

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 161-Tom
Secreción y reutilización de trifosf
Tomás Ferré, José María.
1031591



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

José María Tomás Ferré

Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.

161 Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos/ J. María Tomás Ferré

FJM
Uni-
161
Tom
161

Fundación Juan March
Serie Universitaria



161

José María Tomás Ferré

**Secreción y reutilización de trifosfato
de adenosina (ATP) por
sinaptosomas colinérgicos**



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1979, individual
Departamento de MEDICINA, FARMACIA Y VETERINARIA
Centro de trabajo: Cátedra de Histología y Embriología General
de la Facultad de Medicina de la Universidad
de Barcelona.*

Los Textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M - 25871 - 1981
I.S.B.N.: 84 - 7075 - 210 - 3
Impresión: Gráficas Ibéricas, Tarragona, 34, Madrid-7

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda del Prof. Diego Rivas y la colaboración de los Doctores J. Marsal, J. Esquerda y C. Solsona.

I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	7
MATERIAL Y METODOS	9
1. AISLAMIENTO DE SINAPTOSOMAS	9
1.1. Animales	9
1.2. Método de aislamiento	9
1.3. Métodos analíticos	9
1.4. Microscopía electrónica	10
2. DOSIFICACION DE ATP	10
3. LIBERACION DE ACETILCOLINA (ACh)	11
4. CAPTACION DE ADENOSINA POR LOS SINAPTOSOMAS	11
4.1. Curso temporal	11
4.2. Captación de adenosina en función de la concentración externa.	12
4.3. Centelleo líquido	12
RESULTADOS	13
Características de la fracción de sinaptosomas	13
Liberación de ATP	13
Liberación de ATP y ACh por sinaptosomas tratados con toxina botulínica	13
Captación de adenosina por los sinaptosomas	18
Alteración del gradiente de sodio	18
Papel del calcio intrasinaptosomal	23
Efecto de la depolarización potásica sobre la captación de adenosina..	27
DISCUSION	30
BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUCCION

Las células excitables secretan trifosfato de adenosina (ATP) durante la actividad eléctrica de la membrana (Silinsky, 1975), la activación es específica por un neurotransmisor (Israel y cols., 1976; Israel y Meunier, 1978) y la depolarización inespecífica con elevado potasio extracelular o con drogas depolarizantes (White, 1978). Este fenómeno general incluye la liberación del nucleótido en terminaciones nerviosas sensitivas (Holton y Holton, 1953), motoras (Silinsky y Hubbard, 1973) y autónomas (Burnstock, 1972); en sinaptosomas centrales y periféricos (Kuroda y McIlwain, 1974; Israel y Meunier, 1978), tejidos cerebrales (McIlwain, 1972), membranas postsinápticas (Israel y cols., 1976) y membranas extrasinápticas de células nerviosas y musculares (Abood y cols, 1962; Boyd y Forrester, 1968).

El ATP liberado es hidrolizado rápidamente en el espacio extracelular por la actividad ectoATPasa y 5'-nucleotidasa membranaria apareciendo como producto final de degradación la adenosina, una parte de la cual es inactivada por desaminación a inosina (Dowdall, 1978; Zimmermann y cols., 1979). Sin embargo, la utilización de técnicas con muy escasa inercia temporal como la reacción específica entre el complejo luciferina-luciferasa con el ATP liberado y cuantificación de los fotones emitidos (Ver métodos y Lundin y Thore, 1975) ha permitido en algunos casos precisar la liberación de ATP y monitorizar directa y continuamente el curso temporal del fenómeno antes de que tenga lugar la hidrólisis extracelular o simultáneamente con ella.

El mecanismo(s) básico(s) de liberación de ATP no está completamente elucidado. En lo que se refiere a la secreción por la membrana presináptica, se especula con la posibilidad de que su neurosecreción acompañe a la del transmisor durante la exocitosis, en aquellos casos en los que el ATP no sea, el mismo, el neurotransmisor (Burnstock, 1972). Esta hipótesis, se basa en el hecho de que las vesículas sinápticas contienen ATP junto con el neurotransmisor. Está bien establecido que las vesículas colinérgicas con

tienen ATP en una definida relación estequiométrica con respecto a la acetilcolina (ACh) (razón molar ACh:ATP = 3-5:1) (Dowdall y cols., 1974). Existe una relación similar en gránulos o vesículas que almacenan aminas (Taugner y cols., 1979). Así mismo, una comparación entre el recambio de ACh y nucleótidos de adenina en vesículas colinérgicas estudiado por medio de la incorporación de precursores radioactivos, sugiere que en estas vesículas existe un recambio similar de ambas moléculas (Zimmermann y cols., 1979). En este trabajo, hemos estudiado la liberación de ATP con esta óptica relacionando la liberación del nucleótido con la del neurotransmisor acetilcolina en nuestro modelo experimental.

En cualquier caso, la concentración de ATP en la hendidura sináptica durante la actividad nerviosa -ATP procedente de la membrana presináptica y del componente postsináptico- ha sido calculada entre 100-400 μ M (Ribeiro, 1979). En este margen de concentraciones, los derivados de adenina desempeñan varias acciones fisiológicas descritas para el mismo ATP y para el más activo producto de su degradación, la adenosina. Una de estas acciones descrita por nosotros es la inhibición de la entrada de calcio en terminaciones nerviosas durante la depolarización (Marsal y cols., 1980), y subsecuentemente la inhibición de la liberación de neurotransmisor que es estrictamente calcio-dependiente (Ginsborg y Hirst, 1972; Miledi y cols., 1978). La adenosina es más efectiva en este sentido que sus derivados más fosforilados (Israel y cols., 1977; Marsal y cols., 1980).

Esta acción de los nucleótidos de adenina es inactivada por el funcionamiento de un mecanismo saturable de captación de adenosina localizado en la membrana de las terminaciones nerviosas y que alimenta un sistema intracelular de reutilización con la síntesis de nuevos compuestos fosforilados (Zimmermann y cols., 1979; Israel y cols., 1980). Este sistema de captación de adenosina ha sido estudiado en varias preparaciones de sistema nervioso central. Shimizu y cols., (1972) han demostrado un sistema de captación de alta afinidad en cortes de cerebro; Kuroda y McIlwain, (1974) y Bender y cols., (1980, 1981) han estudiado la incorporación de adenosina en sinapto

somas centrales; Meunier y Morel, (1978) y Zimmermann y cols., (1979) han descrito un sistema de reutilización similar en sinaptosomas del órgano eléctrico del elasmobranquio Torpedo marmorata.

El segundo objetivo de este trabajo ha sido caracterizar el sistema de captación de adenosina y estudiar su eficacia durante algunas modificaciones de los gradientes iónicos transmembranarios, flujos iónicos y fundamentalmente de la concentración intracelular de calcio en sinaptosomas colinérgicos de Torpedo.

MATERIAL Y METODOS

1. Aislamiento de sinaptosomas

1.1. Animales. Los experimentos se han realizado con animales de la especie Torpedo marmorata provenientes del Mediterráneo y mantenidos en agua de mar circulante en el Acuario de Barcelona. Los animales se han anestesiado con MS222 (Sandoz) antes de la excisión de bloques de tejido electrógeno.

1.2. Método de aislamiento. El aislamiento de los sinaptosomas se ha llevado a cabo por un método adoptado de de Israel y cols., (1976) y Morel y cols., (1977). El procedimiento implica el fraccionamiento gradual del tejido electrógeno filtrándolo bajo presión reducida a través de sucesivas mallas calibradas de metal y nylon, y centrifugando el material resultante en un gradiente de densidad discontinuo de sacarosa. El contenido de la solución fisiológica empleada ha sido el siguiente: NaCl, 280 mM; KCl, 3.0 mM; CaCl₂, 3.4 mM; MgCl₂, 1.8 mM; HEPES/ NaOH, 3.6 mM; urea, 300 mM; sacarosa, 100 mM; glucosa, 5.5 mM y NaHCO₃, 5 mM. Este medio se ha oxigenado y su pH ajustado a 7.0-7.1 con la adición de NaHCO₃.

La fracción sinaptosómal se ha sedimentado por centrifugación y los sinaptosomas resuspendidos en 4 ml de la solución fisiológica mencionada, hasta 0.6-0.9 mg de proteína/ml.

1.3. Métodos analíticos. La actividad lactato deshidrogenasa se ha estimado por el método de Johnson y Whittaker, (1963) modificado para la determinación del enzima ocluido por Marchbanks (1967). El contenido en la suspensión

de sinaptosomas del enzima ocluido se ha controlado al principio y al final de nuestros experimentos. El contenido en proteínas de la suspensión de sinaptosomas y en controles de los medios finales de incubación se ha determinado por el método de Lowry y cols. (1951) con albúmina sérica bovina como patrón.

1.4. Microscopia electrónica. Como control morfológico de la pureza de la fracción de sinaptosomas se ha teñido negativamente en cada experimento una gota de la suspensión de sinaptosomas con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 2% (pH:7.4), sobre una rejilla cubierta de formvar-carbón. En algunos experimentos, para un más seguro estudio ultraestructural, el sedimento obtenido a partir de 100 μ l de la suspensión de sinaptosomas se ha fijado en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato/HCl 0.4 M (pH:7.3) durante 30 minutos, lavado repetidas veces en el mismo tampón y postfijado en tetróxido de osmio al 2% en tampón cacodilato. La deshidratación se ha efectuado con etanol y la inclusión en Araldita. Las secciones ultrafinas se han montado en rejillas de cobre, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinadas finalmente y fotografiadas con un microscopio electrónico Philips EM-301.

2. Dosificación de ATP. La liberación de ATP por la preparación de sinaptosomas se ha medido continua y directamente por medio de la reacción enzimática del complejo luciferina-luciferasa con el ATP liberado (ver White, 1978). Se ha colocado en una cuveta cilíndrica 1 ml de diferentes diluciones de la suspensión de sinaptosomas (0.005-0.25 mg de proteína); en los experimentos con baja concentración de calcio extracelular, se han sedimentado alicuotas de la suspensión de sinaptosomas, lavado y resuspendido en una solución fisiológica sin calcio, y el contenido en proteínas redeterminado. En todos los casos, la cuveta se ha introducido en una cámara herméticamente cerrada a la luz externa y expuesta a un fotomultiplicador Hamamatsu R 374. Los experimentos se han iniciado con la inyección en la cuveta a través de una válvula de silicona de 20 μ l del complejo luciferina-luciferasa recientemente preparado. Este complejo se ha preparado diariamente añadiendo 0.2 ml de D-luci-

ferina sintética (5 mg/ml H₂O, almacenada a - 20°) a 0.2 ml de extracto crudo de "firefly" (50 mg Sigma FLE 50 en 2 ml de H₂O, preparada diariamente). Antes de iniciar cualquier manipulación experimental se ha esperado a la estabilización de la luz emitida visualizada con un registrador de pluma o un osciloscopio.

La depolarización potásica de los sinaptosomas se ha llevado a cabo por medio de la inyección de 10 µl de KCl 2 M, y la entrada directa de calcio en los sinaptosomas mediada por el ionóforo A23187 inyectando 10 µl de una solución alcohólica del compuesto (0.005 M).

En los experimentos con toxina botulínica -suministrada generosamente por el Instituto Pasteur-, los sinaptosomas se han preincubado por tiempo variable (1-24 h) con 6×10^4 DL₅₀ de la toxina (tipo A) por mg de proteína sinaptosomal antes de la depolarización potásica o de la introducción del ionóforo. Se han efectuado controles incubando la toxina con antisuero específico. En las experiencias con Hemicolinio-3 (HC-3) se ha seguido el mismo procedimiento (concentración final del compuesto de 100 µM).

3. Liberación de acetilcolina (ACh). En los experimentos de liberación de ACh se han marcado durante 60 minutos los compartimentos del neurotransmisor en sinaptosomas botulinizados o control incubandolos con 1 µCi/ml de 1-¹⁴C acetato (actividad específica 57mCi/mmol) y posteriormente se les ha separado por medio de un filtro Millipore (1.2 µm de poro); los sinaptosomas retenidos en el filtro han sido perfundidos y lavados durante 15 minutos con solución fisiológica y depolarizados al final de este tiempo incrementando la concentración extracelular de potasio hasta 20 mmolar. Las gotas del efluente se han recuperado en viales y la radioactividad contada como en 4.3.

4. Captación de adenosina por los sinaptosomas.

4.1. Curso temporal. Se ha utilizado 2-³H adenosina (21 Ci/mmol.). En todos los experimentos se han centrifugado alícuotas de 100 µl de la suspensión de sinaptosomas, resuspendiendo el sedimento en 1 ml del mismo medio o de una de las soluciones iónicas modificadas; la composición de las distintas soluciones se especifica al pie de las figuras. Después de 1 minuto de preincuba

ción, se ha iniciado el experimento de captación añadiendo 1 μCi del compuesto radioactivo. En algunos experimentos se ha incubado a los sinaptosomas durante 2 minutos en una solución fisiológica conteniendo 50 μM del ionóforo A23187 antes de iniciar el experimento de captación con la adición de adenosina tritiada. La preincubación con ouabaina (10^{-4} M) se ha prolongado durante 2 horas antes del experimento de captación. En todas las condiciones y puesto que no se ha incluido adenosina no radioactiva, la concentración final del nucleósido en el medio de incubación es de 0.04 μM . En los tiempos elegidos, se ha separado rápidamente a los sinaptosomas del medio de incubación reteniéndolos en filtros Millipore y lavandolos con 20 ml del mismo medio sin trazador radioactivo mantenido a 0-4°. En todos los experimentos se han efectuado controles filtrando solo el isótopo-adenosina y restando la radioactividad de fondo de los resultados individuales.

4.2. Captación de adenosina en función de la concentración externa.

Se ha seguido el mismo procedimiento que en 4.1, incubando previamente los sinaptosomas durante 30 minutos con varias concentraciones externas de adenosina y calculando el total incorporado a partir de la radioactividad específica de la adenosina extracelular.

4.3. Centelleo líquido. Se ha efectuado la digestión de los filtros Millipore desecados en 1 ml de dioxan, añadiendo 10 ml de la mezcla Tolueno/Tritón X-100 (3:1) que contiene PPO 5 g/l y POPOP 0.2 g/l. La radioactividad en los viales se ha medido con un contador de centelleo líquido Packard TriCarb. La eficacia del conteo se ha determinado usando un procedimiento de estandarización externo; la eficacia media ha sido de cerca del 60%.

Los resultados están expresados generalmente en términos de picomoles de ^3H adenosina acumulados por mg de proteína. Se han calculado los valores extrapolados a tiempo cero representando fijación inespecífica del trazador, y restandolos en los experimentos cuantitativos.

RESULTADOS

Características de la fracción de sinaptosomas. Los controles de microscopía electrónica efectuados revelan una alta homogeneidad y pureza de la fracción subcelular utilizada que está constituida por sinaptosomas aislados y bien cerrados con el citoplasma ocupado por abundantes vesículas sinápticas y algunas vacuolas y mitocondrias. En nuestros controles morfológicos solo raramente puede observarse alguna membrana postsináptica. Estos sinaptosomas, pueden ser incubados por varias horas sin daño aparente.

El contenido en lactato deshidrogenasa ocluida de la suspensión de sinaptosomas se ha controlado al inicio y al final de los experimentos sin disminución significativa de la actividad enzimática ocluida.

Liberación de ATP. La depolarización de los sinaptosomas por la elevación del potasio extracelular hasta 20–23 mM, manteniendo la concentración fisiológica de calcio (3.4 mM) induce una rápida emisión luminosa debida a la reacción específica entre el ATP liberado y el complejo luciferina–luciferasa que es equivalente en su punto máximo a 425 ± 80 picomoles de ATP/ mg de proteína. En las mismas condiciones experimentales, el ionóforo de calcio A23187 (50 μ M como concentración final) induce una más intensa y prolongada liberación equivalente en el punto máximo a 4.09 ± 1.7 nanomoles de ATP/ mg de proteína. Cuando la depolarización potásica y el incremento en la permeabilidad cálcica mediado por el ionóforo se llevan a cabo en una solución fisiológica carente de calcio, no puede detectarse ninguna emisión luminosa correspondiente a la liberación de ATP por los sinaptosomas (Figura 1 y 2). En los experimentos con calcio externo como sin calcio extracelular, el ATP total de los sinaptosomas medido tras la lisis de membranas con Tritón X-100 (10 μ l, 20%) no se modifica significativamente, (ATP total = 26.5 ± 5.5 nanomoles/ mg de proteína).

Liberación de ATP y ACh por sinaptosomas tratados con toxina botulínica. En los sinaptosomas botulinizados (una hora de preincubación con la toxina a la temperatura del laboratorio), la liberación de ACh por depolarización potásica

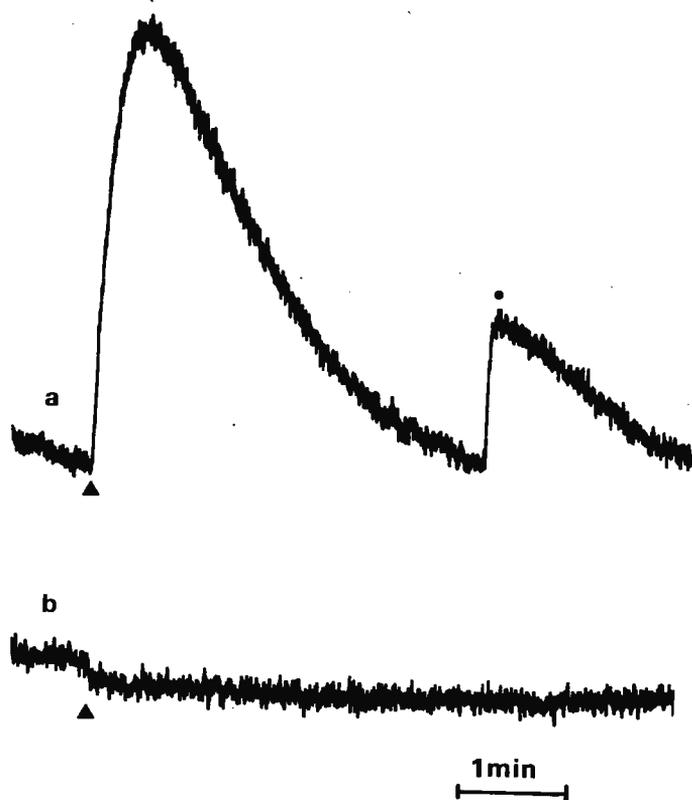


Figura 1. (a) liberación de ATP por sinaptosomas de Torpedo al ser depolarizados por la elevación del potasio extracelular hasta 20 mM (▲). Patrón de 16 picomoles de ATP exógeno (●). En (b), el medio externo no contiene calcio y la depolarización no induce liberación de ATP. Proteínas en la suspensión de sinaptosomas: 100 $\mu\text{g/ml}$.

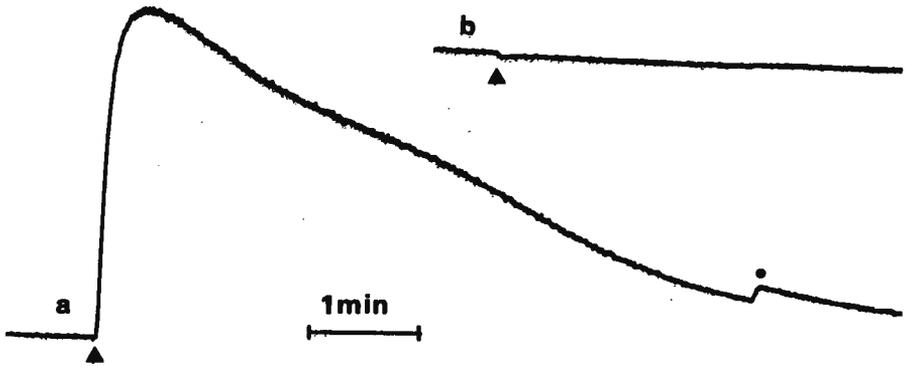


Figura 2. Liberación de ATP por sinaptosomas de Torpedo. (a) emisión luminosa correspondiente a la liberación de ATP por los sinaptosomas al introducir en el medio el ionóforo A23187 (50 μ M final) (\blacktriangle). Patrón de 16 picomoles de ATP exógeno (\bullet). En (b) el medio fisiológico no contiene calcio y el ionóforo no induce liberación de ATP. Proteínas en la suspensión: 100 μ g/ml.

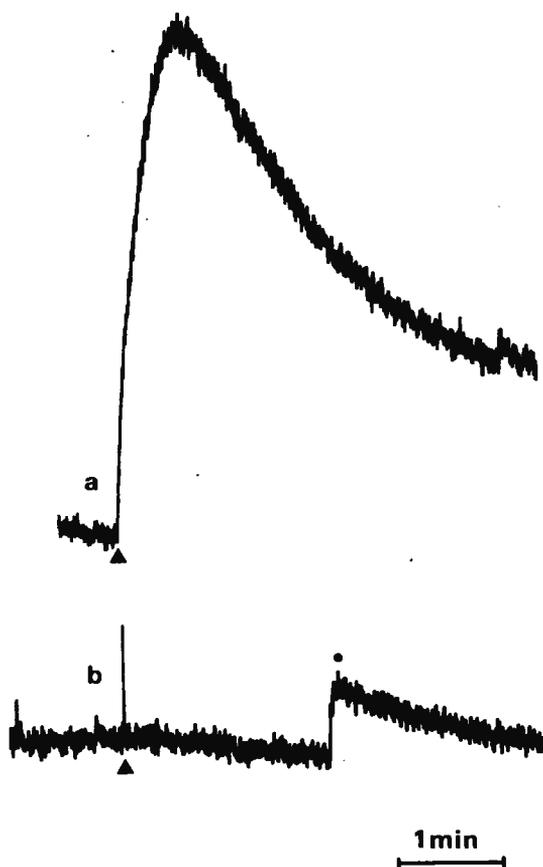


Figura 3. Sinaptosomas pretratados (1 h) con toxina botulínica (6×10^4 DL₅₀ de la toxina tipo A/mg de proteína); (a) liberación de ATP por sinaptosomas control no botulinizados al ser depolarizados (\blacktriangle) por la elevación del potasio extracelular hasta 20 mM. (b) ausencia de liberación de ATP en las mismas condiciones por los sinaptosomas botulinizados; la rápida inflexión del trazado al iniciar la depolarización (\blacktriangle) corresponde al artefacto de inyección de 10 μ l de KCl 2 M. Proteínas en la suspensión: 220 μ g/ml. Patrón de 16 picomoles de ATP exógeno (\bullet).

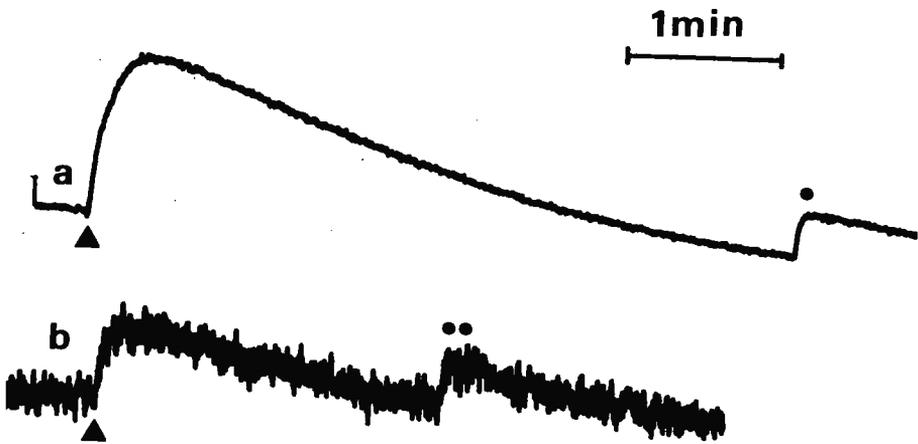


Figura 4. Sinaptosomas pretratados (1 h) con toxina botulínica (6×10^4 DL₅₀ de la toxina tipo A/mg de proteína); (a) liberación de ATP por sinaptosomas control no botulinizados al introducir en el medio el ionóforo A23187 (50 μ M final) (\blacktriangle). Patrón de 64 picomoles de ATP exógeno (\bullet). En (b), masiva reducción de la liberación de ATP por sinaptosomas botulinizados en las mismas condiciones. Patrón de 16 picomoles de ATP exógeno ($\bullet\bullet$). La sensibilidad del trazado en b es $\times 10$ la de a. Proteínas en la suspensión: 60 μ g/ml.

está significativamente reducida con respecto a los sinaptosomas control no botulinizados en más de un 80% en el punto de máxima liberación, como ha sido descrito en otros modelos. En las mismas condiciones experimentales no puede detectarse liberación de ATP por depolarización potásica (figura 3). La toxina botulínica también reduce significativamente la liberación de ATP inducida por el ionóforo A23187 con respecto a los sinaptosomas control no botulinizados, (Figura 4). El ATP total de los sinaptosomas botulinizados no está significativamente alterado con respecto al control.

Se han realizado algunos experimentos preincubando a los sinaptosomas hasta 6 horas con hemicolinio-3 (HC-3, 100 μM). En estas condiciones se bloquea la síntesis de ACh, reduciéndose en más de un 60% el contenido del transmisor en los sinaptosomas. La depolarización potásica en este caso, induce una liberación de ATP no significativamente diferente (alrededor del 15% de reducción) con respecto a los controles no tratados con HC-3.

Captación de adenosina por los sinaptosomas. Cuando se añade $2\text{-}^3\text{H}$ adenosina al medio fisiológico de incubación, el marcador se acumula rápidamente en las terminaciones nerviosas (Figura 5). La captación depende de la temperatura puesto que el enfriamiento rápido (flecha en la figura 5) de la suspensión frene bruscamente la incorporación. Así mismo, los sinaptosomas colinérgicos de Torpedo poseen un mecanismo saturable de captación de adenosina (Figura 6). La representación de Eadie-Hofstee de los datos muestra un componente para la captación de adenosina con una concentración media para la saturación del 50% del sistema de captación (K_m) de 3 μM , y una velocidad de transporte máxima (V_{max}) de 24 picomoles/min/mg de proteína.

Alteración del gradiente de sodio. En la figura 7 puede apreciarse una disminución significativa ($P < 0.01$; a un minuto la diferencia no es significativa) con respecto al control en la razón de incorporación de adenosina tritiada por los sinaptosomas de Torpedo cuando se incuban hasta 30 minutos en un medio externo sin sodio (el ión sodio sustituido por colina). En un medio de estas características, no se ha detectado liberación de ATP por los sinaptosomas. Cuando se incuban los sinaptosomas en un medio sin sodio y sin calcio

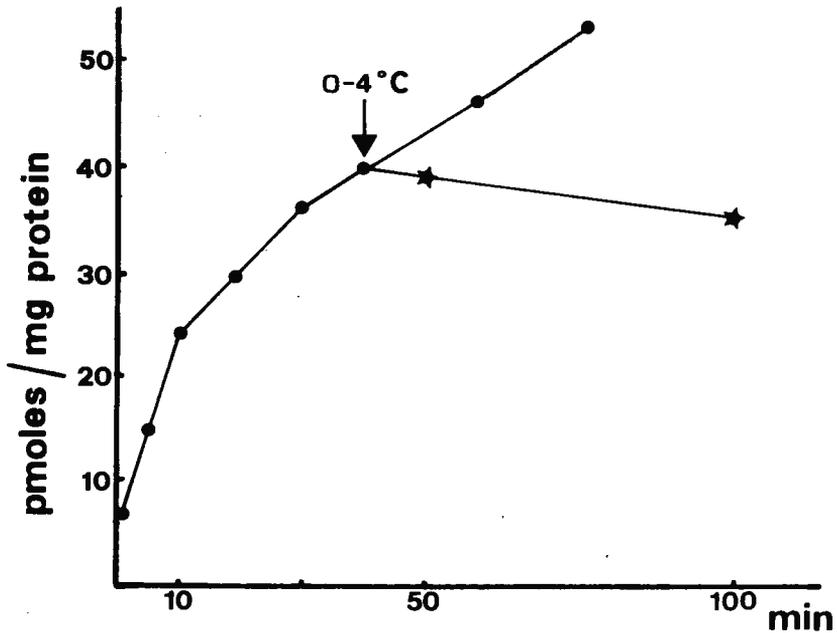


Figura 5. Curso temporal de la captación de ^3H -adenosina a la temperatura de laboratorio por los sinaptosomas de Torpedo. Puesto que no se ha añadido adenosina no radioactiva, la concentración final del nucleósido es de $0.04\ \mu\text{M}$. La flecha indica el tiempo en el que se toma una alicuota de la suspensión de sinaptosomas para enfriarla a $0-4^\circ\text{C}$; a partir de este momento, el curso temporal está señalado con asteriscos.

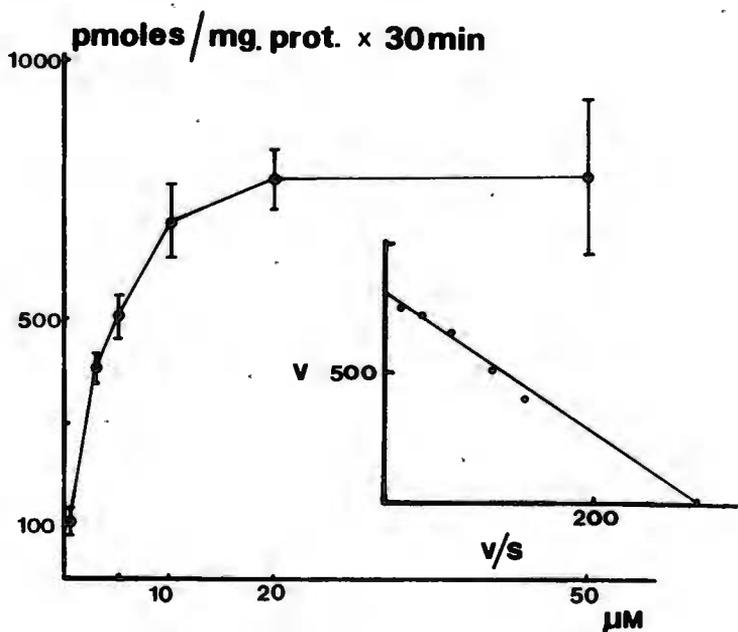


Figura 6. Captación de ^3H -adenosina en función de la concentración externa del nucleósido. La incubación se ha realizado durante 30 minutos a la temperatura del laboratorio y terminado por filtración Millipore rápida. Los datos corresponden a la media de 9 experimentos \pm DE. En la figura se incluye la representación de Eadie-Hofstee de los datos que muestra un componente para la captación de adenosina con $K_m = 3 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 24$ picomoles/min/mg de proteína. La recta ha sido calculada matemáticamente.

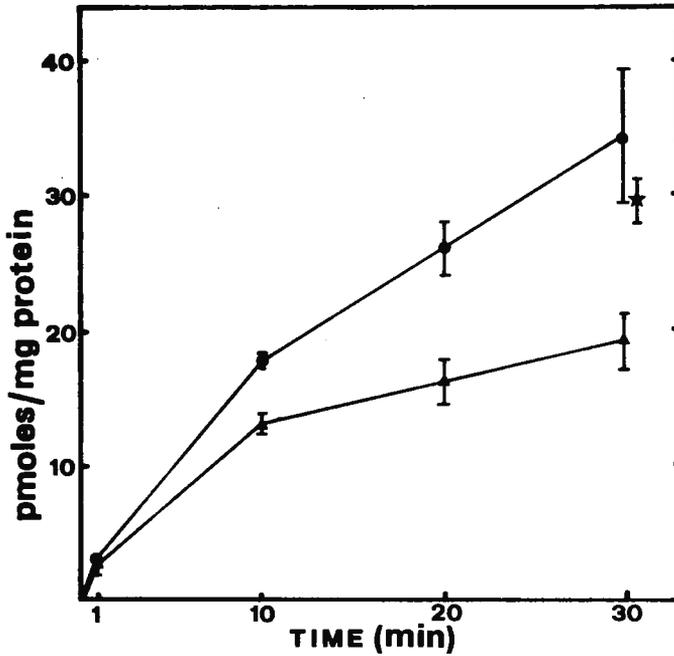


Figura 7. Curso temporal de la captación de ³H-adenosina (0.04 μ M) en solución fisiológica control (●) y en un medio con el ión sodio sustituido por colina(▲). El asterisco indica la incorporación de adenosina a los 30 minutos de incubación en una solución carente simultáneamente de sodio y calcio. Los datos corresponden a la media de 8 experimentos \pm DE.

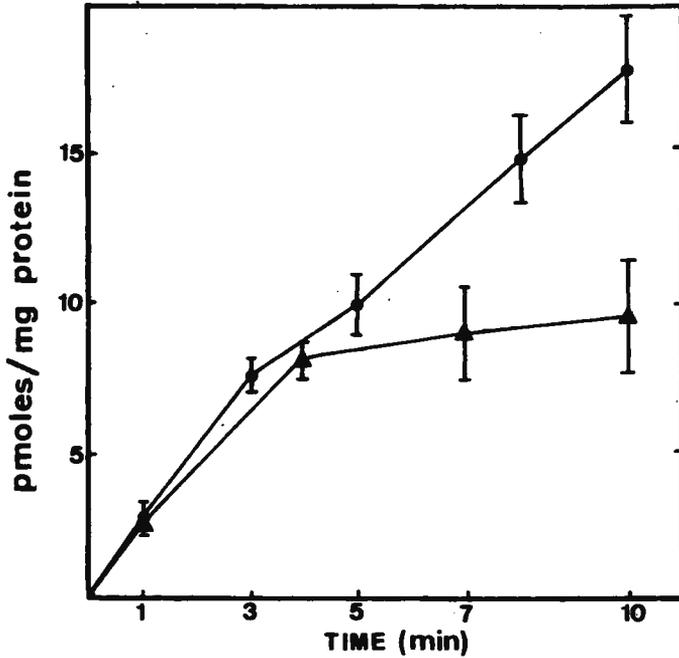


Figura 8. Curso temporal de la captación de ^3H -adenosina ($0.04 \mu\text{M}$) por sinap_{tosomas} de Torpedo en solución fisiológica control (●) y después de una pre_{incubación} de 1 hora en solución fisiológica conteniendo ouabaina 10^{-4}M (g-estrofantina, Boehringer Mannheim GmbH) (▲). Los datos, son la media de 6 experimentos \pm DE.

simultaneamente, el efecto inhibitor sobre la captación de adenosina de las soluciones sin sodio se encuentra significativamente reducido, aproximándose los valores a los de la incubación control en medio fisiológico, y no siendo significativamente diferentes de estos.

La disipación indirecta del gradiente transmembranario de sodio con el glicósido cardiaco ouabaina induce también una reducción en la incorporación de adenosina (Figura 8). En este caso es necesaria una preincubación prolongada con la droga (1 hora) antes de la detección de cambios significativos en la captación de adenosina relacionados con la reducción del gradiente de sodio.

Papel del calcio intrasinaptosomal. La posibilidad de que la clara participación del calcio en el efecto global producido por la alteración directa o indirecta del gradiente de sodio sea fundamentalmente debida a la retención intrasinaptosomal de calcio por la inhibición del intercambio sodio-calcio en el plasmolema, se ve reforzada por los resultados obtenidos cuando se modifica la concentración extracelular de calcio (Figura 9). La elevación de la concentración externa de este ión hasta 10 mM es seguida de una disminución significativa ($P < 0.01$) en la captación de ^3H -adenosina por los sinaptosomas. En estas condiciones, hemos descrito previamente un incremento de hasta tres veces en el calcio acumulado intrasinaptosomal. Las concentraciones de calcio externas por debajo de la fisiológica (3.4 mM) no alteran significativamente el mecanismo de captación de adenosina.

Se ha incrementado también directamente la concentración intracelular de calcio por medio del ionóforo A23187; en estas condiciones, la incorporación de adenosina por los sinaptosomas está así mismo reducida (Figura 10). Considerando el efecto que tiene el ionóforo sobre la liberación de ATP y para descartar la posibilidad de que la inhibición de la captación de adenosina sea debida, al menos en parte, a la liberación inmediata de la misma adenosina incorporada después de su fosforilación intracelular a ATP, hemos repetido el experimento preincubando los sinaptosomas con el ionóforo durante 2 minutos, tiempo en el que se produce cualquier liberación

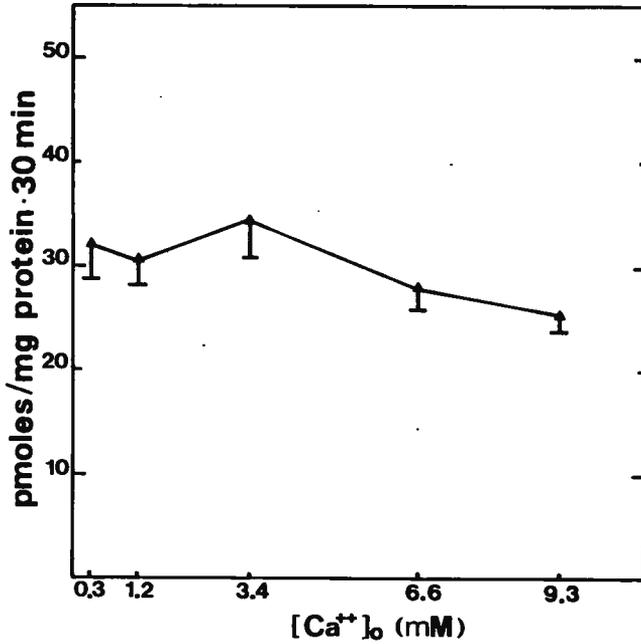


Figura 9. Captación de ^3H -adenosina en función de la concentración extracelular de calcio. La diferencia entre las concentraciones 3.4 y 9.3 es significativa ($P < 0.01$). Los datos corresponden a la media de 6 experimentos \pm DE.

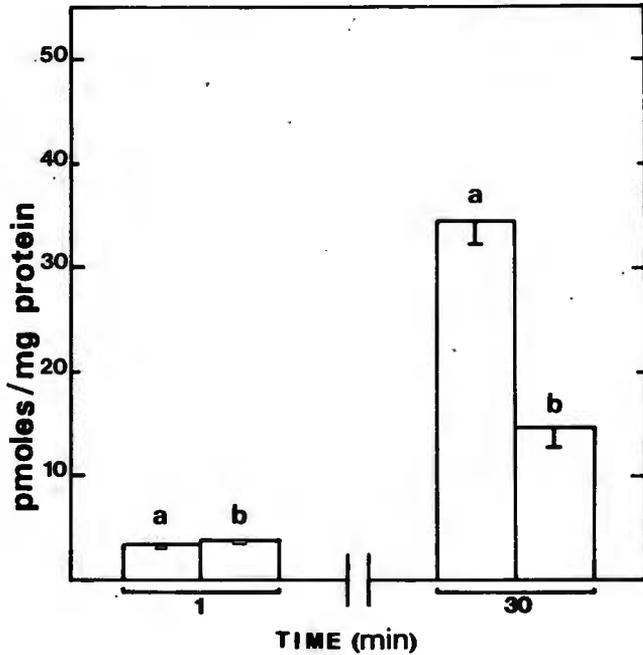


Figura 10. Curso temporal simplificado de la captación de ^3H -adenosina ($0.04 \mu\text{M}$) en solución fisiológica (a) y en un medio conteniendo $50 \mu\text{M}$ del ionóforo A23187 (b). En ambos casos, la concentración extracelular de calcio es la fisiológica (3.4 mM). Los datos corresponden a la media de 4 experimentos \pm DE. La diferencia a 1 minuto no es significativa.

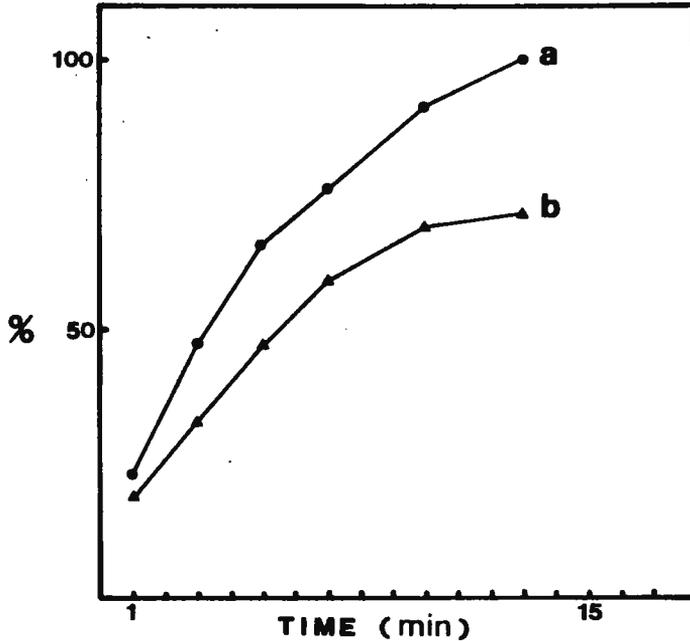


Figura 11. Curso temporal de la incorporación de ^3H -adenosina ($0.04\ \mu\text{M}$) por sinaptosomas de Torpedo. Tanto en (a) como en (b) se ha realizado una preincubación durante 2 minutos en presencia del ionóforo A23187 ($50\ \mu\text{M}$). En (a) el medio externo carece del ión calcio, y en (b) la concentración externa de calcio es la fisiológica ($3.4\ \text{mM}$). Los resultados corresponden a una experiencia típica.

de ATP, e iniciando seguidamente la incubación con ^3H -adenosina en presencia de 3.4 mM de calcio y sin calcio en el medio. En estos experimentos, la acumulación intrasinaptosomal de calcio mediada por el ionóforo en la suspensión con calcio extracelular, se manifiesta en una reducción significativa de la incorporación de adenosina con respecto al control efectuado con el medio externo libre de calcio, (Figura 11).

Efecto de la depolarización potásica sobre la captación de adenosina. En las membranas excitables en las que la permeabilidad potásica es alta con relación a la sódica existe una relación lineal entre el potencial de membrana y el logaritmo de la concentración extracelular de potasio según predice la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz. En la figura 12, se pone de manifiesto una relación lineal inversa entre la captación de adenosina y el logaritmo de la concentración externa de potasio indicando que el transporte de adenosina es función del potencial de membrana en los límites de 15 - 100 mM de potasio extracelular. La figura 13 muestra el curso temporal del fenómeno de inhibición con una concentración externa de potasio de 100 mM. La inhibición de la captación de adenosina por el elevado potasio extracelular no es significativa con respecto a la inhibición debida a la anulación del gradiente de sodio. En las mismas condiciones de depolarización potásica y dependiendo del potencial de membrana hemos descrito previamente un incremento en la concentración intracelular de calcio.

En todos los casos, el inicio de la depolarización potásica se ha llevado a cabo un minuto antes del inicio de la incorporación de ^3H -adenosina, tiempo en el que la liberación de ATP ya se ha producido.

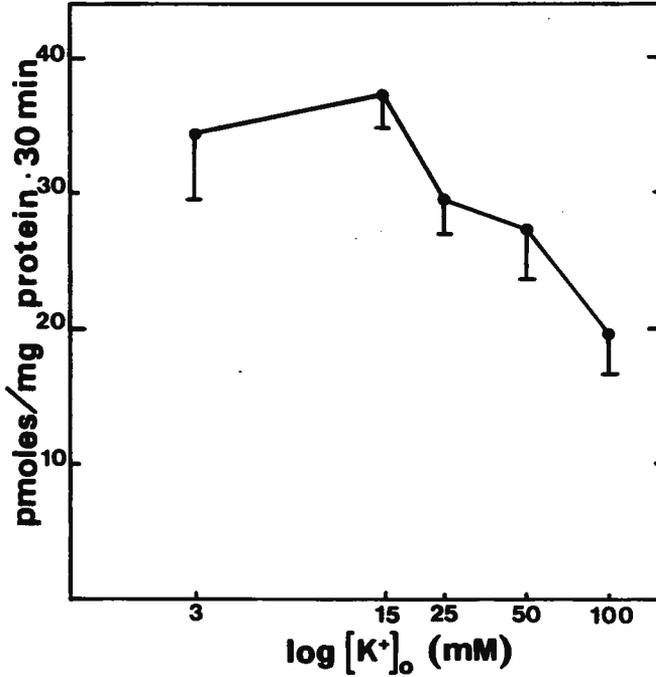


Figura 12. Incorporación de ^3H -adenosina (0.04 μM) en función de la concentración extracelular de potasio. La concentración externa de sodio se ha mantenido fija en todos los puntos e igual a 180 mM; potasio + colina = 100 mM. Los datos corresponden a la media de 6 experimentos \pm DE.

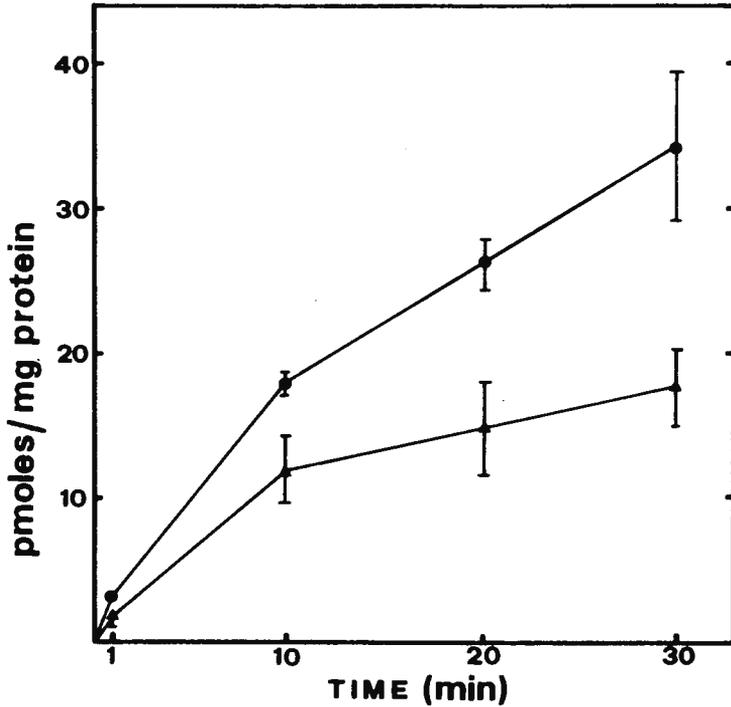


Figura 13. Curso temporal de la incorporación de ^3H -adenosina ($0.04 \mu\text{M}$) en solución fisiológica control conteniendo 100 mM de sodio sustituidos por colina (●) y en medio depolarizante con 100 mM de sodio sustituidos por potasio (▲). Los datos corresponden a la media de 7 experimentos \pm DE.

DISCUSION

Las fracciones subcelulares ricas en terminaciones nerviosas permiten abordar con metodología bioquímica el estudio de las sinapsis. Una de las preparaciones más extensivamente estudiadas es la obtenida a partir del fraccionamiento de corteza cerebral (Whittaker, 1959), preparación que tiene como puntos críticos difícilmente soslayables en algunas interpretaciones la contaminación por fragmentos de células gliales (Henn y cols., 1976) y la heterogeneidad de las terminaciones aisladas. No existe ninguna evidencia que haga suponer que los flujos transmembranarios de calcio por ejemplo, sean idénticos en terminaciones adrenérgicas y colinérgicas (Blaustein, 1975).

Con los sinaptosomas obtenidos a partir del órgano eléctrico de Torpedo (Morel y cols., 1977), la información obtenida es claramente referible a un solo tipo de terminaciones nerviosas colinérgicas puras facilitando la interpretación de los resultados en el marco de un solo compartimento metabólico de neurotransmisión. La homogeneidad de los sinaptosomas de Torpedo debe ser especialmente valorada en el estudio del comportamiento de los derivados de adenina en la regulación de la función sináptica por la existencia de terminaciones purinérgicas en preparaciones de sinaptosomas cerebrales.

Las terminaciones nerviosas colinérgicas obtenidas por el método de Morel y cols., (1977, 1978 y 1979), retienen después de su separación los componentes citoplasmáticos, sintetizan y liberan acetilcolina y son estables "in vitro" durante varias horas. Así mismo, hemos descrito y cuantificado en esta preparación los movimientos de calcio entre los diferentes compartimentos subcelulares (Marsal y cols., 1980). Los sinaptosomas de Torpedo, tienen también para nosotros la ventaja adicional de haberse estudiado en ellos algunos aspectos del metabolismo sináptico de los nucleótidos de adenina (Dowdall, 1978; Meunier y Morel, 1978 y Zimmermann y cols., 1979).

Al igual que en otros modelos experimentales (ver referencias en la introducción), los sinaptosomas de Torpedo liberan ATP al ser depolarizados. Aunque la cuantificación precisa del ATP total liberado en una preparación

celular funcional como los sinaptosomas es dificultosa cuando se utiliza el complejo luciferina-luciferasa añadido directamente al medio extracelular, debido a la imbricación de la cinética de liberación de ATP, su hidrólisis por ectoATPasas de membrana y la cinética propia de la reacción luminiscente, el pico de emisión luminosa es proporcional a la concentración de ATP presente en el medio, y en este estricto sentido, este parámetro es útil como medida semicuantitativa del ATP que aparece en el medio con las manipulaciones experimentales. El método permite monitorizar continua y directamente el fenómeno de secreción del nucleótido.

Los sinaptosomas cerebrales mixtos de cobaya (White, 1978) y los cerebrales de calamar (Pollard y Pappas, 1979) liberan ATP por depolarización potásica en forma calcio-dependiente; las terminaciones colinérgicas del órgano eléctrico de Torpedo liberan así mismo ATP al ser depolarizadas por el potasio, observándose en esta preparación una similar calcio-dependencia. Los resultados obtenidos con el ionóforo A23187 indican que es suficiente el incremento en la concentración intracelular de calcio para inducir la liberación de ATP. Es más, el añadir varias concentraciones de calcio al medio externo carente de este ión, restaura la liberación de ATP inducida por depolarización potásica o por el ionóforo en forma dependiente de la concentración extracelular de calcio (Resultados no publicados). Puesto que el ionóforo A23187 en un medio libre de calcio induce una liberación con extrusión casi total (más del 80%) del calcio ligado a estructuras intracelulares en los sinaptosomas de Torpedo (Marsal y cols., 1980), parece razonable concluir que la movilización del calcio ligado intracelular o el incremento transitorio en el calcio libre interno que ocurre en esta situación, no desempeña en nuestras condiciones un papel significativo en la extrusión de ATP. Probablemente la necesidad de calcio pasa por una fase de relación con el plasmolema ligada a la entrada de este ión desde el medio externo.

La calcio-dependencia que muestra la liberación de ATP tiene un claro paralelismo con la liberación de neurotransmisores en diferentes preparaciones sinápticas indicando una relación entre los dos fenómenos. Sería de

interés evidenciar una posible estequiometria entre el ATP liberado y la acetilcolina similar a la descrita en el contenido de las vesículas sinápticas.

Se ha sugerido recientemente en base a la acción específica que tiene la toxina botulínica sobre las terminaciones colinérgicas al impedir la liberación del neurotransmisor, que en sinaptosomas corticales de cobaya (White y cols., 1980) la ACh y el ATP liberados por depolarización no tendrían como origen común la liberación del contenido de las vesículas sinápticas puesto que en la preparación mencionada la toxina solo reduce la liberación de ATP por depolarización en un 7% mientras que la liberación de ACh se reduce hasta 10 veces más, es decir, la liberación de ACh y ATP seguiría dos vias diferentes. Nuestros resultados indican que en una preparación exclusivamente colinérgica botulinizada, existe una reducción similar en la liberación del neurotransmisor y del ATP, indicando que en los sinaptosomas corticales la inhibición de la secreción de ATP en la subpoblación de sinaptosomas colinérgicos puede estar enmascarada por la secreción general a partir de otros elementos presinápticos.

Nuestros resultados, indican así mismo que la entrada directa de calcio por la acción del ionóforo no es capaz de cortocircuitar el efecto inhibidor de la toxina botulínica y restaurar la liberación de ATP calcio-dependidiente, sugiriendo que el efecto principal de la toxina no puede ser exclusivivamente la reducción en la entrada de calcio mediada por depolarización en los sinaptosomas sino la subsecuente sensibilidad al calcio del mecanismo de secreción.

De especial interés son las pruebas aparentes de la integridad del mecanismo de secreción de ATP en ausencia de ACh liberable al ser bloqueada la síntesis por el compuesto HC-3. Aparentemente, el bloqueo del mecanismo de secreción de ACh (exocitosis u otro mecanismo) bloquea simultaneamente la secreción de ATP, aunque la liberación del neurotransmisor ACh no es imprescindible para que pueda liberarse el nucleótido.

Un aspecto de extraordinaria importancia todavía no aclarado es el hecho de que una molécula de tanto valor en el metabolismo energético como el ATP sea secretada. Su derivado por defosforilación extracelular, la adenosina, parece cumplir con eficacia incluso mayor que el ATP las funciones identificadas actualmente de los derivados de adenina en el espacio extracelular como son la amortiguación de la entrada de calcio en el componente presináptico (Marsal y cols., 1980) con el freno subsiguiente del mecanismo de neurotransmisión (Ginsborg y Hirst, 1972), y el aumento en algunos sistemas de la concentración de AMPc postsináptica (Kuroda, 1978). Aparentemente, la secreción de ATP procede como consecuencia ineludible de la activación por el calcio del mecanismo de secreción del neurotransmisor, posiblemente por liberación exocitótica del contenido vesicular.

Sin embargo, la secreción de ATP por membranas extrasinápticas (ver referencias en la introducción) sugiere la existencia paralela de algún otro mecanismo de liberación, como la inversión durante la depolarización de un sistema de bombeo membranario con síntesis y extrusión de ATP en lugar de su gasto. Esta hipótesis adquiere un cierto sentido si se tiene en cuenta el comportamiento de otros sistemas; así, las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático secuestran calcio del citosol mediante la acción de una ATPasa con hidrólisis de ATP, este secuestro de calcio termina con la contracción muscular. Cuando el flujo de calcio ocurre en sentido contrario a través de la membrana del retículo para potenciar una nueva contracción, se sintetiza ATP a partir de ADP (Hasselbach, 1973). Observaciones similares implicando esta vez flujos bidireccionales de protones se han descrito en membranas de cloroplastos y mitocondrias (Mitchell, 1965). Siguiendo en el terreno hipotético, cabe especular con la posibilidad de que la síntesis membranaria de ATP cuando tiene lugar algún flujo iónico transmembranario a favor de gradiente sea un fenómeno de características generales. Una parte del ATP liberado durante la depolarización de las membranas excitables podría tener este origen como podría tenerlo también el ATP del contenido vesicular.

A nivel sináptico, el ATP liberado es rápidamente defosforilado a adenosina alcanzándose concentraciones del nucleósido en la hendidura sináptica del orden de 100-400 μM (Ribeiro, 1979). En estas condiciones, el freno de la neurotransmisión (Israel y cols., 1980) mediado indirectamente por la amortiguación de la entrada de calcio en el componente presináptico (Marsal y cols., 1980) puede alcanzar probablemente un máximo de eficacia. En cualquier caso, la acción de la adenosina se termina mediante la captación por la membrana presináptica para su reutilización y fosforilación fundamentalmente a ATP (Meunier y Morel, 1978; Zimmermann y cols., 1979).

Dado que la puesta en marcha del mecanismo de reutilización de adenosina puede disminuir eficazmente la concentración de adenosina extracelular, es importante el estudio de los factores susceptibles de regular el mecanismo de captación puesto que se plantea la posibilidad natural de que dicha captación pueda ser modificada según el estado funcional de la terminación nerviosa, alterándose consecuentemente la intensidad de las acciones extracelulares. Así, hemos investigado la captación de adenosina por los sinaptosomas en varias condiciones que modifican los flujos iónicos transmembranarios y llevan a un aumento en la concentración intracelular de calcio como punto de partida de la actividad sináptica.

Los resultados presentados, son consistentes con la idea de que la concentración intracelular de calcio está implicada en la regulación del mecanismo de captación de adenosina en las terminaciones nerviosas del órgano eléctrico de Torpedó. Las características generales del mecanismo de captación son similares a las descritas por otros autores (Meunier y Morel, 1978; Zimmermann y cols., 1979), desde que la K_m calculada es 3 μM y la velocidad máxima, V_{max} es de 24 picomoles /mg de proteína/minuto.

Es conocido que los iones sodio y calcio están implicados de alguna manera en el mecanismo de captación de adenosina (Meunier y Morel, 1978; Bender y cols., 1980, 1981). Nuestros resultados muestran como la disminución en la concentración de sodio del medio extracelular disminuye la captación de adenosina por los sinaptosomas; este efecto debido a la anulación directa

del gradiente de sodio es eliminado cuando simultáneamente con el sodio se retira el calcio del medio externo.

Es conocida la existencia de un mecanismo de extrusión de calcio sodio-dependiente (Baker, 1972), y que las soluciones fisiológicas carentes de sodio incrementan el contenido intracelular de calcio (Blaustein y Ector, 1977; Marsal y cols., 1980). Cuando se retira simultáneamente el calcio y el sodio del medio externo, el efecto de la anulación directa del gradiente de sodio es eliminado porque aunque los iones calcio no pueden abandonar la terminación nerviosa por el intercambio con el sodio, tampoco entra calcio en los sinaptosomas puesto que el medio externo carece de este ión y además la entrada de calcio sodio-dependiente (Vargas y cols., 1976) está evidentemente reducida en estas circunstancias. Además la disipación indirecta del gradiente de sodio por la ouabaina induce así mismo una reducción en la captación de adenosina. Ambas condiciones, medio externo sin sodio y efecto de la ouabaina, incrementan la concentración intracelular de calcio y la liberación de neurotransmisor en terminaciones nerviosas (Vizi, 1978) y ambas condiciones inhiben la captación de adenosina. Así pues, la participación del gradiente de sodio en el mecanismo de captación de adenosina parece mediada por su papel en la regulación de la concentración intracelular de calcio. Como alternativa menos verosímil puede considerarse un mecanismo de co-transporte sodio-adenosina similar al descrito en la captación de aminoácidos (Schultz y Curran, 1970) monosacáridos (Alvarado y Robinson, 1979), noradrenalina y otras aminas (Iversen y Kravitz, 1966), colina (Vaca y Pilar, 1979). La relativamente pequeña -la membrana de la mayor parte de tipos celulares es altamente impermeable al sodio - aunque constante entrada de sodio favorecida por la diferencia de potencial electroquímico para este ión podría ser utilizada para el co-transporte de adenosina, sin embargo, los sistemas de co-transporte con sodio para los compuestos antes mencionados son independientes de la concentración extracelular de calcio (Iversen y Kravitz, 1966), y este no es el caso de la adenosina como hemos mostrado.

Otro procedimiento experimental para incrementar la concentración

intracelular de calcio consiste en elevar la concentración externa de este ión. Cuando la concentración externa de calcio se eleva hasta 10 mM se triplica el contenido cálcico intracelular (Marsal y cols., 1980) y en estas condiciones la captación de adenosina disminuye significativamente dependiendo de la concentración externa de calcio.

El máximo incremento en la concentración intracelular de calcio puede ser obtenido con el ionóforo A23187 (Marsal y cols., 1980). En este caso, la adenosina tritiada disminuye dentro de los sinaptosomas. Puede arguirse que el ionóforo induce la liberación de ATP calcio-dependiente como se muestra en los resultados, pero esta liberación es transicional, fásica, no liberándose ATP en presencia del ionóforo más allá de cuatro minutos de incubación, y la inhibición de la captación de adenosina se manifiesta principalmente a partir de los 10-15 minutos; a un minuto, no se observa una disminución significativa en la adenosina tritiada interiorizada por los sinaptosomas, y la liberación de ATP inducida por el ionóforo es máxima a un minuto. Quizá en tiempos cortos se incorpora poca adenosina al ATP intrasinaptosomal, o bien la fosforilación de la adenosina a ATP es inhibida por el calcio intracelular, sin embargo, en los experimentos en los que el ionóforo se introduce dos minutos antes del comienzo de la incubación con ^3H -adenosina existe una inhibición significativa con respecto al control, de la captación del nucleósido en el caso en el que el ionóforo ha introducido en los sinaptosomas calcio del medio externo, es decir, en el que la concentración interna de calcio es elevada.

Una situación similar se presenta cuando los sinaptosomas son depolarizados elevando la concentración extracelular de potasio. La depolarización potásica inhibe la captación de adenosina por los sinaptosomas y esta inhibición es dosis-dependiente. Es conocido que la entrada de calcio se incrementa cuando la concentración externa de potasio se eleva por encima de 15 mM (Marsal y cols., 1980). También se produce una liberación de ATP inducida por la elevación del potasio externo, pero como sucede en el caso del ionóforo A23187 no se libera ATP más allá de los 2-4 minutos de depolarización, y la máxima inhibición de la captación de adenosina se obtiene a los 30 minutos de depo-

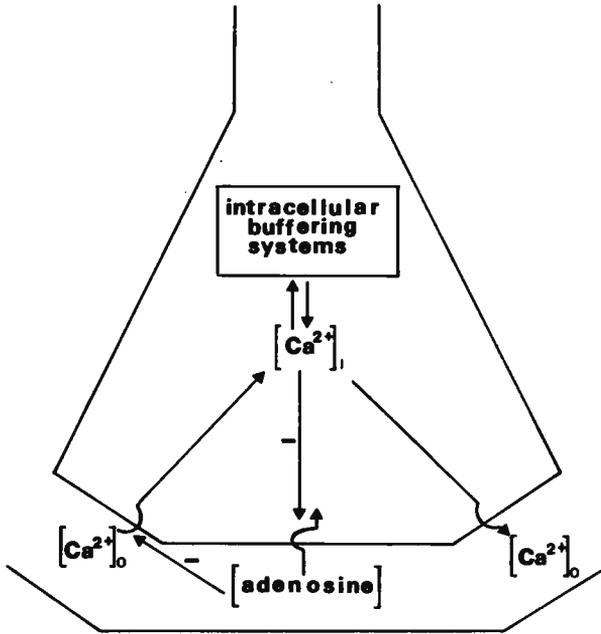


Figura 14. Esquema relacionando la concentración intracelular de calcio con el mecanismo de reutilización de adenosina. (Ver texto).

larización, puesto que a un minuto la inhibición con respecto a los sinaptosomas no depolarizados no es significativa.

Así pues. la concentración intracelular de calcio regula probablemente el sistema de captación de adenosina inhibiendo el fenómeno cuando la concentración de calcio intracelular es elevada. Nuestros resultados no nos permiten elucidar el mecanismo de esta regulación puesto que no es perfectamente conocido el mecanismo de captación de adenosina. Posiblemente el sistema de captación sea similar al de colina (Zimmermann y cols., 1979).

En cualquier caso, el papel fisiológico del mecanismo de captación de adenosina sería el terminar con la acción inhibitoria de los derivados de adenina sobre la liberación del neurotransmisor, y la elevación transitoria de la concentración intracelular de calcio que tiene lugar durante la depolarización, y fundamentalmente durante la actividad repetitiva, reduciría la captación de adenosina manteniendo elevada su concentración en la hendidura sináptica, prolongando su acción inhibitoria extracelular (Ver figura 14).

BIBLIOGRAFIA

- Aboud, L. G.; Koketsu, K. y Miyamoto, S. (1962): *Am. J. Physiol.* 202: 469-474.
- Alvarado, F. y Robinson, J. W. L. (1979): *J. Physiol (Lond.)*. 295: 457-475.
- Baker, P. F. (1972): *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 24: 177-223.
- Bender, A. S., Wu, P. H. y Phillis, J. W. (1980): *J. Neurochem.* 33: 629-640.
- Bender, A. S., Wu, P. H. y Phillis, J. W. (1981): *J. Neurochem.* 36: 651-660.
- Blaustein, M. P. (1975): *J. Physiol (Lond.)*. 247: 617-665.
- Blaustein, M. P. y Ector, A. C. (1976): *Biochim. Biophys. Acta.* 419: 295-308.
- Boyd, I. A. y Forrester, T. (1968): *J. Physiol (Lond.)*. 199: 115-135.
- Burnstock, G. (1972): *Pharmac. Rev.* 24: 509-581.

- Dowdall, M. J., Boyne, A. F. y Whittaker, V. P. (1974): *Biochem. J.* 140: 1-12.
- Dowdall, M. J. (1978): *J. Physiol (Paris)*. 74: 497-501.
- Ginsborg, B. L. y Hirst, G. D. S. (1972): *J. Physiol (Lond)*. 224: 629-645.
- Hasselbach, W. (1973): En "The enzymes", Vol X (Ed. P. Boyer), tercera edición, p. 431-467. Nueva York. Academic Press.
- Henn, F. A., Anderson, D. S. y Rustad, D. G. (1976): *Brain Res.* 101: 341-344.
- Holton, F. A. y Holton, P. (1953): *J. Physiol (Lond)*. 119: 50-51P.
- Israel, M., Manaranche, R., Mastour-Frachon, P. y Morel, N. (1976): *Biochem. J.* 160: 113-115.
- Israel, M., Lesbats, B., Meunier, F. M. y Stinnakre, J. (1976): *Proc. R. Soc. Lond. B.* 193: 461-468.
- Israel, M., Lesbats, B., Manaranche, R., Marsal, J., Mastour-Frachon, P. y Meunier, F. M. (1977): *J. Neurochem.* 28: 1259-1267.
- Israel, M. y Meunier, F. M. (1978): *J. Physiol (Paris)*. 74: 485-490.
- Israel, M., Lesbats, B., Manaranche, R., Meunier, F. M. y Frachon, P. (1980): *J. Neurochem.* 34: 923-932.
- Iversen, L. L. y Kravitz, E. A. (1966): *Molec. Pharmac.* 2: 360-362.
- Johnson, M. K. y Whittaker, V. P. (1963): *Biochem. J.* 88: 404-409.
- Kuroda, Y. y McIlwain, H. (1974): *J. Neurochem.* 22: 691-699.
- Kuroda, Y. (1978): *J. Physiol (Paris)*. 74: 463-470.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951): *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lundin, A. y Thore, A. (1975): *Analytical Biochemistry*. 66: 47-63.
- Marchbanks, R. M. (1967): *Biochem. J.* 104: 148-157.
- Marsal, J., Esquerda, J. E., Fiol, C., Solsona, C. y Tomas, J. (1980): *J. Physiol (Paris)*. 76: 443-457.

- McIlwain, H. (1972): *Biochem. Soc. Symp.* 36: 69-85.
- Meunier, F. M. y Morel, N. (1978): *J. Neurochem.* 31: 845-851.
- Miledi, R., Molenaar, P. C. y Polak, R. L. (1978): *Nature.* 272: 641-643.
- Mitchell, P. (1965): *Biol. Rev.* 41: 445-483.
- Morel, N., Israel, M., Manaranche, R., Mastour-Frachon, P. (1977): *J. Cell. Biol.* 75: 43-55.
- Morel, N., Israel, M. y Manaranche, R. (1978): *J. Neurochem.* 30: 1553-1557.
- Morel, N., Israel, M., Manaranche, R. y Lesbats, B. (1979): En: "The cholinergic synapse". *Prog. in Brain Res.* Vol. 49. (Ed. S. Tucek). Elsevier.
- Pollard, H. B. y Pappas, G. D. (1979): *Biochem. Biophys. Res. Com.* 88: 1315-1321.
- Ribeiro, J. A. (1979): *J. Theor. Biol.* 80: 259-270.
- Schultz, S. G. y Curran, P. F. (1970): *Physiol. Rev.* 50: 637-718.
- Shimizu, H., Tanaka, S. y Kodama, T. (1972): *J. Neurochem.* 19: 687-698.
- Silinsky, E. M. y Hubbard, J. I. (1973): *Nature.* 243: 404-405.
- Silinsky, E. M. (1975): *J. Physiol (Lond).* 247: 145-162.
- Taugner, G., Wunderlich, I., John, F. (1979): *Arch. Pharmacol.* 309: 29-43.
- Vaca, K. y Pilar, G. (1979): *J. Gen Physiol.* 73: 605-628.
- Vargas, O., Miranda, R. y Orrego, F. (1976): *Neuroscience.* 1: 137-145.
- White, T. D. (1978): *J. Neurochem.* 30: 329-336.
- White, T., Potter, P. Wonnacott, S. (1980): *J. Neurochem.* 34: 1109-1112.
- Whittaker, V. P. (1959): *Biochem. J.* 72: 694-706.
- Vizi, E. S. (1978): *Neuroscience.* 3: 367-384.
- Zimmermann, H., Dowdall, M. J., y Lane. D. A. (1979): *Neuroscience.* 4: 979-993.



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugastl Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de *saccharomyces cerevisiae*.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de λ , en el 4^{ta} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para Insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoelectrónica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminícos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

- 115 Cacicado Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótopa.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de Interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.
- 151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.
- 152 Calle García, C.:
Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.
- 154 Alberdi Alonso, M.^a T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).
- 156 Gella Tomás, F. J.:
Estudio de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.
- 157 Margalef Mir, R.:
Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.
- 158 Alvarez Fernández-Represa, J.:
Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.

