

Gaceta Médica de México

VOLUMEN 98

JUNIO DE 1968

NÚMERO 6

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

CONFERENCIA MAGISTRAL "MIGUEL F. JIMENEZ"

FUNDAMENTOS ULTRAESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICOS DE LA TRANSMISIÓN DEL IMPULSO NERVIOSO^{1, 3}

DR. E. DE ROBERTIS²

PROFUNDA emoción me embarga al recibir de esta ilustre y centenaria Academia Nacional de Medicina, el título de miembro honorario. El alto honor que hoy me imponéis sobrepasa los límites de mis merecimientos. Cuando vuestro presidente y renombrado patólogo Dr. Isaac Costero me propuso para este cargo, estoy seguro que lo hizo pensando en homenajear, por mi intermedio, a las ciencias básicas de la

Medicina argentina. Es en su nombre que acepto esta distinción de mis muy estimados colegas mexicanos. Al hacerlo traigo también el saludo fraterno de la casi centenaria Academia Nacional de Ciencias Exactas de Argentina, a la que me honro en pertenecer desde 1960. Aunque la Ciencia no tiene fronteras los científicos actúan dentro del seno de sus respectivas nacionalidades. Desde el otro extremo de Latinoamérica los argentinos seguimos con admiración cuanto estáis haciendo por el desarrollo de la Ciencia y la Medicina y nos congratulamos con vuestros triunfos.

Otro motivo que me llena de satisfacción es dictar la segunda conferencia anual Dr. Miguel F. Jiménez, con la que esta Corporación rinde home-

¹ Sustentada el 22 de mayo de 1968.

² Académico honorario. Director, Instituto de Anatomía General y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

³ Parte de la investigación original mencionada en esta conferencia ha sido subvencionada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina, el National Institutes of Health (Grant NB 06953-02) y la National Multiple Sclerosis Society (Grant No. 456 B).

naje a su miembro fundador y primer presidente. La lúcida exégesis de su obra hecha con motivo de la primera conferencia del Prof. Pickering, por el académico Dr. Germán Somolinos D' Ardois me exime de exaltar sus méritos. Sus notables contribuciones clínicas, que revelan a un profundo observador científico, su influencia en la formación de tantas generaciones de médicos y la intensa labor que desarrolló desde esta Academia y otras instituciones científicas, hacen de Miguel F. Jiménez una figura excepcional de la Medicina mexicana cuyos valores trascienden los límites geográficos y adquieren significación universal.

Permitidme que después de esta breve justificación de mi presencia, entre en el motivo de mi disertación. Antes de hacerlo deseo destacar que las investigaciones a que haré mención son el producto del esfuerzo de un gran número de destacados colaboradores, a quienes también les corresponde el mérito que hoy premiáis en mi persona.

*

* *

En los últimos años se han producido avances extraordinarios en nuestro conocimiento de la función del sistema nervioso. Mientras que por muchas décadas se pensó que su principal actividad era exclusivamente bioeléctrica, se sabe ahora que los mecanismos bioquímicos juegan un papel fundamental en la comunicación entre las células nerviosas así como en la integración del sistema nervioso con las más diversas funciones del organismo. En nuestro libro "Histophysiology of

Synapses and Neurosecretion",¹ publicado en 1964 por la Pergamon Press, sostuvimos un concepto unitario para todos los mecanismos neurohumorales. En síntesis esto significa que todas las neuronas, además de generar y propagar señales eléctricas, tienen funciones secretorias, mediante las cuales sintetizan y liberan las más variadas sustancias activas. Este concepto implica también que no hay diferencias esenciales entre los neurotransmisores, que actúan a corta distancia sobre los receptores situados en la célula postsináptica y las neurohormonas, que son liberadas en los espacios intercelulares y actúan sobre receptores distantes.

Los estudios farmacológicos e histológicos han revelado la existencia de una gran variedad de neuronas que se diferencian por sus productos de síntesis, por su reactividad a los transmisores o a drogas bloqueantes. Es así que se han podido identificar en el sistema nervioso central neuronas colinérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas, histaminérgicas; es decir, productoras de las diversas aminas biógenas; además de neuronas peptidérgicas que secretan hormonas polipeptídicas, como la ocitocina y la vasopresina y una serie de otras neuronas que liberan ácido γ -aminobutírico, glicina y, tal vez, otros aminoácidos.

Este concepto unitario, produjo al principio cierta resistencia entre los histólogos clásicos, pero como lo demostró la reciente conferencia sobre "Neurohormonas y Neurohumores" efectuada en Amsterdam en 1967,² ha ido abriéndose camino aún entre las

mentes más conservadoras. El mismo surgió claramente de nuestros estudios con el microscopio electrónico iniciados sobre sinapsis centrales y periféricas y luego extendidos a los más variados sistemas neurohumorales. En todos los casos pudimos observar que los productos sintetizados se acumulan en vesículas de tamaño uniforme y constante, que representan verdaderas unidades multimoleculares o cuánticas de la secreción. Estas vesículas se acumulan de preferencia en las terminaciones nerviosas cerca de la membrana; es decir, en sitios estratégicos desde donde pueden liberar su contenido a la llegada del impulso nervioso. Salvo los casos excepcionales de sinapsis electrotónicas, la transmisión nerviosa es de naturaleza química y se produce esencialmente por la interacción del neurotransmisor liberado por la primera neurona con el receptor químico situado en la segunda. El cambio iónico

que resulta de dicha interacción es el que genera el potencial sináptico, el que podrá luego excitar o inhibir al elemento postsináptico.

La complejidad de los procesos de transmisión sináptica hacen que para su estudio sea indispensable un enfoque multidisciplinario en el que los mismos sean analizados, a la vez y en forma integrada, mediante métodos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

La conferencia que en 1964 dictara en este mismo recinto y que fuera publicada en el "Libro Conmemorativo del Primer Centenario de la Academia Nacional de Medicina"³ me exime de abundar en los detalles sobre la estructura y ultraestructura de la región sináptica y permite que me concentre en algunos de los hallazgos más recientes de nuestro laboratorio que se refieren especialmente a los aspectos bioquímicos y fisiológicos.

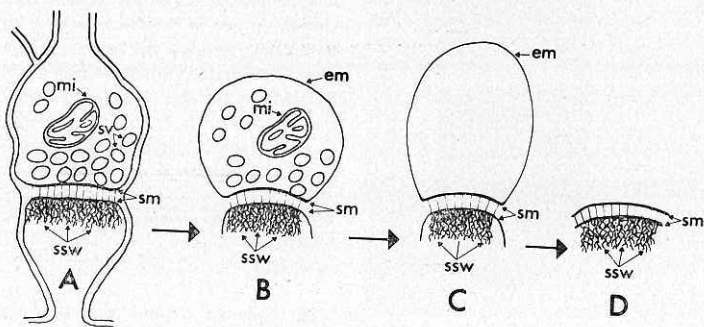


FIG. 1. Diagrama que muestra la disección sistemática de un terminal sináptico de la corteza cerebral. (A) In situ; (B) después de su aislamiento; (C) después del choque osmótico; (D) unión sináptica remanente luego del tratamiento con Triton X-100; *em*, membrana del terminal, *mi*, mitocondria; *sv*, vesículas sinápticas; *sm*, membranas sinápticas unidas por los filamentos intersinápticos; *ssw*, retículo subsináptico.³⁰

A partir de 1961 con nuestros colaboradores hemos desarrollado una serie de métodos de fraccionamiento celular que han permitido el aislamiento de varios tipos de terminaciones sinápticas del sistema nervioso central y además la separación de los diversos componentes estructurales de la región sináptica, tales como: las vesículas sinápticas, axoplasma, mitocondrias, las membranas de la terminación y, finalmente, la unión sináptica propiamente dicha (Fig. 1).

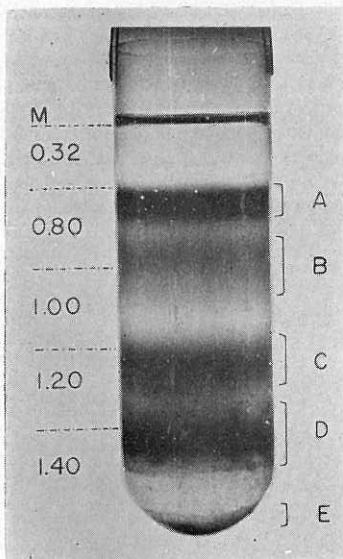


FIG. 2. Microfotografía de un tubo de la ultracentrífuga después de la centrifugación de la fracción mitocondrial. A la izquierda, concentración molar de sucrosa en el gradiente. A la derecha, capas y residuo cuyo contenido se indica en la Tabla 1.⁴

Aislamiento de terminales aminérgicos y no-aminérgicos

Colocando la fracción mitocondrial, aislada del cerebro por homogeneización y centrifugación, sobre un gradiente de sucrosa de densidad variable y haciendo una centrifugación a 100.000 g $\times$ 2 horas se obtiene el resultado que muestra la figura 2.⁴ Las diversas capas tienen al microscopio electrónico una diferente composición morfológica, tal como se indica en la Tabla 1. La misma también resume los resultados bioquímicos y demuestra la heterogeneidad de las terminaciones nerviosas aisladas. Así el grupo (B) y (C) es rico en las diversas aminas biógenas mientras el grupo (D) es pobre en todas ellas. Otros hallazgos sobre el contenido de enzimas relacionadas con las aminas, tales como colinoacetilasa,⁵ 5-hidroxitriptofano-decarboxilasa⁶ y catecol-metiltransferasa⁷ confirman esa heterogeneidad. Llegamos así a la conclusión de que es posible separar a los terminales nerviosos del cerebro en un grupo aminérgico y otro no-aminérgico. Recientemente con Kataoka⁸ hemos encontrado que la fracción microsómica de la corteza cerebral contiene pequeños terminales ricos en histamina.

Aislamiento de terminales inhibitorios ricos en GABA

No podemos resumir aquí la vasta literatura que existe sobre el ácido γ -aminobutírico (GABA) y su papel en la inhibición.⁹ En 1963 estudiamos la localización subcelular de las dos en-

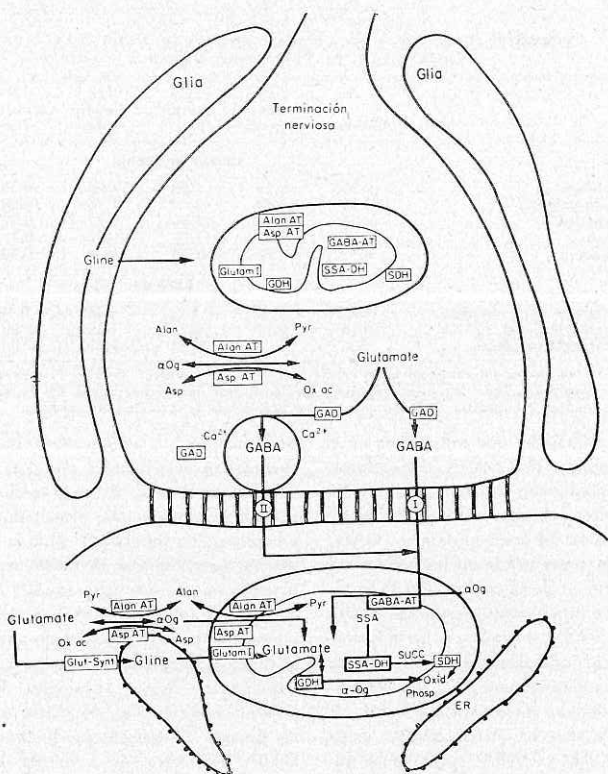


FIG. 3. Diagrama general de la organización ultraestructural y bioquímica de una terminación sináptica de naturaleza inhibitoria. Se observa la localización de las enzimas de los ciclos del glutamato, glutamina y ácido γ aminobutírico (GABA) en los distintos compartimientos y subcompartimientos relacionados con la terminación nerviosa. Se postulan dos posibles mecanismos presinápticos para la acción del GABA (I y II).

En II el GABA actúa como un transmisor (Para una descripción más completa véase¹²). Alan, alanina; Alan AT, alanina-aminotransferasa; Asp, aspartato; Asp AT, asparto-aminotransferasa; α Og, α -cetoglutarato; ER, retículo endoplásmico; GABA-AT, GABA-aminotransferasa; GAD, glutamato decarboxilasa; GDH, glutamato-deshidrogenasa; Gline, glutamina; Glut-Synt, glutamino-sintetasa; Glutam I, glutamina I; Ox.ac, oxalacetato; Oxid, Phosp, fosforilación oxidativa; Pyr, piruvato; SDH, deshidrogenasa succínica; SSA, semi-aldehida succínica; SSA-DH, deshidrogenasa de la SSA; SUCC, succinato.

TABLA 1
 DISTRIBUCION DE LAS AMINAS BIOGENAS Y DE LAS
 ENZIMAS DEL SISTEMA DEL GABA*

	<i>A</i> <i>Mielina</i>	<i>B</i> <i>Terminales</i> <i>pequeños</i>	<i>C</i> <i>Terminales</i>	<i>D</i> <i>Terminales</i>	<i>E</i> <i>Mitocondrias</i>
Aminas biógenas					
Acetilcolina	0.15	2.24	2.99	0.94	0.58
5-hidroxitriptamina	0.61	0.78	2.17	0.76	0.48
Noradrenalina	0.32	2.05	1.66	0.77	0.72
Dopamina	0.79	1.85	1.13	0.91	0.71
Histamina	0.72	2.70	1.56	0.44	0.70
Enzimas					
Decarboxilasa del glutamato	0.02	0.49	1.22	2.00	0.40
Aminotransferasa del GABA	0.15	0.11	0.29	1.10	8.00
Deshidrogenasa succínica	—	—	0.52	2.10	7.60

* Las fracciones submitocondriales (A-E) son las que muestran la Fig. 2. Los resultados se expresan como actividad relativa específica, que es el porcentaje de la amina o de la enzima recuperada dividido por el porcentaje de la proteína recuperada.

zimas principales que intervienen en el metabolismo del GABA demostrando que ambas están situadas en diferentes fracciones submitocondriales.¹⁰ La decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) se halla concentrada en los nervios no-aminérgicos de la subfracción D mientras que la aminotransferasa del GABA (GABA-AT) se halla en las mitocondrias con una distribución casi similar a la deshidrogenasa-succínica, enzima esencialmente mitocondrial (Tabla 1). Dada la estrecha correlación que existe entre GAD y GABA¹¹ postulamos que estos terminales ricos en GAD debían también contener GABA y que este aminoácido podría acumularse en las vesículas sinápticas funcionando en el terminal como un verdadero transmisor (Fig. 3).¹²

Este problema ha sido recientemente encarado mediante el uso de drogas convulsivantes que producen cuadros sintomáticos parecidos al de la epilep-

sia humana y que actúan sobre sistemas enzimáticos relacionados con los aminoácidos cerebrales. Tanto la metionina sulfoximina, que inhibe principalmente a la glutamina sintetasa,¹³ como la allilglicina, que, como se demostró recientemente en nuestro laboratorio¹⁴ inhibe específicamente al GAD, producen alteración de los terminales no-aminérgicos. Con allilglicina se obtiene la destrucción de ciertos terminales de la corteza cerebral (Fig. 4). Estos serían las sinapsis inhibitorias productoras de GABA. Pensamos que con esta droga tenemos en nuestro poder un método selectivo para localizar al microscopio electrónico este tipo de terminales en el sistema nervioso central. Todos estos hechos y otros relacionados con la forma de las vesículas, que según Uchizomo¹⁵ es elíptica y de menor tamaño en las terminaciones inhibitorias, nos llevan a la conclusión de que nuestra fracción D de terminales ricos en GAD



FIG. 4. Microfotografía electrónica de la corteza cerebral de una rata en estado de convulsión por aliglicina.¹⁴ Se observan varios terminales normales (*e*) haciendo contacto con dendritas (*d*); mientras que otros tienen diverso grado de alteración (*ae*). Se observa la hinchazón, reducción de vesículas sinápticas y vacuolización (*v*) de los terminales. 54.000 X.

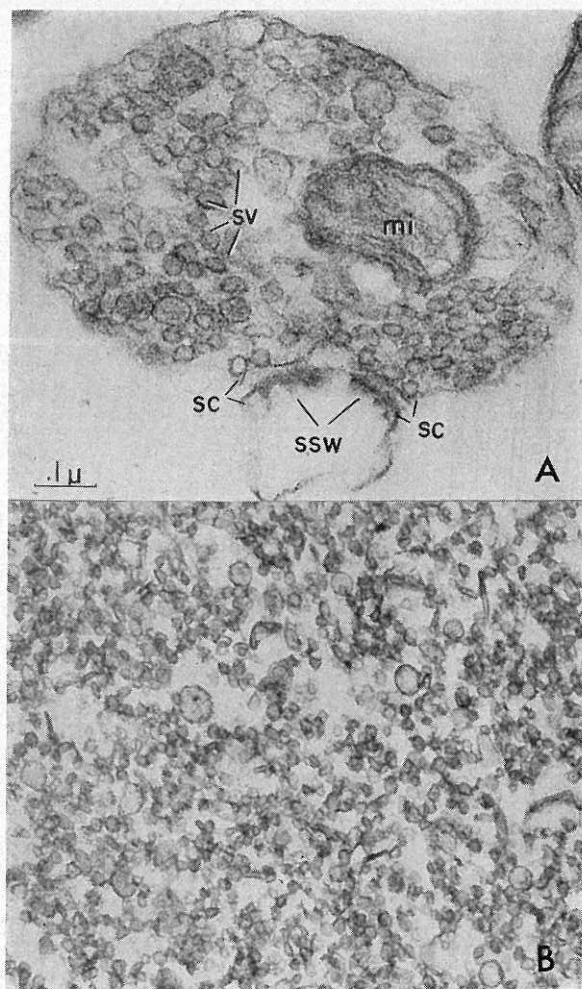


FIG. 5. Microfotografía electrónica de: A un terminal aislado del cerebro de rata;¹⁷ *mi*, mitocondria; *sc*, espacio sináptico; *sv*, vesículas sinápticas; *ssw*, retículo subsináptico. 85.000 X. B vesículas sinápticas aisladas contenidas en la subfracción M₂ (Tabla 2) de la corteza cerebral de la rata 70.000 X.

TABLA 2

CONTENIDO EN AMINAS BIOGENAS DE LAS FRACCIONES M_1 , M_2 (VESÍCULAS SINÁPTICAS) Y M_3 (FRACCIÓN SOLUBLE)*

Aminas biógenas	Fracción		
	M_1	M_2	M_3
Acetilcolina	0.55	2.85	1.20
Noradrenalina	0.40	2.56	1.93
Dopamina	0.46	2.46	1.72
Histamina	0.39	2.24	2.27

* La fracción mitocondrial fue tratada con solución hiposmótica y luego centrifugada. Los resultados se expresan como en la Tabla 1.

contiene la mayoría de las terminaciones inhibitorias de la corteza cerebral.¹⁶

Aislamiento de las vesículas sinápticas

Cuando en 1953 con el Prof. Bennett hallamos las vesículas sinápticas, como un componente submicroscópico constante de las sinapsis, postulamos que ellas debían contener los diversos neurotransmisores. Esto pudo demostrarse recién en 1962 al desarrollarse, en nuestro laboratorio, el método para aislarlas, por choque osmótico, de las terminaciones nerviosas (Fig. 5). Haciendo una centrifugación diferencial las vesículas sinápticas se separan en la fracción M_2 mientras que la porción membranosa de terminal va a la fracción M_1 . En la Tabla 2 se observa que las vesículas sinápticas contienen la más alta concentración de acetilcolina,⁵ noradrenalina,¹⁸ dopamina¹⁸ e histamina.⁸ También la serotonina ha sido hallada en la fracción vesicular del tronco cerebral.¹⁹

Del hipotálamo anterior de la rata

podimos separar una fracción vesicular que contiene 5-6 veces más noradrenalina que otra similar de los hemisferios cerebrales.²⁰ La presencia de numerosas vesículas granuladas en esta fracción del hipotálamo nos hizo concluir que probablemente ellas contienen el transmisor adrenérgico. Estos resultados, confirmados en otros laboratorios,²¹ permiten afirmar que en verdad las vesículas sinápticas son las unidades cuánticas de acumulación de los neurotransmisores y que ellos juegan un papel fundamental en la transmisión nerviosa.

Aislamiento de diversos tipos de membranas de los terminales sinápticos

En los últimos años gran parte del interés del laboratorio se ha concentrado en la separación y estudio de la membrana limitante de la terminación nerviosa, la que lleva adherida las membranas sinápticas y otras estructuras (Fig. 1C). Colocando la antes mencionada fracción M_1 sobre un gradiente de sucrosa se separan cinco capas, tres de las cuales (M_1 0.9, M_1 1.0, y M_1 1.2) contienen membranas de los terminales nerviosos (Tabla 3).²² Estas membranas han sido estudiadas: a) desde el punto de vista de su composición química en lípidos, proteínas y proteolípidos; b) en relación al contenido de enzimas fijas a las mismas y c) en su capacidad de fijar diversas sustancias radioactivas, especialmente bloqueantes colinérgicos y adrenérgicos, serotonina y drogas de acción sico-trópica.

TABLA 3

DISTRIBUCION DE DIVERSAS ENZIMAS EN LAS SUBFRACCIONES DE M₁*

Subfracciones	Estructura	Enzimas						
		AChE	Na ⁺ -K ⁺ ATPasa	K ⁺ p-nitrofenil fosfatasa	GS	Adenil ciclasa	Fosfodiesterasa	MAO
M ₁ 0.8	Mielina	1.68	1.37	0.56	0.66	1.06	1.32	0.44
M ₁ 0.9	Membranas de terminales nerviosos	3.22	2.28	2.41	0.96	2.04	1.77	0.33
M ₁ 1.0	Membranas de terminales nerviosos	2.13	3.16	1.39	2.04	2.46	2.68	0.23
M ₁ 1.2	Membranas de terminales nerviosos	0.98	1.40	2.53	1.74	1.95	1.03	0.65
M ₁ p	Mitocondria	0.15	0.17	0.30	0.73	0.31	0.43	1.56

* Se indica el contenido de cada fracción tal como se observa bajo el microscopio electrónico. Enzimas: AChE, acetilcolinesterasa; Na⁺-K⁺ ATPasa; K⁺ p-nitrofenil-fosfatasa; GS, glutamino sintetasa; adenilciclaza; fosfodiesterasa cíclica y MAO, monoaminoxidasa. Los resultados se expresan como en la Tabla 1.

Algunos de los resultados sobre la localización de enzimas se muestran en la Tabla 4. De interés especial es la localización de la acetilcolinesterasa en M₁ 0.9 y M₁ 1.0, demostrándose que estas fracciones son colinérgicas, mientras que las membranas de M₁ 1.2 son de terminales no-colinérgicas.²³ También son interesantes los resultados sobre la ATPasa sodio y potasio dependiente, la glutaminosintetasa y la adenilciclaza.²⁴ Esta última enzima junto

con la fosfodiesterasa controlan el nivel del adenosin-monofosfato cíclico, lo que sugiere que este nucleótido, tan importante por sus funciones de regulación en otros sistemas, pueda desempeñar un papel similar en la terminación nerviosa.

Producción de antisueros contra terminaciones nerviosas y membranas

Injectando en el conejo terminaciones nerviosas aisladas del conejo (sis-

TABLA 4

DISTRIBUCION DE ACETIL COLINESTERASA (AChE), GANGLIOSIDOS MEDIDOS COMO ACIDO NEURAMICO (NANA), FIJACION DE DIMETIL C¹⁴-D-TUBOCURANINA (C¹⁴ DMTC), METIL C¹⁴ HEXAMETONIO (C¹⁴ MHM) Y H₃-ALO FERINA EN LAS SUBFRACCIONES DE M₁*

Subfracción	Estructura	AChE	NANA	C ¹⁴ DMTC	C ¹⁴ MHM	H ₃ -Aloferina
M ₁ 0.8	Mielina	1.64	1.17	2.14	2.92	3.86
M ₁ 0.9	Membranas de terminales nerviosos	3.40	3.98	4.16	4.44	4.04
M ₁ 1.0	Membranas de terminales nerviosos	3.45	2.92	6.88	4.76	4.37
M ₁ 1.2	Membranas de terminales nerviosos	1.44	1.54	3.00	2.52	2.89
M ₁ p	Mitocondria	0.38	0.25	1.60	0.72	1.87

* Los resultados se expresan como en la Tabla 1. (La radioactividad se expresa por mg. proteína en cada fracción dividida por la fijación en el particulado total).

tema homólogo) o del gato (sistema heterólogo) se han producido antisue-
ros capaces de destruir in vitro las ter-
minaciones nerviosas (en presencia de

complemento) y de producir descargas
epileptógenas cuando son aplicados so-
bre la corteza del gato.²⁵ El mismo ha
sido probado contra terminales demos-

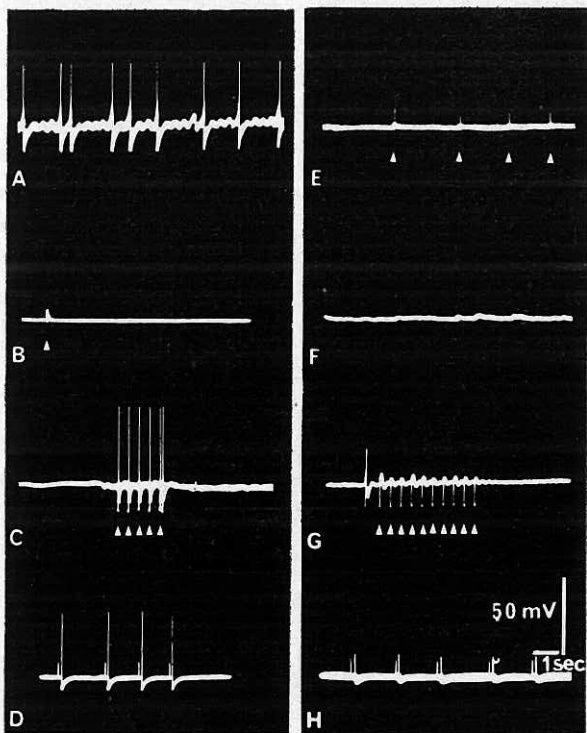


FIG. 6. Registro intracelular en un neurona de molusco sometida a la acción del anti-
siero anti M 1.0 con complemento. A: A los 20 minutos se observa la actividad espontánea
con oscilaciones del potencial de membrana y umbral de respuesta elevada. B: 20 minutos.
Colocando acetilcolina por iontoforesis sobre la neurona no hay respuesta. C: 25 minutos.
Por estimulación de los nervios no se tienen potenciales sinápticos, ni descargas; las espigas
observadas son antidrómicas; D: 25 minutos. Por estimulación intracelular aún se producen
espigas; E: 25 minutos. Por estimulación de los nervios no se obtienen potenciales sinápticos;
F: 30 minutos. La actividad espontánea ha desaparecido; G: 35-40 minutos. Por estimula-
ción de los nervios las espigas antidrómicas han desaparecido; H: 35-40 minutos. La neu-
rona no responde a la estimulación intracelular.

trándose su efecto citolítico y también se ha estudiado su acción sobre neuronas de moluscos sometidas a registros intracelulares con microelectrodos.²⁶ Los resultados electrofisiológicos son particularmente interesantes porque demuestran que, en presencia del complemento, hay un deterioro progresivo de la actividad bioeléctrica (Fig. 6). El mismo se produce en una secuencia que consiste, al principio en una elevación del umbral de descarga espontánea y desaparición de la respuesta a la acetilcolina aplicada por iontoforesis. Luego la actividad espontánea y los potenciales sinápticos son abolidos y finalmente la célula no responde más a la estimulación intracelular o antidrómica y la resistencia de la membra-

na cae en forma abrupta. Al microscopio electrónico se observa una alteración progresiva de la membrana neuronal que lleva finalmente a la citolisis.

Propiedades receptoras de las membranas sinápticas

Un postulado básico de la teoría química de la transmisión es que la membrana subsináptica debe contener los receptores químicos para los varios transmisores. Dado que dicha membrana permanece adherida a la membrana del terminal (Fig. 1C) era de esperar que aquella también contuviera al receptor. Utilizando bloqueantes colinérgicos radioactivos se pudo demos-

TABLA 5

FIJACION DE LA DIMETIL-C¹⁴-d-TUBOCURARINA EN LAS FRACCIONES DE M₁ DEL CEREBRO DEL GATO*

Fracción	Contenido	Sedimento control		Extracto-cloroformo metanol		b a
		Protei- na (mg/g)	c/min mg pro- teína (a)	Protei- na (mg/g)	c/min mg pro- teína (b)	
Experimento 1						
M ₁ 1.0	Membranas de terminales nerviosos	1.32	10.460	0.13	140.307	14.0
M ₁ 0.8	Mielina	25.20	5.838	7.20	18.850	3.2
Experimento 2						
M ₁ 1.0	Membranas de terminales nerviosos	0.93	16.744	0.08	160.100	9.5
M ₁ 0.8	Mielina	17.90	6.948	9.80	14.734	2.1
Experimento 3						
M ₁ 0.9	Membranas de terminales nerviosos	0.68	19.617	0.12	141.458	7.2
M ₁ 0.8	Mielina	8.00	12.788	5.00	18.092	1.4

* Se indica la fracción utilizada, su contenido estructural al microscopio electrónico y en proteínas y las medidas de radioactividad en cuentas por minuto/mg. proteína. La relación $\frac{a}{b}$ indica el aumento en la actividad específica producido con la extracción del sedimento control con cloroformo-metanol³¹.

trar que la mayor capacidad de fijación de los mismos estaba asociada con las membranas ricas en acetilcolinesterasa (Tabla 4).²⁷ También se halló que la acetilcolina, la eserina y la atropina en altas concentraciones podían interferir "in vitro" con la fijación de la dimetil C¹⁴-tubocurarina y el metil-C¹⁴-hexametonio.

Las membranas separadas en M₁ 0.9 y M₁ 1.0 son ricas en gangliósidos²⁸ lo que presenta un interés especial en relación con su posible relación con el receptor de la serotonina,²⁹ problema que estamos actualmente investigando. En cambio, las vesículas sinápticas están prácticamente desprovistas de gangliósidos.

Mediante la acción del Triton X-100, un detergente no iónico, en bajas concentraciones es posible solubilizar la mayor parte de las enzimas fijas a las membranas, con pérdida de proteínas y lípidos, al mismo tiempo que persiste la capacidad de fijación de los bloqueadores colinérgicos.³⁰ Al microscopio electrónico se observó que este sedimento contiene principalmente a la unión sináptica (Fig. 1 D).

Estos hallazgos revelan que las propiedades receptoras se hallan precisamente en esa zona de la región sináptica y probablemente en la membrana subsináptica. También se demuestra que el receptor colinérgico y la acetilcolinesterasa se encuentran en dos entidades macromoleculares diferentes.

Aislamiento de un proteolípido receptor de la tubocurarina

Los resultados antes mencionados sobre la capacidad de fijación de los

bloqueantes colinérgicos por parte de las membranas del terminal nervioso y de la unión sináptica³⁰ nos encaminaron a tratar de aislar la sustancia receptora.³¹ Membranas ricas en AChE de la fracción M₁ 0.9 y M₁ 1.0 fueron tratadas con dimetil C¹⁴-d-tubocurarina y luego extraídas con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1). Como testigo se utilizó la fracción M₁ 0.8 rica en mielina. Este tratamiento inactivó la AChE y extrajo casi todo el material radioactivo de la proteína residual. En el extracto orgánico se encontró un aumento de 7.2 a 14 veces en la actividad específica, expresada por mg de proteína (Tabla 5). En cambio la mielina tuvo una fijación y una concentración en el extracto mucho menor. Por partición con agua se pudo demostrar que la fijación de la tubocurarina no se efectúa sobre los gangliósidos y en corridas en capa delgada sobre gel de sílica se encontró que prácticamente toda la radioactividad se mantenía con los proteolípidos.³⁰ En estos momentos se están separando diversos proteolípidos de la corteza cerebral y de las membranas en columnas de Sephadex. Estos resultados han permitido aislar una proteína que carece prácticamente de colesterol, cerebrosídeos y fosfolípidos y que tiene toda la capacidad de fijación de la tubocurarina. Estos y otros estudios que se siguen activamente con diversos compuestos radioactivos de naturaleza bloqueante, neurotransmisora o psicotrópica hacen pensar que pronto tendremos un panorama mucho más claro sobre la naturaleza y propiedades de

los receptores del sistema nervioso central.

En resumen: Partiendo de los estudios morfológicos al microscopio electrónico se llega a un concepto unitario de los procesos neurohumorales que las neuronas utilizan para intercomunicar la información a nivel sináptico o actuar sobre receptores más distantes integrando las diversas funciones del organismo. El uso del fraccionamiento celular asociado al análisis submicroscópico permite la separación de las terminaciones nerviosas y la progresiva disección de la región sináptica. Del sistema nervioso central se han separado terminaciones aminérgicas que contienen las diversas aminas biógenas y otras no-aminérgicas que probablemente están asociadas con otros mecanismos de transmisión. Se postula que en el conjunto de las terminaciones no-aminérgicas se encuentran aquellas de naturaleza inhibitoria productoras del ácido γ -aminobutírico. El uso de drogas convulsionantes permite ahondar en el conocimiento de la heterogeneidad bioquímica y funcional de las terminaciones nerviosas y aclarar el mecanismo por el cual se producen las convulsiones.

El aislamiento de las vesículas sinápticas ha permitido demostrar definitivamente que ellas contienen los neurotransmisores en unidades multimoleculares o cuánticas, las que se liberan bajo la influencia del impulso nervioso. La separación de diversos tipos de membranas del terminal nervioso ha permitido la localización de diversas enzimas esenciales en su fun-

cionamiento. También se han podido estudiar sus propiedades receptoras mediante el uso de bloqueantes, neurotransmisores y drogas psicotrópicas radioactivas. La disección de la terminación ha sido llevada hasta el extremo de separar la unión sináptica compuesta por las membranas sinápticas, las que conservan la totalidad de la propiedad receptora del terminal sináptico. Estos estudios culminan con el aislamiento de una proteína especial, a partir de la membrana del terminal, la que posee algunas de las propiedades receptoras de la sinapsis.

REFERENCIAS

1. De Robertis, E.: *Histophysiology of synapsis and neurosecretion*. Oxford, Pergamon Press., 1964.
2. *Symposium of the International Society for Neurovegetative Research on Neurohormones and Neurohumors*. Amsterdam, 1967.
3. De Robertis, E.: *Microscopía electrónica e histoquímica en el estudio del sistema nervioso. Ultraestructura y organización de la sinapsis*. Libro conmemorativo del Primer Centenario de la Academia Nacional de Medicina. México, 1964, p. 3.
4. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. y Salganicoff, L.: *J. Neurochem.* 9: 23, 1962.
5. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrino de Iraldi, A. y Zieher, L. M.: *J. Neurochem.* 10: 225, 1963.
6. Rodríguez de Lores Arnaiz, G. y De Robertis, E.: *J. Neurochem.* 11: 213, 1964.
7. Alberici, M., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. y De Robertis, E.: *Life Sci.* 4: 1951, 1964.
8. Kataoka, K. y De Robertis, E.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 156: 114, 1967.
9. Roberts, E.: Ed., *Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid*. New York, Pergamon Press, 1960; Florey, E. Ed., *Nervous inhibition*. New York. Pergamon Press,

1961. *Symposium on structure and function of neuronal inhibition mechanisms*. 4th. Int. Meet. Neurobiol. Stockholm, 1966.
10. Salganicoff, L. y E. De Robertis, E.: *Life Sci.* 2: 85, 1963.
11. Siskin, B., Roberts, E., y Baxter, C. F.: En: *Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid*. Ed. E. Roberts, New York. Pergamon Press, 1960, p. 219.
12. Salganicoff, L., De Robertis, E.: *J. Neurochem.* 12: 287, 1965.
13. De Robertis, E., Sellinger, O. Z., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Alberici, M., y Zieher, L. M.: *J. Neurochem.* 14: 81, 1967.
14. Alberici, M., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. y De Robertis, E.: *Biochem. Pharmacol.* (En prensa).
15. Uchizono, K.: *Nature*, 207: 642, 1965.
16. De Robertis, E.: En: *Structure and functions of inhibitory neuronal mechanisms*. Oxford. Pergamon Press, 1968, p. 511.
17. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., y Pellegrino de Iraldi, A.: *Nature*, 194: 974, 1962.
18. Zieher, L. M. y De Robert, E.: 6º Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Viña del Mar, Chile. Santiago de Chile. Editorial Universitaria, S. A., 1964, p. 150.
19. Maynert, E. W., Levi, R. y De Lorenzo, A.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 144: 385, 1964.
20. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., y Zieher, L. M.: *Life Sci.*, 4: 193 1965. De Robertis, E.: *Pharmacol. Rev.*, 18: 413, 1966.
21. Whittaker, V. P., Michaelson, I. A. y Kirkland, R. J.: *Biochem. J.* 90: 293, 1964. Whittaker, V. P. y Sheridan, J.: *J. Neurochem.* 12: 363, 1965.
22. De Robertis, E., Alberici, M., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. y Azcurra, J. M.: *Life Sci.* 5: 577, 1966.
23. Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Alberici, M., y De Robertis, E.: *J. Neurochem.* 14: 215, 1967.
24. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Alberici, M., Sutherland, E. W. y Butcher, R. W.: *J. Biol. Chem.* 242: 3487, 1967.
25. De Robertis, E., Lapetina, E., Pecci Saavedra, J. y Soto, E. F.: *Life Sci.* 5: 1979, 1966.
26. Wald, F., Mazzuchelli, A., Lapetina, E. G. y De Robertis, E.: *Exp. Neurol.* (En prensa).
27. Azcura, J. M. y De Robertis, E.: *Int. J. Neuropharmacol.* 6: 15, 1967.
28. Lapetina, E. G., Soto, E. F. y De Robertis, E.: *Biochem. Biophys. Acta.* 135: 33, 1967.
29. Wooley, D. W. y Gommi, B. W.: *Nature*, 202: 1074, 1964.
30. De Robertis, E., Azcura, J. M. y Fiszer, S.: *Brain Res.* 5: 45, 1967.
31. De Robertis, E., Fiszer, E. y Soto, E. F.: *Science*, 158: 928, 1967.