lo está la GABAmodulina (Guidotti y col., 1982) y que presenta un peso molecular de 11.000 dalton.

El receptor  $GABA_A$ , es considerado un complejo macromolecular que está formado por 3 unidades funcionales esenciales, el receptor de GABA, el receptor de Benzodiazepinas (Diazepam) y el Ionóforo para el ión cloruro (Simmonds, 1983; Schoch y col., 1984; Kardos y col., 1985). Se ha descrito el efecto de benzodiazepina sobre el ligamen de GABA y su función fisiológica (Martin, 1984; Gallagher y col., 1984).

Por cierto, una interacción de la unión de GABA, como la realizada por las GABAmodulinas postuladas, bien podrían ser explicadas por la acción de algún modulador endógeno para el receptor de benzodiazepinas que forma parte de este complejo macromolecular.

Es probable que la mayoría de las discrepancias que existen en la literatura estén dadas no sólo por la forma como se obtiene el supuesto modulador endógeno, sino también por la preparación de membrana que se usa como detector en el ensayo de unión, y de las características fisiológicas y farmacológicas que ésta presenta.

#### 4.1.2. EN PREPARACIONES DE VESICULAS SINAPTICAS.

Yoneda y Kuriyama (1980), en la discusión de su trabajo donde postula la existencia del GRIF, proponen que aunque el GRIF es de origen neuronal su exacta localización no esté determinada, si el GRIF se localizara en terminales nerviosos presinápticos, es probable que se libere junto con el GABA durante la excitación neuronal y de esta forma modularía la transmisión GABAérgica.

Una de las hipótesis de trabajo planteada en esta Tesis postula la presencia del neurotransmisor inhibitor central dentro de las vesículas sinápticas, en forma similar a como se encuentran los neurotransmisores clásicos y como se ha propuesto en la hipótesis vesicular (ver Introducción).

De esta forma fue importante investigar en preparaciones de

vesículas sinápticas, la presencia de un modulador endógeno para el receptor GABA<sub>A</sub> en dichas estructuras.

En todos los experimentos realizados, utilizando extractos de preparaciones de vesículas sinápticas descritas en la literatura (Hata y col., 1976; Seidler y col., 1977; De Lorenzo y Freedman, 1978), preparadas a partir de diferentes áreas del SNC, el resultado obtenido sólo demostró la presencia de GABA como la única substancia endógena capaz de interactuar con el receptor GABA<sub>A</sub>, compitiendo por la unión de [<sup>3</sup>H]-GABA o [<sup>3</sup>H]-muscimol.

#### 4.1.3. EFECTO DE PEPTIDOS NEUROACTIVOS EN LA UNIÓN DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>.

Interesados por conocer la especificidad del receptor que une GABA presente en la preparación de membranas utilizadas en forma rutinaria en el ensayo de unión, se incubaron estas membranas en presencia de distintos péptidos biológicamente activos y también con el polianión poli-L-glutamato y el polication poli-L-lisina. Ninguno de estos péptidos afectó significativamente la unión específica de [<sup>3</sup>H]-GABA, demostrando así la notable especificidad de este receptor. Es importante destacar la ausencia de efecto de los péptidos colecistoquinina-octapéptido (CCK-8) y somatostatina en la unión de [<sup>3</sup>H]-GABA, la cual prácticamente se mantuvo intacta, con valores de 93,3 ± 4,4 y 89,6 ± 3,5 % del control respectivamente, ya que una publicación reciente de Somogyi y col. (1984), describen en corteza visual e



hipocampo de gato la presencia de neuronas GABAérgicas que contienen además de GABA, somatostatina o colecistoquinina y sugieren que estos péptidos neuroactivos afectan la neurotransmisión GABAérgica.

Recientemente han sido descritas interacciones entre dos neurotransmisores a nivel postsináptico. CCK sobre el receptor de dopamina (Fuxe y col., 1981) y substancia P sobre la unión de serotonina (Agnati y col., 1983).

Estos mismos autores consideran de gran interés probar el efecto de somatostatina, CCK y péptidos relacionados, en su posible acción de agonistas o antagonistas sobre los diferentes sitios de unión asociados al complejo receptor GABA<sub>A</sub>.

Los resultados presentados aquí demuestran claramente que ninguno de los péptidos probados, incluidos somatostatina y CCK-8, producen efecto significativo en la unión de [<sup>3</sup>H]-GABA, sugiriendo que, si estos péptidos juegan un rol regulatorio en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica, ésta no se realiza por interacción a nivel del sitio de unión para GABA, presente en el receptor GABA<sub>A</sub> ubicado en la neurona postsináptica.

De estos resultados, y de los obtenidos al analizar el medio de incubación proveniente de rebanadas de corteza cerebral estimuladas eléctricamente, en los cuales también se obtuvo un solo componente

endógeno capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA, y que coeluye con [ $H^3$ ]-GABA aplicado como marcador interno en la filtración en gel Sephadex G-10 (Logos y col., 1983), podemos concluir que:

1. usando diferentes técnicas de separación y fraccionamiento, como son filtración en gel Sephadex G-10, cromatografía en papel y electroforesis a alto voltaje, para investigar un presunto inhibidor endógeno para el receptor  $GABA_A$ , en distintas estructuras celulares como son membranas sinápticas y vesículas sinápticas. Sólo se ha encontrado una fracción endógena activa capaz de desplazar [ $H^3$ ]-GABA o [ $H^3$ ]-muscimol y esta coincide con los 0,1 - 0,5 pmol de [ $H^3$ ]-GABA aplicado junto a la muestra como marcador interno.

2. el hecho que no se encuentre efecto significativo sobre la unión para [ $H^3$ ]-GABA de varios péptidos biológicamente activos, incluido polianiones como poli-L-glutamato y policationes como poli-L-lisina, dejan en evidencia, además de la alta especificidad de este receptor. Si estos péptidos juegan algún rol regulatorio en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica, éste no se realiza a través de interacción directa con el sitio de unión para GABA. Importante es destacar la alta sensibilidad del ensayo de unión utilizado en esta Tesis, que permite detectar hasta 5 p moles/ml de GABA.

3. el encontrar como único ligando endógeno a GABA en extractos de vesículas sinápticas, obtenidas con la utilización de 3 metodías descritas en la literatura y considerando a la vesícula sináptica como la estructura neuronal donde se acumulan los neurotransmisores, sugiere que, ninguna

otra substancia además de GABA participe en la transmisión o modulación inhibitoria interactuando con el sitio de ligamen de GABA. Por supuesto, esto no significa que otras substancias tales como taurina, glicina o  $\beta$ -alanina (Davison y Kaczmarek, 1971; Okamoto y col., 1983a, 1983b; Oja y Lähdesmäki, 1974; Aprison y Nadi, 1977; De Feudis y Martin del Río, 1977), puedan generar inhibición a diferentes niveles del SNC, actuando sobre receptores diferentes.

#### 4.2. PRESENCIA DE GABA ENDOGENO EN VESICULAS SINAPTICAS.

Cuando se intenta fraccionar un tejido tan complejo como el cerebro, uno se encuentra con ciertos obstáculos que producen una limitación práctica en el intento. Por ejemplo, cualquier fracción subcelular preparada a partir de cerebro es intrínsecamente heterogénea, ya que esta se deriva a partir de distintos tipos de células (neuronas y glia). Aunque fuera posible la separación entre estos dos tipos de células de características morfológicas y funcionales tan distintas, la fracción obtenida todavía será heterogénea debido al hecho que existen subdivisiones en estas dos grandes poblaciones celulares y por lo tanto la fracción obtenida corresponde a una mezcla de elementos provenientes de esta población heterogénea. A modo de ejemplo podemos indicar que, al purificar vesículas sinápticas a partir de terminales nerviosos de una determinada área del SNC, se purificarán vesículas sinápticas provenientes de todos los terminales nerviosos que allí existan, independientemente del tipo de inervación en el cual participen (Whittaker y col., 1964; Whittaker, 1965; Nagy y col., 1976; 1977; Morgan, 1980).

Cabe destacar que en una misma célula neuronal existen regiones claramente definidas, como son el árbol dendrítico, el soma, el axón y la región sináptica presente en el terminal nervioso. Por lo tanto, siempre al aislar una fracción que contenga membrana plasmática sinaptosomal o vesículas sinápticas, esta fracción será heterogénea en su origen.

Un punto crucial en el fraccionamiento subcelular del SNC, es definir el objetivo para el cual se está realizando el fraccionamiento, ya sea para experimentos analíticos o preparativos. Aunque idealmente los criterios para elegir las técnicas utilizadas en ambos procedimientos deben ser los mismos, en la práctica un aumento en la pureza de la fracción obtenida generalmente se acompaña con una disminución en el rendimiento y vice versa, luego el procedimiento óptimo para cumplir con el objetivo determinado será diferente.

En experimentos analíticos clásicos como son el determinar si el contenido de una sustancia o elemento de un determinado tejido se encuentra asociado a una fracción subcelular específica, se debe realizar un paralelo entre la distribución del contenido en cuestión y marcadores conocidos de fracciones subcelulares. La dificultad aquí, entonces, estará en la elección de los marcadores de fracciones subcelulares y el obtener una fracción que esté enriquecida en el marcador apropiado, al mismo tiempo que exista una baja presencia de otros marcadores de fracciones subcelulares distintas. Por último, toda conclusión a que se llegue debe ser siempre confirmada por el aislamiento de una fracción subcelular lo más pura posible. Aunque no siempre es posible colocar a priori un límite arbitrario del grado de pureza que se debe lograr para que los resultados

sean significativos, un criterio importante es que el contaminante no copurifique durante el proceso y que el resultado del contenido en estudio dé una distribución preferencial en dicha fracción aislada.

El objetivo de esta parte de la tesis estuvo dirigido a responder parte de las interrogantes expuestas en la introducción, en especial a las relacionadas con: ¿GABA, como otros neurotransmisores, se encuentra localizado dentro de la vesícula sináptica, o solamente se encuentra en forma soluble en el citoplasma de las neuronas inhibitoras donde se sabe que su concentración es muy alta? El obtener una respuesta afirmativa a esta interrogante, nos permitiría cuantificar el contenido de GABA presente en esta fracción vesicular, y estimar el número de moléculas de GABA contenido en una vesícula sináptica de corteza.

En la literatura hay descritos intentos negativos en asociar amino ácidos con fracciones de vesículas sinápticas preparadas a partir de cerebro total o corteza cerebral (Whittaker, 1965; Mangan y Whittaker, 1966; Rossin, 1972; De Belleruche y Bradford, 1973). Esto podría indicar que los amino ácidos postulados como neurotransmisores no se encuentren acumulados en vesículas sinápticas.

Una explicación alternativa pudiera ser que los aminoácidos difundieran desde la vesícula durante el proceso de purificación y aislamiento. Así el contenido vesicular de amino ácidos debería ser inversamente proporcional a la duración y complejidad del procedimiento utilizado durante la purificación. De hecho, las vesículas sinápticas

preparados por fraccionamientos muy elaborados y prolongados no son capaces de retener sus neurotransmisores (Breckenridge y col., 1973; Morgan y col., 1973).

La mayoría de los métodos para aislar vesículas sinápticas que se han descrito, son modificaciones de los procedimientos originales de Gray y Whittaker, 1962; De Robertis y col., 1962; Whittaker y col., 1964; los cuales fundamentalmente utilizaron como técnicas de separación a la centrifugación diferencial y gradientes de densidad en sacarosa, que aunque han generado preparaciones libres de contaminantes como son los fragmentos grandes de membrana resellada de retículo endoplasmático y membrana plasmática, presentan varias desventajas: como serían los tiempos prolongados de centrifugación, ruptura del equilibrio entre el neurotransmisor citosólico y el intravesicular estimulándose así la difusión del neurotransmisor desde el compartimiento intravesicular (Aprison, 1978 ha sugerido esta explicación para los resultados negativos en relación a glicina), contaminación con proteínas citoplasmáticas solubles y elementos solubles en general. Las cantidades de fracción vesicular obtenidas en un gradiente están en el orden de los microgramos, lo que es insuficiente para realizar estudios de constitución, tampoco es posible separar las vesículas sinápticas de membranas reselladas de tamaño intermedio que presenten una densidad similar al de las vesículas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se eligieron tres métodos diferentes descritos en la literatura (Métodos, sección 2.2.6.1.) para aislar vesículas sinápticas de corteza cerebral de rata. Todos ellos presentan como elementos en común, el fraccionamiento mediante centrifugación

diferencial y tiempos de centrifugación cortos, de tal manera que luego de 2-3 horas se obtiene una fracción enriquecida en vesículas sinápticas que contienen una cantidad apreciable de GABA endógeno que como ya se demostró en la discusión anterior, sería el único ligando endógeno para el receptor  $GABA_A$  que existe en esta fracción vesicular. (Discusión, sección 4.1.; Lagos y col., 1983).

La idea esencial fue continuar la purificación de vesículas sinápticas a partir de estas preparaciones, aplicando un principio distinto de separación como lo es el fraccionamiento por filtración en gel (Cromatografía en columna), y de esta manera evitar fundamentalmente la contaminación con elementos solubles como son las proteínas (Whittaker y Sheridan, 1965; Whittaker, 1984) y el GABA endógeno que se sabe está presente en gran cantidad como amino ácido libre en el citoplasma del terminal nervioso (ver Introducción).

Anteriormente otros grupos también han utilizado filtración en cromatografía líquida para aislar vesículas sinápticas. Morris (1973), utilizando cromatografía en columna formada por esferas de vidrio con tamaño de poro conocido había logrado obtener vesículas sinápticas de la electroplaca del Torpedo, libres de contaminación residual formada por fragmentos de membrana plasmática y proteínas solubles. También Nagy y col. (1976), utilizando este tipo de columna pudo obtener una preparación de vesículas sinápticas de alta pureza a partir de corteza cerebral de cobayo y de la sinapsis electromotora de Torpedo marmorata. Esta preparación de VS le permitió determinar el contenido de acetilcolina presente en vesículas colinérgicas (14 n moles de ACh/mg de proteína, en corteza cerebral de cobayo).

La cromatografía en columna de DEAE-Sephadex permitió a Kadota y Kadota (1973), eliminar la mayor parte de los fragmentos de membrana plasmática presentes como contaminantes de una fracción rica en vesículas recubiertas.

Marcadores bioquímicos, como el contenido de [ $H^3$ ]-NA en vesículas noradrenérgicas (marcador de compartimiento vesicular) y unión de [ $H^3$ ]-ouabaína (ligando específico de alta afinidad por  $Na^+$ - $K^+$  ATPasa), como marcador de presencia de membrana plasmática, además de controles de microscopía electrónica se utilizaron para caracterizar y estudiar las fracciones vesiculares obtenidas.

Cuando la fracción vesicular obtenida por el método de Hata y col. (1976) o Seidler y col. (1977); se sometió a una separación posterior en columna de filtración en gel de Sepharose 4B, una cantidad significativa de GABA endógeno aparece asociado a la fracción particulada, (15 n moles y 7,3 n moles de GABA respectivamente). Esta fracción particulada también presenta el porcentaje mayor de [ $H^3$ ]-NA indicando la presencia de vesículas sinápticas, eluyendo en las fracciones correspondientes a la elución de un GABA particulado. Sin embargo también en esta fracción se observó una contaminación de fragmentos de membrana plasmática, lo que fué más apreciable en la preparación de vesículas obtenidas según el método de Hata y col. (1976) ( $1.310 \pm 128$  fmoles de [ $H^3$ ]-ouabaína unida/mg de proteína), comparándolo con lo que presenta la preparación según el método descrito por Seidler y col., (1977)( $122,6 \pm 10$  fmoles de [ $H^3$ ]-ouabaína unida/mg de proteína). En condiciones similares una preparación de membrana plasmática altamente purificada a partir de riñón de mamífero o túbulo transversal de músculo



esquelético es capaz de unir alrededor de 150 pmol de ouabaína/mg de proteína (comunicación personal de M. de la Fuente y C. Hidalgo).

Esta contaminación por membrana plasmática es reconocida por Hata y col., en su trabajo original. Controles hechos en esta Tesis, realizando microscopía electrónica a la preparación de Hata y col. (1976), confirmaron dicha contaminación (Lagos y col., 1980).

La presencia de membrana plasmática resellada no permitió determinar el contenido de GABA en vesículas sinápticas como era lo pretendido, pero estas preparaciones si sirvieron para demostrar que el GABA libre no es atrapado por la fracción particulada rica en vesículas sinápticas durante el proceso de homogenización y tampoco en las etapas posteriores en el desarrollo de la preparación, ya que al homogeneizar en presencia de 2  $\mu$ Ci de [ $H^3$ ]-GABA, se encontró que el 99% de la marca de tritio aplicada aparece en las fracciones donde eluyen los amino ácidos libres.

Considerando que la preparación de vesículas sinápticas obtenidas de acuerdo al método de Hata y col. (1976), presentaba la mayor contaminación de membrana plasmática, se sometió esta, a un fraccionamiento por filtración en gel de Sepharose 4B-concanavalina A.

La hipótesis de trabajo aquí, postulaba la purificación de una fracción particulada asociada a GABA, que presentara el marcador de vesícula altamente concentrado ([ $H^3$ ]-NA) y en la cual no se observara ligamen a [ $H^3$ ]-ouabaína (marcador de membrana plasmática). Los

membranas plasmáticas presentes como contaminantes deberían quedar retenidas en el gel, por interacción específica de la concanavalina A con los carbohidratos presentes en la membrana plasmática ( $\alpha$ -D-glucosa y  $\alpha$ -D-manosa), (Zachowski y Paraf, 1974; Brunner y col., 1977; Gordon-Weeks y Jones, 1983).

Los resultados indican que el fraccionamiento obtenido no se produce por adsorción de afinidad como era lo esperado, pues la separación se realiza discriminando por tamaño, de igual forma como lo realiza la Sepharose 4B, obteniéndose por lo tanto nuevamente una fracción vesicular con contaminación de membrana plasmática.

La fracción vesicular obtenida de acuerdo al método descrito por De Lorenzo y Freedman (1978), se sometió a una separación por filtración en gel de Sepharose 4B y se obtuvo una óptima purificación.

La fracción particulada que presenta gran contenido de GABA endógeno (26% del GABA total aplicado<sup>(?)</sup>), aparece también portando la casi totalidad de la noradrenalina tritiada, indicando la presencia de vesículas sinápticas en dicha fracción. En esta preparación los sinaptosomas son mantenidos por un período muy corto en condiciones hipoosmóticas, lo que explicaría la alta concentración de [ $H^3$ ]-NA en la fracción vesicular, sin producirse pérdida durante el proceso de separación.

La unión de [ $H^3$ ]-ouabaína medida en esta fracción asociada a vesículas sinápticas fue muy baja ( $37,2 \pm 2,6$  fmoles de [ $H^3$ ]-ouabaína unida/mg de proteína), indicando la insignificante contaminación de

membranas plasmáticas.

Los estudios de microscopía electrónica realizados con esta preparación confirmaron la información entregada por los marcadores bioquímicos. Las microfotografías muestran la presencia de una fracción rica en vesículas sinápticas con escasa contaminación de membrana plasmática, comparable a las mejores preparaciones comunicadas en la literatura como lo son las de Whittaker y col. (1964); Whittaker y Sheridan (1965); De Belleruche y Bradford, (1973); Nagy y col. (1976).

En una amplificación mayor (aumento total 98.750 veces) de esta fracción particulada se observaron conglomerados de vesículas sinápticas de forma esférica y ovaladas, presentando dimensiones que corresponden a las descritas en la literatura en el SNC de diferentes mamíferos (Whittaker y col., 1964; Kadota y Kadota, 1973; Nagy y col., 1976; Uchizono y col., 1979; Navone y col., 1984).

Uchizono y col. (1979), caracterizaron morfológicamente vesículas sinápticas en cerebros de cobayo, clasificándolas de acuerdo a sus formas y en el tipo de sinapsis en que participan: tipo S (esféricas) de un diámetro promedio de 500 Å, participan en la sinapsis excitatoria y dentro de ellas se encuentran los neurotransmisores excitatorios como lo son ACh y el ácido glutámico. Tipo F (ovaladas) que presentan en su diámetro mayor 500 Å y en su diámetro menor 350 Å, estas son características de la sinapsis inhibitoria y dentro de ellas se encuentran contenidos los neurotransmisores inhibitorios, como lo sería el GABA.

Considerando esta clasificación podemos estimar el contenido intravesicular de GABA presente en uno de estas vesículas. Para tal efecto debemos primero determinar el contenido de GABA endógeno presente en una vesícula sináptica expresado como el número de moléculas por vesícula.

El contenido de proteína que presenta una vesícula sináptica es de  $2,7 \times 10^{-17}$  g (Riveros y col., 1986), valor que se correlaciona muy bien con el estimado por Negy y col. (1979) ( $1 \times 10^{-17}$  g). Conociendo el contenido en nmoles de GABA presente en la fracción particulada aislada por filtración en gel de Sepharose 4B (5,97 nmoles de GABA) que representan  $3,6 \times 10^{15}$  moléculas de GABA ( $5,97 \times 10^{-9} \times 6,023 \times 10^{23}$ ) y que en esta fracción particulada asociada a GABA, la cantidad de proteína total es de 971  $\mu$ g.

Considerando la muy baja unión de [ $H^3$ ]-ouabaína y los controles de microscopía electrónica para esta fracción vesicular purificada, podemos asignar que el 95% de la proteína total corresponde a vesículas sinápticas, es decir 922  $\mu$ g y a esta cantidad de proteína le corresponden  $3,42 \times 10^{13}$  vesículas sinápticas ( $922 \times 10^{-6}$  g /  $2,7 \times 10^{-17}$  g).

Entonces podemos decir que  $3,42 \times 10^{13}$  vesículas sinápticas contienen en su interior  $3,6 \times 10^{15}$  moléculas de GABA, luego el número de moléculas de GABA por vesícula sería de 105 moléculas ( $3,6 \times 10^{15} / 3,42 \times 10^{13}$ ).

Pero esta preparación de vesículas sinápticas obtenidas de corteza cerebral de rata, es sin duda una preparación heterogénea en cuanto al contenido de neurotransmisores en vesículas sinápticas, ya que la purificación de vesículas sinápticas se realizó a partir de corteza cerebral completa y en ella se encuentran toda la variedad de terminales nerviosos que la constituyen.

Iversen y Schon (1973) determinaron in vitro, que existe alrededor de un 25% de terminales GABAérgicos en corteza cerebral. Por lo tanto si consideramos este porcentaje como el que representa la proporción de vesículas GABAérgicas presentes en el total de vesículas purificadas, el número de moléculas de GABA por vesícula sináptica llega a 420.

Tomando como modelo de vesícula sináptica inhibidora un elipsoide prolato, el volumen interno estimado para una de estas vesículas es de  $1,05 \times 10^7 \text{ \AA}^3$  (Volumen =  $4/3 \pi ab^2$ ; a = radio mayor =  $190 \text{ \AA}$ , b = radio menor =  $115 \text{ \AA}$ ). Como sabemos que una vesícula contiene 420 moléculas de GABA, entonces la concentración intravesicular de GABA es de 0,07 M en corteza cerebral de rata.

La concentración intravesicular es sólo 3 veces menor que la determinada recientemente para ácido glutámico por Riveros y col. (1986), (hasta ahora la concentración más alta de amino ácidos asociada a fracción vesicular comunicada) y el doble de la calculada a partir de la mayor determinación de ACh intravesicular realizado por Nagy y col. (1976) ( $14 \text{ nmol/mg}$  de proteína) en una preparación de vesículas sinápticas de

alta pureza.

Otsuka y col. (1971) desarrollaron un micro método de determinación de GABA, que les permitió medir hasta  $2 \times 10^{-14}$  mol de GABA. Utilizando este método ellos midieron el contenido de GABA en diferentes neuronas aisladas en el SNC de gato. El nivel más alto de concentración de GABA medido en distintos somas fue de 6,6 mM GABA en células de Purkinje en cerebelo.

De acuerdo a la cantidad de GABA medido en esta Tesis, el GABA estaría concentrado intravesicularmente a lo menos 10 veces en relación a la concentración de GABA medida en neuronas aisladas.

Estimaciones realizadas por Fonnum y Walberg (1973), consideran que en terminales nerviosos inhibitorios la concentración de GABA podría variar entre 0,05 M y 0,15 M. En este caso la cantidad de GABA medido se encuentra dentro del rango estimado por los autores. Ellos sugieren que si la mayoría del GABA intraterminal está almacenado en VS, la concentración intravesicular de GABA debería ser más alta.

Para la determinación del contenido de GABA en vesículas realizado en esta Tesis se ha considerado que no hay pérdida de GABA del compartimiento vesicular mientras transcurre el proceso de aislamiento de las vesículas, de hecho uno de los esfuerzos en esta Tesis estaba dirigido a aminorar al máximo la pérdida de GABA intravesicular, de tal manera que se pudiera demostrar su presencia y cuantificarlo. Dado que, se ha obtenido un resultado positivo en el cumplimiento de este objetivo,

es probable que cierta cantidad de GABA difunda desde las vesículas por el sólo hecho que en los diferentes procesos de homogeneización y separación de fracciones subcelulares se rompe el equilibrio entre la cantidad de GABA extravésicular e intravésicular.

Recientemente en corteza de mono Kisvarday y col. (1986), comparan la distribución de neuronas que son inmunoreactivas a GABA endógeno con las que se marcan autoradiográficamente por captación de  $[H^3]$ -GABA aplicado localmente, demostrando que muchas de las neuronas que acumulan  $[H^3]$ -GABA no presentan inmunoreactividad al antisuero para GABA, siendo la cantidad de neuronas que son inmunoreactivas menor que las que acumulan  $[H^3]$ -GABA, indicando que no todas las neuronas que aparecen marcadas con  $[H^3]$ -GABA son GABAérgicas.

En el cálculo para GABA intravésicular recientemente hecho en esta Tesis, se consideró en un 25% la proporción de VS GABAérgicas presentes en la corteza cerebral considerando la información aportada por Iversen y Schon (1973), donde determinan in situ el porcentaje de terminales GABAérgicos usando la marcación por captación de  $[H^3]$ -GABA. Así el contenido de GABA intravésicular determinado aquí está probablemente subestimado.

De cualquier forma, hasta ahora no se había comunicado la presencia de tan alto contenido de GABA dentro de vesículas sinápticas obtenidas del SNC de rata.

Utilizando columnas de Sephacryl S-1000 también se pudo

obtener, a partir de la preparación de VS descrita por Hata y col.,(1976), una fracción vesicular que permitió hacer una estimación del GABA intravesicular. Sephacryl S-1000 es una resina que presenta macroporos y que permite separar partículas cuyos tamaños varían entre 30 - 300 nm, presentando un límite de exclusión para partículas esféricas de diámetro entre 300 y 400 nm.

Las vesículas sinápticas presentan tamaños cuyo diámetro promedio es de 50 nm (Whittaker, 1985).

Controles obtenidos por microscopía electrónica, de la preparación de Hata y col. (1976), mostraron la presencia de abundante contaminación con membranas plasmáticas reselladas, cuyos tamaños variaban entre 400 - 700 nm. (Lagos y col., 1980).

Los resultados mostraron la separación total del componente que presenta GABA endógeno, de las fracciones que presentan ligamen a [ $H^3$ ]-ouabaína, indicando que las membranas plasmáticas eluyen primero, como se esperaba.

El GABA endógeno apareció parcialmente separado entre un componente particulado que presenta un contenido de proteína de 302  $\mu$ g (20% de la proteína total aplicada a la columna) y un componente libre que coeluye con el marcador de amino ácidos libres ([ $C^{14}$ ]-glicina).

Si consideramos este GABA endógeno particulado, que se encuentra asociado al 20% de la proteína total, y que en cuyas fracciones



no se detectó unión a [ $H^3$ ]-ouabaína, como un GABA endógeno asociado a vesículas sinápticas (11,9 n moles de GABA), podemos hacer un cálculo en forma similar al realizado para la preparación de vesículas sinápticas purificadas en Sepharose 4B. Determinando así, que cada vesícula contiene 2.560 moléculas de GABA, valor que se acerca mucho al tamaño descrito para un quantum de ACh (ver Introducción) y se compara bien con la cifra calculada para el amino ácido glutámico por Riveros y col. (1966), también en corteza cerebral de rata.

Calculando la concentración intravesicular de GABA, de igual forma como se hizo anteriormente, esta corresponde a 0,4 M. Siendo esta la concentración más alta de GABA determinada in vitro y siendo mayor que las medidas en somas de neuronas aisladas (Otsuka y col., 1971), estimadas en terminales nerviosos inhibitorios del SNC (Fonnum y Walberg, 1973) y medida en axones inhibitorios de invertebrados, 0,1 - 0,15 M (Kravitz y Potter, 1965).

Para confirmar estos resultados, más estudios deberán realizarse en relación a identificar esta fracción particulada asociada a GABA (controles de microscopía electrónica), además de realizar esfuerzos para separar totalmente el GABA endógeno particulado, del que aparece eluyendo junto al marcador de amino ácidos libres.

Como se ha señalado anteriormente, las condiciones utilizadas y los tiempos de duración en las preparaciones de vesículas sinápticas son determinantes para obtener estas estructuras subcelulares con presencia de neurotransmisores intravesiculares.

Muchos de los métodos actualmente utilizados están basados en los clásicos métodos descritos inicialmente, todos los cuales incluyen técnicas en gradientes de densidad de sacarosa (para una revisión Whittaker, 1985), la hiperosmolaridad generada por las soluciones de sacarosa necesarias para obtener un gradiente de densidad, es, por decir lo menos, no fisiológica para las vesículas sinápticas.

El uso de gradientes con Ficoll (Kurokawa y col., 1965; Abdel-Latif, 1966; Cotman and Mathews, 1971) eliminaron el problema de hiperosmolaridad, sin embargo Ficoll presentaba la particularidad de adherirse a las membranas biológicas, afectando la actividad de enzimas presentes ahí y comprometiendo en general los estudios bioquímicos (Nagy y Delgado-Escueta, 1984).

El desarrollo de Percoll (partículas de sílice coloidal recubiertas con polivinilpirrolidina, de 15-30 nm de diámetro) solucionó ambos problemas, permitiendo utilizar gradientes isoosmóticos, las cuales se autoforman en tiempos cortos de centrifugación (30 minutos). Percoll no interfiere en la mayoría de las mediciones enzimáticas de los marcadores clásicos de fracciones subcelulares (Nagy y Delgado-Escueta, 1984; Lara, H., 1985), cuando éste se usa en ensayos normales, en que su concentración varía entre 0,1-0,4% de Percoll.

Al aplicar la preparación de VS descrita por Hata y col. (1976) a gradientes autoformados en Percoll isoosmótico, también se obtuvo una fracción rica en VS que permitió estimar el contenido intravesicular de GABA.

Si tomamos el contenido de GABA endógeno y la cantidad de proteína que corresponde a la fracción IV de la gradiente (Fig. 23; 2,2 n moles de GABA y 250  $\mu$ g respectivamente), fracción que corresponde a la fracción vesicular, pues en ella aparece la mayor proporción de [ $H^3$ ]-NA, podemos calcular de igual forma a la hecha anteriormente la concentración de GABA en la vesícula, ésta corresponde a 0,09 M y significa que existen 572 moléculas de GABA por vesícula.

El hecho de encontrar GABA intravesicularmente y en estas cantidades apoya fuertemente la postulación de GABA como neurotransmisor, el cual cumpliría con los tres criterios principales postulados, para ser considerado como tal (Orrego, 1979), además de aportar un antecedente más de apoyo a la postulación de vesículas sinápticas como la estructura especializada de terminal nervioso encargada del almacenamiento del neurotransmisor, como lo sugiere la hipótesis vesicular.

Resumiendo, con los resultados discutidos en esta parte de la Tesis se puede concluir que:

1. GABA se encuentra en vesículas sinápticas purificadas a partir de corteza cerebral de rata, de igual forma como se ha demostrado para otros neurotransmisores.

2. Las cantidades de GABA endógeno determinado intravesicularmente en tres purificaciones distintas de vesículas sinápticas son:

Preparación de VS de la cual se parte	fraccionamiento	GABA intravesicular	
		concentración M	moléculas/VS
De Lorenzo y Freedman, 1978	Sepharose 4B	0,07	420
Hata y col., 1976	Sephacryl S-1000	0,4	2.560
Hata y col., 1976	gradiente isoosmótica al 15% en Percoll	0,09	572

3. La presencia de GABA intravesicular demuestra que GABA cumple con los tres criterios primarios postulados por Orrego (1979), para ser considerado como un neurotransmisor.

4. La concentración de GABA intravesicular calculada (0,07 M, 0,09 M y 0,4 M) apoya la función almacenadora que se le atribuye a las vesículas sinápticas, en la hipótesis vesicular.

#### 4.3. ESTUDIOS DE CAPTACION DE [ $^3$ H]-GABA POR UNA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS.

Con el fin de estudiar las características del mecanismo que está envuelto en la captación y almacenamiento de GABA por vesículas sinápticas, se utilizó la preparación descrita por Seidler y col. (1977) (Métodos, sección 2.2.6.1.).

Esta preparación permite obtener una fracción rica en vesículas sinápticas en un sedimento microsomal ( $P_3$ ), después de una homogeneización vigorosa del tejido en presencia de un medio isotónico (0,3 M sacarosa, Tris-sulfato 25 mM, pH 7,4) realizada con un homogeneizador Dual cónico vidrio-vidrio, permitiendo así la ruptura mecánica de la membrana sináptica liberándose las vesículas sinápticas desde el botón sináptico.

Este procedimiento, a diferencia de otros que utilizan lisis hipoosmótica del sinaptosoma para obtener las vesículas sinápticas, (para una revisión ver Whittaker 1985), los cuales se sabe que presentan pérdidas del neurotransmisor (Mangan y Whittaker, 1966; Rassin, 1972; De Belleruche y Bradford, 1973), lisis de vesículas (De Robertis y col., 1965), pérdida de especificidad de los sistemas de captación vesicular lo que se refleja en alteraciones a la sensibilidad a drogas (Slotkin y col., 1978), permite en un período de tiempo muy corto (1 hora 30 min) obtener una fracción vesicular cruda, que presenta un 36% del contenido original de

NA del cerebro total (Slotkin y col., 1980) y demostrar captación de  $[H^3]$ -NA dependiente de ATP y  $Mg^{+2}$ , la cual es totalmente inhibida por reserpina (Seidler y col., 1977).

Estudios controles hechos en el transcurso de esta Tesis, sólo en condiciones óptimas comprobaron la captación de  $[H^3]$ -NA dependiente de ATP y  $Mg^{+2}$  en esta preparación.

La fracción vesicular sometida a separación en cromatografía en columnas de Sepharose 4B mostró GABA endógeno presente en la fracción particulada (7,3 nmoles de GABA), que coeluye con vesículas noradrenérgicas.

Estos resultados indicaban que la utilización de esta fracción microsomal de vesículas ( $P_3$ ), la cual se obtenía en forma rápida, sin exponer las vesículas a medios hipoosmóticos y tampoco a gradientes hipertónicos podría ser una buena preparación para estudiar la captación y almacenamiento de GABA en vesículas sinápticas.

Los estudios de captación de  $[H^3]$ -GABA realizados en esta preparación de vesículas sinápticas crudas mostraron que: la captación de  $[H^3]$  GABA alcanzaba el equilibrio a los 5 minutos a  $37^\circ C$ , era independiente de ATP, dependiente de  $Na^+$  y estimulada por concentraciones de hasta 30 mM ión  $Cl^-$ .

En presencia de ATP(Tris) o ATP( $K^+$ ) no se observó diferencias con los controles sin ATP. Siempre que se incubó en presencia de ATP ( $Na^+$ )

se observó un aumento en la captación, similar al logrado en presencia de  $\text{Na}^+$  y sin ATP.

Estos resultados corresponden más bien a una captación dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  asociada a membranas plasmáticas sinápticas, como lo descrito para GABA (ver Introducción; Konner, 1978; Radion y Konner, 1983), y para otros amino ácidos neurotransmisores como lo es L-glutámico (Konner y Sharon, 1978).

Este sistema de transporte, bastante caracterizado, ha sido relacionado con el mecanismo principal que permite poner término a la acción del neurotransmisor a nivel del receptor postsináptico (Iversen, 1971).

Seidler y col. (1977), colocan mayor énfasis en su trabajo, por la contaminación microsomal presente en su preparación, no considerando de igual forma la posible contaminación de fragmentos de membranas plasmáticas reselladas presentes.

De acuerdo al ligamen de  $[\text{H}^3]$ -ouabaína medido en esta preparación, en esta Tesis se puede afirmar que existen estos fragmentos de membrana plasmática como contaminantes, lo que explicaría la captación de  $[\text{H}^3]$ -GABA con las características anteriormente mencionadas.

Seidler y col., 1977, reconocen que su preparación es una modificación de la de Philippu y Beyer (1973), donde estos últimos describieron la captación de Dopamina y NA dependiente de ATP en una

fracción vesicular crudo proveniente de cuerpo estriado de cerdo.

También Philippu y Matthaei (1975), describieron una captación dependiente de ATP de serotonina, GABA e histamina en esta preparación, ahora obtenida de núcleo caudado de cerdo.

Si la preparación de Seidler y col. (1977), es sólo una modificación de la descrita por Philippu, y en esta Tesis se utilizó la de Seidler y col., ¿cómo se explica la diferencia de resultados de esta Tesis y los publicados por Philippu y Matthaei (1975)?

Al analizar ambas metodicas se encuentran dos diferencias en el desarrollo de la preparación: la primera es que, el medio de homogeneización utilizado por Seidler y col. (1977), además de sacarosa 0,3 M presenta tampón Tris-sulfato 25 mM a pH 7,4 y la segunda es que, la homogeneización se realiza en un homogeneizador Potter-Elvehjen vidrio-teflón (Philippu y Matthaei, 1975) mientras que Seidler y col. (1977), utilizan un homogeneizador Dual cónico vidrio-vidrio, que es el que se usó en esta Tesis.

Es probable que debido a esta segunda diferencia en el desarrollo de la preparación, donde una homogeneización vigorosa como la que se logra al utilizar el homogeneizador cónico vidrio-vidrio, dañen los sistemas de captación de las vesículas sinápticas GABAérgicas y por esto no sea posible detectar captación vesicular de GABA. Esta hipótesis se encuentra apoyada por los resultados recientemente comunicados por Riveros y col. (1986), donde muestran que vesículas sinápticas de



corteza cerebral de rata, preparadas de acuerdo a Seidler y col.,(1977), no presentan ácido glutámico endógeno.

Queda claro que para estudiar el mecanismo involucrado en la captación y almacenamiento de GABA por vesículas sinápticas es necesario una preparación de vesículas que presente la menor contaminación posible y en especial que esté libre de membranas plasmáticas. Un ejemplo que apoya esta conclusión, es lo logrado por Naito y Ueda (1983);(1985), que preparan vesículas sinápticas por aglutinación con anticuerpos anti sinapsina I (proteína presente en la superficie de vesículas sinápticas) y en esta preparación prácticamente pura, caracterizan la captación de L-glutamato.

Una alternativa interesante sería estudiar la captación de  $[H^3]$ -GABA por la preparación de vesículas sinápticas descrita en esta Tesis, (originadas a partir de la preparación descrita por De Lorenzo y Freedman 1976 y purificada por Sepharose 4B), que presenta de acuerdo a criterios bioquímicos y morfológicos una alta pureza. (Resultados, sección 3.2.1.6. y 3.2.1.7.).

#### 4.4. CONCLUSIONES .

Considerando en forma global los resultados aquí discutidos y volviendo sobre las preguntas inicialmente planteadas en esta Tesis, se puede resumir que:

1. En extractos de membranas sinápticas y vesículas sinápticas provenientes de diferentes áreas del SNC de rata, sólo se encontró una fracción endógena capaz de desplazar  $[H^3]$ -GABA o  $[H^3]$ -muscimol de su unión con los receptores  $GABA_A$  y esta coincide en su separación con el  $[H^3]$ -GABA aplicado como marcador interno.
2. No se encontraron evidencias experimentales que apoyen la postulación de un ligando endógeno de naturaleza peptídica que interactúe con el receptor  $GABA_A$ .
3. GABA se encuentra en vesículas sinápticas purificadas a partir de corteza cerebral de rata, de igual forma, como se ha demostrado para otros neurotransmisores. Siendo la estimación más baja de 420 moléculas de GABA/vesícula sináptica.
4. Los estudios de captación de GABA realizados utilizando la preparación vesicular descrita por Seidler y col.(1977), corresponden más bien a una captación dependiente de  $Na^+$  y  $Cl^-$  asociada a membranas plasmáticas, similar a la descrita para GABA en la literatura, que a una captación de vesícula sináptica como la que presentan los neurotransmisores.

1. Abdel-Latif, A.A. (1966). A simple method for isolation of nerve ending particles from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 121, 403-406.
2. Aberts, B. y Herrick, G. (1971). DNA-cellulose chromatography. In: *Methods in enzymology*, XXI, pp. 198-217.
3. Agnati, L.F., Fuxe, K., Benfenati, F., Zini, I y Hökfelt, T. (1983). The functional role of coexistence of 5-HT and substance P in bulbospinal 5-HT neurons. Substance P reduces affinity and increases density of  $^3\text{H}$ -5 HT binding sites. *Acta Physiol. Scand.* 117, 299-302.
4. Anderson, C.R. y Stevens, C.F. (1973). Voltage clamp analysis of acetylcholine produced endplate current fluctuations at frog neuromuscular junction. *J. Physiol., Lond* 235, 655-691.
5. Aprison, M.H. (1978). Glycine as a neurotransmitter. In: *Psychopharmacology: A Generation of progress.* (M.A. Lipton, A. Di Mascio and K.F. Killam, eds.), pp. 333-345. Raven Press, New York.
6. Aprison, M.H. y Nadi, N.S. (1977). Glycine: inhibition from the sacrum to the medulla. In: *Amino Acids as Chemical Transmitters* (Fonnum, F., ed.), pp. 531-570. Plenum Press, New York.
7. Asano, T. y Ogasawara, N. (1980). Solubilization of gamma-Amino-butyric acid receptor from rat brain. *Life Sci.* 26, 1131-1137.

8. Atwood, H.L. (1976). Organization and synaptic physiology of crustacean neuromuscular system. *Prog. Neurobiol.* 7, 291-391.
9. Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R. y Seale, B. (1950). Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* 187, 35-39.
10. Baldessarini, R.J. y Kopin, I.J. (1967). The effect of drugs on the release of norepinephrine-<sup>3</sup>H from central nervous system tissue by electrical stimulation in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156, 31-38.
11. Birks, R. I. (1974). The relationship of transmitter storage and release to fine structure in a sympathetic ganglion. *J. Neurocytol.* 3, 133-160.
12. Birks, R. I. y Fitch, S. J. G. (1974) Storage and release of acetylcholine in a sympathetic ganglion. *J. Physiol. Lond.* 240, 125-134.
13. Björklund, A. y Lindvall, O. (1975) Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestion for a role in dendritic terminals. *Brain Res.* 83,531-537.
14. Bogdanski, D.F., Weissbach, H. y Udenfriend, S. (1957). The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase and monoamine oxidase in brain. *J. Neurochem.* 1, 227-228.

15. Bone, E. A. y Michell, R. H. (1985) Accumulation of inositol phosphates in sympathetic ganglia: effects of depolarization and of amine and peptide neurotransmitters. *Biochem. J.* 227, 263-269.
16. Bone, E. A., Fretten, P., Kirky, C. J. y Michell, R. H. (1984) Rapid accumulation of inositol phosphates in isolated rat superior cervical sympathetic ganglia exposed to  $V_1$ -vasopressin and muscarinic cholinergic stimuli. *Biochem. J.* 221, 803-811.
17. Bowman, C.L. y Kimelberg, H.K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature* 311, 656-659.
18. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
19. Breeckenridge, W.C., Morgan, I.G., Zanetta, J.P. y Vincendon, G. (1973). Adult rat brain synaptic vesicles. II Lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 320, 681-686.
20. Brunner, G., Ferber, E. y Resch, K. (1977). Fractionation of membrane vesicles. I. A separation method for different population of membrane vesicles of thymocytes by affinity chromatography on con A-Sepharose. *Anal. Biochem.* 80, 420-429.

21. Ceccarelli, B. y Hurlbut, W.P. (1980). Vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine. *Physiol. Rev.* 60, 396-441.
22. Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. y Mauro, A. (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57, 499-524.
23. Celio, M.R. (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid - containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* , 231,995-997.
24. Collier, B. (1969) The preferential release of newly synthesized transmitter by a sympathetic ganglion. *J. Physiol. Lond.* 205, 341-352.
25. Costa, E. (1980). Pharmacological evidence for an interaction of benzodiazepine and GABA receptors. In: *GABA and Benzodiazepine Receptors*. Raven Press, New York.
26. Cotman, C.W. y Matthews, D.A. (1971). Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 380-394.
27. Cragg, B.G. (1967). The density of synapses and neurones in the motor and visual areas of the cerebral cortex. *J. Anat.* 101, 639-654.
28. Curtis, D.R. y Johnston, G.A.R. (1970). Amino acid transmitters. In: *Handbook of Neurochemistry*. (A. Lajtha, ed.), 4, pp. 115-134. Plenum Press, New York.

29. Curtis, D.R., Duggan, A.W. y Felix, D. (1970). GABA and inhibition of Deiters neurones. *Brain Res.* 23, 117-120.
30. Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D. y Johnston, G.A.R. (1970). GABA, bicuculline and central inhibition. *Nature, Lond* 226, 1222-1224.
31. Chan-Palay, V., Nilaver, G., Palay, S. L., Beinfeld, M.C., Zimmerman, E. A., Wu, J.-Y. y O' Donohue, T. L. (1981) Chemical heterogeneity in cerebellar Purkinje cells: Existence and coexistence of glutamic acid decarboxylase-like and motilin-like immunoreactivities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78,7787-7791.
32. Davison, A.N. y Kaczmarek, L.K. (1971). Taurine a possible neurotransmitter? *Nature, Lond* 234, 107-108.
33. De Belleruche, J.S. y Bradford, H.F. (1973). Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal. *J. Neurochem.* 21, 441-451.
34. De Feudis, F.V. y Mandel, P. (eds.). (1981). Amino Acid Neurotransmitters. In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology.* 29, Raven Press, New York.
35. De Feudis, F.V. y Martin del Rio, R. (1977). Is  $\beta$ -alanine an inhibitory neurotransmitter? *Gen. Pharmac.* 8, 177-180.

36. Del Castillo, J.B. y Katz B. (1954). Quantal components of the end plate potential. *J. Physiol., Lond* 124, 560-573
37. Del Castillo, J.B. y Katz, B. (1956). Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Prog. Biophys. Chem.* 6, 121-170.
38. De Lorenzo, R.J. y Freedman, S.D. (1978). Calcium dependent neurotransmitter release and protein phosphorylation in synaptic vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 183-192.
39. De Potter, W.P., De Schaepestryver, A.F., Moerman, E.J. y Smith, A.D. (1969). Evidence for the release of vesicle-proteins together with noradrenaline upon stimulation of the splenic nerve. *J. Physiol., Lond* 204, 102-104.
40. De Robertis, E. y Bennet, H.S. (1955). Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 47-58.
41. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodriguez de Lores Arnaiz, G. y Zieher, L.M. (1965). Synaptic vesicles isolated from the rat hypothalamus. Isolation and norepinephrine content. *Life Sci.* 4, 193-201.
42. De Robertis, E., Rodriguez, De Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrino de Iraldi, A. y Zieher, L.M. (1963). Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. *J. Neurochem.* 10, 225-235.



43. Dreifuss, J.J., Kelly, J.S. y Krnjevic, K. (1969). Cortical inhibition and gamma-aminobutyric acid. *Exp. Brain Res.* 9, 137-154.
44. Drummond, R. J. y Phillips, A. T. (1977) Intracellular amino acid content of neuronal, glial and non-neuronal cell cultures : the relationship to glutamic acid compartmentation. *J. Neurochem.* 29,101-108.
45. Dunant, Y., y Israël. M. (1979) When the vesicular hypothesis is no longer the vesicular hypothesis. *TINS*, May, 130-132.
46. Eccles, J.C. (1964). *The physiology of synapses.* Springer-Verlag, Berlin.
47. Enna, S.J. y Snyder, S.H. (1975). Properties of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. *Brain Res.* 100, 81-97.
48. Enna, S.J. y Snyder, S.H. (1976). A simple, sensitive and specific radioreceptor assay for endogenous GABA in brain tissue. *J. Neurochem.* 26, 221-224.
49. Enna, S.J., Kuhar, M. y Snyder, S.H. (1975). Regional distribution of post synaptic receptor binding for gamma-aminobutyric acid (GABA) in monkey brain. *Brain Res.* 93, 168-174.

50. Enna, S.J., Wood, J.H. y Snyder, S.H. (1977). Gamma-aminobutyric acid (GABA) in human cerebrospinal fluid: radioreceptor assay. *J. Neurochem.* 28, 1121-1124.
51. Erecinska, M., Troeger, M.B. y Alston, T.A. (1986). Amino Acid Neurotransmitter in the CNS: Properties of Diaminobutyric Acid Transport. *J. Neurochem.* 46, 1452-1457.
52. Fatt, P. y Katz, B. (1952). spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol., Lond* 117, 109-128.
53. Fletcher, P. y Forrester, T. (1975). The effect of curare on the release of acetylcholine from mammalian motor nerve terminals and a estimate of quantum content. *J. Physiol., Lond* 251, 131-144.
54. Florey, E. (1960). Physiological evidence for naturally occurring inhibitory substance. In: *Inhibition in the Nervous System and Gamma- Aminobutyric Acid* (Roberts, E.; Baxter, C.F.; Van Harrefeld, A.; Wiersma, C.A.G.; Adey, W.R. and Killan, K.F., eds.), pp. 72-84, Pergamon Press, Oxford.
55. Fonnum, F. (1968). The distribution of glutamate decarboxylase and aspartate transaminase in subcellular fraction of rat and guinea-pig brain. *Biochem. J.* 106, 401-412.
56. Fonnum, F. (ed.) (1977). *Amino acids as chemical transmitters.* Plenum Press, New York.

57. Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, 1-11.
58. Freund, T.F., Martin, K.A.C., Smith, A.D. y Somogyi, P. (1983). Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnate axo-axonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal cells of the cat's visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 221, 263-276.
59. Fuxe, K., Aganati, L.F., Köhler, C., Kuonen, D., Ögren, S.O., Anderson, K. y Hökfelt, T. (1981). Characterization of normal and supersensitive dopamine receptors: Effects of ergot drug and neuropeptides. *J. Neural Transm.* 51, 3-37.
60. Galindo, A. (1969). GABA-picrotoxin interaction in the mammalian central nervous system. *Brain Res.* 14, 763-767.
61. Galleger, D.W., Lakosky, J.M., Gonsalves, S.F. y Rauch, L. (1984). Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity. *Nature, Lond* 308, 74-77.
62. Gardner, C.R., Klein, J. y Grove, J. (1981). Endogenous GABA determines the characteristics of [<sup>3</sup>H] GABA-binding. *Eur. J. Pharmacol.* 75, 83-92.
63. Geffen, L.G., Levett, B. y Rush, R.A. (1969). Immunological localization of chromogranins in sheep sympathetic neurones, and their release by nerve impulses. *J. Physiol., Lond* 204, 58-59p.

64. Gewitz, G.P. y Kopin, I.J. (1970). Release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase with norepinephrine during cat splenic nerve stimulation. *Nature, Lond* 227, 406-407.
65. Gordon-Week, P.R. y Jones, D.H. (1983). Binding and uptake of concanavalin A into rat brain synaptosomes: evidence for synaptic vesicle recycling. *Proc. Roy. Soc. Lond.* B219, 413-422.
66. Gray, E.G. y Whittaker, V.P. (1962). The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* 96, 79-88.
67. Greenlee, D.V., Van Ness, P.C. y Olsen, R.W. (1978). Endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Life Sci.* 22, 1653-1662.
68. Guidotti, A., Toffano, G. y Costa, E. (1978). An endogenous protein modulates de affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature, Lond* 275, 553-555.
69. Guidotti, A., Konkel, D.R., Ebstein, B., Corda, M.G., Wise, B.C., Krestzsch, H., Meek, J.L. y Costa, E. (1982). Isolation, characterization and purification to homogeneity of a rat brain protein (GABAmo-dulin). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6084-6088.

70. Heimann, C., Torri-Tarelli, F., Fesce, R. y Ceccarelli, B. (1985). Measurement of Quantal Secretion Induced by Ouabain and its correlation with Depletion of Synaptic Vesicles. *Cell Biol.* 101, 1953-1965.
71. Hanley, M.R., Benton, H.R., Lightman, S. L., Todd, K., Bone, E. A., Fretten, P., Palmer, S., Kirk, C. J. y Michell, R.H. (1984) A vasopressin-like peptide in the mammalian sympathetic nervous system. *Nature, Lond.* 309,258-261.
72. Hansen, O. (1976). Non-uniform populations of g-strophanthin binding sites of  $(\text{Na}^+-\text{K}^+)$ -activated ATPase. Apparent conversion to uniformity by  $\text{K}^+$ . *Biochim. Biophys. Acta* 433,383-392.
73. Harzell, H.C., Kuffler, S.W. y Yoshikami, D. (1976). The number of acetylcholine molecules in a quantum and the interaction between quanta at the subsynaptic membrane of the skeletal neuromuscular synapse. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* XL, 175-186.
74. Hata, F., Kuo, C., Matsuda, T. y Yoshida, H. (1976). Factors required for  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive acetylcholine release from crude synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 27, 139-144.
75. Hebb, C. (1970). Central nervous system at the cellular level: Identity of transmitter agents. *Ann. Rev. Physiol.* 32, 165-192.
76. Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Ljunberg, J.M. y Schultzberg, M. (1980). Peptidergic neurones. *Nature* 284, 515-517.

77. Holzbauer, M. y Sherman, D.F. (1972). In: Catecholamines. (Blaschko, H. and E. Muscholl, eds.), pp. 110. Springer-Verlag, Berlin.
78. Horng, J.S. y Wong, D.T. (1979). Gamma-aminobutyric acid receptors in cerebellar membranes of rat brain after a treatment with Triton X-100. *J. Neurochem.* 32, 1379-1386.
79. Israël, M., Dunant, Y. y Manaranche, R. (1979) The present status of the vesicular hypothesis. *Prog. Neurobiol.* 13,237-275.
80. Iversen, L.L. (1979). The chemistry of the brain. *Sci. Amer.* 241, 118-129.
81. Iversen L.L. y Johnston, G.A.R. (1971). GABA uptake in rat central nervous system: comparison of uptake in slices and homogenates and the effects of some inhibitors. *J. Neurochem.* 18, 1939-1950.
82. Iversen, L.L. y Kelly, J.S. (1975). Uptake and metabolism of gamma-aminobutyric acid by neurons and glial cells. *Biochem. Pharmacol.* 24, 933-938.
83. Iversen, L.L., Schon, F.E. (1973). The use of autoradiographic techniques for the identification and mapping of transmitter specific neurons in CNS. In: *New concepts in neurotransmitter mechanisms*, (Mandell, A.J., ed.), pp. 153-193. Plenum Press, New York.
84. Iversen, L.L., Mitchell, J.F. y Srinivassan, V. (1971). The release of gamma-aminobutyric acid during inhibition in the cat visual cortex. *J. Physiol. Lond* 212, 519-534.

85. Jankowski, E. y Roberts, W.J. (1972). An electrophysiological demonstration of the axonal projection of single spinal interneurons in the cat. *J. Physiol. Lond* 222, 597-622.
86. Johnston, G.A.R. (1976). Physiologic pharmacology of GABA and its antagonist in the vertebrate nervous system. In: *GABA in nervous system function*. (Roberts, E.; Chase, T.N. and Tower, D.B., eds.), pp. 305-317. Raven Press, New York.
87. Kadota, K. y Kadota, T. (1973). Isolation of coated vesicles, plain synaptic vesicles and flocculent material from a crude synaptosome fraction of guinea pig whole brain. *Cell Biol.* 58, 135-151.
88. Kakiuchi, S., Sobue, K., Yamazaki, R. Kambayashi, J., Sakon, M. y Kasaki, G. (1981). Lack of tissue specificity of calmodulin: a rapid and high-yield purification method. *FEBS Lett.* 126, 203-207.
89. Kanner, B.I. (1978). Active transport of gamma aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochem.* 17, 1207-1211.
90. Kanner, B.I. y Sharon, I. (1978). Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochem.* 17, 3949-3953.
91. Kardos, J., Maderspach, K. y Simonyi, M. (1985). Towards a more physiological approach in GABA binding. *Neurochem. Int.* 7, 737-743.

92. Katz, B. y Miledi, R. (1972). The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J. Physiol. Lond* 224, 665-699.
93. Kingsbury, A.E., Wilkin, J.P., Patel, A.J. y Balázs, R. (1980). Distribution of GABA receptors in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* 35, 739-742.
94. Kiraly, M., Audigier, S., Tribollet, E., Barberis, C., Dolivo, M. y Dreifuss, J.J. (1986) Biochemical and electrophysiological evidence of functional vasopressin receptors in the rat superior cervical ganglion. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, in press.
95. Kisvárdy, Z.F., Cowey, A., Hodgson, A.J. y Somogyi, P. (1986). The relationship between GABA immunoreactivity and labelling by local uptake of [<sup>3</sup>H] GABA in the striate cortex of monkey. *Exp. Brain Res.* 62, 89-98.
96. Kopin, I. J., Breeze, G.R., Krauss, K.R. y Weise, V. K. (1968) Selective release of newly synthesized norepinephrine from the cat spleen during sympathetic nerve stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 161, 271-278.
97. Kravitz, E.A. y Potter, D.D. (1965). A further study of the distribution of gamma-aminobutyric acid between excitatory and inhibitory axons of the lobster. *J. Neurochem.* 12, 323-329.
98. Krnjevic, K. (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54, 418-540.



99. Krnjevic, K. y Phillis, J.W. (1963). Iontophoretic studies on neurones in the mammalian cerebral cortex. *J. Physiol. Lond* 165, 274-304.
100. Kuffler, S.W. y Yoshikami, D. (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J. Physiol. Lond* 251, 465-482.
101. Kurioka, S., Hayata, H. y Matsuda, M. (1981). Characterization of gamma-aminobutyric acid binding sites on crude synaptic membranes. *J. Neurochem.* 37, 283-288.
102. Kurokawa, M.T., Sakamoto, M.T. y Kato, M. (1965). Distribution of sodium-plus-potassium-stimulated adenosine-triphosphatase activity in isolated nerve-ending particles. *Biochem. J.* 97, 833-844.
103. Lagos, N., Valdés, F., Muñoz, C. y Orrego, F. (1980). ¿Existe GABA en vesículas sinápticas del SNC de rata? *Arch. Biol. Med. Exp.* 13: R79.
104. Lagos, N., Valdés, F. y Orrego, F. (1983). A search for endogenous modulators of the GABA receptor in different regions of the rat CNS. *Neurochem. Int.* 5, 325-331.
105. Lara, H. (1985). Tesis de Doctorado en Bioquímica: Purificación y caracterización bioquímica y funcional de las vesículas noradrenérgicas de ovario de gato y su modificación por hormonas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

106. Legget Bailey, J. (1962)a. Paper chromatography of amino acids and peptides. In: Techniques in protein chemistry. Elsevier, chapter 1, pp. 1-36.
107. Legget Bailey, J. (1962)b. High-voltage paper electrophoresis. In: Techniques in protein chemistry. Elsevier, chapter 2, pp. 37-55.
108. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
109. Lundberg, J.M. y Hökfelt, T. (1983) Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *TINS.* 6,325-333.
110. Mangan, J.L. y Whittaker, V.P. (1966). The distribution of free amino acids in subcellular fractions of guinea-pig brain. *Biochem. J.* 98, 128-137.
111. Martin, I.L. (1984). The benzodiazepine receptor functional complexity. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 343-347.
112. Maurer, R. (1979). [<sup>3</sup>H] Muscimol binding to rat cerebellar membranes. In: *GABA-Biochemistry and CNS Functions.* (Mandel, P. and De Feudis, F.V., eds.), pp. 363-370. Plenum Press, New York.
113. Mather, I.H. y Tamplin, C.B. (1979). A method for the determination of protein in the presence of Triton X-100. *Anal. Biochem.* 93, 139-142.

114. Massotti, M. Guidotti, A. y Costa, E. (1981). Characterization of benzodiazepine and gamma-aminobutyric recognition sites and their endogenous modulators. *J. Neurosci.* 1, 409-418
115. McIlwain, H. y Snyder, S.H. (1970). Stimulation of piriform and neocortical tissue in an in vitro flow-system: Metabolic properties and release of putative neurotransmitters. *J. Neurochem.* 17, 521-530.
116. Meyer, D.K. y Krauss, J. (1983) Dopamine modulates cholecystokinin release in neostriatum. *Nature, Lond.* 301, 338-340.
117. Michell, R. H. y Bone, E. A. (1984) Inositol lipid hydrolysis as a signal generator in sympathetic ganglia and in peripheral cells responding to catecholamines or vasopressin. In: *Adrenergic Receptors; Molecular properties and Therapeutic Implications.* (Lefkowitz, R.J. y Lindenlaub, E., eds) pp. 399-411. Schattauer Verlag, Stuttgart.
118. Mitchell, R. y Fleetwood-Walker, S. (1981) Substance P, but not TRH modulates the 5-HT autoreceptor in ventral lumbar spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* 76, 119-120.
119. Morgan, I.G. (1980) Synaptosomes and cell separation. In: *Comentaries in the Neurosciences.* (Smith, A.D., Llinas, R. y Kostyuk, P.G., eds.), pp. 3-10 Pergamon Press. New York.
120. Morgan, I. G. , Vicendon, G. y Gombos , G. (1973) Adult rat brain synaptic vesicles. I. Isolation and characterization. *Biochem. Biophys. Acta*, 320, 671-680.

121. Morris, S. J. (1973) Removal of residual amounts of acetylcholinesterase and membrane contamination from synaptic vesicles isolated from the electric organ of *Torpedo*. *J. Neurochem.* 21,713-715.
122. Nagy, A. y Delgado-Escueta, V. A. (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* 43,1114-1123.
123. Nagy, A., Baker, R. R., Morris, S. J. y Whittaker, V. P. (1976) The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res.* 109,285-309.
124. Nagy, A. Verady, Gy., Joo, F., Rakonczay, Z. y Pilc, A. (1977). Separation of acetylcholine and catecholamine containing synaptic vesicles from brain cortex. *J. Neurochem.* 29,449-459.
125. Naito, S. y Ueda, T. (1983). Adenosine triphosphate- dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 258,696-699.
126. Naito, S y Ueda, T. (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44,99-109.
127. Napias, C., Bergman, M.O., Van Ness, P.C., Greenlee, D.V. y Olsen, R. W. (1980). GABA binding in mammalian brain: inhibition by endogenous GABA. *Life Sci.* 27,1001-1011.

128. Navone, F., Greengard, P. y De Camilli, P. (1984). Synapsin I in nerve terminals: selective association with small synaptic vesicles. *Science*, 226, 1209-1211.
129. Nieoullon, A., Cheramy, A., y Glowinski, J. (1977). Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature, Lond.* 260, 375-377.
130. Nishimura, Y., Schwartz, L.M. y Rakic, P. (1986). GABA and GAD immunoreactivity of photoreceptor terminals in primate retina. *Nature, Lond.* 320, 753-756.
131. Oertel, W. H., Graybiel, A.M., Mugnaini, E., Elde, R.P., Schmechel, E. y Kopin, I. J. (1983). Coexistence of glutamic acid decarboxylase- and somatostatin-like immunoreactivity in neurons of the feline nucleus reticularis thalami. *J. Neurosci.* 3, 1322-1332.
132. Oja, S. S. y Lähdesmäki, P. (1974). Is taurine an inhibitory neurotransmitter? *Med. Biol.* 52, 138-143.
133. Okamoto, K., Kimura, H. y Sakai, Y. (1983)a. Effects of taurine and GABA on Ca spikes and Na spikes in cerebellar Purkinje cells in vitro: intrasomatic study. *Brain Res.* 260, 249-259.
134. Okamoto, K., Kimura, H. y Sakai, Y. (1983)b. Ionic mechanisms of the action of taurine on cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro: intradendritic study. *Brain. Res.* 260, 259-261.

135. Orrego, F. (1979). Criteria for the identification of central neurotransmitters and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro. *Neurosci.* 4,1037-1057.
136. Orrego,F., Lagos, N., Riveros, N. y Valdés, L.F. (1986).Endogenous GABA:presence in rat brain synaptic vesicles, release, and postsynaptic effec. In :GABA and Endocrine Function . Adv. in Biochem.Psychoph. 42,(Donoso, A.O and Racagni,G., eds.) Raven Press, New York.
137. Otsuka,M.(1976). GABA in crustacean nervous system: a historical review. In: GABA in Nervous System Function. (Roberts, E.,Chase, T. N. y Tower,D.B. eds),pp.245-249. Raven Press,New York.
138. Otsuka, M.,Obata,K.,Miyata,Y., y Tanaka,Y. (1971). Measurement of gamma-aminobutyric acid in isolated nerve cells of cat central nervous system. *J. Neurochem.* 18,287-295.
139. Palay,S.L. y Palade,G.E.(1954).Electron microscope study of the cytoplasm of neurones. *Anat. Rec.* 116, 336.
140. Pastuszko,A., Wilson, D.F. y Erecinska, M. (1981). Net uptake of gamma-aminobutyric acid by a high affinity system of rat brain sinaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78,1242-1244.
141. Pastuszko, A.Wilson, D. F. y Erecinska.M. (1982). Energetics of gamma-aminobutyrate transport in rat brain synaptosomes. *J. Biol.Chem.* 257, 7514-7519.

142. Peters, A., Palay, S.L. y Webster, H. De F. (1970). the fine structure of the nervous system. Harper and Row, New York.
143. Philippu, A. y Beyer, J. (1973). Dopamine and noradrenaline transport into subcellular vesicles of striatum. Naunyn. Schmied. Arch. Pharmacol. 278, 387-402.
144. Philippu, A. y Matthaei, H. (1975). Uptake of serotonin, gamma-aminobutyric acid and histamine into synaptic vesicles of the pig caudate nucleus. Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol. 287, 191-204.
145. Potter, L.T. (1970) Synthesis, storage and release of [ $^{14}$ C] acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles. J. Physiol. Lond. 206, 145-166.
146. Puij, E. (1981). S-Glutamate: its interactions with spinal neurons. Brain Res. Rev. 3, 229-322.
147. Pycock, C. J. y Kerwin, R. W. (1981) the status of glycine as a supra-spinal neurotransmitter. Life Sci. 28, 2679-2686.
148. Radian, R. y Kanner, B.I. (1983). Stiochiometry of sodium and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transport by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. Biochem. 22, 1236-1241.
149. Ramsay, P.B., Krigman, M. R. y Morell, P. (1980). Developmental studies of the uptake of choline, GABA and dopamine by crude synaptosomal preparations after in vivo lead treatment. Brain Res. 187, 383-402.

150. Ranck, J.B. (1975). Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res.* 98, 417-440.
151. Rassin, D.K. (1972). Amino acids as putative transmitters: failure to bind to synaptic vesicles of guinea pig cerebral cortex. *J. Neurochem.* 19, 139-148.
152. Riback, C.E. (1985). Axon terminals of GABA-ergic chandelier cells are lost at epileptic foci. *Brain Res.* 326, 251-260.
153. Riback, C.E., Vaughn, J.E. y Saito, K. (1978). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140, 315-332.
154. Riveros, N., Fiedler, J., Lagos, N., Muñoz, C., y Orrego, F. (1986). Glutamate in rat brain cortex synaptic vesicles: influence of the vesicle isolation procedure. *Brain Res.* 386, 405-408.
155. Roberts, E. (1974). Gamma-aminobutyric acid and nervous system function. A Perspective. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2637-2649.
156. Roberts, E., y Frankel, S. (1950). Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187, 55-63.



157. Roberts, E., Baxter, C.F., Van Harreveld, A., Wiersma, C.A.G., Adey, W.R. y Killam, K.F. (eds) (1960). Inhibition in the Nervous System and Gamma-Aminobutyric Acid. Pergamon Press, Oxford.
158. Roberts, E., Chase, T. N. y Tower, D. B. (eds) (1976). GABA in Nervous System Function. Raven Press, New York.
159. Sandoval, M.E., Horch, P. y Cotman, C. W. (1978). Evaluation of glutamate uptake as a hippocampal neurotransmitter: glutamate uptake and release from synaptosomes. Brain Res. 142, 285-299.
160. Schoch, P., Häring, P., Tabacs, B., Stähli, C. y Möhler, H. (1984). A GABA/Benzodiazepine receptor complex from bovine brain: purification, reconstitution and immunological characterization. J. Recept. Res. 4, 189-200.
161. Schoch, P., Richards, J.G., Häring, P., Takacs, B., Stähli, C., Staehelin, T. Haefely, W. y Möhler, H. (1985). Co-Localization of GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepine receptors in the brain shown by monoclonal antibodies. Nature, Lond. 314, 168-171.
162. Schuurmans Steckhoven, F.M.A.H., De Pont, J.J.H.H.M. y Bonting, S.L. (1976). Studies on (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase. XXXVII. Stabilization by cations of the enzyme-ouabain complex formed with Mg<sup>2+</sup> and inorganic phosphate. Biochim. Biophys. Acta, 419, 137-149.

163. Seidler, F.J., Kirksey, D.F., Lau, C., Whitmore, W.L. y Slotkin, T.A. (1977). Uptake of (-) [ $^3$ H] norepinephrine by storage vesicles prepared from whole rat brain: properties of the uptake system and its inhibition by drugs. *Life Sci.* 21, 1075-1086.
164. Seguela, P., Gamrani, H., Geffard, M., Calas, A. y LeMoal, M. (1985). Ultrastructural immunocytochemistry of gamma-aminobutyrate in the cerebral and cerebellar cortex of the rat. *Neurosci.* 16, 865-874.
165. Simantov, R., Oste-Granite, M.L., Herndon, R.L. y Snyder, S. H. (1976). Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding selectively depleted by a viral-induced granule cell loss in hamster cerebellum. *Brain Res.* 105, 365-371.
166. Simmonds, M. A. (1983). Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. *TINS*, 6, 279-281.
167. Sjöstrand, F.S. (1953). The ultrastructure of the retinal rod synapses the guinea pig eye. *J. Appl. Physiol.* 24, 1422.
168. Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Whitmore, W.L., Salvaggio, M. y Lau, C. (1978). Ionic and nucleotide cofactor requirements for uptake of [ $^3$ H] norepinephrine by rat brain synaptic vesicle preparations. *Molec. Pharmacol.* 14, 828-876.

169. Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Whitmore, W.L., Salvaggio, M. y Bareis, L.D. (1980). Release of [ $^3$ H] norepinephrine from synaptic vesicles isolated from rat brain after the intracisternal administration of [ $^3$ H] norepinephrine: influence of nucleotides, ions and drugs, and destabilization of transmitter storage caused by acute or chronic lithium administration. *Neurosci.* 5, 753-762.
170. Smith, A.D. (1973). Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves. *Br. med. Bull.* 29, 123-129.
171. Smith, A. D., De Potter, W. P., Noerman, E. J. y De Schaepestryver, A. F. (1970). Release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase and chromogranin A upon stimulation of splenic nerve. *Tissue and Cell* 2, 547-568.
172. Somogyi, P., Hodgson, A. J., Smith, A. D., Nunzi, M. G., Gorio, y J. (1984). Different populations of GABA-ergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J. Neurosci.* 4, 2590-2603.
173. Starr, M.S. (1982). Influence of peptide on  $^3$ H-dopamine release from superfused rat striatal slices. *Neurochem. Int.* 4, 233-240.
174. Stevinoha, W. B. y Weintraub, S. J. (1974). Choline content of rat brain. *Science*, 183, 964-965.

175. Storm-Mathisen, J., Leknes, A. K., Bore, A.T., Vealand, J. L., Edminson, P., Haug, F.M.S. y Ottersen, O.P. (1983). First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature, Lond.* 301,517-520.
176. Syngge, R.L.M. (1951). Methods for isolating  $\gamma$ -amino acids: gamma-aminobutyric acid from rye grass. *Biochem. J.* 48,429-435.
177. Szerb, J.C. (1979). Relationship between  $Ca^{2+}$ -dependent and independent release of [ $^3H$ ] GABA evoked by high  $K^+$ , veratridine or electrical stimulation from rat cortical slices. *J. Neurochem.* 32, 1565-1573.
178. Takeuchi, A. (1976). Studies of inhibitory effects of GABA in vertebrate nervous systems. In: *GABA in Nervous System Function*. (Roberts, E., Chase, T.N. y Tower, D.B. eds) pp. 255 - 267, Raven Press, New York.
179. Tauc, L. (1962). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Physiological Rev.* 63,857-893.
180. Tauc, L., Hoffmann, A., Tsuji, S., Hinzen, D.H. y Fäille, L. (1974) Transmission abolished on a cholinergic synapse after injection of acetylcholinesterase into the presynaptic neurone. *Nature, Lond.* 257, 496-488.

181. Thierry, A.M., Blanc, G., Sobel, A., Stinus, L. y Glowinski, J. (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science*, 182, 499-501.
182. Toffano, G., Guidotti, A. y Costa, E. (1978). Purification of an endogenous protein inhibitor of the high affinity binding of GABA to synaptic membranes of rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 75, 4024-4028.
183. Torri-Tarelli, F., Grohovaz, F., Fesce, R. y Ceccarelli, B. (1985) Temporal coincidence between synaptic vesicle fusion and quantal secretion of acetylcholine. *J. Cell Biol.* 101, 1386-1399.
184. Uchizono, K., Ohsawa, K., Ikemoto, H. y Al-Samarrai, S. (1979). Morphological and biochemical properties of synaptic vesicles isolated from guinea pig brain. *Neurosci.* 4, 593-601.
185. Valdés, F., y Orrego, F. (1978). Electrically induced, calcium-dependent release of endogenous GABA from rat brain cortex slices. *Brain Res.* 141, 357-363.
186. Vargas, O. y Orrego, F. (1976). Elevated extracellular potassium as a stimulus for releasing [ $^3\text{H}$ ] norepinephrine and [ $^{14}\text{C}$ ] alpha-aminoisobutyrate from neocortical slices. Specificity and calcium dependency of the process. *J. Neurochem.* 26, 31-34.
187. Watkins, J.C. y Evans, R.H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 165-204.

188. Werman, R., Davidoff, R.A. y Aprison, M.H. (1968) Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 31,81-95.
189. White J.D. Stewart, K.D., Krause, J.E. y Mc Keluy, J.F. (1985) Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Physiol. Rev.* 65,553-606.
190. Whittaker, V.P. (1965) The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain fuction. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 15,39-96.
191. Whittaker, V.P. (1985). The synaptic vesicle. In: *Handbook of Neurochem.* (Lajtha, A., ed.) 2nd ed, 7, pp 41-69. Plenum Press, New York.
192. Whittaker, V.P. y Sheridan, M.M. (1965). The morphology and acetylcholine content of cerebral cortical synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 12, 363-372.
193. Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. y Kirkland, R.J.A. (1963) the separation of synaptic vesicles from disrupted nerve ending particles. *Biochem. Pharmac.* 12,300-302.
194. Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. y Kirkland, R.J.A. (1964) The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem. J.* 90,293-303.

195. Wilson, W.S., Schulz, R.A. y Cooper, J.T. (1973). The isolation of cholinergic synaptic vesicles from bovine superior cervical ganglion and estimation of their acetylcholine content. *J. Neurochem.* 20, 659-667.
196. Williams, M. y Risley, E. A. (1979). Characterization of the binding of [<sup>3</sup>H] Muscimol, a potent GABA agonist, to rat brain synaptosomal membranes using a filtration assay. *J. Neurochem.* 32, 713-718.
197. Wise, B.C., Guidotti, A. y Costa, E. (1983). Phosphorylation induces a decrease in the biological activity of the protein inhibitor (GABA-modulin) of gamma-aminobutyric acid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 886-890.
198. Yamamoto, T., Nanjoh, Ch. y Kuruma, I. (1985). Determination of endogenous GABA released from the cerebral cortex slices of the rat by high-performance liquid chromatography with a series-dual electrochemical detector. *Neurochem. Int.* 7, 77-82.
199. Yoneda, Y., y Kuriyama, K. (1980). Presence of a low molecular weight endogenous inhibitor on [<sup>3</sup>H] Muscimol binding in synaptic membranes. *Nature, Lond.* 285, 670-673.
200. Zachonski, A. y Paraf, A. (1974). Use of a concanavalin A polymer to isolate right side-out vesicles of purified plasma membranes from eukariotic cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 57, 787-7992.

201. Zimmerman, H. (1979). Vesicle recycling and transmitter release. In: Commentaries in the Neuroscience, (Smith, A.D., Llinas, R. y Kostyuk, P. G. ,eds.) pp 95-124. Pergamon Press, New York.
202. Zimmerman, H. y Whittaker, V.P. (1974). Effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electrical organ of Torpedo: a combined biochemical, electrophysiological and morphological study. *J. Neurochem.* 22, 435-450.
203. Zukin, S.R., Young, A.B y Snyder, S.H. (1974). Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 71, 4802-4807.