

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"MECANISMO DE ACCION DE TOXINAS DEL ALACRAN  
MEXICANO CENTRUROIDES NOXIUS SOBRE TERMINA-  
LES NERVIOSAS AISLADAS DE CEREBRO DE RATON"

Tesis para optar por el grado de:  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA LA M. en C.

MARIA SITGES BERRONDO

México, D.F.

1987

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	12
II.1. LOS ALACRANES Y SUS VENENOS	
Distribución geográfica	12
El veneno de los escorpiones	14
Estudios realizados con el veneno de <u>Centruroides noxius</u> Hoffmann	15
II.2. NEUROTOXINAS DE ORIGEN NATURAL QUE ALTERAN EL FUNCIONAMIENTO DE LA SINAPISIS	24
A. Toxinas de origen natural con acción sobre la función presináptica: emisión de señales químicas.	
A.1. Toxinas estimuladoras de la liberación de mensajeros químicos:	
Alcaloides Esteroidales Neurotóxicos de diversos orígenes	25
Toxinas de alacranes	27
Toxinas de anémoma	29
A.2. Toxinas inhibitoras de la liberación de mensajeros químicos:	
Toxinas de bacterias que inhiben la liberación de neurotransmisores	29
Guanidinas heterocíclicas neurotóxicas: TTX y STX	30
Toxinas de serpientes con acción presináptica	33
B. Toxinas de origen natural con acción sobre la función postsináptica: recepción de señales químicas.	
Toxinas de serpientes	35
Toxinas de bacterias	36

II.3. SINAPTOSOMAS PARA ESTUDIAR LIBERACION DE NEURO- TRANSMISORES _____	37
II.4. PRINCIPIO DEL METODO DE DETECCION DEL NEUROTRANS- MISOR LIBERADO _____	39
II.5. PRINCIPIOS BASICOS QUE DIRIGIERON LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL _____	45
II.6. FUNDAMENTOS PARA EL DISEÑO DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL _____	49
II.7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EMPLEADA PARA CARACTE- RIZAR EL MECANISMO DE ACCION DE LAS TOXINAS DE <u>C. NOXIUS</u> SOBRE LA LIBERACION DE TRANSMISORES _____	56
III. DESARROLLO EXPERIMENTAL _____	60
III.1. Toxinas naturales como herramientas experimentales en Neu- robiología _____	63
III.2. Noxiustoxin, a short chain toxin from the mexican scorpion <u>Centruroides noxius</u> , induces transmitter release by blocking $K^+$ permeability _____	73
III.3. Characterization of the actions of toxins II.9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion <u>Centruroides noxius</u> on transmitter release from mouse brain synaptosomes _____	79
Organización de la Discusión General _____	88

IV. DISCUSION GENERAL Y COMENTARIOS _____	89
Valoración de la estrategia experimental _____	96
El Calcio y la liberación de neurotransmisores _____	99
APENDICE I . Eventos moleculares que participan en el proceso de liberación de neurotransmisores _____	104
APENDICE II . Herramientas Farmacológicas Experimentales _____	109
V. REFERENCIAS _____	112

## INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1.	Secuencias completas o N-terminal de las toxinas de escorpiones _____	16
FIGURA 2.	Fracccionación del veneno soluble de <u>C. noxius</u> _____	18
FIGURA 3.	Cromatografía de intercambio iónico de la fracción II del veneno de <u>C. noxius</u> _____	19
FIGURA 4.	Comparación de la secuencia de aminoácidos N-terminal de las toxinas II-9.2.2, II-10, II-13 y II-14 del veneno de <u>C. noxius</u> _____	21
FIGURA 5.	Secuencia de aminoácidos de la toxina II-11 (noxistoxina) del veneno de <u>C. noxius</u> _____	21
FIGURA 6.	Acción de la toxina II-10 sobre los canales de $\text{Na}^+$ del axón gigante del calamar _____	22
FIGURA 7.	Acción de la toxina II-11 sobre los canales de $\text{K}^+$ _____	23
FIGURA 8.	Alcaloides esteroidales neurotóxicos de origen natural que alteran el comportamiento de los canales de $\text{Na}^+$ sensibles a voltaje aumentando su permeabilidad _____	26
FIGURA 9.	Guanidinas heterocíclicas neurotóxicas que bloquean a los canales de $\text{Na}^+$ sensibles a voltaje _____	31
FIGURA 10.	Mecanismos de Inactivación de Neurotransmisores _____	40
FIGURA 11.	Captura del neurotransmisor radioactivo en estudios de liberación de neurotransmisores _____	42
FIGURA 12.	Comparación de la liberación del neurotransmisor radioactivo y el transmisor endógeno _____	44
FIGURA 13.	Distribuciones iónicas y permeabilidades iónicas relativas de una membrana en estado de reposo _____	47
FIGURA 14.	Alteraciones de las concentraciones iónicas o de las permeabilidades iónicas que generan liberación de transmisores _____	50

FIGURA 15.	Estimulación de la liberación de GABA inducida con concentraciones crecientes de alto $K^+$	51
FIGURA 16.	Diagrama que esquematiza la "Hipótesis del $Ca^{2+}$ "	54
FIGURA 17.	Efecto de la fracción II del veneno de <u>C. noxius</u> sobre la liberación de GABA de sinaptosomas de cerebro de ratón	62
FIGURA 18.	Efecto de la toxina II-14, contenida en el veneno de <u>Centruroides noxius</u> , sobre la liberación de GABA de sinaptosomas de cerebro de ratón	91
FIGURA 19.	Herramientas experimentales útiles para estudiar los mecanismos de acción de nuevas sustancias que alteren la liberación de neurotransmisores	111

NOTA : ESTE INDICE DE FIGURAS NO INCLUYE A LAS FIGURAS DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS EN LA PARTE DE DESARROLLO EXPERIMENTAL (a excepción de la figura 17 ).

## I. INTRODUCCION.

En Neurobiología varias moléculas neurotóxicas producidas por diferentes especies tanto de plantas como de animales, han jugado un papel importante. Los estudios neurobiológicos en donde se reportan alteraciones inducidas por toxinas de origen natural son muy variados; están realizados en diferentes preparaciones con diversos abordajes experimentales. Esto no es sorprendente, dado que un gran número de toxinas naturales, cuyos mecanismos de acción han sido establecidos, interactúan con diferentes componentes moleculares directamente involucrados en la comunicación nerviosa. En consecuencia, este tipo de interacciones se reflejan en varios niveles del funcionamiento del sistema nervioso. Por ejemplo, algunos de los péptidos contenidos en el veneno del alacrán mexicano Centruroides noxius, al ser inyectados a animales de laboratorio los matan en unas cuantas horas después de la presentación de síntomas neurobiológicos (Poussani y col. 1981 c), y al ser aplicados a una preparación de axón gigante de calamar alteran selectivamente las corrientes iónicas de su membrana (Carbone y col. 1982).

En estudios electrofisiológicos en el axón gigante del calamar, así como en fibras nerviosas o músculo esquelético de anfibio, se ha encontrado que varias toxinas naturales, algunas de ellas procedentes de venenos de escorpiones, alteran de diferentes formas las corrientes



de  $\text{Na}^+$  de sus membranas (Schwarz y col. 1973, Gillespie y Meves 1980, Wang y Strichartz 1982, Meves y col. 1982, Jaimovich y col. 1982, Lazdunski y Renaud 1982, Carbone y col. 1984).

Las preparaciones de axón gigante, músculo esquelético o fibras nerviosas, permiten por su tamaño, la colocación de electrodos con los que se pueden registrar, cambios en las corrientes iónicas de sus membranas en respuesta a alguna manipulación experimental. En especial, la preparación del axón gigante del calamar ha sido exitosamente usada en estudios electrofisiológicos: del análisis de las corrientes iónicas de la membrana del axón gigante del calamar, se originó el modelo de "dos canales" (uno de  $\text{Na}^+$  y otro de  $\text{K}^+$ ) que explicaba las bases iónicas del potencial de acción (Hodgkin y col. 1949, Hodgkin y Huxley 1952 a, 1952 b, 1952 c, 1952 d). Durante mucho tiempo se pensó que dicho modelo bioeléctrico de la membrana era aplicable a todas las membranas de la célula nerviosa. Actualmente, además de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del axón, se ha encontrado otro tipo de canales al estudiar las membranas de otras regiones de la neurona. Esto ha sido posible gracias a que el sistema nervioso de los moluscos cuenta con neuronas de gran tamaño y ganglios que exhiben sinapsis gigantes. La disección de estas estructuras "gigantes" ha permitido estudiar las corrientes iónicas de regiones neuronales tales como el soma o las terminales nerviosas mediante métodos electrofisiológicos. Estos estudios, han dado lugar al concepto de multicanales que considera a los canales

iónicos que en estas preparaciones han podido conocerse (Kandel 1980). Así, además de las corrientes iónicas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de los axones y fibras nerviosas, en el cuerpo neuronal de moluscos se han encontrado otras corrientes iónicas adicionales (Hagiwara y col. 1961, Connor y Stevens 1971a, 1971b, Neher 1971, Meech 1974, Gerasimov y col. 1965, Geduldig y Junge 1968) y en las terminales nerviosas, las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  han cobrado importancia. En vista de que el desarrollo experimental de esta tesis está realizado en terminales nerviosas, a continuación mencionaré brevemente esta parte de la historia electrofisiológica:

Baker y colaboradores (1971) encontraron que en el axón gigante del calamar, un potencial de acción sólo es capaz de movilizar una pequeña cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales sensibles a voltaje y selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$ . Según Katz y Miledi (1967a, 1967b, 1969) estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del axón, sólo funcionarían como acarreadores de carga (como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$ ), mientras que en las terminales nerviosas deberían servir para permitir el acceso al  $\text{Ca}^{2+}$  que juega un papel importante en la liberación de transmisores por lo que deberían ser mucho más abundantes en esta región neuronal. Para explorar esta hipótesis, Katz y Miledi (1967a, 1967b, 1969) estudiaron la participación de los iones:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la liberación del neurotransmisor en la sinápsis gigante del calamar, que por su tamaño permitiría

la inserción de 2 electrodos en la presinapsis: uno de estimulación y el otro de registro, además de un electrodo de registro en la post-sinapsis. Con ayuda de antagonistas selectivos de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ , ellos pudieron correlacionar la corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  con el proceso de liberación del neurotransmisor. Empleando esta misma preparación, Llinás y colaboradores (1976b, 1981) hicieron contribuciones importantes relacionadas con la dinámica del acoplamiento entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación del transmisor. Ellos demostraron que la aparición del potencial excitatorio en la fibra postsináptica se ve precedido de una corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  a la terminal presináptica.

La función de la membrana del axón o de las fibras nerviosas es la conducción del impulso nervioso mediante movimientos de cargas a través de sus canales iónicos, mientras que la función de las terminales nerviosas es la emisión de señales a través de la liberación de mensajeros químicos. En vista de que la función de dichas estructuras es diferente, es posible que los canales insertos en las membranas de las terminales presinápticas, exhiban diferencias funcionales al compararlos con los del axón.

No obstante la importancia de los estudios electrofisiológicos en las terminales nerviosas aisladas de moluscos, en dichos estudios la cantidad de neurotransmisor liberado no se mide directamente, sino mediante la amplitud del potencial registrado en la postsinapsis. Además de esta preparación sináptica de molusco que por sus dimensio-

nes permite un abordaje de tipo electrofisiológico, para estudiar la liberación de mensajeros químicos o neurotransmisores contamos con la preparación de terminales nerviosas aisladas de sistema nervioso central de mamífero, que nos permite a través de un abordaje bioquímico detectar directamente al neurotransmisor liberado.

En estudios neuroquímicos en terminales nerviosas aisladas de sistema nervioso central de mamíferos se ha encontrado que algunos de los péptidos neurotóxicos contenidos en los venenos de los escorpiones Tityus serrulatus o Centruroides suffusus, estimulan la liberación de neurotransmisores (Coutinho-Netto y col. 1980, Couraud y col. 1982).

La evidencia experimental indica que los canales iónicos contenidos en las membranas de las diferentes regiones neuronales (soma, axones, terminales) están distribuidos en diferentes proporciones o incluso son de diferentes tipos. Por este motivo no es posible hacer extrapolaciones totalmente confiables de los hallazgos obtenidos en una región particular de la célula nerviosa como por ejemplo el axón, a otra región de la misma (i.e. terminales nerviosas), e incluso, es probable que encontremos diferencias cuando pasamos de uno a otro filum (moluscos vs. mamíferos).

Como algunas toxinas de escorpiones han demostrado afectar distintas manifestaciones funcionales (corrientes iónicas, liberación de

transmisores) de diversas regiones neuronales, y con la evidencia de que entre los péptidos contenidos en el veneno del escorpión Cen - truroides noxius que fueron letales al ser inyectados a ratones, algunos inhibieron selectivamente las corrientes iónicas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del axón gigante del calamar, mientras que otros no ejercieron ningún efecto sobre las mismas (Carbone y col. 1982, 1984), decidimos ampliar la caracterización biológica de estos péptidos estudiando su posible acción sobre la manifestación funcional (liberación de transmisores) de las terminales nerviosas del sistema nervioso central del ratón.

Las terminales nerviosas purificadas de cerebro de mamífero conocidas como sinaptosomas, actualmente pueden ser aisladas por métodos bien establecidos (De Robertis 1961, Hajós 1975, Dodd y col. 1981). Sin embargo, en las membranas de estas terminales no se ha podido demostrar la presencia de canales iónicos mediante métodos electrofisiológicos debido a lo reducido de su tamaño (en promedio una micra). No obstante hay muchas evidencias que impiden poner en duda la funcionalidad de canales iónicos en los sinaptosomas (Krueger y Blaustein 1980, Bartschat y Blaustein 1985).

Los estudios bioquímicos de liberación de transmisores en sinaptosomas tienen la ventaja sobre los estudios electrofisiológicos de que en ellos la cantidad de neurotransmisor liberado se mide directamente en las fracciones colectadas, mientras que en los estu-

os electrofisiológicos, la cantidad de transmisor (6 transmisores) liberado se infiere indirectamente a través de la amplitud de los potenciales postsinápticos.

La ventaja del abordaje bioquímico reside en que permite cuantificar directamente a cualquier mensajero químico cuya liberación se altere en respuesta a una determinada condición experimental. Sin embargo, esto es posible siempre y cuando contemos con un método que tenga la suficiente sensibilidad para poder detectar al mensajero químico cuya liberación nos interesa estudiar.

Los mensajeros químicos son moléculas que al secretarse o liberarse desde las terminales nerviosas juegan algún papel en la comunicación de las células nerviosas. Por consiguiente con este término me refiero tanto a los neurotransmisores clásicos : acetilcolina, ácido gamma amino butírico, glutamato, serotonina, dopamina, norepinefrina , epinefrina, etc. (Tapia, 1976), como a los transmisores peptídicos, a las hormonas y a los moduladores que incluyen a moléculas incluso de naturaleza lipídica (Bradford y col. 1983). Como se puede apreciar, el grupo de moléculas que actúan como mensajeros químicos es muy variado y en consecuencia, los métodos para detectar mensajeros químicos también son diversos.

Hay métodos bioquímicos establecidos para la detección de diferentes grupos funcionales que nos permiten medir con elevada sensibilidad a algunos de los mensajeros químicos. Entre estos métodos se encuentra la cuantificación de las monoaminas por cromatografía líquida de alta presión mediante un detector electroquímico y la

detección de aminoácidos neurotransmisores mediante detección fluorimétrica. Para la detección de mensajeros de naturaleza peptídica tales como las hormonas ó los péptidos neurotransmisores , el radioinmunoanálisis ha sido ampliamente utilizado. Adicionalmente a estos métodos que implican un alto costo y la disponibilidad del equipo adecuado, existe un método ampliamente usado en estudios de liberación de neurotransmisores que consiste en medir la liberación del neurotransmisor marcado radioactivamente previamente captado por la preparación. La explicación de este último método así como sus fundamentos se encuentran mas ampliamente discutidos en el en el capítulo II.4 de esta tesis , ya que este método fue el que se utilizó para la realización de los trabajos que se presentan en la parte III de la tesis.

Una vez elegido el método de detección, habia que elegir al neurotransmisor cuya liberación iba a ser medida para estudiar los posibles efectos de las toxinas del veneno de C. noxius sobre la liberación de transmisores. Elegimos al transmisor inhibidor ácido gamma aminobutírico (GABA) por varias razones prácticas: El GABA está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de mamíferos, lo que nos permite usar al cerebro completo como materia prima para la purificación de las terminales presinápticas (no es necesario disecar una estructura cerebral enriquecida con el neurotransmisor como en el caso de otros transmisores). Las terminales nerviosas que

normalmente liberan GABA, contienen en sus membranas sistemas de captura de este transmisor que nos permiten cargar a los sinaptosomas con GABA marcado radioactivamente para después medir su liberación bajo diferentes condiciones experimentales con alta sensibilidad.

La alteración de la liberación de mensajeros químicos por medio de agonistas y antagonistas selectivos de los diferentes canales iónicos, ha probado ser una buena alternativa para caracterizar el mecanismo de acción subyacente a la liberación de transmisores provocada por un fármaco bajo estudio. Con este tipo de abordaje, decidimos elucidar las acciones de las toxinas de C. noxius sobre los canales iónicos de la membrana sinaptosomal. Para ello, aislamos las terminales nerviosas del cerebro completo del ratón por el método de Hajós (1975), para proceder a estudiar como se alteraba la liberación de GABA en presencia de algunos de los péptidos de C. noxius que habían resultado letales al ser inyectados en ratones. Para estudiar los posibles cambios en la liberación del <sup>3</sup>H-GABA en respuesta a dichos péptidos, utilizamos un método de perfusión continua. En este método, los sinaptosomas son bañados con diferentes medios de perfusión (la composición detallada de éstos se encuentra en las páginas 74 y 81 de esta tesis), que son arrastrados continuamente con ayuda de una bomba peristáltica.

La presencia de cualquiera de las 3 toxinas (II-9, II-10 y II-11) purificadas del veneno de C. noxius en el Ringer de perfusión estimuló la liberación del <sup>3</sup>H-GABA contenido en los sinaptosomas.



Para elucidar el mecanismo de acción a través del cual cada toxina estimulaba la liberación del GABA, probamos como se modificaba la liberación inducida por la toxina en presencia de ionóforos, agonistas y antagonistas selectivos de los canales iónicos. También probamos cómo se modificaba la liberación inducida por la toxina cuando se omitía la presencia de ciertos iones o se aumentaba su concentración en el Ringer de perfusión. Siguiendo este protocolo experimental nos fue posible determinar el mecanismo de acción por medio del cual cada toxina estimula la liberación de GABA de sinaptosomas.

#### Organización de la tesis.

En esta tesis se incluyen 3 trabajos que resultaron de los estudios realizados con las toxinas del alacrán mexicano Centruroides noxius en terminales nerviosas aisladas de cerebro de ratón. El trabajo que aparece primero, fué cronológicamente escrito después de los que le preceden, pero lo antepuse a ellos pues es un trabajo de divulgación en español que compila los aspectos mas relevantes de los trabajos II y III. Este trabajo fué escrito para las Jornadas Anuales del Instituto Mexicano de Psiquiatría, donde actualmente me encuentro trabajando. En el trabajo II (Sitges y col. 1986), está propuesto el mecanismo de acción de la toxina II-11 o noxiustoxina del veneno de C. noxius pa-

ra inducir la liberación de GABA. En el trabajo III de esta tesis (Sitges y col. 1987) se proponen los mecanismos de acción de las toxinas II-9 y II-10, también contenidas en el veneno del escorpión Centruroides noxius, para provocar la liberación de neurotransmisores.

En la parte de Antecedentes, que precede a estos trabajos, hice un esfuerzo por clasificar a las toxinas de origen natural de acuerdo con sus acciones a nivel de la sinapsis. Esto, con objeto de ubicar a las toxinas de escorpiones en un marco teórico más general. Los antecedentes también incluyen una parte relacionada con el principio en el que se basa el método de detección del GABA liberado, y otra parte dedicada a los fundamentos en los que se apoya la estrategia experimental que se utilizó para caracterizar las acciones de las toxinas de Centruroides noxius sobre la liberación de transmisores. La organización de la parte de Discusión General y Comentarios, está al principio de la misma. Después de esta discusión aparecen dos apéndices, cuya justificación se da al principio de cada uno.

## II. ANTECEDENTES

Los antecedentes de esta tesis abarcan 2 secciones básicamente: la primera sección incluye la clasificación de los alacranes venenosos en paralelo con su distribución geográfica. Las especies mexicanas reciben especial atención. Esta parte también incluye aspectos de los venenos de escorpiones en general y del veneno de Centruroides noxius en particular. En la segunda sección intento clasificar a las toxinas de origen natural con base en sus acciones a nivel de la sinapsis, doy especial atención a las toxinas cuyas acciones sobre el funcionamiento de la presinapsis han sido reportadas.

### II.1. LOS ALACRANES Y SUS VENENOS

Distribución geográfica. Los alacranes que producen venenos altamente tóxicos, están representados por los géneros: Leiurus, Androctonus, Buthus, Buthotus y Heterometrus del Norte de Africa, India y Medio Oriente y por los géneros Tityus y Centruroides de Lati-

noamérica. El género Tityus se encuentra en Brasil, Trinidad, Tobago y Venezuela y el Centruroides se localiza en México y Sur de Estados Unidos (Bazolet, 1971).

El género Centruroides cuenta con varias especies cuya distribución geográfica se indica a continuación (Hoffman, 1938):

1. Centruroides sculpturatus localizado en el Sur de Arizona y al Norte de Sinaloa.
2. Centruroides suffusus, con dos subespecies:
  - a) C. suffusus chiaravigli al Norte de la Meseta Central de la República Mexicana.
  - b) C. suffusus suffusus localizado al Sur de Durango, Noroeste de Zacatecas y Este de Sinaloa.
3. Centruroides noxius que habita en el estado de Nayarit y al Sur este de Sinaloa.
4. Centruroides limpidus con dos subespecies:
  - a) C. limpidus limpidus que se encuentra en el Estado de Morelos, Sureste del Estado de México, Sureste de Michoacán y Suroeste de Puebla, principalmente en la cuenca del río Balsas.
  - b) C. limpidus tecomanus que habita en el estado de Colima.
5. Centruroides elegans con dos subespecies:
  - a) C. elegans insularis que se encuentra en las Islas Marías.
  - b) C. elegans elegans que habita en dos regiones geográficas

separadas, una al Norte de Jalisco, áreas costeras de Nayarit y en Sinaloa y otra en la región costera de Guerrero y parte de Oaxaca.

6. Centruroides infamatus se encuentra en el centro del país, en el sur de Durango y en Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán y Jalisco. Cuenta con dos subespecies: C. infamatus y C. infamatus ornatus.

El veneno de los escorpiones. El veneno de los alacranes que se obtiene por estimulación eléctrica del telson, tiene una apariencia lechosa opalescente y su pH es aproximadamente de 7. El veneno así obtenido se recupera en agua bidestilada y contiene un material insoluble que carece de toxicidad. Este, está aparentemente constituido por mucoproteínas y desechos celulares y puede separarse por centrifugación. La parte soluble, en donde se retienen todas las fracciones tóxicas del veneno, está compuesta principalmente por proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares y por pequeñas cantidades de lípidos, nucleótidos, sales inorgánicas y aminoácidos libres. Entre las proteínas del veneno de alacrán se encuentran presentes algunas enzimas, éstas sin embargo no parecen ser las responsables de la acción letal del veneno, como es el caso de los venenos de otros animales ponzoñosos, que contienen enzimas del tipo de las fosfolipasas o proteinasas. La presencia de hialuronidasa en una cantidad considerable parece ser una constante en el veneno de todas las especies de alacranes.

Los componentes del veneno de alacrán que resultan letales al realizar las pruebas rutinarias de toxicidad, que consisten en la inyección intraperitoneal de una dosis pequeña (i.e. 2 a 3  $\mu$ gr/gr. de peso) a animales de laboratorio, están representados principalmente por una serie de polipéptidos básicos de pesos moleculares cercanos a 7 000. La composición de aminoácidos, así como su grado de toxicidad, varían. Los polipéptidos neurotóxicos de los alacranes latinoamericanos están constituidos en general por 53 a 65 residuos aminoácidos (Possani y col., 1977, 1978, 1981a, 1981b, 1985). Estos polipéptidos "largos" contrastan con la toxina II-11 o noxiustoxina contenida en el veneno del alacrán mexicano C. noxius que es una toxina "corta" que está constituida por 39 residuos aminoácidos. El número de aminoácidos que conforman a las toxinas de otros alacranes, entre ellos los norteafricanos, varía de 36 a 70 residuos (Miranda y col., 1970; Babbin y col., 1975; Zlotkin y col., 1978).

La estructura primaria completa o N-terminal de muchas de las toxinas contenidas en los venenos de distintas especies de alacranes venenosos han sido determinadas por varios grupos de investigación (Fig. 1). Como se puede observar en la figura 1 las toxinas provenientes de los venenos de distintas especies de alacranes exhiben homologías en sus secuencias de aminoácidos.

Estudios realizados con el veneno de Centruroides noxius Hoffman. Entre los venenos producidos por las diferentes especies



del género Centruroides, la noxius es de las más potentes. Su veneno se caracteriza por una virulencia especial, más rápido y más intenso en su acción (Hoffman y Vargas, 1935; Hoffmann, 1938). El fraccionamiento y purificación de los componentes del veneno de C. noxius (Porsani y col., 1981c), se realiza con una primera separación del veneno soluble a través de una columna de Sephadex G-50 de donde se obtienen 3 fracciones: la fracción I está constituida por componentes de alto peso molecular entre ellos hialuronidasa; la fracción II por componentes entre 3 000 y 15 000 de peso molecular (es la fracción que contiene a los polipéptidos neurotóxicos), y la fracción III que contiene péptidos de bajo peso molecular (Fig. 2). La cromatografía de intercambio iónico en carboximetilcelulosa (CMC) de la fracción II obtenida del veneno soluble de C. noxius da como resultado la separación de 14 componentes (Fig. 3). De éstos, el II-8, II-9, II-10, II-11 y II-13 son letales, pues al ser inyectados intraperitonealmente a una dosis entre 2 y 4  $\mu\text{g}/\text{gr}$  de ratón, matan a los animales durante las 20 horas siguientes a su inyección. Los componentes II-6, II-12 y II-14 son tóxicos cuando se inyectan a la misma dosis (2-4  $\mu\text{g}/\text{gr}$  de ratón). Se toman como parámetros de toxicidad síntomas tales como: excitabilidad, salivación, parálisis temporal de los miembros anteriores, disnea (durante las 20 horas siguientes a la inyección del componente). Los otros componentes, no son tóxicos, ya que al ser inyectados intraperitonealmente a dicha dosis no producen cambios aparentes en los animales, los cuales se comportan de manera similar a los ratones ~~testigo~~



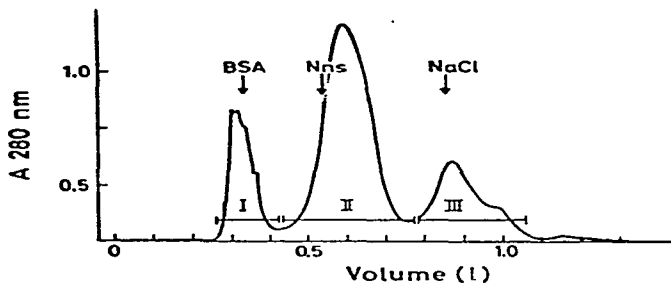
FRACCIONAMIENTO DEL VENENO SOLUBLE DE C. NOXIUS .

Fig. 2 En una columna de Sephadex G-50 de 2.9 x 170 cm, equilibrada con acetato de amonio 0.02 M pH 7.4, se cargan 6.3 ml del veneno soluble (500 unidades de absorbancia a 280 nm) y se eluyen con el mismo amortiguador a un flujo de 50 ml/hr. Se colectan fracciones de 10 ml como se indica en las abcisas. Las fracciones I, II y III contienen respectivamente 17, 63 y 20% del material recuperado. La única fracción tóxica (II), se liofiliza y se guarda a  $-20^{\circ}$  C para cromatografías posteriores. Marcadores de peso molecular: BSA, albúmina de suero bovino PM 66 000; N.n.s., toxina de Naja naja siamensis PM 8 000 y NaCl. Figura tomada de Possani y col. 1981c.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION II  
 DEL VENENO DE C. NOXIUS .

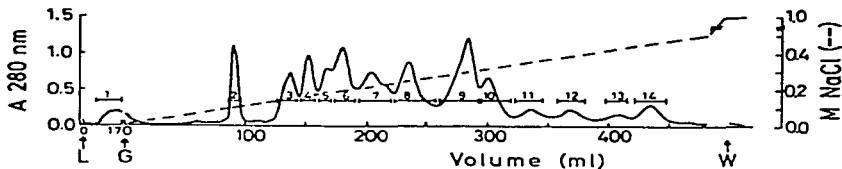


Fig. 3 Cromatografía de Intercambio iónico de la fracción II eluida del Sephadex G-50. La fracción II (95 mg de peso seco, 116.6 unidades de absorbancia a 280 nm en 17 ml) se cargó (L) en una columna de 0.9 X 27 cm de CM-32 equilibrada con 0.02 M de acetato de amonio pH 7.4. En G se inició un gradiente lineal con 240 ml de amortiguador con NaCl 0.5M. Se colectaron fracciones de 2.4 ml (indicadas por las barras horizontales). El flujo fue de 30ml/hora. Al final del gradiente (W), la columna se lavó con el mismo amortiguador conteniendo NaCl 1M. Figura tomada de Possani y col. 1981 c.

que se inyectan con salina al 0.9% (Dent y col. 1980, Possani y col. 1981c).

La secuencia amino terminal de algunos de los polipéptidos neurotóxicos de la fracción II del veneno soluble de C. noxius, a saber: el II-9, II-10, II-13 y II-14 (Fig. 4) fue determinada por Possani y col. (1981 c). La secuencia de aminoácidos de la fracción "corta" II-11 del veneno de C. noxius (Fig. 5) ha sido determinada completamente por Possani y cols. (1982).

Con estudios de pinza de voltaje en axón gigante de calamar, fue demostrado que el componente II:10 del veneno de C. noxius bloquea específicamente la corriente entrante de  $\text{Na}^+$  (Fig. 6) y que el componente II:11 de dicha fracción bloquea selectivamente al canal de  $\text{K}^+$  (Fig. 7), mientras que las toxinas II:8, II:9, II:12 y II:14, no presentan un efecto apreciable sobre las corrientes de dichos iones en el axón de calamar (Carbone y col., 1982).

COMPARACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS N-TERMINAL  
DE LAS TOXINAS II-9.2.2., II-10, II-13 y II-14 DEL VENENO DE  
C. NOXIUS.

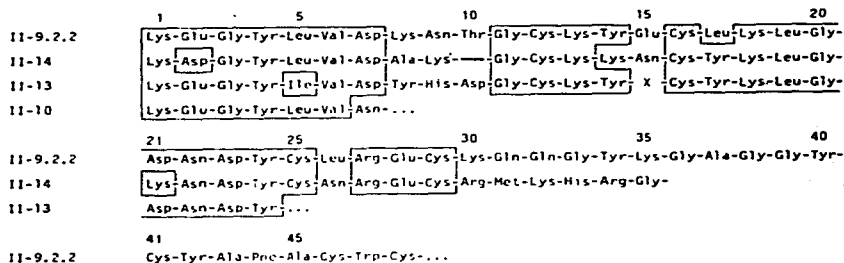


Figura 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos amino-terminal de las toxinas II. 9.2.2., II-10, II-13 y II-14 del veneno del escorpión Centruroides noxius. Figura tomada de Possani y col. 1981 c.

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA NOXIUSTOXINA.

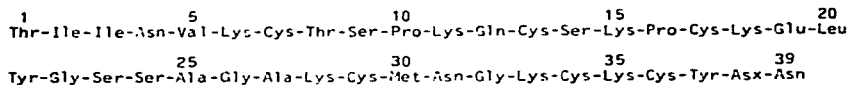


Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la toxina II-11 (noxiustoxina) del veneno del escorpión Centruroides noxius. Tomado de Possani y col. 1982.

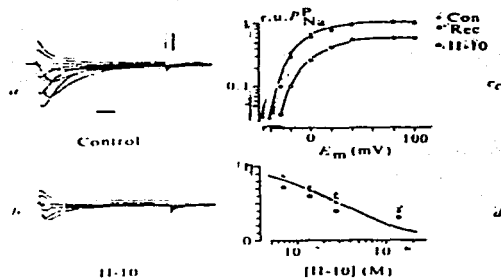


Figura 6. Acción de la toxina II-10 sobre los canales de  $\text{Na}^+$  del axón gigante del calamar. a, b, corrientes de  $\text{Na}^+$  registradas antes y después de la aplicación de toxina II-10 280 nM. En b, los trazos fueron obtenidos después de 14 min. de exposición a la toxina II-10. Escala de las barras: 1mA y 2ms. El axón se mantuvo a  $-70\text{mV}$  (Eh) y se preconditionó durante 80ms a  $-90\text{mV}$  (Ec) antes de proceder con los potenciales de prueba (E<sub>t</sub>):  $-40$ ,  $-30$ ,  $-20$ ,  $0$ ,  $20$ ,  $40$ ,  $60$ ,  $80$  y  $100$  mV. Los estímulos sucesivos se separaron por 2 segundos. Composición del medio interno (mM): CSF (267), NaF (50), sacarosa (307), Fosfato de K (45), pH 7.2. Composición del medio externo (mM): NaCl (435), KCl (10), Ca Cl<sub>2</sub> (10) MgCl<sub>2</sub> (40), tris-HCl (20) pH 8. Temperatura  $5^\circ\text{C}$ . c. Permeabilidad pico del  $\text{Na}^+$  en unidades relativas ( $P_{\text{Na}}^{\text{p}}$ ) de los registros a y b.  $E_{\text{Na}}^{\text{p}} = 58$  mV. d. Curva dosis-respuesta de la toxina II-10. Los diferentes símbolos indican diferentes axones. Ordenadas,  $P_{\text{Na}}^{\text{p}}$  relativas a  $E_m = 100$  mV. Abcisas, concentraciones molares de la toxina. Figura tomada de Carbone y col. 1982.

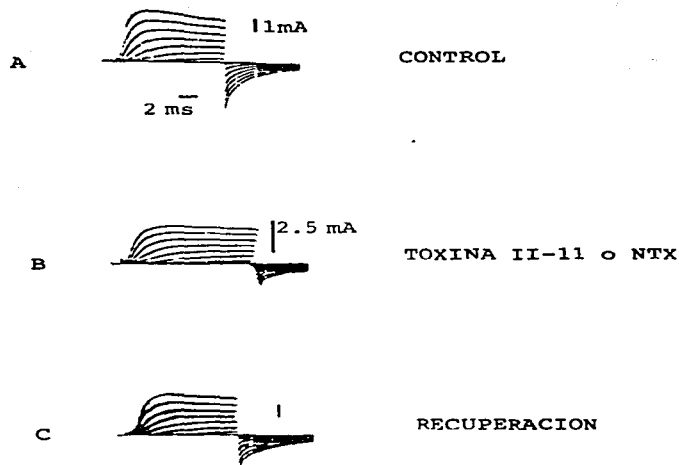


Figura 7. Acción de la toxina II-11 sobre los canales de  $K^+$ . A-C,  $I_k$  registrada a varios potenciales de prueba (-20, 0, 20, 40, 60, 80 y 100 mV) antes, durante y después de la aplicación de la toxina  $1.4 \mu M$ . Los trazos en b se obtuvieron después de 10min de exposición a la toxina II-11 y los trazos en c, 22min después de iniciada la recuperación.  $E_h = -70mV$ ,  $E_c = -90mV$ , durante 80ms. Los estímulos sucesivos se separaron 3ms. Se usaron retroalimentación positiva y compensación analógica para las corrientes capacitiva y de escurrimiento (leakage). Composición mM del medio interno: KF (317), sacarosa (307), Fosfato de K (45),  $pH$  7.2. Composición mM del medio externo: NaCl (435), KCl (10),  $CaCl_2$  (10),  $MgCl_2$  (40), Tris-HCl (20),  $pH$  8.0, TTX ( $3 \times 10^{-7} M$ ). Temperatura  $5 \pm 1^\circ C$ . Figura tomada de Carbone y col. 1982.

## II.2. NEUROTOXINAS DE ORIGEN NATURAL QUE ALTERAN EL FUNCIONAMIENTO DE LA SINAPSI

La sinapsis es la estructura responsable de la neurotransmisión. Los extremos terminales de las ramificaciones de un axón constituyen al componente presináptico y la porción de la célula nerviosa o muscular con la que hace contacto dicho componente es la porción postsináptica. La sinapsis está representada por la zona de comunicación entre las estructuras pre y postsinápticas.

El sitio primario de interacción de las toxinas naturales con las células, es la membrana plasmática. Así, en el caso de las membranas sinápticas, estas interacciones se verán reflejadas sobre manifestaciones funcionales propias de las membranas pre o postsinápticas, como por ejemplo, alteraciones en la liberación de neurotransmisores o cambios en la respuesta a la estimulación de los receptores postsinápticos, respectivamente.

Con base en la acción que se ha reportado ejercen las neurotoxinas a nivel de la sinapsis, podríamos clasificarlas en dos grupos:

- a) Toxinas naturales que alteran la transmisión nerviosa interactuando con moléculas insertas en la membrana presináptica y cuya alteración modifica directa o indirectamente la liberación de neurotransmisores.
- b) Toxinas naturales que modifican la comunicación nerviosa al unirse a moléculas inmersas en la membrana postsináptica e involucradas con la recepción de señales químicas.

## A. TOXINAS DE ORIGEN NATURAL CON ACCION SOBRE LA FUNCION PRESINAPTICA: emisión de señales químicas.

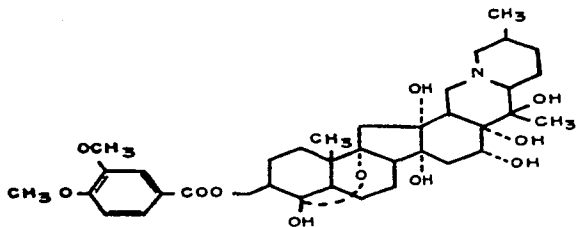
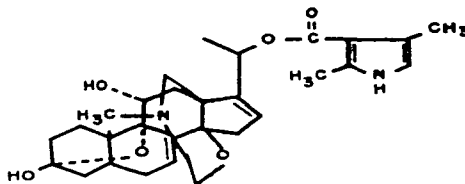
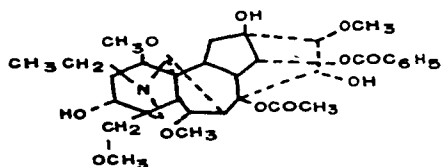
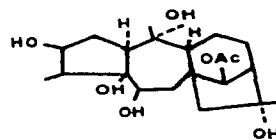
### A.1. Toxinas Estimuladoras de la liberación de mensajeros químicos.

Se sabe que el impulso nervioso al llegar a la terminal presináptica la despolariza. Esta despolarización es la señal que entiende normalmente la terminal para desempeñar su función, es decir para liberar al neurotransmisor. No sólo los estímulos eléctricos inducen liberación de neurotransmisores; además de ellos, existen estrategias experimentales para estimular la liberación de mensajeros químicos. El empleo de un Ringer con una elevada concentración de  $K^+$  es la estrategia más común y mas ampliamente usada para inducir liberación de mensajeros químicos experimentalmente. Otras formas de inducir liberación de sustancias neuroactivas incluyen el empleo de toxinas de origen natural como las que se describen a continuación.

### Alcaloides Esteroidales neurotóxicos de diversos orígenes.

Los alcaloides neurotóxicos están representados por la batracotoxina que se encuentra en la piel de la rana Phyllobates aurotaenia, la aconitina que produce la planta Acconitum napellus, las grayanotoxinas de las hojas del rododendro y de otras plantas de la familia Ericaceae así como la veratridina, producida por plantas de la familia Lilaceae (fig 8). Estas moléculas policíclicas liposolubles aumentan la permeabilidad al  $Na^+$



**VERATRIDINA****BATRACOTOXINA****ACONITINA****GRAYANOTOXINA**

**Figura 8.** Alcaloides esteroidales neurotóxicos de origen natural que alteran el comportamiento de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje aumentando su permeabilidad.

En la revisión que hace Catterall (1980) se sugiere que los alcaloides esteroidales neurotóxicos actúan interaccionando con mayor afinidad con el estado activo del canal de  $\text{Na}^+$  y así, desplazan el equilibrio dependiente de voltaje, de los estados inactivos a los activos. La eficacia de estas toxinas para activar a los canales de  $\text{Na}^+$  depende de su selectividad por la unión a los estados activos versus los inactivos.

Electrofisiológicamente, el potencial de membrana umbral para la activación de los canales de  $\text{Na}^+$  disminuye en presencia de estos alcaloides y los canales de  $\text{Na}^+$  se activan al potencial de reposo de la membrana (ver pg 47). Entre estos alcaloides, la veratridina en especial ha sido ampliamente usada como inductor de la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas (Levi y col. 1978, Norris y col. 1983, Shira y col. 1984, Tapia y col. 1985).

Toxinas de alacranes. Otro grupo de moléculas que induce la liberación de neurotransmisores aparentemente a través de su interacción con el canal de  $\text{Na}^+$ , está representado por varias de las toxinas polipeptídicas contenidas en los venenos de los alacranes. Entre las toxinas purificadas de los venenos de alacranes americanos, cuyos efectos sobre la liberación de neurotransmisores han sido estudiados, están: la tityus toxina, del veneno del alacrán Tityus serrulatus, que aumenta la liberación de GABA, glutamato, aspartato (Coutinho-Netto 1980) y acetilcolina (Gómez y col. 1975) de rebanadas de corteza cerebral de rata y la toxina II del alacrán americano Centruroides suffusus s. que aumenta la liberación de GABA de sinaptosomas de cerebro de rata (Couraud y col. 1982).

La mayor parte de las toxinas contenidas en los venenos de los escorpiones son polipéptidos básicos con pesos moleculares cercanos a 7000 (Fig. 1). Por estudios electrofisiológicos sabemos que varias toxinas de este peso molecular ejercen modificaciones sobre las corrientes de  $\text{Na}^+$ . Estos estudios indican también que no todas las toxinas de escorpiones que modifican las corrientes de  $\text{Na}^+$ , lo hacen de la misma manera. En estudios realizados con algunos venenos de alacranes norteafricanos (Narahashi y col. 1972), o con toxinas

purificadas de dichos venenos, tales como la toxina V del alacrán norteafricano Leiurus quinquestriatus (Catterall 1979) o la toxina II del veneno del escorpión también norteafricano Androctonus australis Hector (Romey y col. 1975) se ha encontrado que dichos venenos o toxinas actúan haciendo más lenta la inactivación del canal de  $\text{Na}^+$ , el cual no llega a inactivarse completamente. Estas toxinas cambian el potencial umbral para la activación de los canales de  $\text{Na}^+$  pero sólo unos cuantos milivoltios más negativo. Por otro lado, el veneno del escorpión americano Centruroides sculpturatus no tiene efecto sobre la inactivación del canal de  $\text{Na}^+$ , mientras que sí modifica drásticamente la activación dependiente de voltaje, y a potenciales de membrana 40 a 50 mV más negativos, el canal de  $\text{Na}^+$  se ve activado (Cahalan 1975). La toxina II-10 del alacrán mexicano Centruroides noxius, disminuye la permeabilidad pico al  $\text{Na}^+$  en el axón gigante del calamar (Carbone y col. 1982) y a concentraciones mayores ejerce efectos adicionales sobre las corrientes de  $\text{Na}^+$  (Carbone y col. 1984).

Además de estas diferencias funcionales, hay evidencias de que no todas las toxinas de escorpiones que ejercen sus efectos mediante interacciones con los canales de  $\text{Na}^+$  se unen a éstos en el mismo sitio de la proteína canal (Catterall 1982, Couraud y col. 1982). Este tipo de diferencias que exhiben las toxinas de diferentes especies de escorpiones, hacen que el estudio de cada una de ellas sea potencialmente interesante.

Toxinas de anémona. Estas están contenidas en los nematocistos de la anémona de mar Anémóna sulcata y sus efectos son muy similares a los de algunas toxinas contenidas en los venenos de los alacranes (Catterall y Beres, 1978; Catterall, 1980). Se ha sugerido que la toxina de anémona y la toxina V del alacrán norteafricano Leiurus quinquestriatus, se unen a un sitio del canal de  $\text{Na}^+$  diferente al que se unen los alcaloides esteroidales neurotóxicos antes mencionados pues sus acciones en presencia de dichas toxinas naturales se potencian (Catterall 1977, Stallcup 1977, Krueger y Blaustein 1980, Catterall 1982).

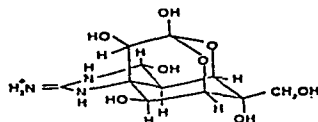
#### A.2. Toxinas inhibidoras de la liberación de mensajeros químicos.

Toxinas de bacterias que inhiben la liberación de neurotransmisores. Entre las toxinas naturales que inhiben la liberación de neurotransmisores se encuentran las toxinas tetánica y botulínica que producen las bacterias Clostridium botulinum y Clostridium tetani respectivamente. La toxina tetánica consiste en una cadena peptídica ligera (55 000) unida por un puente disulfuro a una pesada (100 000). La toxina botulínica se presenta en varios tipos (A, B,  $C_\alpha$ ,  $C_\beta$ , D, E, F, G) pero todos tienen una subunidad proteica común (150 000 aproximadamente) responsable de la neurotoxicidad (Simpson 1979).

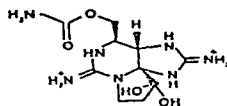
La toxina botulínica inhibe la liberación de acetilcolina (ACh) inducida por estimulación en preparaciones de placa neuromuscular (Burgen y col. 1949, Simpson y Dasgupta 1983), en preparaciones de diafragma de rata (Gundersen y Jenden 1983) y en preparaciones de sinaptosomas (Wonnacott y Marchbanks 1976). La toxina tetánica inhibe la liberación de GABA y glicina de sinaptosomas de cerebro de mamífero y de médula espinal respectivamente (Curtis y De Groat 1968, Curtis y col. 1973, Osborne y Bradford 1973). En rebanadas de estriado, de corteza cerebral y de sustancia nigra de rata, la estimulación de la liberación de GABA, dependiente de  $Ca^{2+}$  externo, inducida con medios despolarizantes de alto  $K^{+}$  se inhibe con toxina tetánica (Collingridge y Davies 1982a, 1982b, Heredero y col. 1983). Esta toxina también causa parálisis flácida por inhibición de la liberación de ACh en la placa neuromuscular (Duchen y Tonge 1973). Tanto la toxina botulínica como la tetánica causan inhibición de la liberación de metionina encefalina dependiente de  $Ca^{2+}$  inducida por alto  $K^{+}$ , toxina II de anémona de mar y veneno de la araña Latrodectus mactans (Janicki y Habermann 1983).

Guanidinas heterocíclicas neurotóxicas: TTX y STX. Estas son toxinas no polipeptídicas producidas por especies diversas (fig.9). La tetrodotoxina (TTX) se encontró originalmente en los ovarios y el hígado del "pez globo" y más recientemente en algunas especies de pulpo y rana (Brown y Mosher, 1963; Crone y col., 1976; Kim y col.,

## GUANIDINAS HETEROCICLICAS NEUROTÓXICAS



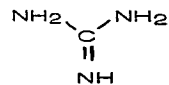
TETRODOTOXINA



SAXITOXINA

Figura 9. Estructura de las guanidinas heterocíclicas neurotóxicas que bloquean a los canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje con alta selectividad.

Estructura común a los 2 bloqueadores



Guanidina

1975; Sheumack y col., 1978; Noguchi y Hashimoto, 1973) y la saxitoxina (STX) es producida por dinoflagelados del género Gonyaulax. La estructura química de las guanidinas heterocíclicas, así como su farmacología han sido estudiadas detalladamente (Kao, 1966; Evans, 1972; Narahashi, 1974).

Desde hace dos décadas Narahashi y col. (1964) y Nakamura y col. (1965) demostraron, en preparaciones de axón gigante, que la TTX a concentraciones de  $10^{-7}$  M bloquea selectivamente el aumento de la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  que induce la despolarización, y no afecta las permeabilidades iónicas del axón no estimulado. Un año después, Kao (1966), demostró que, en los axones motores, la TTX bloquea la conducción del impulso nervioso.

Las guanidinas heterocíclicas neurotóxicas TTX y STX actúan de manera muy similar: inhiben la liberación de mensajeros químicos en respuesta a la despolarización mediada por un aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ , a través de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje. Para determinar mecanismos iónicos subyacentes a la liberación de mensajeros químicos, inducida por fármacos u otras toxinas naturales, la TTX ha sido ampliamente utilizada. La liberación de GABA, de sinaptosomas, que induce la veratridina es bloqueada con TTX (Levi y col. 1978), la liberación de oxitocina y vasopresina, de rebanadas de hipotálamo medio basal, en respuesta a veratridina es bloqueada con TTX (Nordmann y Dyball 1978). También la liberación del factor

liberador de la hormona luteinizante como la de somatostatina, de rebanadas de hipotálamo, se bloquea con TTX (Drouva y col. 1982). Además de inhibir la liberación de neurotransmisores clásicos o de neuropéptidos inducida por los alcaloides esteroidales neurotóxicos, la TTX también inhibe la liberación en respuesta a algunas toxinas naturales contenidas en los venenos de escorpiones: la liberación de ACh que se induce con tityustoxina, péptido neurotóxico del veneno del alacrán Tytilus serrulatus, es inhibida con TTX (Gómez y col. 1975), la liberación de GABA que induce la toxina II del veneno del alacrán norteamericano Centruroides suffusus también se bloquea con TTX (Couraud y col. 1982) y la liberación de GABA que inducen las toxinas II-9 y II-10 del alacrán mexicano Centruroides noxius también es bloqueada por TTX (trabajo III de esta tesis).

Toxinas de serpientes con acción presináptica. Los venenos de serpientes contienen dos tipos de toxinas, las de tipo alfa, que actúan postsinápticamente (a estas me referiré más adelante) y las que actúan presinápticamente alterando la liberación de los neurotransmisores. Entre las neurotoxinas presinápticas de serpientes se encuentran la beta-bungarotoxina, la crotoxina, la notexina y la taipoxina entre otras. Por estudios electrofisiológicos, se ha propuesto que el modo de acción de las toxinas presinápticas de serpientes incluye dos fases: en la primera hay un aumento de la liberación de ACh, monitoreada por la frecuencia de descarga de los potenciales de placa minia



tura. Este aumento, se ve seguido por la segunda fase, en la que se produce un bloqueo tanto de la liberación espontánea como de la estimulada (Chang y col. 1973, Cull-Candy y col. 1976, Chang y col. 1977).

En sinaptosomas, se ha demostrado que la  $\beta$ -bungarotoxina del veneno de Bungarus multicinctus, aumenta la liberación de acetilcolina (Sen y Cooper 1978) y de aminoácidos transmisores (Wernicke y col. 1974, 1975, Smith y col. 1980). Esta liberación en respuesta a la  $\beta$ -bungarotoxina se inhibe con TTX y requiere de la presencia de  $Ca^{2+}$  externo. Estos datos sugieren que posiblemente la primera fase de la acción de este tipo de toxinas presinápticas de serpiente se deba a una despolarización mediada por la activación de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje.

La actividad de fosfolipasa  $A_2$  que presentan todas las toxinas presinápticas de serpientes, se ha relacionado con la salida del contenido de la terminal nerviosa (Oberg y Kelly 1976). Esta explicación podría dar cuenta de la liberación inicial del neurotransmisor seguida del bloqueo de la liberación tanto estimulada como espontánea monitoreadas eléctricamente. Sin embargo, su acción parece ser mas complicada en vista de lo siguiente:

Las toxinas presinápticas de serpientes están constituidas por 2 polipéptidos, uno de los cuales presenta alta homología con la secuencia de la fosfolipasa  $A_2$ , mientras que el otro es muy diferente. La-crotoxina, por ejemplo, está constituida por un complejo de 2 polipéptidos: la crotoxina A que es una proteína ácida y la crotoxina B que es una fosfolipasa básica  $A_2$ . La crotoxina A por si sola no muestra ni toxicidad ni acción enzimática y la crotoxina B por si

sola, no es más que ligeramente tóxica. La recombinación de ambas moléculas restaura la letalidad de la crotoxina, mientras que la actividad de fosfolipasa  $A_2$  se reduce (Hendon y Fraenkel-Conrat, 1971; Brazil y col., 1973). El mecanismo a través del cual participan los dos componentes que constituyen a estas toxinas presinápticas de serpientes y que se traduce en su efecto neurotóxico, aún es motivo de debate.

**B. TOXINAS DE ORIGEN NATURAL CON ACCION SOBRE LA FUNCION POSTSINAPTICA: recepción de señales químicas.**

Toxinas de serpientes. Entre las toxinas de origen natural que modifican la comunicación nerviosa a través de interacciones con moléculas involucradas en la recepción de las señales químicas se encuentran muchas de las proteínas tóxicas que contienen los venenos de serpientes. Estas exhiben un efecto curaremimético pues bloquean la transmisión neuromuscular al unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina, localizados en la membrana postsináptica de la placa neuromuscular. Hasta la fecha han sido secuenciadas más de 40 neurotoxinas postsinápticas de los venenos tanto de serpientes terrestres como marinas de las familias Elapidae e Hydrophiidae. De acuerdo con el tamaño de la cadena polipeptídica, las neurotoxinas postsinápticas de los venenos de serpientes han sido clasificadas en cortas y largas. Las primeras están constituidas por 60 a 62 residuos de aminoácidos y 4 puentes disulfuro, las largas por 71 a 74 residuos de aminoácidos

y 5 puentes disulfuro (Lee 1979). Ejemplos del primer grupo son la co-bratoxina y la erabutoxina b (Low 1979). La alfa bungarotoxina es una neurotoxina postsináptica larga. Hay varios estudios, en diferentes tejidos, relacionados con la unión de estas neurotoxinas postsinápticas con el receptor de acetilcolina y dicha unión no es covalente sino que se realiza por medio de interacciones electrostáticas múltiples (Chicheporticte y col. 1975).

Toxinas de bacterias. Otros ejemplos de toxinas de origen natural que interaccionan selectivamente con componentes inmersos en las membranas postsinápticas son las toxinas pertussis y del cólera. La primera es producida por la bacteria Bordetella pertussis y la del cólera por Vibrio cholerae. La interacción de algunas hormonas y neurotransmisores con su receptor, aumenta la concentración de AMP cíclico mediante la activación de la adenilato ciclasa. Entre el receptor y la adenilato ciclasa hay un componente de acoplamiento (Rodbell 1980) denominado proteína "G" o "N" porque fija GTP y otros nucleótidos de guanina. Esta proteína de acoplamiento tiene un comportamiento bifásico por lo que se ha postulado la existencia de 2 componentes acopladores: uno conocido como "Ns" que está relacionado con la activación de la ciclasa y el otro conocido como "Ni" relacionado con la inhibición de la misma. La toxina del cólera actúa selectivamente sobre la proteína N<sub>s</sub>, mientras que la toxina pertussis actúa sobre la Ni. Estas dos toxinas de origen natural han sido de gran utilidad para la caracterización de estas proteínas acopladoras (García Sañz 1985).

### II.3. SINAPTOSOMAS PARA ESTUDIAR LIBERACION DE NEURO- TRANSMISORES

Las preparaciones empleadas para estudiar liberación de neurotransmisores abarcan desde el animal completo hasta las terminales nerviosas aisladas.

Para colectar al neurotransmisor liberado desde una región del cerebro de un animal vivo en libre movimiento se han diseñado varios tipos de cánulas (Bayón y Drucker-Colín 1985). Aunque los estudios de liberación en vivo son muy valiosos si se desean correlacionar cambios en la liberación de un mensajero químico con un evento conductual, hay eventos que se pueden controlar y estudiar mejor en preparaciones celulares o subcelulares, pues sería imposible interpretarlos o incluso detectarlos en vivo.

Las preparaciones in vitro (de componentes celulares o subcelulares) más frecuentemente usadas para estudios de liberación de mensajeros químicos son: las rebanadas de tejido, provenientes de alguna región de interés previamente disecada (corteza cerebral, estríado, hipocampo, etc.); los cultivos de tejidos y las terminales nerviosas aisladas mejor conocidas como sinaptosomas, que pueden aislarse de cerebro completo o de alguna región cerebral específica. Cada una de estas preparaciones tiene sus ventajas y sus desventajas, y una u otra resulta adecuada según la pregunta que quiera contestarse. Como en estos trabajos se deseaban determinar los eventos

iónicos subyacentes a la liberación de transmisores evocada por las toxinas del veneno de Centruroides noxius, la preparación sinaptosomal resultaba adecuada ya que las terminales presinápticas son el sitio preciso desde donde se liberan los neurotransmisores. Podría decirse que la obtención de sinaptosomas equivale a la disección del componente funcional de la liberación de neurotransmisores.

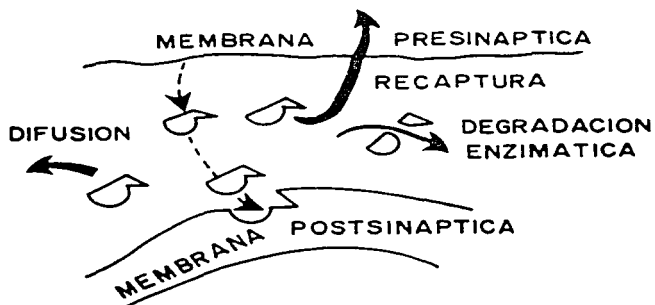
#### II.4 PRINCIPIO DEL METODO DE DETECCION DEL NEUROTRANSMISOR LIBERADO

Mecanismos de inactivación de neurotransmisores. Fisiológicamente los neurotransmisores que se liberan desde la neurona presináptica, una vez que llevaron la señal a la célula receptora o neurona postsináptica, son rápidamente eliminados de la hendidura sináptica, para permitir que el potencial de membrana regrese a su nivel de reposo y quede en disposición de recibir otra señal. Existen 3 mecanismos que operan para eliminar a los neurotransmisores de la hendidura sináptica (Fig. 8): 1) recaptura del neurotransmisor liberado; 2) difusión del neurotransmisor al espacio extracelular y 3) degradación enzimática del neurotransmisor liberado.

A excepción de la acetilcolina que cesa su acción al ser degradada por una acetilcolinesterasa específica que la rompe en acetato y colina, los demás neurotransmisores "clásicos" (dopamina, noradrenalina, serotonina, glutamato, aspartato, GABA, glicina, taurina) cesan su acción al ser recapturados por las terminales nerviosas que los liberaron. Para estos neurotransmisores han sido demostrados sistemas de captura de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  y temperatura.

Utilidad del mecanismo de inactivación por recaptura. Desde hace varios años, este mecanismo de inactivación ha sido aprovechado por los neuroquímicos para estudiar la liberación de los neuro-

## MECANISMOS DE INACTIVACION DE NEUROTRANSMISORES



**Fig.10.** La eliminación del neurotransmisor del espacio o hendidura sináptica es un fenómeno esencial de la transmisión química. La remoción del mensajero químico una vez que ha emitido su señal se lleva a cabo mediante, cuando menos, tres mecanismos: destrucción enzimática, captura a la terminal presináptica, a la neurona postsináptica o a las células gliales vecinas y difusión en el espacio intercelular.

transmisores "clásicos", ya que es posible cargar a la preparación elegida (sinaptosomas, rebanadas de tejido) con un neurotransmisor marcado radioactivamente para después seguir su liberación bajo distintas condiciones experimentales.

Como los sitios de captura de alta afinidad están localizados en las membranas de las terminales nerviosas que normalmente sintetizan, almacenan y liberan a un determinado neurotransmisor "clásico" (Fonnum y col. 1981, Wilson y col. 1975), al someter una preparación heterogénea de sinaptosomas de cerebro completo, a dicho neurotransmisor marcado radioactivamente, favoreceremos su captura por los sinaptosomas que normalmente lo liberan. Con base en estas consideraciones, los efectos de las toxinas de C. noxius sobre la liberación de GABA, fueron estudiados en sinaptosomas de cerebro de ratón siguiendo el método de detección del neurotransmisor radioactivo. Este procedimiento se ilustra en la figura 9 y consiste en lo siguiente: los sinaptosomas se incuban en un Ringer de composición fisiológica a 37°C que contiene al transmisor marcado radioactivamente ( $^3\text{H}$ -GABA) a la concentración adecuada (0.83  $\mu\text{Ci}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ ) para favorecer la captura a través de los sistemas de remoción de alta afinidad ubicados en las membranas de algunos sinaptosomas. Una vez captado el neurotransmisor marcado se estudia su liberación, previa eliminación del transmisor radioactivo que no fue internalizado por los sinaptosomas, para lo cual se inicia la perfusión con un flujo rápido (1 ml/min) durante 10 minutos. Después de este período de lavado el neurotransmisor que se



CAPTURA DEL NEUROTRANSMISOR RADIOACTIVO EN ESTUDIOS DE LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES.

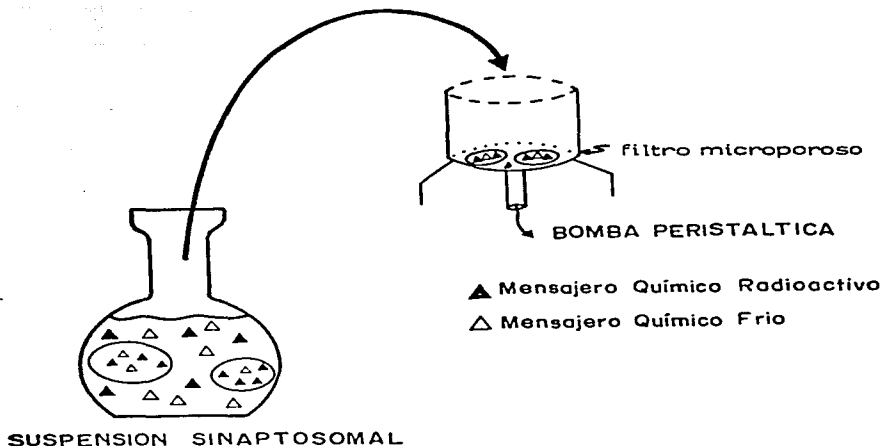


Figura 11. El mecanismo de inactivación por recaptura (pg 39) nos permite "cargar" a la preparación de elección (i.e. rebanadas de tejido, sinaptosomas) con el neurotransmisor marcado radioactivamente, para después estudiar su liberación mediante el seguimiento de la marca radioactiva.

En los trabajos que presento en la parte de resultados, se estudió en particular la liberación del neurotransmisor  $\gamma$  amino butírico (GABA). La suspensión sinaptosomal se incubó durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en un Ringer estándar de la siguiente composición (mM): NaCl 127,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18, KCl 3.73,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgSO}_4$  1.18,  $\text{NaHCO}_3$  20, dextrosa 11.2, ácido aminooxiacético 0.1 y una mezcla de GABA marcado y GABA frío ( $0.83 \mu\text{Ci}$ ,  $0.5 \mu\text{M}$ ). Al finalizar la incubación, se colocaron alicuotas de la suspensión sinaptosomal sobre filtros microporosos de  $0.65 \mu\text{m}$  (éstos retienen a los sinaptosomas caragdos con  $^3\text{H}$ -GABA). Con ayuda de una bomba peristáltica, se eliminó la radioactividad que no fue incorporada por la preparación lavando continuamente con el Ringer de perfusión respectivo. Alcanzado el valor de liberación basal (aproximadamente 1.5% de la radioactividad total incorporada por la preparación), los sinaptosomas fueron sometidos a las diferentes condiciones experimentales.

libera es sólo aquel que fue captado por la preparación.

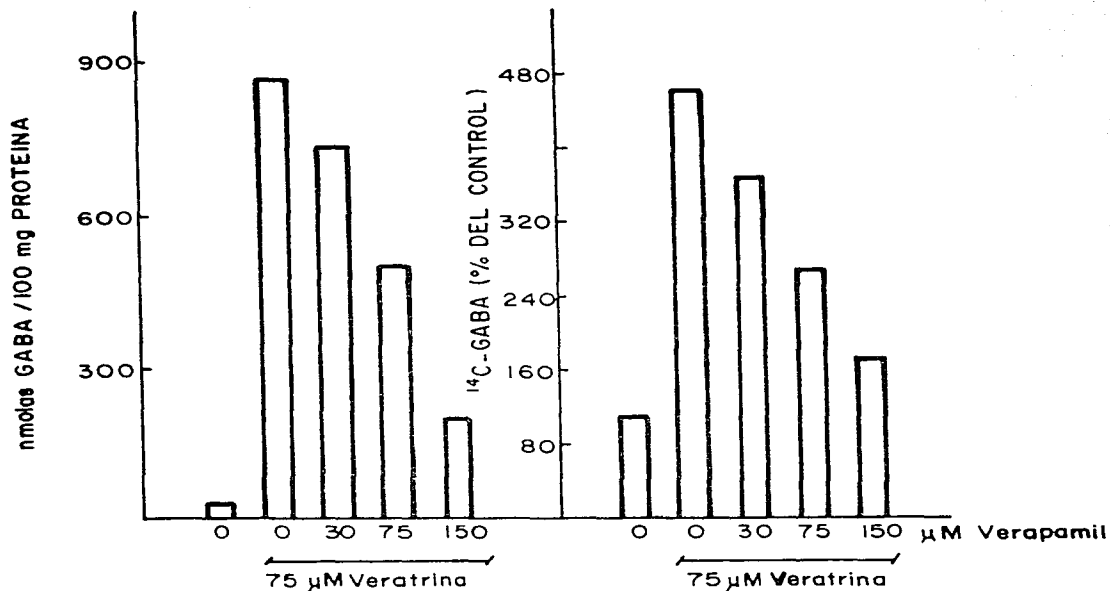
El empleo de esta estrategia nos plantea las siguientes preguntas:

1. ¿El neurotransmisor radioactivo que se libera de los sinaptosomas se comporta igual que el neurotransmisor endógeno contenido en las terminales?
2. ¿Las moléculas marcadas y no marcadas se distribuyen homogéneamente dentro de las terminales?

La figura 10 modificada de un trabajo de Norris y cols. (1983) se anexa con el objeto de poder comparar la liberación de un neurotransmisor radioactivo ( $^3\text{H}$ -GABA) detectado mediante el método antes descrito, con la liberación del GABA endógeno detectado por un método fluorimétrico. Como se puede apreciar en la figura, la detección por ambos métodos genera resultados equivalentes.

En la literatura aparecen tanto estudios de liberación de neurotransmisores marcados (exógenos) como de neurotransmisores endógenos indistintamente. Sin embargo, es difícil encontrar en un mismo trabajo los mismos resultados obtenidos por dos métodos de detección. Es por eso que me permití incluir la figura 10, con objeto de validar el método de detección que se utilizó en los trabajos realizados en esta tesis.

COMPARACION DE LA LIBERACION DEL TRANSMISOR RADIOACTIVO  
Y EL TRANSMISOR ENDOGENO.



ADAPTADA DE NORRIS Y COL. (1983)

Figura 12. Inhibición con verapamil de la liberación de GABA evocada con veratrina 75  $\mu$ M. En esta figura se puede apreciar que concentraciones crecientes (30, 75 y 150  $\mu$ M) del bloqueador de los canales de  $Ca^{2+}$ , verapamil, inhiben de forma dosis-dependiente el incremento en la liberación tanto del GABA radioactivo como del GABA endógeno de sinaptosomas de corteza cerebral de rata evocada por el alcaloide esteroideal neurotóxico veratridina (componente activo de la veratrina).

## II.5. PRINCIPIOS BASICOS QUE DIRIGIERON LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia que dirigió la caracterización de los efectos de las toxinas de Centruroides noxius sobre la liberación de neurotransmisores, está basada en los principios que rigen las propiedades bioeléctricas de las células nerviosas. Por este motivo, a continuación haré un recordatorio de ciertos conceptos básicos que fueron útiles en el diseño de la estrategia que dirigió los trabajos que incluyo en la parte III (Desarrollo Experimental) de esta tesis.

Las propiedades bioeléctricas de las células resultan de la existencia de una diferencia de potencial electroquímico transmembranal. El potencial transmembranal o potencial de la membrana de una neurona o de la membrana de alguna de sus partes (soma, dendritas, axón, terminales nerviosas), está determinado por las distribuciones y las permeabilidades relativas a los iones:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}$  principalmente. (Es posible que el  $\text{Ca}^{2+}$  también contribuya a este potencial transmembranal).

En condiciones de reposo, el citoplasma de la neurona o de la terminal nerviosa presináptica, presenta una elevada concentración de  $\text{K}^+$  y una baja concentración de  $\text{Na}^+$  comparativamente con el fluido extracelular, en donde el  $\text{K}^+$  no excede el 5% de la concentración citoplásmica y el  $\text{Na}^+$  supera alrededor de 10 veces la concentración citoplásmica. La permeabilidad de la membrana en con-

diciones de reposo es alta para el potasio y baja para el  $\text{Na}^+$ . La permeabilidad al  $\text{Cl}^-$  es elevada y este anión se distribuye pasivamente a través de ella (Figura 13). En las membranas de las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) en reposo, hay un exceso de cargas negativas en la parte interna de la membrana y un exceso de cargas positivas por su cara externa. La membrana del sinaptosoma (como las de otras membranas excitables) tiene la capacidad de mantener esta separación de cargas pues actúa como una barrera semipermeable a la difusión de los iones antes mencionados. Esta separación de cargas determina el potencial de reposo de la membrana el cual es negativo con respecto al exterior.

Las neuronas se comunican entre sí emitiendo señales. Estas señales se producen cuando las distribuciones iónicas o las permeabilidades relativas a los iones que determinan el potencial de la membrana en reposo son perturbadas. La diferencia de potencial de una membrana en reposo puede perturbarse en dos sentidos: hiperpolarizándose, cuando el interior se hace aun más negativo con respecto al exterior de la membrana y despolarizándose, cuando el interior se hace positivo con respecto al exterior.

Basándose en la ecuación de Goldmann, que relaciona el potencial de membrana ( $V_m$ ) con las concentraciones y las permeabilidades relativas de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , es posible predecir qué alteraciones de permeabilidad o de concentración nos llevarían

DISTRIBUCIONES IONICAS Y PERMEABILIDADES IONICAS RELATIVAS DE UNA MEMBRANA EN ESTADO DE REPOSO.

47

EL POTENCIAL DE MEMBRANA ( $V_m$ ) ES NEGATIVO EN EL INTERIOR CON RESPECTO AL EXTERIOR.

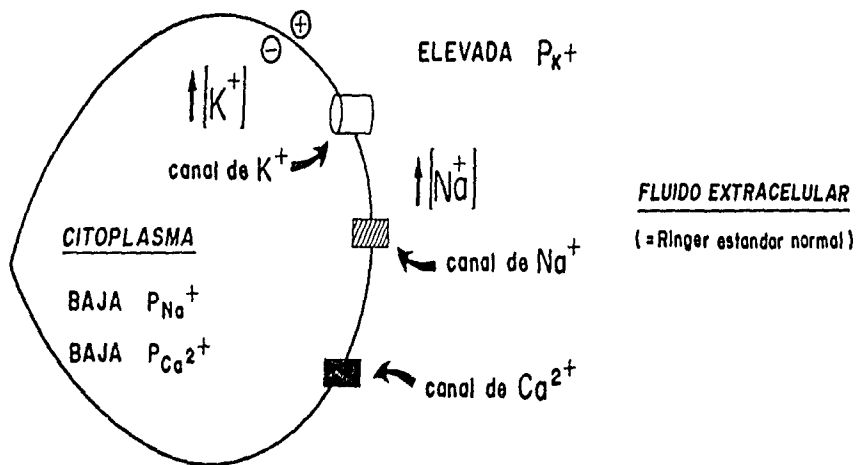


Figura 13.

Esquema para ilustrar las concentraciones iónicas relativas  $[ ]$ , y las permeabilidades iónicas relativas  $P$ , que exhiben las terminales nerviosas cuando la membrana está en estado de reposo. Las flechas hacia arriba indican una elevada concentración del ión respectivo ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) con respecto a su concentración al otro lado de la membrana. El sentido de las flechas que señalan a cada uno de los 3 canales, indica el gradiente electroquímico del ión respectivo en el reposo.

nos llevarían a una perturbación del potencial de reposo en el sentido de la despolarización o de la hiperpolarización.

La Ecuación de Goldman es la siguiente :

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} [K^+]_o + P_{Na^+} [Na^+]_o + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{K^+} [K^+]_i + P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_o}$$

En esta ecuación R es la constante de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin y F es la constante de Faraday.  $P_{K^+}$ ,  $P_{Na^+}$  y  $P_{Cl^-}$  indican las permeabilidades relativas de los iones respectivos y las letras i y o a la derecha de los signos de concentración ( [ ] ) indican concentración del ión dentro y fuera de la membrana respectivamente.

## II.6 FUNDAMENTOS PARA EL DISEÑO DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Cuando el potencial de reposo de la neurona es perturbado, se induce algún tipo de expresión o manifestación de la actividad neural. La manifestación propia de la actividad de una terminal nerviosa es la liberación de neurotransmisores. Sabemos que la perturbación del potencial de reposo en el sentido de la despolarización, desencadena la liberación de neurotransmisores. Ahora bien, con base en la ecuación de Goldman, la despolarización de la membrana de los sinaptosomas que conduce a la liberación de neurotransmisores puede ser inducida de diversas maneras (Fig. 14):

1. Si elevamos la concentración del  $K^+$  externo sobre su concentración en estado de reposo, perturbaremos el potencial de la membrana en el sentido de la despolarización, y mientras mayor sea el aumento en la concentración externa de  $K^+$ , mayor será la despolarización. Esta despolarización se ve reflejada en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas. En la figura 15 se puede observar como aumenta la liberación de  $^3H$ -GABA de sinaptosomas de cerebro de ratón a medida que aumenta la concentración de  $K^+$  en el ringer de perfusión. (La concentración de  $K^+$  en un ringer estandar es de 4 mM aproxi-



POTENCIAL DE MEMBRANA EN REPOSO

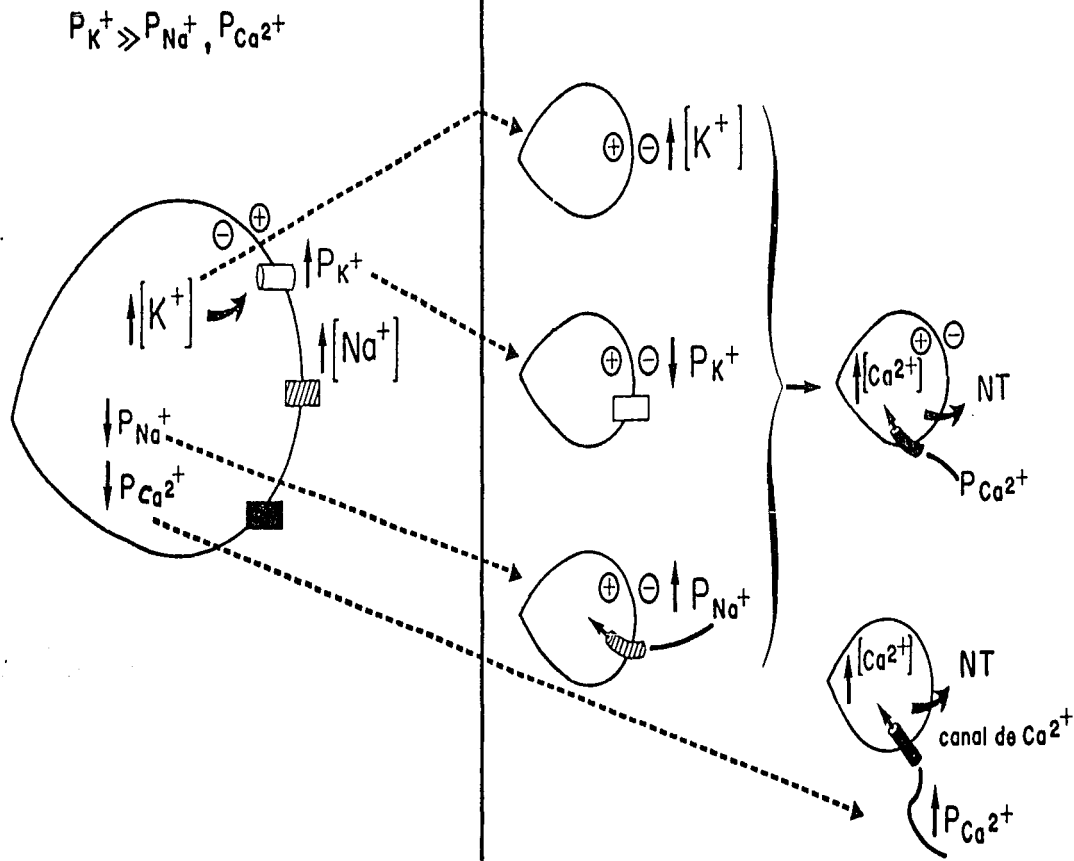


Figura 14.

Esquema que ejemplifica alteraciones del estado de reposo que inducen liberación de neurotransmisores. P= permeabilidad relativa del ión respectivo; NT = neurotransmisor; [ ] = concentración del ión respectivo (precedida de la flecha hacia arriba indica elevada concentración con respecto al otro lado de la membrana. Los signos + y - se refieren al potencial (positivo o negativo con respecto al otro lado de la membrana).

ESTIMULACION DE LA LIBERACION DE GABA INDUCIDA CON CON-

CENTRACIONES CRECIENTES DE ALTO K<sup>+</sup>.

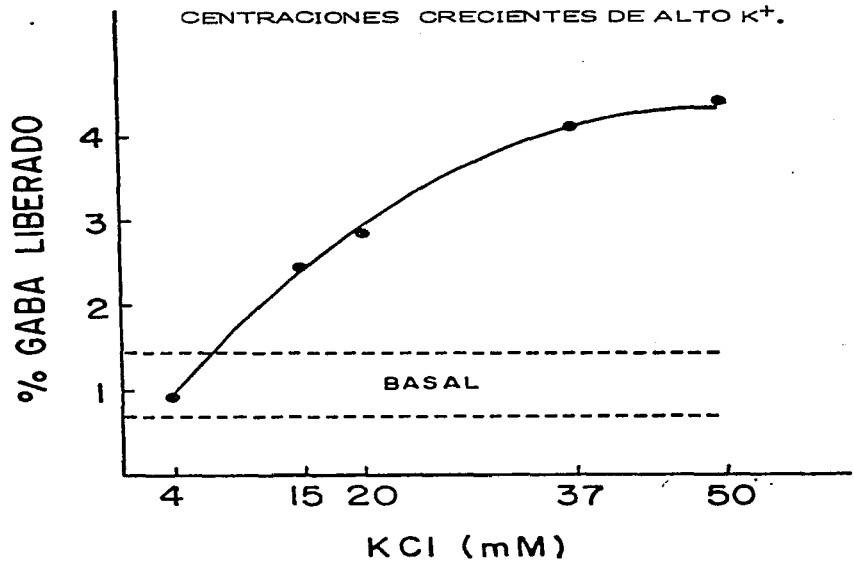


Figura 15. Los sinaptosomas se cargaron con GABA tritiado (0.83  $\mu$ Ci, concentración final 0.5  $\mu$ M) y se perfundieron con un Ringer estandar (SRM) cuya composición se indica en el trabajo III.2. de esta tesis pg 63. Una vez eliminado el GABA radioactivo no captado por la preparación (con un lavado de 10 minutos de perfusión a un flujo de 10 ml/min), se procedió a colectar durante 6 minutos antes de proceder a estimular la liberación con alto K<sup>+</sup>. El GABA liberado en ese tiempo corresponde a la liberación basal que oscila entre 0.75 y 1.5% y se indica con las líneas punteadas. Obsérvese que el GABA liberado con la concentración de 4mM de KCl cae dentro de los valores basales. Este punto es un control, ya que el Ringer estandar contiene esta concentración de potasio. Los valores en las ordenadas indican la cantidad de <sup>3</sup>H-GABA liberada en el minuto correspondiente al pico de la respuesta (minuto 9) expresado como % de la radioactividad total contenida en los sinaptosomas al inicio de la perfusión. Radioactividad total = radioactividad liberada en 15 perfusados colectados cada minuto mas la radioactividad contenida en el filtro al final de la perfusión. (datos no publicados).

- madamente, concentraciones superiores a 8 mM ya inducen cierto grado de despolarización).
2. Si disminuimos la permeabilidad al  $K^+$  también alteramos las condiciones del estado de reposo, ya que en este estado la permeabilidad relativa al  $K^+$  es muy alta. Al disminuir la permeabilidad al  $K^+$  esperaríamos, según la ecuación de Goldman, una alteración del potencial de membrana también en el sentido de la despolarización y la predicción sería aumento en la liberación de transmisores.
  3. En estado de reposo, la membrana de las terminales nerviosas exhibe una baja permeabilidad al  $Na^+$ , por lo que un aumento en la permeabilidad al  $Na^+$ , también perturbaría el potencial de membrana en el sentido de la despolarización.

Es claro que las alteraciones en las concentraciones o en las permeabilidades relativas de los 2 cationes ( $Na^+$  y  $K^+$ ) que determinan principalmente el potencial de la membrana de las terminales nerviosas promueven un aumento de la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, existe un tercer catión, el calcio, que en condiciones de reposo sigue un patrón de distribución similar al del  $Na^+$ , pues su concentración en el fluido extracelular es superior a la del citoplasma y la membrana exhibe gran resistencia a su paso en el reposo. Este tercer catión, el calcio, juega un papel crucial en los procesos de secreción o liberación de neurotransmisores.

### Hipótesis del Calcio

La participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos de secreción, se conoce desde hace mucho tiempo. Uno de estos procesos de secreción está representado por la liberación de neurotransmisores desde la presinápsis. En este caso el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  no solo es reconocido sino que ha dado lugar a la llamada "hipótesis del Calcio", bien conocida por los neurocientíficos interesados en la comunicación sináptica mediada por mensajeros químicos. Esta hipótesis que nació en 1969 con un trabajo de Katz, consiste brevemente en el postulado siguiente: "Cuando un potencial de acción invade la terminal nerviosa presináptica, la despolarización que genera, abre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje que están inmersos en la membrana presináptica. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la terminal a favor de su gradiente electroquímico y el aumento transitorio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  interno dispara la liberación del neurotransmisor". (fig.16)

La hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$  se reafirmó con varios trabajos encaminados a demostrar que un aumento en la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  generaba la liberación del neurotransmisor. Las estrategias empleadas para aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  interno fueron variadas: inyección directa de  $\text{Ca}^{2+}$  (Miledi, 1973), uso de ionóforos selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$  (Kita y Vander Kloot, 1974), fusión de liposomas cargados con  $\text{Ca}^{2+}$  (Rahamimoff y col., 1978), etc.

# DIAGRAMA QUE ESQUEMATIZA LA "HIPOTESIS DEL CALCIO"

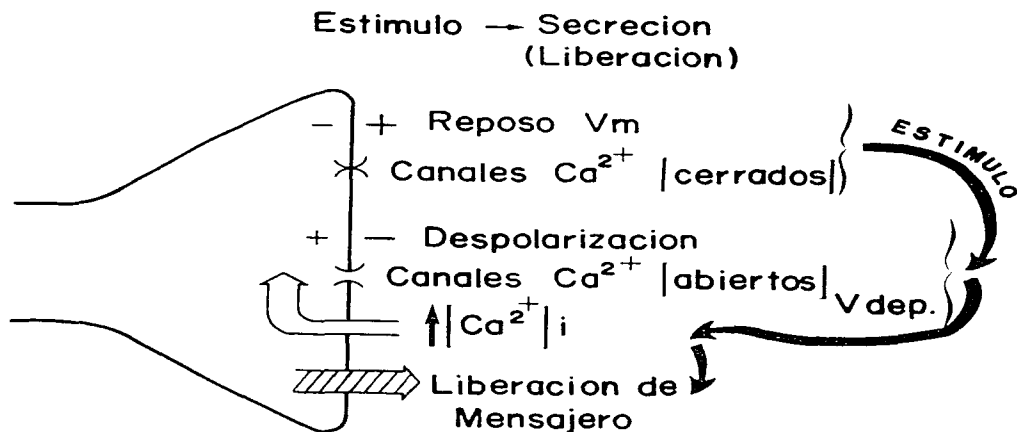


Figura 16. En estado de reposo el potencial de la membrana de la terminal presináptica es negativo en el interior con respecto al exterior y los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje exhiben baja permeabilidad al ión (están cerrados). Ante un estímulo despolarizante, el potencial de membrana se vuelve positivo en el interior con respecto al exterior y los canales de  $Ca^{2+}$  insertos en la membrana se abren, ante el cambio de potencial permitiendo la entrada al  $Ca^{2+}$  extracelular a favor de su gradiente electroquímico. El aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma, genera la liberación del neurotransmisor.

No había duda de que el aumento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  interno por cualquiera de los métodos empleados encontraba correlato con la liberación del neurotransmisor o con alguna manifestación de que se había liberado (potencial postsináptico excitatorio).

## II.7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EMPLEADA PARA CARACTERIZAR EL MECANISMO DE ACCION DE LAS TOXINAS DE C. NOXIUS SOBRE LA LIBERACION DE TRANSMISORES.

La estrategia que nos permitió discriminar qué canales iónicos estaban directamente involucrados en las acciones de las toxinas de Centruroides noxius sobre la liberación de GABA en sinaptosomas, se pudo llevar a cabo gracias a la existencia de herramientas farmacológicas con acciones específicas.

Entre la serie de herramientas experimentales que fueron usadas para la caracterización de los efectos de dichas toxinas en sinaptosomas, algunas jugaron un papel crucial y otras sirvieron para apoyar (por consistencia) el mecanismo de acción propuesto.

Las evidencias electrofisiológicas indicaban que cuando menos dos de las toxinas (II-10 y II-11) del veneno de C. noxius ejercían acciones selectivas sobre las permeabilidades al  $\text{Na}^+$  o al  $\text{K}^+$  en el axón gigante del calamar (Carbone y col. 1982) y con base en la ecuación de Goldman y en la hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$ , había 3 casos en los que un cambio selectivo de permeabilidad iónica daría como resultado un aumento en la liberación del transmisor. Estos 3 casos serían los siguientes:

1. Aumento de la permeabilidad al ión  $\text{Na}^+$ .
2. Aumento de la permeabilidad al ión  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. Disminución de la permeabilidad al ión  $\text{K}^+$ .

Para distinguir un efecto mediado por aumento de la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  a través de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, de efectos mediados por aumento de la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  o disminución de la permeabilidad al  $\text{K}^+$  (condiciones 2 y 3), la herramienta que jugó el papel discriminador fué la tetrodotoxina (TTX). La TTX, bloquea a los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje con elevada selectividad (pg 30). Por consiguiente, la liberación del transmisor en respuesta a la toxina de C. noxius bajo estudio, que estuviera mediada por un aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  a través de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, se inhibiría en presencia de TTX. Por el contrario, si la toxina de C. noxius en cuestión, estimulaba la liberación del transmisor aumentando la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  o disminuyendo la permeabilidad al  $\text{K}^+$ , seguiría estimulándola en presencia de TTX.

Cuando la presencia de TTX no inhibía la estimulación de la liberación inducida por la toxina de C. noxius, se descartaba la posibilidad de que el efecto involucrara a canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a TTX.

Para distinguir entre las condiciones 2 y 3, se utilizó la valinomicina, que es un ionóforo selectivo para  $\text{K}^+$ , con base en la siguiente hipótesis: Si al aumento en la liberación de GABA inducido por la toxina de C. noxius subyacía una disminución de la permeabilidad al  $\text{K}^+$ , este aumento debería ser inhibido en presencia de valinomicina, la que, sin alterar directamente a los canales de la membrana, permitiría el paso de  $\text{K}^+$  a favor de su gradiente electroquímico y, en consecuencia mantendría alta la permea-



bilidad al  $K^+$ . Mientras que si un aumento directo de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  subyacía a la acción de la toxina, la liberación del transmisor inducida por la toxina, no se bloquearía con valinomicina. La figura 5 del trabajo II.2 de la parte de "Desarrollo experimental" se muestra el poder discriminador de este ionóforo.

Además de estas herramientas farmacológicas (TTX y valinomicina) que jugaron un papel primordial para sugerir la causa primaria de la liberación de GABA provocada por cada una de las toxinas de C. noxius que fueron estudiadas, los bloqueadores de los canales de  $Ca^{2+}$  (verapamil y  $Co^{2+}$ ) también fueron importantes: la inhibición de la liberación del transmisor inducida por las toxinas de C. noxius en presencia de dichos bloqueadores nos llevó a pensar en la participación de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje, como evento secundario a la despolarización inducida ya fuera por disminución de la permeabilidad al  $K^+$  ó por aumento de la permeabilidad al  $Na^+$ .

Las condiciones complementarias : ausencia de iones específicos en el líquido de perfusión que haría las veces de fluido extracelular y las adiciones simultáneas de las toxinas con otras condiciones despolarizantes conocidas como medios de potasio alto, medios conteniendo veratrina, se usaron para ampliar la caracterización de los efectos de cada una de las toxinas de Centruroides noxius y compararlos con los

efectos sobre la liberación de transmisores mediados por fármacos tales como la 4-aminopiridina o con la veratrina.

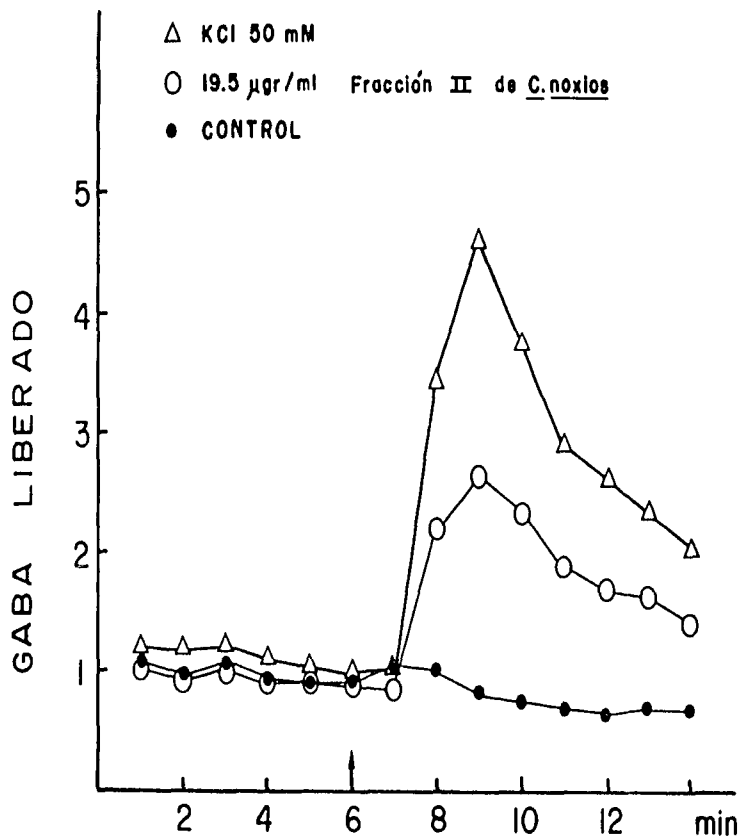
Al final de la tesis en el apéndice II titulado "Herramientas farmacológicas experimentales", se encuentra una tabla que incluye a los fármacos y toxinas que se usaron en los trabajos presentados para facilitar su manejo.

III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En los trabajos que presento a continuación, se caracterizan las acciones de algunas de las toxinas purificadas del veneno del escorpión Centruroides noxius sobre la liberación de GABA (como ejemplo de transmisor) en sinaptosomas. Como la purificación de cada péptido (toxina) contenido en el veneno de C. noxius implica mucho trabajo experimental, antes de probar si alguno de los péptidos puros alteraba de algún modo la liberación de transmisores, probé si la fracción tóxica completa o fracción II que se obtiene de la primera separación en Sephadex G-50 (ver fig. 2) y que contiene a todos los péptidos (II-1 a II-14) ejercía algún efecto sobre la liberación de GABA en sinaptosomas. En la figura 17 se compara el aumento de la liberación basal de GABA inducido por un medio despolarizante de  $K^+$  alto (50 mM) con el aumento inducido por la fracción II del veneno de C. noxius a una dosis de 19.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La discusión de estos datos se encuentra al final de la tesis en la parte de "Discusión General", ya que me interesa comparar este efecto con los inducidos por las toxinas purificadas (II-9, II-10 y II-11) que presento en los trabajos que se encuentran a continuación.

Figura 17. EFECTO DE LA FRACCIÓN II DEL VENENO DE C. NOXIUS SOBRE LA LIBERACION DE GABA DE SINAPTOSOMAS DE CERERRO DE RATON.



El procedimiento seguido es el mismo que en la figura 1A del trabajo III.2, excepto que se empleó la fracción II en vez de la toxina II-11 o NTX para estimular la liberación.

**TRABAJO III.1**

**Toxinas naturales como "Herramientas Experimentales" en Neurobiología.**

# TOXINAS NATURALES COMO "HERRAMIENTAS EXPERIMENTALES" EN NEUROBIOLOGIA

María Sitges\*  
Lourival Possani\*\*  
Alejandro Bayón\*

## Abstract

The venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* contains several neurotoxic peptides, whose aminoacid sequences have been determined. This study is concerned with the mechanism of action of 3 neurotoxic peptides (II-9, II-10 and II-11) from *C. noxius* to increase GABA release from mouse brain synaptosomes.

The release of GABA induced by toxins II-9 and II-10, both long chain peptides (7000 M. w.) whose aminoacid sequences exhibit a high degree of homology, is inhibited by the voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channel blocker, tetrodotoxin. In contrast, the release of GABA evoked by the short chain peptide ( $\approx$  4000 M. w) II-11 called noxiustoxin (NTX) is not modified by tetrodotoxin. Ca<sup>2+</sup> channel blockers (verapamil or Co<sup>2+</sup>) or the absence of external Ca<sup>2+</sup> prevents the releasing effects of the 3 toxins. In synaptosomes, the two long chain toxins increase <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> permeability and NTX decreases <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> permeability. The K<sup>+</sup> ionophore valinomycin completely inhibits the release induced by NTX, as well as that evoked by the K<sup>+</sup> channel blocker 4-aminopyridine. Based on these findings, it is proposed that transmitter release induced by NTX is due to a depolarization in response to the decrease of K<sup>+</sup> permeability, and that transmitter release in response to toxins II-9 and II-10 to a depolarization mediated by the increase in Na<sup>+</sup> permeability. The external Ca<sup>2+</sup> dependence of the 3 toxins to evoked release is related to the activation of voltage sensitive Ca<sup>2+</sup> channels by depolarization. The value of natural toxins as "experimental tools" is discussed and their high potency and selectivity is confirmed.

## Resumen

El veneno del escorpión mexicano *Centruroides noxius* contiene varios péptidos neurotóxicos cuyas secuencias de aminoácidos han sido determinadas. En este estudio se describen los mecanismos de acción subyacentes a la liberación de un neurotransmisor clásico (GABA) de sinaptosomas de cerebro de ratón, evocada por 3 péptidos neurotóxicos de *C. noxius*: II-9, II-10 y II-11. La liberación de GABA inducida por los péptidos "largos" (P. M. 7 000) II-9 y II-10, cuyas secuencias de aminoácidos exhiben alta homología, es inhibida por el bloqueador de los canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje, tetrodotoxina. En contraste, la liberación evocada con el péptido "corto" (P. M. 4 000) II-11, conocido como noxiustoxina (NTX), no se bloquea con tetrodotoxina. La liberación del transmisor, inducida por cualquiera de las 3 neurotoxinas, es inhibida con bloqueadores de los canales de calcio (verapamil, cobalto) y depende de Ca<sup>2+</sup> externo. En sinaptosomas, los dos péptidos "largos" aumentan la permeabilidad al <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> y el II-11 o NTX disminuye la permeabilidad al <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>. La NTX, al igual que el bio-

queador de los canales de K<sup>+</sup>, 4-aminopiridina, no evoca liberación de GABA de sinaptosomas previamente tratados con el ionoforo de K<sup>+</sup> valinomicina. Con base en estos resultados, se propone que la liberación del transmisor evocada con NTX, está mediada por una depolarización en respuesta a la disminución de la permeabilidad al K<sup>+</sup> y la evocada por las toxinas II-9 ó II-10 por una depolarización como resultado del aumento en la permeabilidad al Na<sup>+</sup>. La dependencia de Ca<sup>2+</sup> externo que exhiben las 3 toxinas para inducir liberación es secundaria y se relaciona con la activación de los canales de Ca<sup>2+</sup> como consecuencia de la depolarización. Se discute el valor de las toxinas naturales como "herramientas experimentales" y se reafirma la alta potencia y selectividad con que actúan.

## Introducción

En la naturaleza existen numerosas especies productoras de sustancias neurotóxicas, mismas que utilizan frecuentemente como mecanismo de defensa. Desde hace varias décadas, los estudiosos de los mecanismos moleculares de la comunicación nerviosa han mostrado interés por las toxinas naturales. Las moléculas con las cuales interaccionan muchas de las toxinas de origen natural, hasta ahora estudiadas, están directamente involucradas en la fisiología de la neurotransmisión. Algunas toxinas naturales exhiben elevada selectividad y gran afinidad por moléculas fisiológicamente importantes como canales iónicos y receptores de neurotransmisores, lo que ha permitido, incluso, purificar con ellas a algunas de estas entidades moleculares<sup>(1, 7, 8, 12 y 18)</sup>.

Son muchas las sustancias de origen natural reportadas como neurotóxicas<sup>(8, 10 y 14)</sup>; sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a sus efectos sólo se conocen en contados casos. Las toxinas naturales cuyos mecanismos de acción están establecidos, son valiosas "herramientas experimentales" para abordar el estudio del funcionamiento neural en diversas preparaciones.

## Distribución geográfica de los escorpiones

Entre las especies que producen neurotoxinas potencialmente interesantes, se encuentran los escorpiones que producen venenos altamente tóxicos. Su distribución está restringida al Norte de África, Asia Central, Brasil y México. El género representativo de México es el *Centruroides*. Entre las diferentes especies de este género, la *noxius* produce el veneno más potente.

\*Unidad de Desarrollo de Técnicas Analíticas para la Investigación en Psiquiatría y Neuroquímica, IMP-UNAM.

\*\*Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## Purificación y secuenciación de las toxinas de *C. noxius*

Antes de iniciar cualquier estudio con una toxina potencialmente interesante, es necesario que la toxina en cuestión haya sido purificada.

Los péptidos tóxicos contenidos en el veneno del alacrán *Centruroides noxius*, cuyos efectos sobre la liberación de transmisores se reportan en este trabajo, no sólo han sido purificados, sino que sus secuencias de aminoácidos también han sido determinadas por el grupo del doctor Lourival Possari<sup>(16, 19 y 20)</sup>.

Al analizar el componente tóxico del veneno del *C. noxius*, éste se subdividió en 14 fracciones. De éstas, las fracciones II-8, II-9, II-10, II-11 y II-13, resultaron letales al ser practicada una prueba de toxicidad (inyección i.p. de 2 µg/gr de ratón). Las fracciones II-6, II-12 y II-14 fueron tóxicas y las restantes no tuvieron efectos aparentes<sup>(19)</sup>.

En este trabajo se reportan las acciones de 3 de las fracciones con efectos letales (II-9, II-10 y II-11), por lo que nos limitaremos a describir sus características. Los péptidos purificados de las fracciones II-9 y II-10 han sido secuenciados, cuando menos en su porción aminoterminal<sup>(16, 19)</sup>.

La comparación de sus secuencias de aminoácidos demuestra que existe un alto grado de homología entre ellos (Fig. 1), la que también comparten con algunas toxinas contenidas en los venenos de alacranes de otras especies<sup>(21)</sup>. La secuencia de aminoácidos de la NTX difiere totalmente de las determinadas para las toxinas "largas" II-9 y II-10 (Fig. 1).

FIG 1. Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-Thr-Ser-Pro-Lys-Gln-Cys-Ser-Lys-Pro-Cys-Lys-Glu-Leu-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-Cys-Het-Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Cys-Tyr-Asp-Asn.

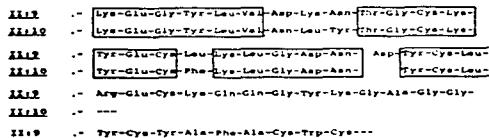


Figura 1. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las toxinas II-9, II-10 y II-11 (NTX) del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Holtmann.

El peso molecular de la mayor parte de las toxinas que han sido purificadas de los venenos de diferentes especies de alacranes es cercano a 7 000, como es el caso de las fracciones II-9 y II-10 de *C. noxius*. Además de estas toxinas "largas", en los venenos de algunas especies de alacranes han sido detectados péptidos más cortos, con pesos moleculares de 4 000 aproximadamente. La noxiustoxina (NTX) correspondiente a la fracción II-11 del veneno de *C. noxius* es un péptido de este tipo.

### Efecto de las toxinas de *C. noxius* sobre las corrientes iónicas del axón gigante del calamar

La actividad de las células nerviosas se expresa por

medio de movimientos iónicos a través de sus membranas. Para abordar el estudio de la comunicación nerviosa, encontrar toxinas o nuevos fármacos que interaccionen selectivamente con algún canal iónico es de valor primordial. Cuando las toxinas de *C. noxius* fueron probadas sobre las corrientes iónicas de  $Na^+$  y de  $K^+$  en el axón gigante del calamar bajo pinza de voltaje, sólo la toxina "larga" II-10 y la NTX resultaron efectivas. La primera inhibiendo selectivamente la corriente de  $Na^+$  y la NTX bloqueando la de  $K^+$ <sup>(15)</sup>.

Por mucho tiempo se pensó que el modelo de 2 canales, uno de  $Na^+$  y otro de  $K^+$ , que surgió del análisis de las corrientes iónicas de la membrana del axón, era aplicable a todas las membranas de la célula nerviosa. Sin embargo, en los últimos años, al estudiar las corrientes iónicas de otras regiones de la célula nerviosa (soma, terminales nerviosas), se ha evidenciado la existencia de otros canales iónicos<sup>(15)</sup>. Con estos nuevos canales se comienzan a explicar propiedades particulares de las diferentes regiones membranales de la célula nerviosa. Así, parece que no todas las membranas están estructuradas de la misma forma que las del axón<sup>(15)</sup>.

### Planteamiento del problema

Como estaba reportado que otras toxinas "largas" purificadas de venenos de otras especies de escorpiones aumentaban la captura de  $Na^+$ <sup>(16)</sup>, desencadenando así la liberación de neurotransmisores en terminales nerviosas aisladas<sup>(9 y 11)</sup>, resultaba curioso que la toxina II-10 estuviera actuando de forma opuesta en el axón: inhibiendo en vez de aumentando la permeabilidad al  $Na^+$ .

Esta diferencia hacía interesante conocer el tipo de efecto que pudiera ejercer la toxina II-10 de *C. noxius* sobre la liberación de neurotransmisores y sobre los movimientos de  $Na^+$  directamente en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas). Considerando que también la toxina II-9, que presenta un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos con la toxina II-10, había resultado letal al inyectarse a baja dosis a ratones (aunque carente de efecto en el axón), en este trabajo también se estudiaron sus efectos en sinaptosomas.

Además, con el antecedente de que la 4-aminopiridina (4-AP), que bloquea la permeabilidad al  $K^+$  en el axón<sup>(25)</sup>, aumenta la liberación de Glutamato, GABA y ACh de sinaptosomas<sup>(24)</sup>, decidimos estudiar los efectos de la NTX, que en el axón había inhibido la corriente de  $K^+$ <sup>(15)</sup>, en la liberación de transmisores y en los movimientos de  $K^+$  en sinaptosomas.

### Procedimiento

Para determinar qué tipo de efecto ejercían tanto las dos toxinas "largas" (II-9 y II-10) como la toxina "corta" (II-11 NTX) de *C. noxius* en la liberación de transmisores, se midió la liberación de GABA, un neurotransmisor clásico, de terminales nerviosas aisladas de cerebro de ratón.

Los sinaptosomas se aislaron según el método de Hajós<sup>(13)</sup>. Una vez obtenidos, se cargaron con GABA marcado radioactivamente (2, 3-<sup>[3H]</sup>GABA, 0.83 µCi, 0.5 µM final). Para seguir la liberación de este transmi-



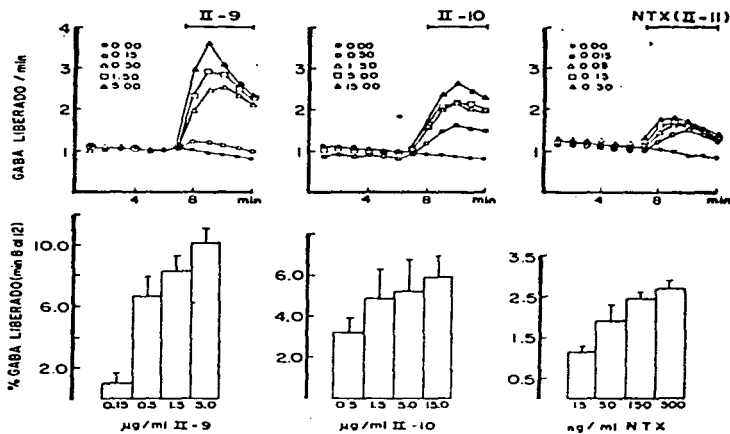


Figura 2. Efecto de las toxinas II-9, II-10 y NTX sobre la liberación basal de GABA. Los sinaptosomas fueron cargados con GABA radioactivo y perfundidos con un Ringer normal de la siguiente composición (mM):  $\text{NaCl}$  127,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18,  $\text{KCl}$  3.73,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgSO}_4$  1.18,  $\text{NaHCO}_3$  20, dextrosa 11.2, ácido amino-oxalacético 0.1 mM, albúmina bovina 0.1%, pH 7.4. Después de lavado el  $^3\text{H}$ -GABA no captado y alcanzado el nivel de liberación basal (minutos 1 al 7), los sinaptosomas fueron perfundidos con el mismo Ringer sin (o), control y con la toxina bajo estudio a diferentes concentraciones. Los números junto a los símbolos en el margen superior derecho de las 3 gráficas superiores indican  $\mu\text{g/ml}$  añadidos de cada toxina. GABA liberado/min, se refiere a la marca radioactiva liberada por minuto, expresada como  $\%$  de la radioactividad total contenida en los sinaptosomas en el minuto 1 de la perfusión. Cada símbolo resulta del promedio de 4 a 5 experimentos independientes. En las gráficas inferiores de dosis-respuesta el % de GABA liberado se refiere al porcentaje total de radioactividad liberada en presencia de la toxina (minutos 8 al 12) menos la radioactividad liberada en su ausencia durante los mismos minutos. En las barras se indica la media  $\pm$  el error estándar de los 4 a 5 experimentos independientes.

sor, se empleó la técnica de perfusión previamente reportada por Tapia y Sitges<sup>(24)</sup>. Para estudiar los movimientos de  $\text{K}^+$  en sinaptosomas, se midió el flujo de  $^{86}\text{Rb}^+$  según el método de Sitges y col.<sup>(23)</sup> y para los movimientos de  $\text{Na}^+$  se midió el flujo de  $^{22}\text{Na}^+$  como se especifica en el pie de la figura 4.

#### Resultados

##### Efecto de las toxinas II-9, II-10 y II-11 de *C. noxius* sobre la liberación de GABA en sinaptosomas

Tanto las 2 toxinas "largas" de *C. noxius* como la toxina "corta" incrementaron la liberación de GABA en forma dependiente a la dosis (Fig. 2). Sus dosis efectivas medias fueron: 2.9 nM para la NTX y aproximadamente 60 nM para las toxinas "largas". Este aumento en la liberación de GABA podía estar mediado por una despolarización de la membrana sinaptosomal.

Con base en que el potencial de membrana es función de las concentraciones externa e interna y de las

permeabilidades relativas a ciertos iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y pasivamente la de  $\text{Cl}^-$ ) era posible que una alteración selectiva de dichas permeabilidades, por efecto de las toxinas, fuera la causa que estaba desencadenando la liberación del transmisor.

Para explorar esta posibilidad se diseñó una estrategia experimental que consistió en probar cómo se modificaba la liberación de GABA evocada por cada una de las 3 toxinas de *C. noxius*, cuando se aumentaba o bloqueaba selectivamente (con el empleo de bloqueadores de canales y ionóforos selectivos) la permeabilidad a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ .

##### Efecto de las toxinas II-9, II-10 y II-11 en sinaptosomas con los canales de $\text{Na}^+$ sensibles a voltaje bloqueados con tetrodotoxina.

El bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, tetrodotoxina (TTX), no impidió que la toxina "corta" (NTX) aumentara la liberación de GABA. En cambio, las toxinas "largas" II-9 y II-10 perdieron su efectividad para liberar al transmisor de sinaptosomas

previamente tratados con TTX (Fig. 3). Estos resultados indicaban que la NTX no estaba induciendo la liberación de GABA a través de una activación de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, mientras que la estimulación de la liberación inducida por la toxina II-9 o por la toxina II-10 estaba muy probablemente relacionada con un aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  a través de los canales sensibles a TTX.

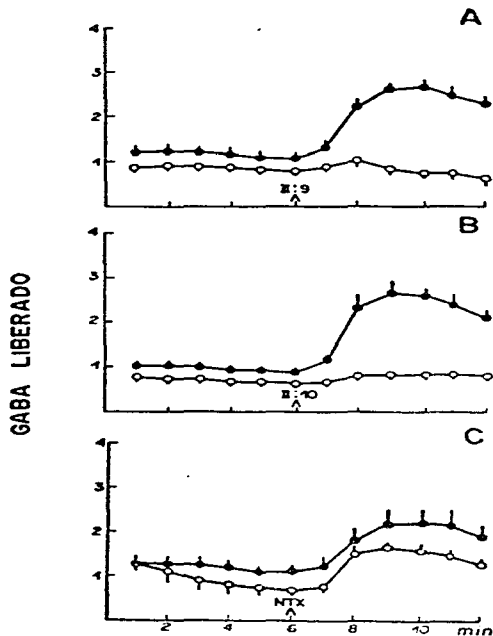


Figura 3. Efecto del bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  (TTX) en la liberación evocada por las toxinas II-9, II-10 y NTX de *Centruroides noxius*. Los sinaptosomas fueron perfundidos con el Ringer normal en ausencia (o) o en presencia de tetrodotoxina (o). En el minuto indicado por la flecha el Ringer también contenía 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina II-9 ó II-10 (A y B respectivamente) ó 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de NTX (C).

#### I. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO LIBERADOR EVOCADO POR LAS TOXINAS II-9 Y II-10

Efecto de las toxinas "largas" de *C. noxius* en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en los sinaptosomas

Resultaba interesante que la toxina "larga" II-10

que había disminuido la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en el axón, parecía ejercer un efecto opuesto sobre dicha permeabilidad en las terminales nerviosas aisladas. También era notable que la toxina II-9, sin efecto en el axón, ejerciera un efecto similar a su homóloga II-10, en sinaptosomas. Esto nos llevó a estudiar el efecto que podían tener estas toxinas sobre la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en la preparación sinaptosomal. Para ello, medimos el flujo de  $^{22}\text{Na}^+$  de sinaptosomas previamente cargados con el ion radioactivo; la monensina, que es un ionóforo de  $\text{Na}^+$ , así como la veratrina, que se une al canal de  $\text{Na}^+$  aumentando la permeabilidad a dicho ion, se emplearon como controles positivos en estos experimentos (Fig. 4). El aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  evocado por estas toxinas, era menor que el inducido por veratrina y más aun comparado con el obtenido en respuesta a la monensina. No obstante, este estudio demostró que en efecto, las dos toxinas "largas" eran capaces de aumentar la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en los sinaptosomas.

Efecto de las toxinas II-9, II-10 y II-11 en sinaptosomas con los canales de calcio bloqueados con cobalto o verapamil

Para bloquear los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  contenidos en las membranas de sinaptosomas, estos fueron perfundidos con un Ringer normal que contenía un bloqueador orgánico (verapamil) o un bloqueador inorgánico (cobalto). La presencia de cualquiera de dichos bloqueadores impidió a las 3 toxinas de *C. noxius* estimular la liberación del trasmisor. En la figura 5 se ejemplifica el bloqueo, con cobalto, de la liberación del trasmisor en respuesta a las 3 toxinas. Además, tanto las toxinas "largas" como la NTX dependen de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo para inducir liberación, ya que el efecto estimulador evocado por cada una de ellas también es inhibido en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo<sup>(23)</sup> (Fig. 6).

Mecanismo de acción de las toxinas "largas"

El aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ , evocado por las toxinas II-9 y II-10 aunado al bloqueo con TTX de la liberación evocada por dichas toxinas, indicaba que una despolarización de la membrana sinaptosomal tras la entrada de  $\text{Na}^+$  por los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, era la causa del aumento de la liberación de GABA evocado por la toxina II-9 o por la toxina II-10. La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, así como la inhibición por cobalto (o verapamil) del efecto de las 2 toxinas "largas", era muy posiblemente secundario (debido al acoplamiento final estímulo-secreción dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la terminal); la despolarización debida a la interacción de la toxina II-9 o de la II-10 con los canales de  $\text{Na}^+$ , activa a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo y la liberación del neurotransmisor.

#### II. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO LIBERADOR EVOCADO POR NTX

La posibilidad de que la NTX estimulara la libera-

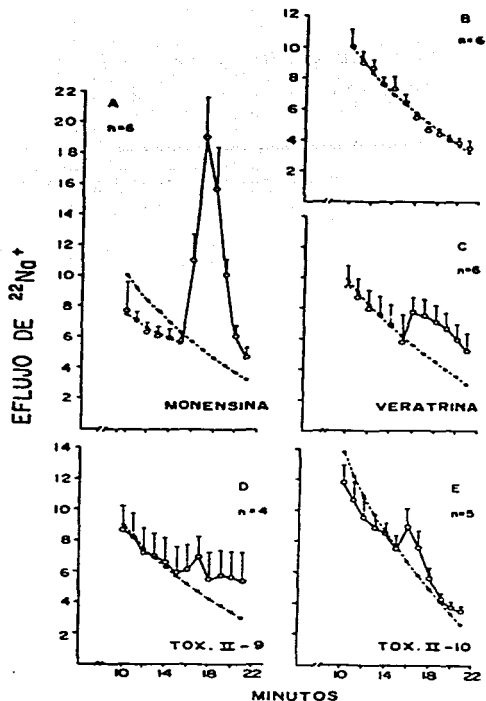


Figura 4. Efecto de Monensina, Veratrina, toxina II-9 y toxina II-10 en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en sinaptosomas. Los sinaptosomas fueron suspendidos en un Ringer normal en el cual 120 mM de  $\text{NaCl}$  se reemplazó por cloruro de colina y el  $\text{NaHCO}_3$  por 20 mM de TPA. Esta suspensión sinaptosomal (1.5 mg/ml) se cargó con 25  $\mu\text{Ci/ml}$  (radioact. esp. 13 mCi/mmol) de  $^{22}\text{Na}^+$  durante una hora. Transcurrido este tiempo, se colocaron alícuotas de esta suspensión sobre filtros Millipore de 0,65  $\mu\text{m}$  y se lavaron rápidamente con el Ringer de colina en el portafiltras Millipore conectado a una bomba de vacío de 3/4 MP. Los filtros con los sinaptosomas cargados con  $^{22}\text{Na}^+$  se trasladaron rápidamente a las cámaras de perfusión conectadas a una bomba peristáltica. Se procedió a perfundir de la misma manera que en los experimentos de liberación de  $^3\text{H}$ -GABA. El  $^{22}\text{Na}^+$  liberado durante cada minuto en ausencia (minutos 1 a 15) y en presencia de: (A) monensina 10  $\mu\text{M}$ , (B) Ringer normal, (C) Veratrina 50  $\mu\text{g/ml}$ , (D) toxina II-9 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , (E) toxina II-10 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , (minutos 16 al 22) se expresa como % del contenido total de re-

lacioactividad en los sinaptosomas en el momento de la adición del fármaco. Las líneas punteadas representan el flujo de  $^{22}\text{Na}^+$  obtenido en experimentos paralelos en ausencia de fármaco. En B se grafica uno de estos controles con sus errores estándar. Cada punto es la media  $\pm$  el error estándar de 4 a 6 experimentos independientes.

ción de GABA, aumentando la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  a través de los canales sensibles al voltaje, estaba descartada con base en los resultados obtenidos con TTX (Fig. 3).

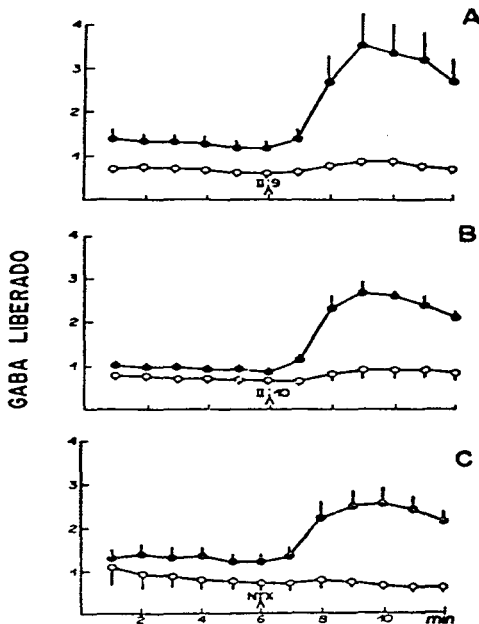


Figura 5. Efecto del bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (CO-BALTO) en la liberación evocada por las toxinas II-9, II-10 y NTX de *C. nauxius*. Los sinaptosomas fueron perfundidos con el Ringer normal (o) o con un Ringer normal en el cual el  $\text{CaCl}_2$  fue sustituido por  $\text{CoCl}_2$  ( $\Delta$ ). En el minuto indicado por la flecha ambos ringers contenían 1,5  $\mu\text{g/ml}$  de toxina II-9 (A), 1,5  $\mu\text{g/ml}$  de toxina II-10 (B) ó 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de NTX (C). Cada punto es la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes.

Como en el caso de las toxinas "largas", la liberación de GABA inducida por la NTX se inhibió en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo<sup>(23)</sup> y en presencia de bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5). Estas observacio-

nes indicaban que la NTX inducía una entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales sensibles a verapamil y a  $Co^{2+}$ . Había entonces que determinar si la NTX activaba directamente a los canales de  $Ca^{2+}$  o si éstos se activaban como resultado de una despolarización disparada por otro mecanismo. El hecho de que la NTX hubiera disminuido la permeabilidad al  $K^+$  en el axón gigante del calamar, planteaba la posibilidad de que éste fuera el mecanismo causal de su efecto. Antes de pensar en algún otro mecanismo había que encontrar una estrategia para distinguir entre las dos posibilidades anotadas.

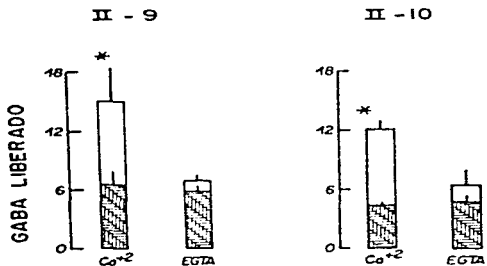


Figura 6. La liberación de GABA en respuesta a las toxinas II-9 e II-10 se inhibe en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo. La zona blanca de las barras expresa el % de  $^3H$ -GABA liberado durante 5 minutos de exposición de los sinaptosomas a las toxinas II-9 e II-10, disueltas en un Ringer normal ( $Ca^{2+}$ ) o en un Ringer sin  $CaCl_2$  y con EGTA  $50 \mu M$  (EGTA). La altura de las barras es la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $= p < 0.01$ .

#### Efecto de la NTX en sinaptosomas continuamente permeables al $K^+$

Para distinguir entre la liberación mediada por un aumento directo de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  o una disminución directa de la permeabilidad al  $K^+$  (que despolarizaría la membrana y activaría la entrada de  $Ca^{2+}$ ), los sinaptosomas fueron tratados con el ionóforo de  $K^+$  valinomicina para aumentar, en forma independiente de canales, su permeabilidad al  $K^+$ . Si el efecto de la NTX sobre la liberación de GABA estaba mediado por una disminución de la permeabilidad al  $K^+$  por canales de  $K^+$ , los sinaptosomas tratados con valinomicina no responderían a la NTX. Por otro lado, si el efecto de la NTX estaba mediado por un aumento directo de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ , la presencia de valinomicina no debería impedir la liberación inducida por NTX.

En la figura 7 se muestra que la NTX no es capaz de evocar liberación de sinaptosomas tratados con valinomicina. Tampoco la 4-aminopiridina (un bloqueador de canales de  $K^+$ ), fue capaz de inducir liberación en presencia de valinomicina. En contraste, la liberación de GABA evocada por un aumento en la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  (inducido por el ionóforo de  $Ca^{2+}$ , A-23187), no se inhibió con valinomicina.

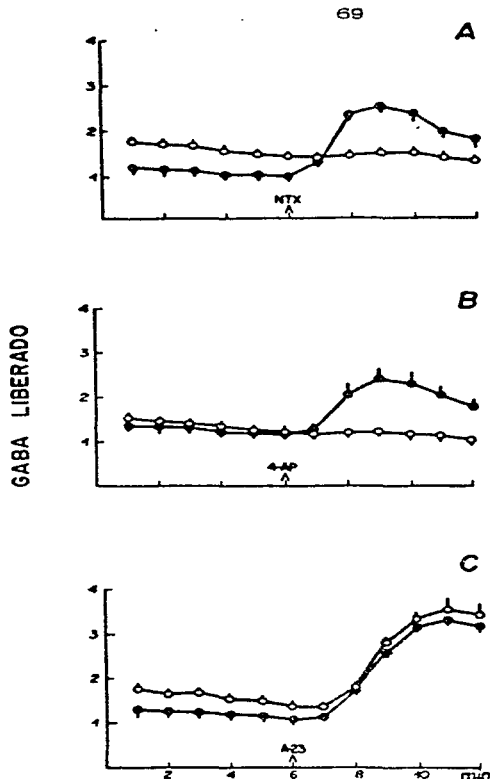


Figura 7. Modificación de la liberación de  $^3H$ -GABA inducida por NTX, 4-AP y A-23187 de sinaptosomas tratados con el ionóforo de  $K^+$  valinomicina. Los sinaptosomas fueron perfundidos con un Ringer normal sin (o) valinomicina (o). En el minuto indicado por  $\uparrow$  se añadió NTX  $0.1 \mu M$  (A), 4-AP  $50 \mu M$  (B) y A-23187  $5 \mu M$  (C). Cada punto es la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes.

#### Efecto de la NTX en la permeabilidad al $K^+$ de los sinaptosomas

Con el antecedente de que la toxina II-10 de *C. noxius* había ejercido efectos contrarios en la permeabilidad al  $Na^+$  del axón y de los sinaptosomas, se antojaba necesario estudiar si la NTX ejercía el mismo efecto sobre la permeabilidad al  $K^+$  en ambas preparaciones. Para

contestar ésto, se estudió la acción de la NTX en el flujo de  $^{86}\text{Rb}^+$  (un análogo funcional de  $\text{K}^+$  en las membranas) de sinaptosomas. La figura 8 demuestra que tanto la NTX como la 4-AP disminuyeron en un 90% el flujo de  $^{86}\text{Rb}^+$  de los sinaptosomas que fueron previamente cargados con este ión radioactivo.

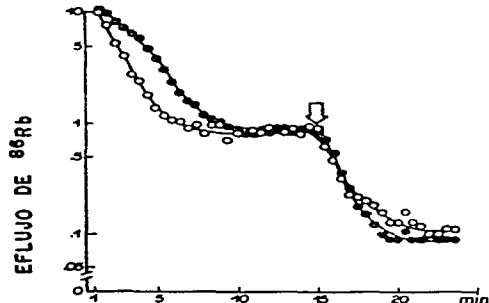


Figura 8. Efecto de la NTX y la 4-AP en el flujo de  $^{86}\text{Rb}^+$  en sinaptosomas. Los filtros Millipore ( $0.65\ \mu\text{M}$ ) con los sinaptosomas cargados con  $^{86}\text{Rb}^+$  fueron perfundidos con un Ringer normal. En el momento indicado por la flecha, este Ringer contenía NTX  $0.24\ \mu\text{M}$  (o) o 4-AP  $200\ \mu\text{M}$  (o). Los resultados se expresan como % de la radioactividad total contenida en los sinaptosomas al inicio de la perfusión.

#### Mecanismo de acción de la NTX

Ya que en sinaptosomas, la NTX induce una disminución de la permeabilidad al  $^{86}\text{Rb}^+$  y es inefectiva para liberar GABA de sinaptosomas cuya permeabilidad al  $\text{K}^+$  ha sido incrementada con valinomicina, se propone el siguiente mecanismo: la liberación de transmisor que induce la NTX debe estar mediada por una despolarización en respuesta a la disminución de la permeabilidad al  $\text{K}^+$  en los sinaptosomas. La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, de nueve, debe ser secundaria, relacionada con el acoplamiento entre el estímulo y el proceso de liberación.

#### Comentarios y perspectivas futuras

##### Toxinas II-9 y II-10 de *Centruroides noxius*

En este trabajo se reafirma el valor de las toxinas naturales como moléculas altamente selectivas y potentes farmacológicamente.

Los efectos opuestos de la toxina II-10 en el axón y en los sinaptosomas indican que debe haber diferencias entre los canales de  $\text{Na}^+$  contenidos en el axón y en las terminales nerviosas. Aún falta definir si estas diferencias son estructurales, pero lo que sí resulta claro es

que la interacción de la toxina II-10 altera en forma opuesta el funcionamiento de los canales de  $\text{Na}^+$  contenidos en estas dos regiones de la célula nerviosa. Desde este punto de vista, resulta interesante el hecho de que la toxina "larga" II-9 (que presenta una alta homología con la toxina "larga" II-10) fuese inactiva en el axón y se comportara de formar casi paralela a la toxina II-10 en sinaptosomas. Es materia de experimentos futuros el determinar si estas toxinas serán capaces de desenmascarar poblaciones de canales, propias de las terminales nerviosas.

La toxinas "largas" II-9 y II-10 de *C. noxius*, a diferencia de otros fármacos capaces de aumentar la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  (como la monensina o la veratrina), dependen de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo para evocar la liberación de GABA de sinaptosomas. La veratrina<sup>(17)</sup> y la monensina<sup>(22)</sup> aumentan la liberación de GABA en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo.

Otra característica distintiva es que tanto la veratrina como la monensina son más eficaces que las toxinas II-9 y II-10 de *C. noxius*, tanto para aumentar la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  (Fig. 3), como para evocar la liberación del neurotransmisor<sup>(17 y 22)</sup>.

Estas diferencias podrían ser indicativas del vaciamiento de diferentes pozos del neurotransmisor liberable.

Una de las principales perspectivas futuras de este trabajo es averiguar si las toxinas "largas" de *Centruroides noxius* son capaces de evocar la liberación de neurotransmisores desde una poza soluble o vesicular. Como el GABA liberado proviene preferencialmente del comportamiento citosólico<sup>(4)</sup>, este estudio se ampliará caracterizando la liberación de encefalinas endógenas (localizadas en vesículas) sinaptosomales, en respuesta a las toxinas de *C. noxius* y a otros fármacos. Esto permitirá comparar los patrones de liberación, bajo diferentes condiciones experimentales, de un neurotransmisor liberado de vesículas con los ya obtenidos de la liberación de GABA.

#### Noxiustoxina

Entre los pocos bloqueadores de los canales de  $\text{K}^+$  hasta la fecha conocidos, la NTX parece ser la más potente; en los sinaptosomas su  $\text{ED}_{50}$  para evocar la liberación de GABA es  $2.9\ \text{nM}$ , mientras que la 4-AP requiere concentraciones micromolares para evocar liberación de neurotransmisores<sup>(24)</sup>. En el axón, la NTX tiene una  $\text{K}_{50}$  de  $300\ \text{nM}$  para disminuir la corriente de  $\text{K}^+$ <sup>(5)</sup>, mientras que la 4-AP y el tetratilamonio (otro fármaco conocido como bloqueador de los canales de  $\text{K}^+$ <sup>(2)</sup>, son activos sobre las corrientes de  $\text{K}^+$  del axón a concentraciones milimolares.

Aunque la NTX y la 4-AP se comportan como bloqueadores de los canales de  $\text{K}^+$  e inducen liberación de neurotransmisores, existen ciertas diferencias en sus efectos, por ejemplo, su eficacia para evocar la liberación de neurotransmisores es diferente<sup>(23, 24)</sup>; la 4-AP es incapaz de aumentar la liberación de neurotransmisores en una preparación despolarizada con  $\text{K}^+$  alto ( $20\ \text{mM}$ )<sup>(24)</sup>, mientras que la NTX suma su efecto liberador al

evocado por  $K^+$  15 mM(23). Los experimentos de Bartschat y Blaustein<sup>(3)</sup> sugieren la presencia de diferentes poblaciones de canales de  $K^+$  en las membranas sinaptosomales. Las diferencias entre los efectos de la NTX y la 4-AP podrían indicar que estos dos fármacos están interaccionando preferencialmente con diferentes poblaciones de canales de  $K^+$  o que emplean diferentes mecanismos para reducir la permeabilidad al  $K^+$ .

Son pocos los fármacos que se conocen como bloqueadores específicos de los canales de  $K^+$ . Para poder

entender las funciones mediadas por la nueva "familia" de canales de  $K^+$  que se ha comenzado a descubrir, la caracterización de "herramientas experimentales" como la NTX, es de valor primordial.

En resumen, la caracterización de los mecanismos de acción de nuevas toxinas naturales, sobre distintos eventos involucrados en la transmisión nerviosa (corrientes, flujos iónicos, liberación de transmisores, etc.), abre nuevas perspectivas en el entendimiento de los procesos moleculares que determinan la función neural.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo adicional de donativos de CONACYT y de la Fundación R. J. Zebada (R.C.H.).

#### REFERENCIAS

- AGNEW W S, LEVINSON S R, BRABSON J S, RAFFERY M A: Purification of the tetrodotoxin binding component associated with the voltage sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proc Nat Acad Sci USA* 75: 2606-2610, 1978.
- ARMSTRONG C M, BINSTOCK L: Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol* 48: 859-872, 1965.
- BARTSCHAT D K, BLAUSTEIN M P: Calcium-activated potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J Physiol*, Londres 361: 441-457, 1985.
- BELLERCOHE J S, BRADFORD H F: On the site of origin of transmitter amino acids released by depolarization of nerve terminals in vitro. *J Neurochem* 29: 335-343, 1977.
- CARBONE E, WANKE G, PRESPITINO G, POSSANI L D, MAELICKE A: Selective blockage of voltage-dependent  $K^+$  channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296: 90-91, 1982.
- CARBONE E, PRESPITINO G, FRANCIOLINI F, DENT M A R, POSSANI L D: Selective modification of the squid axon  $Na^+$  currents by Centruroides noxius toxin II-10. *J Physiol Paris* 79: 179-184, 1984.
- CATTERALL W A, MORROW C S, HARTSHORNER R P: Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact lysed, and detergent solubilized brain membranes. *J Biol Chem* 254: 11379-11387, 1979.
- CATTERALL W A: The emerging molecular view of the sodium channel. *Trends Neurosci* 5: 303-305, 1982.
- COURAUD F, JOVER E, DUBOIS J M, ROCHAT H: Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicol* 20: 9-16, 1982.
- COURAUD F, JOVER E: Mechanism of action of scorpion toxins. En: *Insect Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms*. Ed. Anthony T, Tu. *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 2, Marcel Dekker Inc. Nueva York y Basel. pp. 659-678, 1984.
- COUTINHO-NETTO J, ABDUL-GHANI A S, NORRIS P J, THOMAS A J, BRADFORD H F: The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro. *J Neurochem* 35: 558-565, 1980.
- DOLLY J O: Biochemistry of acetylcholine receptors from skeletal muscle. En: *International Review of Biochemistry, Neurochemistry and Biochemical Pharmacology* Ed. K. Tipton University Park Press, Baltimore 26: 257-309, 1979.
- HAJOS F: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res* 136: 387-392, 1975.
- HOWARD B D, GUNDERSEN Jr C B: Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 20: 307-336, 1980.
- KANDEL E: The multichannel model of the nerve cell membrane: A perspective. En: *Molluscan Nerve Cells: From Biophysics to Behavior*, Eds. J. Koster y J. H. Byrne Cold Spring Harbor, Reports in the Neurosciences, 1: 1-10, 1980.
- KRUEGER B K, BLAUSTEIN M P: Sodium channels in presynaptic nerve terminals. *J Gen Physiol* 76: 287-313, 1980.
- LEVI G, BANAY-SCHARTZ M, RAITERI M: Uptake, exchange and release of GABA in isolated nerve endings. En *Amino Acids as Chemical Transmitters*. Ed. F. Fonnum Plenum Press, Nueva York, pp. 327-350, 1978.
- NORMAN R I, SCHMID A, LOMBET A, BARHANIN J, LAZDUNSKI M: Purification of binding protein for Tityus toxin identified with the gating component of the voltage-sensitive  $Na^+$  channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4164-4168, 1983.
- POSSANI L D, DENT M A, MARTIN B M, MAELICKE A, SVENDSEN I: The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Carlsberg Res Commun* 46: 207-214, 1981.

20. POSSANI L D, MARTIN B M, SVENDSEN I: The primary structure of noxiustoxin: A  $K^+$  channel blocker peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res Commun* 47: 285-289, 1982.
21. POSSANI L D: Structure of scorpion toxins. En: *Handbook of Natural Toxins* Ed. Tu A. T. Marcel Dekker Inc. Nueva York y Basel pp. 513-543, 1984.
22. SANDOVAL M E, AQUINO G, CHAVEZ J L: Sodium-dependent, calmodulin-dependent transmitter release from synaptosomes. *Neurosci Lett* 56: 271-277, 1985.
23. SITGES M, POSSANI L D, BAYON A: Noxiustoxin a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* induces transmitter release by blocking  $K^+$  permeability. *Neurosci*. 6: 1570-1574, 1986.
24. TAPIA R, SITGES M: Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res* 250: 291-299, 1982.
25. YEH J Z, OXFORD G S, WU C H, NARAHASHI T: Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophysical J* 16: 77-81, 1978.

### TRABAJO III. 2

Noxiustoxin, a short chain toxin from the mexican scorpion Centruroides noxius, induces transmitter release by blocking  $K^+$  permeability.



## Noxiustoxin, A Short-Chain Toxin from the Mexican Scorpion *Centruroides noxius*, Induces Transmitter Release by Blocking K<sup>+</sup> Permeability

Maria Sitges,\* † Lourival Domingos Possani,\* and Alejandro Bayón\* †

\*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. and †Instituto Mexicano de Psiquiatría, México, D.F.

Noxiustoxin (NTX), a 39 amino acid peptide purified from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, has been shown to block voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in the squid giant axon (Possani et al., 1982; Carbone et al., 1982). Although several other drugs known as K<sup>+</sup> channel blockers in the squid axon also act on isolated nerve terminals to produce an increase in transmitter release, these releasing effects have not been shown to be related to a decrease of K<sup>+</sup> permeability in synaptosomes (Vizi et al., 1977; Tapia and Sitges, 1982). In this work we show that NTX increases <sup>3</sup>H-GABA release from perfused mouse brain synaptosomes. This effect was not blocked by TTX, Ca<sup>2+</sup> channel blockers (verapamil or Co<sup>2+</sup>) or the absence of external Ca<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> prevents the releasing effect of this toxin. NTX does not seem to induce transmitter release by directly increasing Ca<sup>2+</sup> permeability; The K<sup>+</sup> ionophore valinomyin completely inhibits the release induced by NTX, as well as that evoked by the K<sup>+</sup> channel blocker 4-aminopyridine; in contrast, the release evoked by a Ca<sup>2+</sup> ionophore is not blocked by valinomyin. These findings strongly suggest that the releasing effect of NTX is mediated by a decrease in K<sup>+</sup> permeability. External Ca<sup>2+</sup> is needed only in order to couple this stimulus with the release process. Consistent with this hypothesis, we present evidence that NTX blocks the efflux of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> from synaptosomes. An extended comparison of the effect of 4-aminopyridine with that of NTX is also reported.

Neurotoxins from several sources, including those from scorpion venoms, have proved to be valuable tools for neurobiological studies (Catterall, 1982; Couraud and Jover, 1984; Narahashi, 1974). Recently, several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, have been purified and their amino acid sequences determined (Possani et al., 1981, 1982, 1985). These are basic polypeptides with a molecular weight of approximately 7000; some, like noxiustoxin (NTX), are short-chain polypeptides with a molecular weight of about 4000. NTX has been studied on the voltage-clamped squid axon, in which it specifically depressed potassium permeability (Carbone et al., 1982).

Drugs like 4-aminopyridine (4-AP) and tetraethylammonium, known K<sup>+</sup> channel blockers in the squid axon, also act on nerve terminals to increase transmitter release. However, their releasing effect has not been shown to be related to a decrease in K<sup>+</sup> permeability across the synaptotome (Armstrong

and Binstock, 1965; Lundh et al., 1976; Tapia and Sitges, 1982; Vizi et al., 1977; Yeh et al., 1976). Here, we show that NTX increases the release of labeled GABA from perfused mouse brain synaptosomes. We have characterized this action by studying how it is affected by the ion composition of the medium or by the presence of other drugs that modify specific ion permeabilities. Our results indicate that the releasing effect of NTX is due to a reduction of K<sup>+</sup> permeability in synaptosomes.

### Materials and Methods

#### Release experiments

In each experiment the brains, without the cerebellums, of 4 adult albino mice (C57 strain) were used to obtain a purified synaptosomal fraction following the method of Hajós (1975) with slight modifications. The method used to load synaptosomes with labeled GABA and to study its release has been described previously (Tapia and Sitges, 1982). Briefly, aliquots (0.8 mg protein) of the final synaptosomal pellet resuspended in dextrose (0.32 M) were incubated (10 min) in the uptake medium (127 mM NaCl, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.73 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.6 mM dextrose, aminooxyacetic acid 0.1 mM, <sup>3</sup>H-GABA 0.83  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration); the medium was bubbled with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 95:5, to give pH 7.4. <sup>3</sup>H-GABA-loaded synaptosomes (0.2–0.3 mg protein) were placed on Millipore filters (0.65  $\mu$ m) lying on perfusion chambers aligned in parallel. The uptake medium was washed out, and perfusate fractions (0.5 ml) were collected by peristaltic pumping at 1 min intervals. After 6 min a test medium was substituted for the control medium. The radioactivity released into each collected fraction and that remaining in the filters at the end of the experiment was counted in Tinosol (Fricke, 1975). The release of labeled GABA per minute was expressed as the percentage of the total radioactivity present in the synaptosomes at the beginning of the perfusion (i.e., the radioactivity released during 12 min of perfusion plus that remaining in the filter at the end of the experiment). Experiments to study the effect of NTX on the release (leakage) of the nontransmitter  $\alpha$ -amino isobutyric acid (AIB) were carried out by the same procedure as GABA, except that 2.5  $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H-AIB (22  $\mu$ M final) was substituted for the labeled GABA in the uptake medium.

#### Perfusion media

The composition of standard Ringer's medium (SRM) used to perfuse the synaptosomal preparation was (mM): NaCl, 127; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; KCl, 3.73; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; MgSO<sub>4</sub>, 1.18; NaHCO<sub>3</sub>, 20; dextrose, 11.2; and 0.1% BSA. Aminooxyacetic acid, 0.1 mM, was present to block GABA metabolism. The final pH was adjusted to 7.4 by gassing the medium with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5, vol/vol).

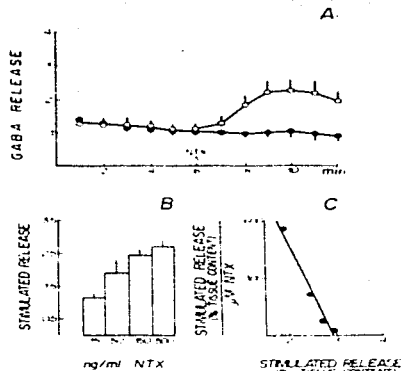
The GABA-releasing effect produced by NTX was first studied with regard to its dependence on the presence of external Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions. The effect of NTX was also tested in the presence of Na<sup>+</sup> or Ca<sup>2+</sup> channel blockers. Na<sup>+</sup>-free media were prepared by substituting NaCl for choline and NaHCO<sub>3</sub> for Tris buffer, keeping the pH at 7.4. Ca<sup>2+</sup>-free media were prepared by excluding this ion from standard Ringer's and adding 50  $\mu$ M EGTA. TTX, 0.5  $\mu$ M, was used to block Na<sup>+</sup> channels. In order to block Ca<sup>2+</sup> channels, low concentrations of verapamil (20  $\mu$ M) or Co<sup>2+</sup>

Received Apr. 29, 1985; revised Oct. 22, 1985; accepted Nov. 25, 1985.

This work was supported in part by grants from CONACYT México (L.D.P., A.B.) and Fundación R. J. Zavala (D.C.H. México).

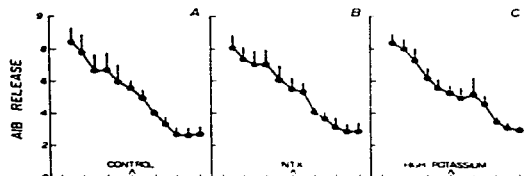
Correspondence should be addressed to Dr. Bayón, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México, D.F., México.

Copyright © 1986 Society for Neuroscience 0270-6474/86/061570-05\$02.00/0

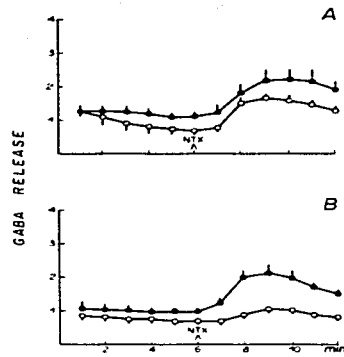


**Figure 1.** Effect of NTX on the resting release of GABA. *A*, Synaptosomes were loaded with labeled GABA and perfused as described in Materials and Methods. At 6 min (arrow), the standard, low-potassium, Ringer's medium (SRM) was rapidly substituted by the same medium (●) or by a SRM containing 0.1  $\mu$ M NTX (○). <sup>3</sup>H-GABA release, in this and in the following figures, is expressed as the percentage of the total radioactivity present in the synaptosomes at the beginning of the perfusion (see Materials and Methods). Results are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. *B*, NTX dose-response plot. Stimulated release is expressed as the difference between the percentage total radioactivity released in the presence of NTX and in the absence of NTX. Total radioactivity refers to the total label contained in synaptosomes at the beginning of the perfusion. *C*, Scatchard plot of the stimulated release evoked by increasing concentrations (3–100 nM) of NTX. For *B* and *C*, results are means of 4 independent experiments. SEM shown in *B*.

(replacing Ca<sup>2+</sup>) were present in the media. The role of K<sup>+</sup> permeability on the effect of NTX was studied using synaptosomes perfused with a SRM containing 1  $\mu$ g/ml of the K<sup>+</sup> ionophore valinomyin. In order to compare the effect of NTX in the presence of valinomyin with the effects of the K<sup>+</sup> channel blocker 4-AP (20  $\mu$ M) or the Ca<sup>2+</sup> ionophore A-23187 (5  $\mu$ M), these drugs were also tested in the presence of vali-



**Figure 2.** Passive leakage of <sup>3</sup>H-AIB in the presence of NTX or high concentrations of external potassium. <sup>3</sup>H-AIB-loaded synaptosomes were perfused with SRM. At 6 min (arrows), the SRM was substituted by the same medium (*A*), by SRM containing 0.2  $\mu$ M NTX (*B*), or by a 50 mM K<sup>+</sup> depolarizing medium (*C*). Results are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.



**Figure 3.** Release of GABA evoked by NTX in the presence of TTX and in the absence of external sodium. *A*, Synaptosomes were perfused with SRM (●) or with SRM containing 0.5  $\mu$ M TTX (○); NTX (0.1  $\mu$ M) was added to these perfusing media from min 6 (arrowhead) to min 12. *B*, Synaptosomes were perfused with SRM (●) or with a modified SRM in which Na<sup>+</sup> was replaced by choline (○). NTX was added as indicated in *A*. Results (expressed as a percentage of <sup>3</sup>H-GABA in synaptosomes before perfusion), are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

nomycin. Experiments were designed to study the combined effects of NTX and a depolarizing high-potassium (15 mM) perfusion medium, substituting K<sup>+</sup> for an equimolar concentration of Na<sup>+</sup>. The combined actions of NTX and veratrine (2.5  $\mu$ g/ml) and of NTX and 4-AP (1 mM) on GABA release were also studied.

#### Rubidium efflux

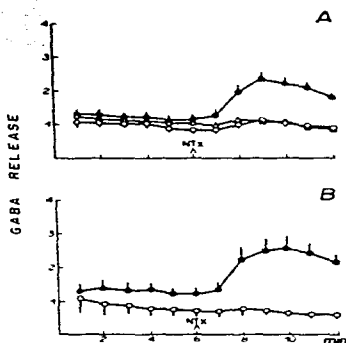
Experimental procedures were similar to those used to study the release of GABA. Synaptosomes were resuspended in SRM (2.5 mg synaptosomal protein/ml), preincubated 5 min, and incubated in the presence of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (1.5  $\times$  10<sup>6</sup> cpm/ml) for 20 min. Aliquots (250  $\mu$ l) from this suspension were placed in microporous filters and rapidly washed 3 times with 5 ml of cold SRM. This preparation was perfused until a constant <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux was attained, before testing the effect of NTX. Perfusate fractions were collected every 30 sec. <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux is expressed as the percentage of the total radioactivity present in synaptosomes at the beginning of the perfusion.

NTX (fraction II-11 from the venom of *C. noxius* Hoffmann) was purified according to Possani et al. (1982). Other toxins from this venom, II-9, 2, 2 and II-10, were purified according to Possani et al. (1981). 2,3-<sup>3</sup>H-GABA (specific activity 34.7 Ci/nmol) and  $\alpha$ -methyl-<sup>3</sup>H-AIB (specific activity, 2.2 Ci/nmol) were obtained from New England Nuclear. <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (specific activity, 0.24 Ci/nmol) was from Amersham. Veratrine hydrochloride, TTX, 4-AP, valinomyin, aminoacetic acid, and the calcium ionophore A23187 (cat. no. 7522) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Verapamil HCl was a gift of Knoll Laboratories (México, D.F.).

#### Results

##### Effect of NTX on resting release of GABA

Synaptosomes were perfused with SRM and then exposed to the same medium containing various concentrations of NTX. There was no observable delay in the onset of the response (Fig. 1*A*). A dose-dependent increase of labeled GABA release was observed. Maximal stimulation was obtained with 500 ng/ml (0.1  $\mu$ M) NTX (Fig. 1*B*); higher concentrations produced the



**Figure 4.** Inhibition of the releasing effect of NTX in the absence of external  $Ca^{2+}$  or in the presence of verapamil or  $Co^{2+}$ . Synaptosomes were perfused with SRM (●, control), SRM containing  $20 \mu M$  verapamil (○, in A), SRM  $Ca^{2+}$ -free containing  $50 \mu M$  EGTA ( $\Delta$ ), or with a SRM in which  $Ca^{2+}$  was replaced for  $Co^{2+}$  (○, in B). In all cases,  $0.1 \mu M$  NTX was added at 6 min (arrow). Each point is the mean of 3 experiments  $\pm$  SEM.

same response. An  $ED_{50}$  of  $2.9 \text{ nM}$  NTX was calculated from the Scatchard plot of the dose-response data (Fig. 1C).

Figure 2 shows that the passive leakage of a nontransmitter amino acid, AIB, from nerve terminals is not altered by the presence of NTX nor by chemical depolarization ( $50 \text{ mM } K^+$ ).

#### Effect of NTX in the presence of TTX and in the absence of external $Na^+$

Although the presence of TTX in the perfusing medium decreases the resting release of GABA, it does not affect the release evoked by NTX (Fig. 3A); nor can the absence of external  $Na^+$  completely block the NTX releasing effect (Fig. 3B).

#### Dependence of the effect of NTX on external $Ca^{2+}$ and $Ca^{2+}$ permeability

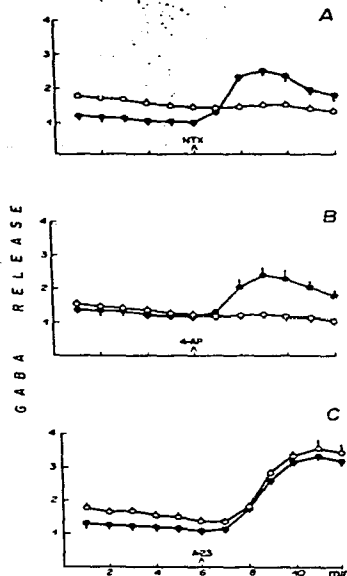
In the absence of calcium ( $50 \mu M$  EGTA) in the perfusion medium, NTX did not increase the release of labeled GABA. Also, the substitution of cobalt for  $Ca^{2+}$  or the addition of a low concentration of verapamil ( $20 \mu M$ ) to the medium blocked the release induced by this toxin (Fig. 4).

#### Suppression of the NTX effect by increasing $K^+$ permeability

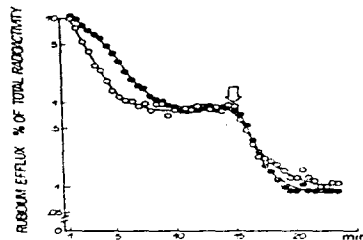
Although the presence of valinomyacin, a  $K^+$  ionophore, increases the resting GABA release, it completely blocks the release evoked by NTX (Fig. 5A). Also 4-AP, a putative  $K^+$  channel blocker, was ineffective in evoking release in the presence of this ionophore (Fig. 5B). In contrast, the release of GABA elicited by a calcium ionophore (A-23187) was not altered by valinomyacin (Fig. 5C).

#### Effect of NTX and 4-AP on $^{86}Rb^+$ efflux

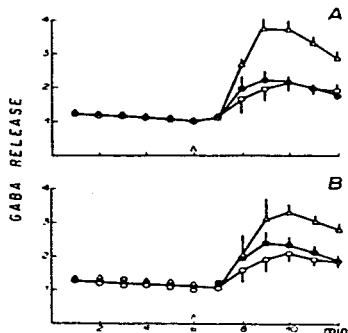
Experiments were carried out allowing the efflux of  $^{86}Rb^+$  from synaptosomes to reach a steady state (10–15 min perfusion). Under this condition, addition of NTX ( $0.2 \mu M$ ) rapidly decreased  $Rb^+$  efflux to less than 10% of the resting value. Also, 4-AP ( $200 \mu M$ ) drastically inhibited  $Rb^+$  permeability (Fig. 6).



**Figure 5.** Modification of the release of  $^3H$ -GABA evoked by NTX, 4-AP, and A-23187 in the presence of the  $K^+$  ionophore valinomyacin. Synaptosomes were perfused with SRM (●) or with SRM containing  $1 \mu g/ml$  valinomyacin (○). Beginning at 6 min these media also contained  $0.1 \mu M$  NTX (A),  $50 \mu M$  4-AP (B), and  $5 \mu M$  calcium ionophore A-23187 (C). Each point is the mean of 3–4 experiments.



**Figure 6.** Effect of NTX and 4-AP on  $^{86}Rb^+$  efflux from synaptosomes. Filter holding  $^{86}Rb^+$ -loaded synaptosomes were transferred to parallel perfusion chambers and superfused with SRM. At the time indicated by the arrow, SRM was substituted by a SRM containing  $0.2 \mu M$  NTX (●) or  $200 \mu M$  4-AP (○). Results are expressed as a percentage of the total radioactivity contained in the synaptosomes.



**Figure 7.** Combined effects of NTX or 4-AP and veratrine. Synaptosomes were perfused with the SRM, and at 6 min the SRM was substituted as follows: *A*, SRM containing 0.1  $\mu$ M NTX ( $\bullet$ ), SRM containing 2.5  $\mu$ g/ml veratrine (O), or SRM containing 0.1  $\mu$ M NTX plus 2.5  $\mu$ g/ml veratrine ( $\Delta$ ). *B*, SRM containing 20  $\mu$ M 4-AP ( $\bullet$ ), SRM containing 2.5  $\mu$ g/ml veratrine (O), or SRM containing 20  $\mu$ M 4-AP plus 2.5  $\mu$ g/ml veratrine ( $\Delta$ ). Results are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

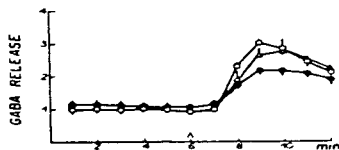
Independent experiments were carried out as a control of the spontaneous release of <sup>3</sup>Hb<sup>+</sup> for as long as 30 min. The plateau after 10 min remained, showing that the effects of NTX or 4-AP were not artifactual (data not shown).

#### Combined effects of NTX and veratrine

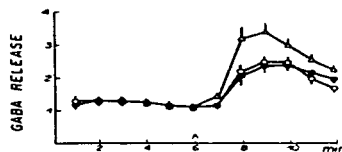
At doses of NTX and veratrine producing nearly half-maximal effects, their combined actions elicited a releasing response close to the sum of their separate contributions (Fig. 7*A*). Similarly, an additive effect was observed between 4-AP and veratrine (Fig. 7*B*). When these experiments were performed using doses of veratrine evoking the maximal response, NTX or 4-AP did not further increase the stimulated release of GABA (data not shown).

#### Combined effects of NTX and 4-AP

When NTX and 4-AP were tested at doses producing maximal effects, the release of GABA evoked by 4-AP was higher than that evoked by NTX. Their combined maximal effects were not additive: The release of GABA in the presence of both was



**Figure 8.** Combined effects of NTX and 4-AP on <sup>3</sup>H-GABA release. Synaptosomes were perfused with the SRM, and at 6 min it was substituted by a SRM containing 0.2  $\mu$ M NTX ( $\bullet$ ), 1 mM 4-AP (O), or NTX plus 4-AP at the indicated concentrations ( $\Delta$ ). Each point is the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.



**Figure 9.** Combined effects of NTX and high K<sup>+</sup> (15 mM) on <sup>3</sup>H-GABA release. Synaptosomes were perfused with the SRM, and at 6 min SRM was substituted by SRM containing 0.1  $\mu$ M NTX ( $\bullet$ ), SRM containing 15 mM K<sup>+</sup> (O), or 15 mM K<sup>+</sup>-Ringer's containing 0.1  $\mu$ M NTX ( $\Delta$ ). Each point is the mean  $\pm$  SEM of 3 experiments.

between that produced by NTX or 4-AP alone (Fig. 8). At lower 4-AP doses, the combined action of NTX and 4-AP always resulted in a releasing response, lower than that evoked by 4-AP alone (data not shown).

#### Effect of NTX in the presence of high concentrations of external potassium

The effect of NTX on chemically depolarized synaptosomes was studied by adding this toxin to a perfusing medium containing 15 mM K<sup>+</sup>. The releasing effect of NTX (0.1  $\mu$ M) was superimposed on that produced by the depolarizing medium (Fig. 9). Synaptosomes depolarized in 50 mM external K<sup>+</sup> released 6 times more <sup>3</sup>H-GABA than 15 mM K<sup>+</sup> or NTX alone, and the addition of NTX did not further increase this release (data not shown).

#### Discussion

We have shown that the exposure of synaptosomes to NTX purified from *C. noxius* venom results in an enhanced release of preloaded labeled neurotransmitter. In contrast, NTX did not increase the release of the nontransmitter amino acid <sup>3</sup>H-AIB. This difference shows that NTX acts on the physiological mechanisms involved in neurotransmitter release and does not have an indiscriminate effect promoting the leakage of synaptosomal contents. It is noteworthy that the effective doses of NTX in the axon ( $K_{50} = 300$  nM) (Carbone et al., 1982) and in synaptosomes ( $ED_{50} = 2.9$  nM) differ widely. In addition, the delay of several min to the onset of NTX action on the squid axon was not observed in the synaptosomal preparation. These differences could be explained by a difference in the access of NTX to its receptors in each of these preparations.

The releasing effects of many scorpion toxins, including some from *C. noxius* (Table 1), are mediated by an increase of Na<sup>+</sup> permeability that is blocked by TTX. The results given in Table 1 show that toxins II-9.2.2 and II-10, both long-chain toxins

**Table 1.** GABA release evoked by *C. noxius* toxins in the presence of TTX or veratrine

	Evoked release (%)		
	NTX (0.1 $\mu$ M)	II-9.2.2 (0.2 $\mu$ M)	II-10 (0.2 $\mu$ M)
Scorpion toxins			
ScTx alone	92 $\pm$ 11*	92 $\pm$ 14	111 $\pm$ 21
ScTx + TTX (0.5 $\mu$ M)	89 $\pm$ 22	0	9 $\pm$ 3
ScTx + veratrine (2.5 $\mu$ g/ml) (71 $\pm$ 11)	183 $\pm$ 15	297 $\pm$ 32	298 $\pm$ 31

Evoked release is expressed as a percentage of the resting control values.

\* Scorpion toxins (ScTx) were tested either alone or together with TTX or veratrine. Veratrine (2.5  $\mu$ g/ml) alone stimulated release by 71  $\pm$  11%, and TTX alone slightly decreased (30  $\pm$  6%) the resting value.

\* SEM calculated from 3–4 independent experiments.

from *C. noxius* venom, affect GABA release from synaptosomes in a similar way as those from *Tityus serrulatus* and *C. suffusus suffusus* (Couraud et al., 1982; Coutinho-Netto et al., 1980). In contrast, the effect of NTX was not blocked by TTX, indicating that NTX does not induce GABA release through the activation of TTX-sensitive  $\text{Na}^+$  channels. However, the releasing action of NTX appeared to depend on the sodium gradient and the sodium equilibrium potential, which are reversed in  $\text{Na}^+$ -free media, since the absence of external  $\text{Na}^+$  reduced the effectiveness of NTX.

The release of GABA induced by NTX was blocked in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  or by the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists. This observation indicated that a  $\text{Ca}^{2+}$  influx through verapamil or cobalt-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels might be directly induced by the toxin or otherwise required for the release process triggered by NTX.

The latter possibility—that NTX can initiate the release process by a mechanism different from direct activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels—is supported by the fact that this toxin decreases  $\text{K}^+$  permeability in the voltage-clamped squid axon (Carbone et al., 1982). In order to test if the release of GABA evoked by NTX was triggered by a reduction of  $\text{K}^+$  permeability, synaptosomes were treated with valinomycin to increase their permeability to  $\text{K}^+$  ions. In the presence of this  $\text{K}^+$  ionophore, the releasing action of NTX was completely blocked. Also, the release of GABA evoked by 4-AP, a drug that blocks the  $\text{K}^+$  conductance in the presynaptic terminal of the squid giant synapse (Llinás et al., 1976), was inhibited by valinomycin. In contrast, the release evoked by a calcium ionophore was not modified in the presence of valinomycin, making it unlikely that NTX could act by directly increasing  $\text{Ca}^{2+}$  permeability. Thus, the  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of the releasing effect of NTX appears to be linked to the role of this ion in the coupling of stimulus and secretion. All these results, along with direct evidence that NTX (and also 4-AP) blocks  $^{86}\text{Rb}$  efflux in the synaptosomal preparation, support the concept that this toxin induces release by decreasing  $\text{K}^+$  permeability.

The effect of many scorpion toxins that bind to  $\text{Na}^+$  channels is potentiated in the presence of steroidal alkaloids like veratridine, which are also activators of  $\text{Na}^+$  currents (Catterall, 1975; Krueger and Blaustein, 1980; Ulbricht, 1969). Neither the releasing effect of NTX nor that of 4-AP was potentiated by veratridine, further supporting the concept that the mechanism of action of NTX differs from that of the scorpion toxins acting on  $\text{Na}^+$  channels (Table 1). However, the observation that the effects of NTX and veratridine appear to be additive suggests that stimuli mediated through  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  channels are capable of acting simultaneously to increase transmitter release.

Although NTX and 4-AP behave as  $\text{K}^+$  channel blockers, several differences between them have been found. The maximal releasing response evoked in their presence differs, suggesting that they might preferentially interact with different populations of  $\text{K}^+$  channels (Bartschat and Blaustein, 1985; Rogawski, 1985) or that they could use different mechanisms to reduce  $\text{K}^+$  permeability. In this regard it is noteworthy that the combined effect of NTX and 4-AP that we observed can be interpreted either as negative cooperativity between them or as competition for the same sites.

In the squid axon, NTX blocks  $\text{K}^+$  permeability in a voltage-independent manner (Carbone et al., 1982), whereas the blockade produced by 4-AP is overcome at large depolarizations (Yeh et al., 1976). Consistent with this observation is the finding that while 4-AP is unable to increase the release of transmitters in a depolarized (20 mM  $\text{K}^+$ ) synaptosomal preparation (Tapia and Sitges, 1982), NTX-induced release is observed over and above that produced by 15 mM external  $\text{K}^+$ .

Finally, among  $\text{K}^+$  channel blockers, NTX is the most potent; in synaptosomes the  $\text{ED}_{50}$  of NTX-induced GABA release is

2.9 nM, while 4-AP is required in micromolar concentrations to elicit a measurable release (Tapia and Sitges, 1982). In the squid axon, NTX has a  $K_d$  of 300 nM to depress  $\text{K}^+$  permeability (Carbone et al., 1982), whereas 4-AP and TEA are active only in the millimolar range (Armstrong and Binstock, 1965; Yeh et al., 1976).

NTX actions have to be characterized in more detail using other techniques and preparations, but what we know about its mechanism of action on the nerve terminals makes it a promising tool for neurobiological research.

## References

- Armstrong, C. M., and L. Binstock (1965). Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol.* 48: 859-872.
- Bartschat, D. K., and M. P. Blaustein (1985). Calcium-activated potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J. Physiol. (Lond.)* 367: 441-457.
- Carbone, E., E. Wanke, G. Prestipino, L. D. Possani, and A. Maelicke (1982). Selective blockage of voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296: 90-91.
- Catterall, W. A. (1975). Cooperative activation of action potential  $\text{Na}^+$  ionophore by neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1782-1786.
- Catterall, W. A. (1982). The emerging molecular view of the sodium channel. *Trends Neurosci.* 5: 302-305.
- Couraud, F., and E. Jover (1984). Mechanism of action of scorpion toxins. In *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 2, A. T. Tu, ed., pp. 659-678. Dekker, New York.
- Couraud, F., E. Jover, J. M. Dubois, and H. Rochat (1982). Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicol.* 20: 9-16.
- Coutinho-Netto, J. A. S., Abdul-Ghani, P. J., Norris, A. J., Thomas, and H. F. Bradford (1980). The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro. *J. Neurochem.* 35: 558-565.
- Frickle, L. F. (1975). Tritiosol: A new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal. Biochem.* 63: 555-558.
- Hajos, F. (1975). An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93: 485-489.
- Krueger, B. K., and M. P. Blaustein (1980). Sodium channels in presynaptic nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* 76: 287-313.
- Llinás, R., K. Walton, and V. Bohr (1976). Synaptic transmission in the squid giant synapse after potassium conductance blockade with external 3- and 4-aminopyridine. *Biophys. J.* 16: 83-86.
- Lundh, H., S. G. Cull Candy, S. Leander, and S. Thesleff (1976). Restoration of transmitter release in botulinum poisoned skeletal muscle. *Brain Res.* 110: 194-198.
- Narashashi, T. (1974). Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.* 54: 813.
- Possani, L. D., M. A. R. Dent, B. M. Martín, A. Maelicke, and I. Svendsen (1981). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46: 207-214.
- Possani, L. D., B. M. Martín, and I. Svendsen (1982). The primary structure of noxiustoxin: A  $\text{K}^+$  channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47: 285-289.
- Possani, L. D., B. M. Martín, I. Svendsen, G. S. Rode, and B. W. Erickson (1985). Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. *J. Biochem.* 229: 739-750.
- Rogawski, M. A. (1985). The A-current: How ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends Neurosci.* 8: 214-219.
- Tapia, R., and M. Sitges (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250: 291-299.
- Ulbricht, W. (1969). The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.* 61: 18-71.
- Vizi, E. S., J. Van Dijk, and F. F. Foldes (1977). Effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release. *J. Neural Transm.* 41: 265-274.
- Yeh, Z., G. S. G. G. G. G. G. H. Wu, and T. Narashashi (1976). Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophys. J.* 16: 77-81.

ESTA FOLIO NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### TRABAJO III.3

Characterization of the actions of toxins  
II.9.2.2 and II-10 from the venom of the  
scorpion Centruroides noxius on transmit-  
ter release from mouse brain synaptosomes.

## Characterization of the Actions of Toxins II-9.2.2 and II-10 from the Venom of the Scorpion *Centruroides noxius* on Transmitter Release from Mouse Brain Synaptosomes

\*†María Sitges, ‡Lourival Domingos Possani, and \*†Alejandro Bayón

\*Instituto de Investigaciones Biomédicas and ‡Centro de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; and †Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Mexicano de Psiquiatría, México City, México

**Abstract:** Toxic peptides II-9.2.2 and II-10, purified from *Centruroides noxius* venom, bear highly homologous N-terminal amino acid sequences, and both toxins are lethal to mice. However, only toxin II-10 is active on the voltage-clamped squid axon, selectively decreasing the voltage-dependent  $\text{Na}^+$  current. Here, we have tested toxins II-9 and II-10 on synaptosomes from mouse brain: both toxins increased the release of  $\gamma$ -[ $^3\text{H}$ ]aminobutyric acid ([ $^3\text{H}$ ]GABA). Their effect was completely blocked by tetrodotoxin or by the absence of external  $\text{Na}^+$ . Also, both toxins increased  $\text{Na}^+$  permeability in isolated nerve terminals. Besides the observation that toxin II-9 is active on synaptosomes, the effect of toxin II-10 in this preparation is opposite to that observed in the squid axon. Thus, our results reflect functional differences between the populations of  $\text{Na}^+$  channels in mouse brain synaptosomes and in the squid axon. The release of GABA evoked by these toxins from synap-

somes required external  $\text{Ca}^{2+}$  and was blocked by  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (verapamil and  $\text{Co}^{2+}$ ). This latter observation is in sharp contrast to the releasing action of veratrine, which evoked release even in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ . Furthermore, the action of both *C. noxius* toxins was potentiated by veratrine, a result suggesting they have different mechanisms of action. Among drugs that release neurotransmitters by increasing  $\text{Na}^+$  permeability, it is noteworthy that scorpion toxins are the only ones yet reported to have a strict requirement for external  $\text{Ca}^{2+}$ . **Key Words:** Synaptosomes—Release— $\gamma$ -Aminobutyric acid—Scorpion toxins—Veratridine—Tetrodotoxin—Calcium channel blockers. Sitges M, et al. Characterization of the actions of toxins II-9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* on transmitter release from mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 48, 1745–1752 (1987).

Various toxins purified from the venoms of African and American scorpions have been shown to interact with sodium channels of excitable membranes (Cutler et al., 1976; Coutinho-Netto et al., 1980; Krueger and Blaustein, 1980; Barhanin et al., 1982; Couraud et al., 1982; Jaimovich et al., 1982; Meves et al., 1982; Wang and Strichartz, 1982). These toxins are basic polypeptides of ~7,000 daltons. The complete, or the N-terminal amino acid, sequences of several of them have been determined to reveal high degrees of homology (Rochat et al., 1979; Possani, 1984), which could account for their functional similarities.

Several toxins purified from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* (Possani et al., 1981) have been shown to belong to this peptide family, by both molecular weight and primary structure.

Toxins II-10 and II-9 from this venom have been tested on the voltage-clamped squid axon: The former decreased the peak  $\text{Na}^+$  current, whereas the latter was ineffective (Carbone et al., 1982, 1984). Because several toxins from other scorpion venoms have been shown to increase  $\text{Na}^+$  permeability (Krueger and Blaustein, 1980) and transmitter release in synaptosomes (Coutinho-Netto et al., 1980; Couraud et al., 1982), we decided to test the effect of toxin II-10 on  $\text{Na}^+$  permeability and transmitter release in synaptosomes using  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as a model transmitter. Toxin II-9 was also tested in this preparation. Our results show that, in contrast to the squid axon, both toxin II-9 and toxin II-10 increase GABA release and  $\text{Na}^+$  permeability in mouse brain synaptosomes. These results indicate that  $\text{Na}^+$  channel-inter-

Received June 18, 1986; accepted November 24, 1986.

Address correspondence and reprint requests to Dr. A. Bayón at Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70228, 04510 México D.F., México.

**Abbreviations used:** GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; ScTx, scorpion toxin; SRM, standard Ringer's medium; TTX, tetrodotoxin.

acting scorpion toxins (ScTxS) may have different actions on the populations of Na<sup>+</sup> channels of these two preparations.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Toxin II-9 (the same as toxin II-9:2.2) and toxin II-10 from the venom of *C. noxius* were purified according to the method of Possanti et al. (1981). [2,3-<sup>3</sup>H]GABA (spec. act., 34.7 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.) and <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> (spec. act., 13 mCi/mmol) was from Amersham (Arlington Heights, IL, U.S.A.). Veratrine hydrochloride, tetrodotoxin (TTX), valinomycin, monensin, and aminooxyacetic acid were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Verapamil-HCl was a gift of Knoll Laboratories (Mexico, D.F.).

### Release experiments

Purified synaptosomal fractions from the brains of adult albino mice (CD1 strain) were obtained by a slight modification of the method of Hajós (1975). Synaptosomes were resuspended in glucose (0.32 M) and loaded with labeled GABA. Release was studied using a superfusion procedure previously described by Tapia and Sitges (1982). In brief, 0.8 mg of synaptosomal protein was incubated (37°C) in 5 ml of uptake medium (127 mM NaCl, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.73 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.6 mM glucose, and 0.1 mM aminooxyacetic acid, pH 7.4, containing [<sup>3</sup>H]GABA, 0.83 μCi; final concentration, 0.5 μM). Loaded synaptosomes (0.2–0.3 mg of protein) were transferred to Millipore filters lying on multiperforated perfusion chambers aligned in parallel. The radioactivity not incorporated into the synaptosomes was washed out by perfusion with a standard Ringer's medium (SRM; see Perfusion media). After the washout period, perfusate fractions were collected at 1-min intervals (0.5 ml). At min 6, the medium to be tested was substituted for the initial control medium. The radioactivity released in each collected fraction and that remaining in the filters at the end of the perfusion experiment were counted in Tritosol (Fricke, 1975). The radioactivity released under these experimental conditions has been shown to be at least 90% GABA (Tapia and Sandoval, 1974; López-Colomé et al., 1978). The results of the release experiments are expressed as percentages of the total radioactivity released/min (total radioactivity was the radioactivity released during the 12 min of perfusion plus that remaining in the filter at the end of the experiment).

### Perfusion media

For testing of their effect on GABA release, toxin II-9 and toxin II-10 were added to a SRM. The composition of this perfusion medium was (in mM): 127 NaCl, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.73 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 20 NaHCO<sub>3</sub>, 11.2 dextrose, and plus 0.1% bovine serum albumin. Aminooxyacetic acid (0.1 mM) was present in the medium so that GABA metabolism was blocked (Tapia, 1976). The final pH was adjusted to 7.4 by gassing the solution with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5% vol/vol). Sodium-free media were prepared replacing NaCl with choline chloride and NaHCO<sub>3</sub> with Tris buffer, keeping the pH at 7.4. Ca<sup>2+</sup>-free media were prepared ex-

cluding this ion from the SRM and adding 50 μM EGTA. When indicated, veratrine, TTX, verapamil, or valinomycin was added to the SRM to give final concentrations of 2.5 μg/ml, 0.5 μM, 20 μM, and 1 μg/ml (stock solutions of veratrine and valinomycin were prepared in ethanol). When cobalt was present, it replaced Ca<sup>2+</sup>.

### Sodium efflux experiments

For studying the effect of toxins II-9 and II-10 on Na<sup>+</sup> permeability, <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> efflux experiments were done. The experimental setup and conditions were comparable to those used in release experiments: Synaptosomes (3 mg) were suspended in 1.5 ml of a choline-SRM in which 120 mM NaCl in the SRM was replaced with choline-Cl and 20 mM NaHCO<sub>3</sub> with 20 mM Tris, pH 7.4. This suspension was incubated in the presence of <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> (25 μCi/ml) for 1 h. Aliquots (0.4 mg) from this suspension were placed in microperforated filters and rapidly washed with a choline-SRM in which KCl and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were omitted. Filters holding <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>-loaded synaptosomes were perfused as in release experiments (0.5 ml/min) and during a 15-min period with SRM before the effect of toxin II-10, toxin II-9, veratrine, or monensin was tested. Perfusate fractions were collected every minute. <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> efflux is expressed as the percentage of the total radioactivity content in synaptosomes at the time of drug addition. Stimulated efflux was calculated as the sum of efflux values after drug addition (min 16 – min 21) divided by the sum of efflux values in control experiments over the same period in the absence of the drug.

### Statistics

Student's *t* test was used for statistical evaluations.

## RESULTS

### Effect of toxins II-9 and II-10 on GABA release: dose-response relationships

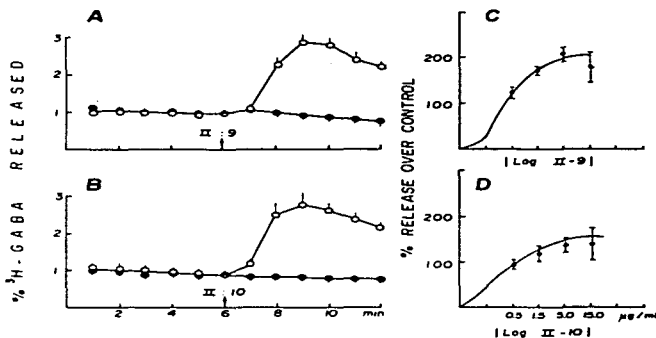
Figure 1A and B shows a marked enhancement of the baseline release of GABA in the presence of toxin II-9 or II-10 (1.5 μg/ml, ~0.2 μM). Increasing concentrations (from 0.15 to 15 μg/ml) of these toxins had progressively larger effects on GABA release. However, a reduced response was observed at the highest concentration (15 μg/ml) of toxin II-9. Dose-response curves of these data (Fig. 1C and D) show that at maximal effect, toxins II-9 and II-10 stimulated GABA release over control values by ~220 and 141%, respectively. The maximal amount of GABA released in response to *C. noxius* toxins is ~30% of that induced by veratridine (Levi et al., 1978; Tapia et al., 1985) and ~50% of that induced by 50 mM K<sup>+</sup> (Arias et al., 1984). The calculated ED<sub>50</sub> values were 0.40 μg/ml for toxin II-9 and 0.32 μg/ml for toxin II-10 (~60 nM).

### Dependence of effect of toxins II-9 and II-10 on external Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> permeability

The releasing effect of toxins II-9 and II-10 was initially characterized with regard to its dependence on external Na<sup>+</sup>. When synaptosomes were perfused with



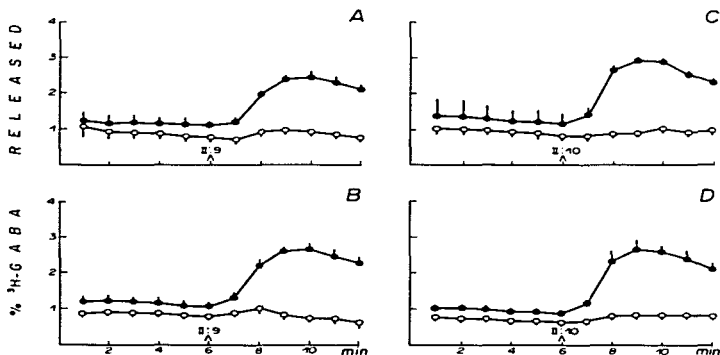
**FIG. 1.** Effect of toxins II-9 and II-10 on resting release of GABA. Synaptosomes were loaded with labeled GABA (300 nCi/mg of protein) and perfused as described in Materials and Methods. At min 6 (arrow), the SRM was rapidly replaced with the same medium (●) or by a SRM containing 1.5  $\mu$ g/ml of toxin II-9 ( $\sim 0.2 \mu$ M; ○ in A) or 1.5  $\mu$ g/ml of toxin II-10 ( $\sim 0.2 \mu$ M; ○ in B). The percentage of [ $^3$ H]GABA released is calculated as the percentage released/min of the total radioactivity contained in synaptosomes at the beginning of the perfusion (after removal by washing of the radioactivity not incorporated into the preparation). Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from four or five determinations. Log dose-response plots of the releasing response evoked by increasing concentrations (0.5–15  $\mu$ g/ml) of toxin II-9 (C) or of toxin II-10 (D) are also shown. Percentage release over control refers to the radioactivity released during the same period in the absence of toxin. Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from four and five independent experiments, respectively, for toxins II-10 and II-9.



a sodium-free medium, both toxins were ineffective at evoking GABA release (Fig. 2A and C). This finding led us to test if the effects of these toxins were dependent on the availability of  $\text{Na}^+$  channels. In fact, the presence of the voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channel blocker TTX (0.5  $\mu$ M) in the SRM completely inhibited the releasing action of both toxins (Fig. 2B and D).

#### Effect of toxin II-9, toxin II-10, veratrine, and monensin on $\text{Na}^+$ permeability

The efflux of  $^{22}\text{Na}^+$  from preloaded synaptosomes followed exponential kinetics (Fig. 3B). Addition of the  $\text{Na}^+$  ionophore monensin increased  $^{22}\text{Na}^+$  efflux 150% over control values (Fig. 3A). Veratrine stimulated efflux by 60% (Fig. 3C), whereas toxins II-9 and II-10 only increased it by 45 and 16%, respectively



**FIG. 2.** Modification of the release of GABA evoked by toxins II-9 and II-10 in the presence of TTX or in the absence of external sodium. Synaptosomes were perfused with SRM (●) or with SRM containing 0.5  $\mu$ M TTX (○ in B and D) or with a modified SRM where  $\text{Na}^+$  was replaced by choline (○ in A and C). Basal release was slightly decreased in the presence of TTX or in the absence of  $\text{Na}^+$ . Toxin II-9 or II-10 (1.5  $\mu$ g/ml) was present in these perfusing media from min 6 (arrow) to min 12. Results are mean  $\pm$  SEM (bars) values from three independent experiments. The percentage of [ $^3$ H]GABA released was calculated as for Fig. 1.

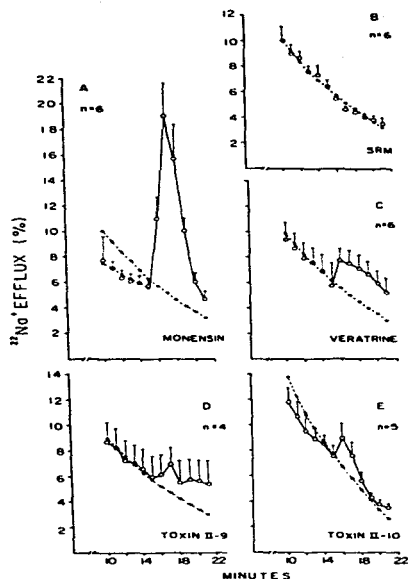


FIG. 3. Effect of toxin II-9, toxin II-10, veratrine, and monensin on  $^{22}\text{Na}^+$  efflux. The synaptosomal suspension (1.5 mg/ml) was loaded with  $^{22}\text{Na}^+$  (25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) for 1 h, rapidly washed with choline-SRM, and then perfused with SRM (see Materials and Methods). From min 16, the SRM contained 10  $\mu\text{M}$  monensin (A), 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of veratrine (C), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of toxin II-9 (D), or 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of toxin II-10 (E). Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from four to six independent experiments. Dotted lines are the curves of the mean values of control experiments done in parallel chambers (as in B).  $^{22}\text{Na}^+$  efflux is expressed as the percentage of the total radioactivity present in synaptosomes at 16 min. The differences in total efflux in the presence of the drugs compared with the total efflux in its absence was significant:  $p < 0.005$  (A),  $p < 0.01$  (C),  $p < 0.05$  (D), and  $p < 0.1$  (E) by Student's *t* test.

(Fig. 3D and E).  $\text{Na}^+$  efflux in response to toxin II-9 has a much slower onset than that in response to veratrine and a longer-lasting effect than that in response to toxin II-10.

#### Dependence of effect of toxins II-9 and II-10 on $\text{K}^+$ permeability

The  $\text{K}^+$  ionophore valinomycin completely inhibits the releasing action of  $\text{K}^+$  channel blockers (Sitges et

al., 1986). The release of GABA in response to toxins II-9 and II-10 was only partially inhibited when synaptosomes were perfused in the presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of valinomycin (Fig. 4).

#### Dependence of effect of toxins II-9 and II-10 on $\text{Ca}^{2+}$ permeability and external $\text{Ca}^{2+}$

For testing if the effect of these toxins depends on the availability of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, perfusion media containing either an organic (verapamil) or an inorganic (cobalt)  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker were used. The presence of toxin II-9 or II-10 in those perfusion media was ineffective in inducing the release of GABA (Fig. 5).

The releasing effect of these toxins was also dependent on external  $\text{Ca}^{2+}$ . Figure 6B and C shows that in synaptosomes perfused with a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium (50  $\mu\text{M}$  EGTA), the effect of toxins II-9 and II-10 was markedly reduced. This is in sharp contrast to the observation that  $\text{Na}^+$  channel activators, such as veratridine (Levi et al., 1978) or veratrine alkaloid mixture (Norris et al., 1983; Sandoval et al., 1985), are able to induce GABA release in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ , even at a dose less than the  $\text{ED}_{50}$ , which induces a releasing response similar to that evoked by *C. noxius* toxins (Fig. 6).

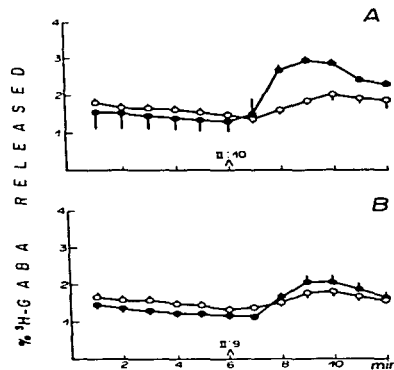
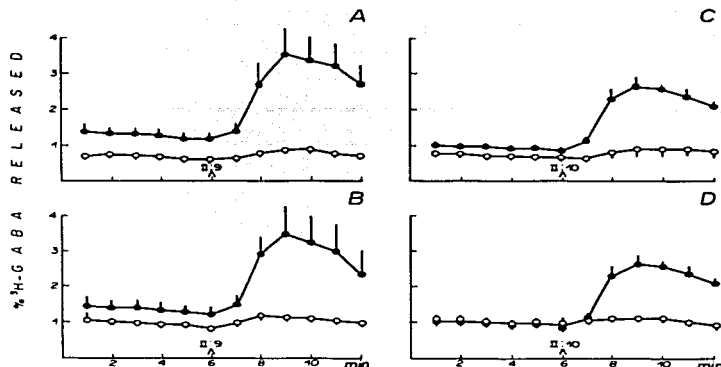


FIG. 4. Modification of release of GABA evoked by toxins II-9 and II-10 in the presence of the  $\text{K}^+$  ionophore valinomycin. Synaptosomes were perfused with SRM (●) or with SRM containing 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of valinomycin (○). From min 6, these media also contained 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of toxin II-10 (A) or toxin II-9 (B). Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from three to six experiments, respectively, for A and B. The effects of the presence of valinomycin in A and B were significant:  $p < 0.02$  and  $p < 0.05$ , respectively. The percentage of [ $^3\text{H}$ ]GABA released was calculated as for Fig. 1.

FIG. 5. Inhibition of the releasing effect of toxins II-9 and II-10 in the presence of verapamil or cobalt. Synaptosomes were perfused with SRM (●), SRM containing 20  $\mu$ M verapamil (○ in A and C), or with SRM in which  $Ca^{2+}$  was replaced with  $Co^{2+}$  (○ in B and D). Basal release was often decreased in the presence of  $Ca^{2+}$  channel blockers. In all cases, 1.5  $\mu$ g/ml of toxin II-9 or toxin II-10, as indicated, was added from min 6 (arrow). Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from three experiments. The percentage of [ $^3H$ ]GABA released was calculated as in Fig. 1.



#### Combined effects of veratrine, toxin II-9, and toxin II-10

The increase of GABA release evoked by 1.5  $\mu$ g/ml of toxin II-9 (0.2  $\mu$ M) alone was  $130 \pm 18\%$ , and that induced by veratrine in the low concentration (2.5  $\mu$ g/ml, or 4  $\mu$ M; less than the  $ED_{50}$ ) was  $72 \pm 27\%$ . When both drugs were present in the medium, potentiation ( $297 \pm 32\%$ ) of their effects was observed (Fig. 7A). A synergistic effect ( $298 \pm 31\%$ ) was also observed with veratrine (2.5  $\mu$ g/ml; less than the  $ED_{50}$ ) and 1.5  $\mu$ g/ml of toxin II-10 (Fig. 7B). The interaction between toxin II-9 and toxin II-10 was studied by perfusing the synaptosomal preparation with a SRM containing 0.3  $\mu$ g/ml of toxin II-10 (less than the  $ED_{50}$ ) and 0.2  $\mu$ g/ml of toxin II-9 (less than the  $ED_{50}$ ). When both toxins were added simultaneously (Fig. 7C), neither addition nor potentiation was observed.

#### DISCUSSION

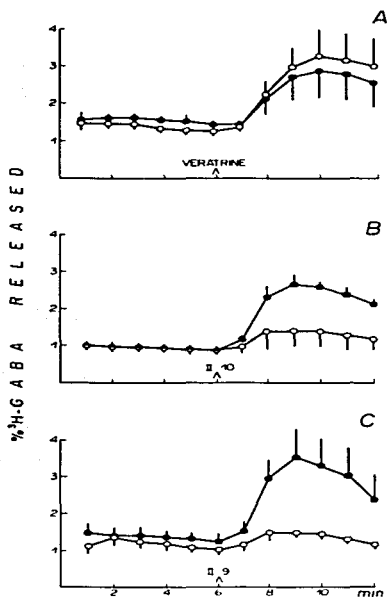
In this work, we show that the two homologous toxins II-9 and II-10 from *C. noxius* stimulate the release of GABA from synaptosomes in a dose-dependent manner. Present evidence indicates that the releasing effect of toxins II-9 and II-10 is mediated through an increase in  $Na^+$  permeability: Their action is blocked in the absence of external  $Na^+$  or in the presence of TTX, and both toxins increase  $^{22}Na^+$  efflux in synaptosomes.

The possibility that these toxins could evoke release by blocking  $K^+$  permeability is excluded on the basis that the release induced by  $K^+$  channel blockers like 4-aminopyridine (Yeh et al., 1976) or Noxiustoxin (also from *C. noxius* venom; Carbone et al., 1982) is not

affected by TTX and is completely inhibited in the presence of the  $K^+$  ionophore valinomycin (Siges et al., 1986). In contrast, the effect of toxins II-9 and II-10 was TTX sensitive and only partially depressed by valinomycin (Fig. 4).

The possibility that toxin II-9 or toxin II-10 could evoke release by directly increasing  $Ca^{2+}$  permeability is also excluded, because the release induced by  $Ca^{2+}$  ionophores, such as A-23187, is not modified in the presence of TTX or valinomycin (Siges et al., 1986). It is likely that the dependence on external  $Ca^{2+}$  and the blockade by verapamil or  $Co^{2+}$  of the release evoked by toxin II-9 or II-10 (Figs. 5 and 6B and C) is due to the participation of  $Ca^{2+}$  in the stimulus-secretion coupling. This has been previously suggested for the releasing effect of Tityustoxin (Henriquez and Gómez, 1981; Macedo and Gómez, 1982), another  $Na^+$  channel interacting ScTx.

It is noteworthy that in contrast to toxins II-9 and II-10,  $Na^+$  channel-interacting alkaloids, such as veratridine or veratrine alkaloid mixture, can induce transmitter release even in the absence of external  $Ca^{2+}$  (Levi et al., 1978; Norris et al., 1983; Sandoval et al., 1985; present study, Fig. 6A). This difference might be due to the higher efficacy of veratridine in increasing both transmitter release and  $Na^+$  permeability in synaptosomes, compared with these and other toxins (Krueger and Blaustein, 1980). It has been proposed that a large  $Na^+$  influx increases the cytosolic  $Ca^{2+}$  level from intraterminal organelles (Baker and Crawford, 1975; Lowe et al., 1976) and, thus, evokes transmitter release. The small increase of  $^{22}Na^+$  permeability in response to *C. noxius* toxins compared with that produced by veratrine would be

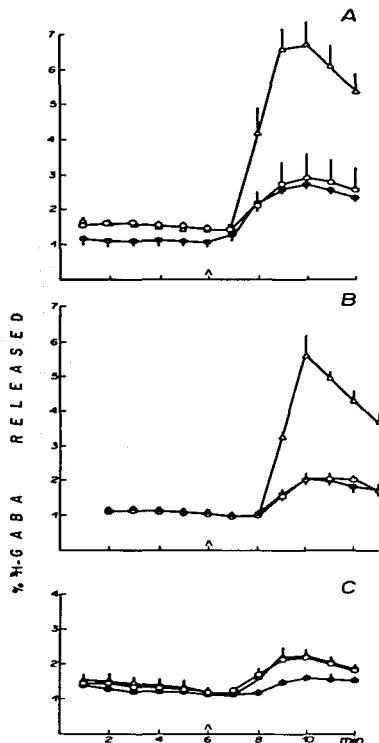


**FIG. 6.** External calcium dependence of the releasing effect of toxins II-9 and II-10 and external calcium independence of the veratrine-induced release. Synaptosomes were perfused with SRM (●) control or with  $\text{Ca}^{2+}$ -free SRM containing  $50 \mu\text{M}$  EGTA (○). Concentrations of  $2.5 \mu\text{g/ml}$  veratrine (A),  $1.5 \mu\text{g/ml}$  of toxin II-10 (B), or  $1.5 \mu\text{g/ml}$  of toxin II-9 (C) were present in these perfusing media from min 6 (arrow) to min 12. Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from three experiments. The effect of the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  was significant:  $p < 0.1$  (A),  $p < 0.02$  (B), and  $p < 0.05$  (C).

consistent with this hypothesis. Furthermore, transmitter release from synaptosomes in response to mionsin, which drastically affects  $\text{Na}^+$  permeability (Fig. 3A), is also independent of the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (Sandoval et al., 1985).

A potentiation of the effects of steroidal alkaloids and other ScTxS on  $\text{Na}^+$  uptake was previously reported (Catterall, 1980, 1982; Norman et al., 1983). On this basis, it was suggested that these toxic alkaloids and ScTxS have different sites of action on  $\text{Na}^+$  channels (Catterall, 1975). The effect of toxins II-9

and II-10 on transmitter release is potentiated by veratrine. In contrast, the simultaneous presence of toxins II-9 and II-10 in the perfusing medium elicits a re-



**FIG. 7.** Combined effects of veratrine, toxin II-9, and toxin II-10. From min 6, synaptosomes were perfused as follows. A: With SRM containing  $1.5 \mu\text{g/ml}$  of toxin II-9 (●),  $2.5 \mu\text{g/ml}$  (less than the  $\text{ED}_{50}$ ) of veratrine (○), or both (△). B: With SRM containing  $1 \mu\text{g/ml}$  of toxin II-10 (●),  $2.5 \mu\text{g/ml}$  of veratrine (○), or both (△). C: With SRM containing  $0.2 \mu\text{g/ml}$  of toxin II-9 (●),  $0.3 \mu\text{g/ml}$  of toxin II-10 (○), or both toxins at the previous concentrations (△). Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values from three independent experiments.

sponse barely higher than that produced by toxin II-10 alone (Fig. 7C), a result suggesting that these two toxins may share the same site of action.

ScTxS have been classified in two groups:  $\alpha$  and  $\beta$  (Couraud et al., 1982). The binding of  $\alpha$  toxins, but not of  $\beta$  toxins, to  $\text{Na}^+$  channels is voltage dependent; only  $\alpha$  toxins potentiate the effect of steroidal alkaloids on  $\text{Na}^+$  uptake. There is a high degree of homology between the N-terminal amino acid sequences of toxin II-9 from *C. noxius* and toxin II from *Centruroides suffusus suffusus* (Possani, 1984), the latter being a typical  $\beta$  toxin (Couraud et al., 1982). In addition, the binding of toxin II-10 of *C. noxius* to the squid giant axon is voltage independent (Carbone et al., 1982), which is also a characteristic of  $\beta$  toxins. However, the releasing effects of toxins II-9 and II-10 are potentiated by veratrine. If this effect is related to a potentiation of  $\text{Na}^+$  uptake, their behavior would correspond, in this regard, to that of an  $\alpha$  toxin. Thus, the present classification may not encompass all classes of ScTxS.

The blockade of the peak  $\text{Na}^+$  currents by toxin II-10 in the squid axon (Carbone et al., 1982) is in sharp contrast with the increase in  $\text{Na}^+$  permeability induced by this toxin in synaptosomes. Indeed, in the former preparation, the effect of TTX was the same as that of toxin II-10, whereas in the synaptosomal preparation, TTX blocked the toxin-induced release. Carbone et al. (1984) have found that at high concentrations (>2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), toxin II-10 also increases and prolongs the  $\text{Na}^+$ -maintained conductance. However, with synaptosomes, even the lower dose of toxin II-10 still stimulates GABA release.

For the squid axon, two populations of  $\text{Na}^+$  channels have been postulated: one related to the fast, the other to the maintained  $\text{Na}^+$  conductance (Matteson and Armstrong, 1982; Carbone et al., 1984). Our results on synaptosomes could indicate that synaptosomal membranes are enriched with  $\text{Na}^+$  channels of the maintained type. Also, the lack of effect of toxin II-9 on the squid axon and its action on synaptosomes suggest differences in the populations of  $\text{Na}^+$  channels contained in the membranes of molluscan axons and mammalian nerve terminals.

**Acknowledgment:** This work was supported in part by grants PCCBBNA-001370, and PCSABNA-22640 from CONACyT, México; Fundación R. J. Zevada (B.C.H.), México; and grant 3120 from Instituto Mexicano de Psiquiatría, México.

## REFERENCES

- Arias C., Stites M., and Tapia R. (1984) Stimulation of  $[^3\text{H}]$ -aminobutyric acid release by calcium chelators in synaptosomes. *J. Neurochem.* 42, 1507-1514.
- Baker P. A., and Crawford A. C. (1975) A note on the mechanisms by which inhibitors of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)* 246, 209-266.
- Barhanin J., Giglio J. R., Leopold P., Schmid A., Sampaio S. V., and Lazdunski M. (1982) *Titus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *J. Biol. Chem.* 257, 12553-12558.
- Carbone E., Wanke G., Prespitino G., Possani L. D., and Maelicke A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296, 90-91.
- Carbone E., Prespitino G., Franciolini F., Dent M. A. R., and Possani L. D. (1984) Selective modification of the squid axon  $\text{Na}^+$  currents by *Centruroides noxius* toxin II-10. *J. Physiol. (Paris)* 79, 179-184.
- Catterall W. A. (1975) Cooperative activation of action potential  $\text{Na}^+$  ionophore by neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1782-1786.
- Catterall W. A. (1976) Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore. *J. Biol. Chem.* 251, 5528-5536.
- Catterall W. A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15-43.
- Catterall W. A. (1982) The emerging molecular view of the sodium channel. *Trends Neurosci.* 5, 303-305.
- Couraud F., Jover E., Dubois J. M., and Rochat H. (1982) Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicol.* 20, 9-16.
- Coutinho-Netto J., Abdul-Ghani A. S., Norris P. J., Thomas A. J., and Bradford H. F. (1980) The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* 35, 558-565.
- Fricke U. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal. Biochem.* 53, 555-558.
- Hajós F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.
- Hernández M. M. V. (1982) The effect of scorpion venom Titus toxin on the uptake of calcium in synaptosomes. *Brain Res.* 7, 255-259.
- Jaimovich E., Ildelfonso M., Barhanin J., Rougier O., and Lazdunski M. (1982) Centruroides toxin, a selective blocker of surface  $\text{Na}^+$  channels in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3890-3900.
- Krueger B. K., and Blaustein M. P. (1980) Sodium channels in presynaptic nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* 76, 287-313.
- Levi G., Banay-Schartz M., and Raiteri M. (1978) Uptake, exchange and release of GABA in isolated nerve endings, in *Amino Acids as Chemical Transmitters* (Fonnum F., ed), pp. 327-350. Plenum Press, New York.
- López-Colomé A. M., Tapia R., Salceda R., and Pasantes-Morales H. (1978)  $\text{K}^+$ -stimulated release of labeled  $\gamma$ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. *Neuroscience* 3, 1069-1074.
- Lowe D. A., Richardson B. P., Taylor P., and Donatsch P. (1976) Increasing intracellular sodium triggers calcium release from bound pools. *Nature* 260, 337-338.
- Macedo T. M., and Gómez M. V. (1982) Effects of Titus toxin (TTx) from scorpion venom on the release and synthesis of acetylcholine in brain slices. *Toxicol.* 20, 601-606.
- Matteson D. R., and Armstrong C. M. (1982) Evidence for a population of sleepy sodium channels in squid axon at low temperature. *J. Gen. Physiol.* 79, 739-758.
- Meves H., Rubly N., and Watt D. D. (1982) Effects of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* on the  $\text{Na}^+$  currents of the node of Ranvier. *Pflügers Arch.* 393, 56-62.
- Norman R. I., Schmid A., Lombet A., Barhanin J., and Lazdunski M. (1983) Purification of binding protein for *Titus*  $\gamma$  toxin identified with the gating component of the voltage-sensitive  $\text{Na}^+$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4164-4168.
- Norris P. J., Dhalwal D. K., Druce D. P., and Bradford H. F. (1983) The suppression of stimulus-evoked release of amino acid neu-

- rotransmitters from synaptosomes by verapamil. *J. Neurochem.* **40**, 514-521.
- Possani L. D. (1984) Structure of scorpion toxins, in *Handbook of Natural Toxins* (Tu A. T., ed), pp. 513-543. Marcel Dekker, New York.
- Possani L. D., Dent M. A., Martin B. M., Maelicke A., and Svendsen I. (1981) The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* **46**, 207-214.
- Rochat H., Bernard P., and Couraud F. (1979) Scorpion toxins: chemistry and mode of action, in *Advances in Cytopharmacology* (Ceccarelli B. and Clementi F., eds), pp. 325-334. Raven Press, New York.
- Sandoval M. E., Aquino G., and Chávez J. L. (1985) Sodium-dependent, calmodulin-dependent transmitter release from synaptosomes. *Neurosci. Lett.* **56**, 271-277.
- Sitges M., Possani L. D., and Bayón A. (1986) Noxiustoxin a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* induces transmitter release by blocking  $K^+$  permeability. *J. Neurosci.* **6**, 1570-1574.
- Tapia R. (1976) Evidence for a synthesis-dependent release of GABA, in *Transport Phenomena in the Nervous System* (Levi G., Battistin L., and Lajtha A., eds.), pp. 385-394. Plenum, New York.
- Tapia R. and Sandoval M. E. (1974) Possible participation of gamma-aminobutyric acid in the regulation of protein synthesis in brain, in vivo. *Brain Res.* **69**, 255-263.
- Tapia R. and Sitges M. (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* **250**, 291-299.
- Tapia R., Sitges M., and Morales E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* **361**, 373-382.
- Wang G. K. and Strichartz G. (1982) Simultaneous modifications of sodium channel gating by two scorpion toxins. *Biophys. J.* **40**, 175-179.
- Yeh J. Z., Oxford G. S., Wu C. H., and Narahashi T. (1976) Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophys. J.* **16**, 77-81.

### Organización de la Discusión General.

En vista de que en cada uno de los trabajos presentados se incluye la discusión de los resultados del trabajo respectivo, en esta discusión general de la tesis, sólo comentaré algunos puntos que, por las características de las publicaciones formales, no fueron discutidos en ellas.

Después de presentar por separado una parte en donde se discute el papel del  $Ca^{2+}$  en la liberación de neurotransmisores y otra en donde se discuten los alcances y limitaciones de la estrategia empleada en los trabajos de esta tesis, finalizo con un apéndice titulado "Eventos moleculares que participan en el proceso de liberación de neurotransmisores", en el que ejemplifico, con algunos hallazgos ilustrativos, otros eventos moleculares que empiezan a ser considerados en el proceso de liberación de transmisores. Este apéndice está escrito con objeto de ampliar el panorama conceptual de los mecanismos de liberación de transmisores, para no limitarme a los relacionados con los canales presinápticos, que aunque explican el trabajo experimental de esta tesis, sólo dan cuenta, de forma un tanto simplificada, del mecanismo responsable del primer evento (la despolarización), que tras una serie de mecanismos, a nuestros días oscuros, culmina en la liberación del neurotransmisor.

## IV

## DISCUSION GENERAL Y COMENTARIOS

En los estudios que presenté en la parte de "Desarrollo Experimental", se caracterizaron las acciones de algunas de las toxinas purificadas del veneno soluble del alacrán mexicano Centruroides noxius sobre la liberación de GABA, como ejemplo de transmisor, en sinaptosomas; pero antes de iniciar esos estudios, hice experimentos preliminares con la fracción tóxica o fracción II del veneno de C. noxius que considero pertinente discutir a continuación: La fracción tóxica del veneno de Centruroides noxius corresponde aproximadamente al 63% del veneno soluble total, considerando a éste constituido por las fracciones I, II y III (ver figura 2 de esta tesis). Esta fracción tóxica (II), está constituida por 14 péptidos (ver figura 3) entre ellos, las toxinas homólogas de cadena larga II-9 y II-10 y la toxina de cadena corta II-11 o noxiustoxina, todas inductoras individualmente de la liberación de GABA en sinaptosomas ("Desarrollo Experimental"). Cuando apliqué la fracción II a una dosis de 19.5 µg/ml, ésta indujo un aumento en la liberación de GABA de sinaptosomas, semejante a la máxima respuesta que se obtiene con cada una de las toxinas puras II-9, II-10 ó NTX por separado (figura 17). Resulta curioso que, independientemente de cual sea su mecanismo de acción, tanto las toxinas II-9, II-10 ó II-11 como la fracción II completa (que además



de estos 3 péptidos contiene a los otros 11 péptidos), todas aumentan la liberación del transmisor con una eficacia similar. El hecho de que la fracción II no sea ni más ni menos eficaz para estimular la liberación de GABA que cada una de las 3 toxinas puras estudiadas, no se debe a sus diferentes proporciones en la fracción II ni a las diferencias de potencia entre ellas. Aunque tomemos en cuenta que la toxina II-10 corresponde al 7.3% de la fracción II, la toxina II-9 al 18.4% y la NTX al 3.1% (Possani y col. 1981c) y aunque consideremos que la NTX es más potente - para inducir la liberación de GABA ( $ED_{50}$  3nM, 0.01  $\mu$ g/ml) que las toxinas II-9 ó II-10 cuyas dosis efectivas medias para inducir la liberación - fueron de 60 nM (0.4  $\mu$ g/ml), a la dosis de fracción II probada (19.5  $\mu$ g/ml) cualquiera de las 3 toxinas se encontraba en una concentración tal - que produciría respectivamente su máxima respuesta sobre la liberación de GABA.

Otro hecho que merece consideración es el siguiente: Entre las toxinas contenidas en la fracción II algunas resultaron letales, otras tóxicas y otras no tuvieron efecto cuando se inyectaron a ratones a una misma dosis (Possani y col. 1981c). Las toxinas II-9, II-10 y NTX cuyos efectos sobre la liberación de GABA en sinaptosomas de ratón caracterizamos, pertenecen a las toxinas cuya inyección resultó letal. Entre las toxinas que resultaron tóxicas a esa dosis se encuentra la II-14. La secuencia de aminoácidos de la toxina II-14 pre

EFFECTO DE LA TOXINA II-14 CONTENIDA EN EL  
VENENO DE CENTRUROIDES NOXIUS SOBRE LA LIBERACION  
DE GABA DE SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATON.

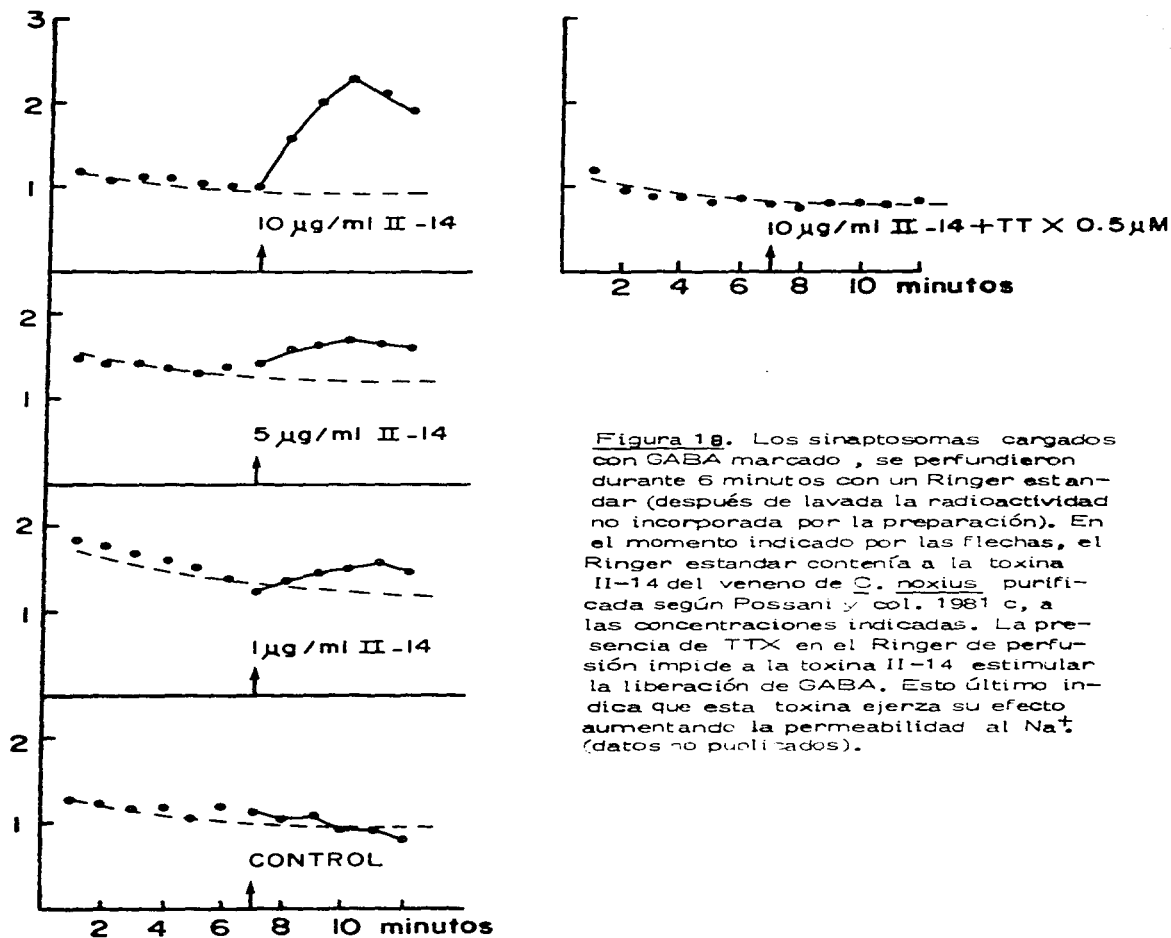


Figura 18. Los sinaptosomas cargados con GABA marcado, se perfundieron durante 6 minutos con un Ringer estándar (después de lavada la radioactividad no incorporada por la preparación). En el momento indicado por las flechas, el Ringer estándar contenía a la toxina II-14 del veneno de C. noxius purificada según Possani y col. 1981 c, a las concentraciones indicadas. La presencia de TTX en el Ringer de perfusión impide a la toxina II-14 estimular la liberación de GABA. Esto último indica que esta toxina ejerce su efecto aumentando la permeabilidad al  $Na^+$  (datos no publicados).

presenta cierto grado de homología con las toxinas largas II-9 y II-10 (figura 4) cuando menos en su porción amino terminal y también es una toxina de cadena larga. Cuando esta toxina se probó sobre la liberación de GABA en sinaptosomas también la estimuló (figura 18) y su efecto fué bloqueado en presencia de tetrodotoxina lo que sugiere que posiblemente también esta toxina, como las toxinas de cadena larga II-9 y II-10, actúe mediante un aumento de la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  por los canales sensibles a voltaje; pero lo que resulta interesante es advertir que la concentración necesaria de toxina II-14 para inducir una respuesta de liberación de GABA es mucho mayor que la que se necesita para inducir liberación del transmisor con las 3 toxinas letales (II-9, II-10 y II-11). Aunque sería arriesgado proponer que estos mecanismos son los responsables del efecto del veneno de los escorpiones en el animal completo, este tipo de correlaciones resultan sugerentes.

La respuesta máxima de liberación de GABA provocada por cada una de las toxinas puras (II-9, II-10, II-11 y II-14) probadas por separado es del orden de la provocada con la fracción II y menor que la respuesta máxima que induce la veratridina o la alta concentración de  $\text{K}^+$  en el fluido extracelular. La estimulación máxima de la liberación de GABA en respuesta a las toxinas de C. noxius (o a la fracción II) es de alrededor del 30% de la respuesta máxima a veratridina (Levi y col. 1978, Tapia y col. 1985) y como del 50% de la respues

puesta máxima a  $K^+$  50 mM (figura 17). A la fecha no se sabe si las diferentes eficacias para evocar liberación de transmisores, obtenidas con diversos tratamientos son o no indicativas de por ejemplo la secreción desde diferentes posas liberables. Estas diferencias parecen no estar relacionadas con el azar ya que son reproducibles y muy pronunciadas. No obstante su elucidación requeriría de la realización de experimentos sistematizados encaminados a responder a ese punto específicamente.

Elucubrando un poco en el sentido biológico, cabría preguntarse ¿Para qué un escorpión que produce su veneno para defenderse de sus predadores, necesitaría contener en él, diversos tipos de toxinas que ejercieran el mismo efecto neto (aumento de la liberación de transmisores) con eficacias similares. En este sentido se antoja especular que la versatilidad de los mecanismos de acción de los diferentes péptidos contenidos en el veneno, garantizaría la eficacia de la defensa ante diversos predadores, esta especulación lleva implícita la suposición de que los canales iónicos contenidos en las membranas de las diferentes especies de predadores presentan diferencias entre ellos. Estas diferencias podrían ser estructurales o de distribución de canales. El modo de acción opuesto de la toxina II-10 en el axón gigante del calamar y en los sinaptosomas de mamífero parece apoyar indirectamente estas ideas. Desde este mismo punto de vista es interesante

subrayar que algunas de las toxinas de escorpiones han sido etiquetadas como "Insectotoxinas" (Grishin y col. 1980, 1981), como toxinas de "mamíferos" (Possani y col. 1984), etc. Estas diferencias empíricas frecuentemente usadas en la literatura, requieren un poco de reflexión.

En Neurobiología estamos acostumbrados a emplear, e incluso buscar modelos biológicos que nos permitan realizar una serie de estudios que serían imposibles, desde el punto de vista experimental, en otras preparaciones. Por ejemplo: las células nerviosas gigantes, los axones gigantes y las terminales gigantes de moluscos han sido ampliamente usadas para conocer los canales iónicos involucrados en la transmisión nerviosa (Kandel 1980). Los hallazgos en estas preparaciones han sido muy valiosos porque pensamos que los principios biológicos que rigen a los procesos celulares son comunes en el curso de la evolución de las especies. No obstante la validez indiscutible de este concepto, cuando pasamos a analizar moléculas importantes biológicamente, vemos que existen diferencias importantes entre especies. La insulina o la hemoglobina que han sido secuenciadas en diferentes especies son un ejemplo (Zuckerkindl 1968, Schroer y col. 1983). A pesar de la correspondencia en muchos de los residuos aminoácidos u homólogos entre las moléculas de hemoglobina de: Humano, gorila, cerdo y caballo (que incluso no son especies tan alejadas filogenéticamente), se

ha encontrado que al comparar la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de la hemoglobina humana con la de la cadena beta de gorila, hay una diferencia de un sólo sitio, pero difiere en 17 sitios con la de caballo (Zuckerland 1968). El canal de  $\text{Na}^+$  no puede ser analizado desde este punto de vista ya que a la fecha no se conoce su secuencia de aminoácidos. Pero sí se han realizado numerosos trabajos encauzados a su purificación, lo que nos permite actualmente saber que éste tiene un peso molecular aproximado de cuando menos 250 000. El peso molecular reportado para el canal de  $\text{Na}^+$  purificado de membranas de Electrophorus electricus es de 270 000 (Norman y col. 1983, Miller y col. 1983), y el peso molecular del componente que une saxitoxina purificado de sarcolema de músculo esquelético de rata es del orden de 300 000 (Barchi y col. 1980). No obstante el desconocimiento de la estructura molecular de los canales de  $\text{Na}^+$  de diferentes especies, las diferencias funcionalmente opuestas que exhiben los canales de  $\text{Na}^+$  de sinaptosomas de ratón y los del axón del calamar no hacen tan arriesgado suponer la existencia de posibles diferencias estructurales en ellos: La toxina II-10 purificada del veneno de C. noxius que aumentó la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  así como la liberación de GABA en sinaptosomas de cerebro de ratón, disminuyó la permeabilidad pico al  $\text{Na}^+$  en el axón gigante del calamar (Carbone y col. 1982, Sitges y col. 1987).

Valoración de la estrategia experimental. Los fundamentos de la estrategia experimental que nos sirvió para sugerir los mecanismos de acción subyacentes a los efectos de las toxinas de Centruroides noxius sobre la liberación de GABA, puede ser útil para estudiar el modo de acción de otros fármacos o toxinas que ejerzan efectos sobre la liberación de neurotransmisores.

El empleo de la estrategia experimental propuesta para estudiar el modo de acción de un nuevo fármaco, permitiría saber si al cambio en la liberación de transmisores inducido por el fármaco en cuestión, subyace algún cambio de permeabilidad iónica. No obstante, es importante subrayar que el cambio en permeabilidad iónica no excluye la acción del fármaco en cuestión sobre otros componentes relacionados con la serie de eventos moleculares que deben desencadenarse tras la señal despolarizante (ver apéndice I).

El encontrar que un fármaco bajo estudio conduce a una despolarización interaccionando o alterando el comportamiento de algún tipo de canales iónicos es per se de gran valor: algunas toxinas naturales como la tetrodotoxina, la saxitoxina o la tityustoxina, por interaccionar selectivamente y con gran afinidad con el canal de  $\text{Na}^+$  han servido para purificarlo, lo que ha hecho posible empezar a conocerlo desde el punto de vista químico (Agnew y col. 1978, Catterall 1982, Norman y col. 1983).

Otra toxina natural que ha servido para purificar a un componente molecular involucrado en la comunicación nerviosa es la alfa-bungarotoxina que se une específicamente al receptor de acetilcolina (Dolly y col. 1979). El poder contar con este tipo de sustancias altamente específicas permitirá en un futuro no muy lejano aislar otros elementos involucrados en la comunicación nerviosa, entre ellos canales iónicos como los de  $Ca^{2+}$  o los de  $K^{+}$  y posiblemente incluso subpoblaciones o diferentes tipos de ellos. Es posible que entre las toxinas naturales cuyos mecanismos de acción aún son motivo de debate o no se han realizado los experimentos suficientes o pertinentes para establecerlos, haya algunas que resulten de gran valor en este sentido.

La caracterización de los efectos de una toxina o fármaco bajo estudio sobre diferentes manifestaciones de la actividad neural en diferentes preparaciones y con diferentes abordajes experimentales (entre ellos estudios de unión -"binding"-) es lo que nos permite suponer su alta selectividad sobre algún componente molecular involucrado en la comunicación nerviosa pero a la vez nos permite convertirla en una herramienta farmacológica experimental que puede ser de gran utilidad para entender los mecanismos moleculares subyacentes a la misma función de la comunicación nerviosa.

Dentro del contexto de averiguar los eventos moleculares que se suceden tras la despolarización y que culminan en la liberación del trans-



misor, el estudio de los mecanismos de acción de las toxinas u otros fármacos neuroactivos sobre el evento generador de la señal (despolarización de la membrana por diferentes causas) no es suficiente. Este debe ser ampliado, sometido a condiciones que den luz de su efecto sobre alguno de los pasos subsecuentes en la cascada de eventos moleculares que se generan entre la señal (despolarización) y la respuesta celular (i.e. liberación del transmisor). Con objeto de aclarar estas ideas me he permitido anexar el apéndice I que se encuentra en la página 104 en el que menciono algunos hallazgos ilustrativos relacionados con otros eventos moleculares que parecen participar en el proceso de liberación de neurotransmisores.

### El Calcio y la Liberación de Neurotransmisores.

Independientemente de cual sea el mecanismo generador de la despolarización (disminución de la permeabilidad al  $K^+$ , aumento de la permeabilidad al  $Na^+$ , aumento en la concentración extracelular de  $K^+$ , impulso eléctrico, etc.), cuando la membrana presináptica se despolariza, los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje se abren ante el cambio de potencial de la membrana y dan acceso al  $Ca^{2+}$  extracelular que sigue su gradiente electroquímico, aumentando así la concentración de  $Ca^{2+}$  intraterminal. Por la hipótesis del  $Ca^{2+}$  (pg 53) el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intraterminal a expensas del  $Ca^{2+}$  externo, dispara la liberación del neurotransmisor. No obstante esta hipótesis, que da cuenta de numerosas evidencias experimentales, es importante subrayar que en experimentos in vitro (donde la composición del Ringer que hace las veces de fluido extracelular puede modificarse a voluntad), algunos fármacos como : la veratridina (Levi y col. 1978), la veratrina (Norris y col. 1983, Sitges y col. 1987), la monensina (Sandoval y col. 1985) ó la  $\alpha$ -latrotoxina (Meldolesi y col. 1984), siguen siendo eficaces para evocar la liberación de los transmisores estudiados (GABA, dopamina, Metionina encefalina), en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo. Estas evidencias de liberación de neurotransmisores en condiciones de ausencia de  $Ca^{2+}$  externo, sugieren la posible existencia de otros eventos moleculares responsables de disparar la liberación de transmisores, diferentes a aquellos promovidos por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje.

Para explicar la estimulación de la liberación de neurotransmisores inducida por algunos fármacos en condiciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, se ha propuesto que el  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrado en los organelos intraterminales pasa a aumentar la concentración intraterminal de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en respuesta a dichos fármacos (Adam-Vizi y Ligeti 1984, Heinonen y col. 1984, Norris y col. 1983, Sandoval y col. 1980). Algunos autores han sugerido que el aumento en los niveles de  $\text{Na}^+$  intracelular moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  desde pozas intracelulares (Lowe y col. 1976, Sandoval y col. 1985). Desde este punto de vista es interesante recordar que la veratrina que resultó mucho más eficaz que las toxinas II-9.2.2 y II-10 del veneno de Centruroides noxius para aumentar la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en sinaptosomas, induce la liberación de GABA independientemente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extrasinaptosomal, mientras que las toxinas largas II-9 y II-10 son incapaces de incrementar la liberación de GABA en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (ver pags. 83 y 85; figs. 3 y 6). Es posible que esta diferencia se deba a que la cantidad de  $\text{Na}^+$  permeabilizada en respuesta a las toxinas de C. noxius (II-9 y II-10), no sea suficiente para promover la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los organelos intraterminales.

Una explicación adicional de la estimulación de la liberación de GABA por veratrina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo podría ser la siguiente: En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, el  $\text{Na}^+$  podría entrar a la terminal por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulando la liberación por medio del sistema adicional

$\text{Na}^+$  dependiente sugerido específicamente para GABA (Arias y col. 1984); ya que tanto la estimulación de la liberación de GABA inducida por el EGTA como la inducida por veratrina, ambas en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, son inhibidas por bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arias y col. 1984, datos no publicados). Sin embargo, debe ser subrayado que solamente la liberación de los neurotransmisores "clásicos" como: el GABA (Levi y col. 1978, Sitges y col. 1987), la dopamina (Sandoval, col. 1985) o la acetilcolina (datos no publicados obtenidos en el laboratorio del Dr. Tapia) se ha demostrado que es estimulada con drogas como la veratrina o la monensina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Esto pondría en duda la explicación adicional, ya que el EGTA no fué capaz de inducir la liberación de dopamina o de acetilcolina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, mientras que la veratrina o la monensina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo siguen estimulando la liberación de acetilcolina y de dopamina respectivamente.

Un hecho que merece atención, es que a diferencia de los neurotransmisores "clásicos", la liberación de las sustancias neuroactivas de naturaleza peptídica estimulada con veratridina (o con veratrina) requiere de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular (Drouva y col. 1982). Estas diferencias en los procesos de liberación que se ponen de manifiesto con ciertos fármacos estimuladores de la liberación de neurotransmisores.

(veratridina, monensina, EGTA) sugieren que muy probablemente existan diferencias en los mecanismos moleculares que controlan los procesos de liberación o secreción de las distintas moléculas neuroactivas. Su manifestación mediante herramientas experimentales con diferentes mecanismos de acción aun espera ser aclarada.

Actualmente, la explicación que implica la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrado en los organelos intraterminales para explicar la liberación de transmisores en condiciones de ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, ya comienza a ser puesta en duda por algunos autores que cuestionan el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como único segundo mensajero en los procesos de secreción (Meldolesi y col. 1984). Además de esta posición hay estudios, también recientes, aparentemente motivados por encontrar una explicación al papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos de secreción. En estos estudios se relacionan proteínas tales como cinasas, fosfolipasas, proteasas y o productos de su actividad (diacilglicerol, araquidoniato, prostaglandinas, lisoderivados, etc.) con los procesos de secreción. Hay evidencias de que algunos de estos sistemas juegan un papel determinante en los eventos de liberación de transmisores ( ver apéndice I). Intentos en este sentido han sido realizados en la preparación sinaptosomal (Bradford y col. 1983, Moskowitz y col. 1983, Valencia y col. 1985) y aunque el campo es relativamente nuevo es posible que permita llegar a una concepción mas acertada de los mecanismos que determinan la comunicación mediada por mensajeros químicos.

Es indudable que aun resta mucho camino por recorrer para poder comprender y conocer en su totalidad la serie de eventos moleculares que se suceden en la presinápsis y culminan en la liberación del transmisor. No obstante, también es indudable el progreso del conocimiento en este campo. Parte de él, gracias a la existencia de "herramientas farmacológicas experimentales" de alta selectividad y gran potencia con las que podemos eliminar contribuciones funcionales del sistema, lo que nos permite desenmascarar y o estudiar otras.

## APENDICE I.

### Eventos moleculares que participan en el proceso de liberación de neurotransmisores.

Hay evidencias que sugieren la participación de algunas enzimas en la serie de eventos moleculares que deben desencadenarse entre el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intraterminal y la liberación del neurotransmisor. Estas enzimas incluyen tanto a fosfolipasas (Bradford y col. 1983, Moskowitz y col. 1983), como a proteasas (Frederick y col. 1984) o a cinasas (Kaczmarek 1987) cuyas actividades dependen de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Bradford y colaboradores (1983) encontraron que la despolarización de sinaptosomas de cerebro de rata con alto  $\text{K}^+$  así como el tratamiento con A 23187 de los mismos, inducen un aumento de la actividad de fosfolipasa  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) endógena y que la estimulación de la liberación de catecolaminas con  $\text{K}^+$  alto se inhibe en presencia de inhibidores de la actividad de la  $\text{PLA}_2$ . Esta enzima que depende de  $\text{Ca}^{2+}$  para activarse, cataliza la hidrólisis de la unión éster en posición 2 de los fosfolípidos. La importancia de esta enzima en los procesos de secreción reside en su capacidad de generar lisolecitina (entre otros lisoderivados) y ácido araquidónico. Este último, es el precursor de las prostaglandinas (PG). El tratamiento de los sinaptosomas con  $\text{K}^+$  alto aumenta los niveles de araquidonato,  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sinaptosomales. La  $\text{PGE}_2$  disminuye la liberación basal de  $^3\text{H}$ -noradrenalina, mientras que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la lisolecitina

la estimulan, cuando se administran exógenamente a sinaptosomas. Con estos hallazgos se ha sugerido que el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intraterminal, activa a la  $\text{PLA}_2$  y que algunos de sus productos (lisolecitina,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , araquidoníato) modulan la neurosecreción.

Otra interpretación de la participación de la  $\text{PLA}_2$  en los procesos de liberación de neurotransmisores ha sido propuesta por Moskowitz y colaboradores (1983), quienes caracterizaron la actividad de esta enzima en vesículas sinápticas de cerebro de bovino, y encontraron que depende de  $\text{Ca}^{2+}$  y tiene un pH óptimo de 9. La  $V_{\text{max}}$  de la  $\text{PLA}_2$  de bovino se aumenta con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mientras que disminuye con  $\text{PGE}_1$ . En este mismo estudio los autores encuentran que el aumento en la  $V_{\text{max}}$  de la  $\text{PLA}_2$  de las vesículas sinápticas de bovino, correlaciona con la agregación, lisis y posiblemente fusión de las vesículas sinápticas (monitorean la agregación con técnicas de dispersión de luz, contraste de fases y microscopía electrónica). La agregación de las vesículas en respuesta a la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ó a calmodulina (en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) disminuye cuando preincuban las vesículas con inhibidores de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ .

Estos autores sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra tras la despolarización de la terminal presináptica, debe activar a la  $\text{PLA}_2$  de las vesículas sinápticas uniéndose directamente a la enzima o a la calmodulina. Kleith y col (1981) demostraron que la proteína que constituye a la  $\text{PLA}_2$  presenta una región que une  $\text{Ca}^{2+}$  y Wong y Cheung (1979) encontraron que la calmodulina estimula la actividad de  $\text{PLA}_2$ .

Moskowitz (1983) sugiere que la lisolecitina que induce fusión de membranas propiciaría la exocitosis del neurotransmisor. Las pros-



taglandinas , cuyo precursor es el ácido araquidónico que resulta de la actividad de  $PLA_2$ , participando como moduladores de la liberación del neurotransmisor.

Con estas nuevas perspectivas de los procesos de liberación se antoja hipotetizar una explicación de la participación de los 2 componentes que constituyen a las toxinas presinápticas de serpientes (ver pag. 34): El componente con secuencia de aminoácidos distinta a la de la fosfolipasa  $A_2$ , es posible que haga las veces de despolarizante , mientras que el componente con secuencia de  $PLA_2$ , garantizaría el aumento de liberación del neurotransmisor. Las evidencias de Bradford y col. (1983) demuestran que la actividad de  $PLA_2$  esta involucrada en la serie de eventos moleculares que se desencadenan tras la despolarización de las terminales nerviosas: El bloqueo de la actividad de  $PLA_2$  inhibe la liberación de catecolaminas evocada por despolarización.

Otra enzima cuya participación en los procesos de liberación de neurotransmisores ha sido demostrada es la proteína cinasa C. La actividad de esta enzima, muy abundante en el sistema nervioso central, comparativamente con otros tejidos, depende de  $Ca^{2+}$ , de diacilglicerol (DG) y de un ambiente lipídico. Se ha demostrado que la activación de esta enzima con agonistas del DG tales como los esteroides del forbol, aumentan la liberación de neurotransmisores (Publicover 1985, Eusebi 1986). Entre los sustratos de la proteína

cinasa C, se encuentra el canal de  $\text{Na}^+$  voltaje dependiente (Costa y Catterall 1984). Con base en evidencias tanto electrofisiológicas como bioquímicas, citadas en la revisión de Kaczmarek, este autor propone que la proteína cinasa C, actúa regulando a los canales iónicos y así controla la cantidad de neurotransmisor liberado. Otro trabajo relacionado con la participación de esta cinasa C en los procesos de secreción es el de Valencia y colaboradores (1985): En terminales nerviosas de hipotálamo, estos autores encuentran que la secreción de LHRH (hormona liberadora de la hormona luteinizante) así como de  $\text{PGE}_2$ , se estimula con esteres del forbol, mientras que el diacilglicerol (DG) estimula la liberación de  $\text{PGE}_2$  pero no la de la LHRH. Solamente en presencia de un inhibidor de la lipooxigenasa, el DG es capaz de estimular la liberación de ambas ( $\text{PGE}_2$  y LHRH). Con estos datos ellos sugieren que la activación de la proteína cinasa C estimula la liberación de este neuropéptido y que algunos metabolitos del ácido araquidónico deben estar inhibiendo la secreción de LHRH. El DG también debe estar activando la formación de productos del araquidonato que inhiben la liberación de LHRH.

No me extenderé más en este sentido ya que los trabajos de las toxinas de Centruroides noxius que aparecen en esta tesis, no contemplan estos aspectos, aunque he encontrado recientemente que la liberación de GABA inducida con las toxinas II-9 y II-10

de C. noxius, así como la inducida con veratrina, son inhibidas en presencia de un inhibidor de la fosfolipasa  $A_2$ . Esto abre nuevos horizontes para abordar otros aspectos relacionados con el estudio del mecanismo molecular de la liberación de neurotransmisores evocado por estas herramientas experimentales.

No obstante las evidencias de que esas (y otras) enzimas y/o los productos de su actividad, tienen algún tipo de participación en los procesos de secreción de neurotransmisores, es necesario esperar a que experimentos futuros, disequen y eluciden su tipo de participación. No sabemos acerca del curso temporal de los eventos que se suceden, ni de las posibles diferencias de estos eventos moleculares en las diversas preparaciones (células secretoras en cultivo, linfocitos, plaquetas, terminales nerviosas) que han sido estudiadas. Sin embargo, este panorama hasta la fecha burdo y confuso, abre nuevas rutas para estudiar los eventos moleculares que determinan los procesos de secreción y entre ellos la liberación de neurotransmisores.

## APENDICE

## I I

HERRAMIENTAS FARMACOLOGICAS EXPERIMENTALES

Actualmente contamos con una serie de fármacos y toxinas de origen natural cuyos mecanismos de acción han sido ampliamente establecidos, lo que las ha convertido en herramientas farmacológicas experimentales.

Entre las herramientas útiles para caracterizar y/o dilucidar mecanismos de acción de nuevas sustancias que alteren la liberación de neurotransmisores se encuentran las empleadas en los trabajos de esta tesis. Con el propósito de facilitar su manejo las enlisto a continuación incluyendo en esta lista a las toxinas de Centruroides noxius caracterizadas en los trabajos que presento.

En la figura 19, se esquematizan sus estructuras (omito las fórmulas de aquellas que tienen naturaleza peptídica).

I. FARMACOS O TOXINAS QUE AUMENTAN LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES A TRAVES DE:

1. Aumentar la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  mediante los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje: VERATRIDINA (VERATRINA)  
TOXINA II-9 de C. noxius  
TOXINA II-10 de C. noxius

2. Disminuir la permeabilidad al  $\text{K}^+$  mediante los canales de  $\text{K}^+$ :  
NOXIUSTOXINA de C. noxius  
4-AMINOPIRIDINA

II. IONOFOROS QUE AUMENTAN LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES A TRAVES DE:

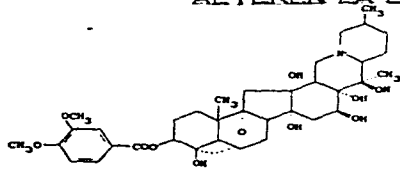
1. Aumentar la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ , independientemente de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje: MONENSINA.
2. Aumentar la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , independientemente de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje: A-23 187.

III. Toxinas que bloquean la liberación de neurotransmisores evocada por aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  (a través de la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje): TETRODOTOXINA.

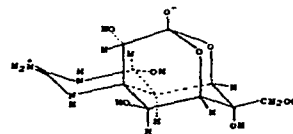
IV. Ionóforo que inhibe la liberación evocada por disminución en la permeabilidad al  $\text{K}^+$  a través del bloqueo de canales de  $\text{K}^+$ : VALINOMICINA.

V. Los antagonistas orgánicos e inorgánicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como el VERAPAMIL y el COBALTO, inhiben la liberación que promueve la despolarización evocada por diversas causas (i.e. aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ , disminución en la permeabilidad al  $\text{K}^+$ ).

HERRAMIENTAS EXPERIMENTALES UTILES PARA ESTUDIAR  
LOS MECANISMOS DE ACCION DE NUEVAS SUSTANCIAS QUE  
ALTEREN LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES.



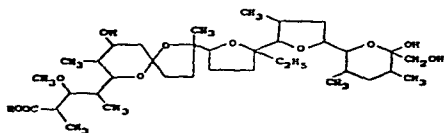
VERATRIDINA



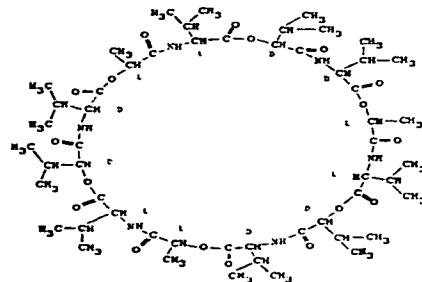
TETRODOTOXINA



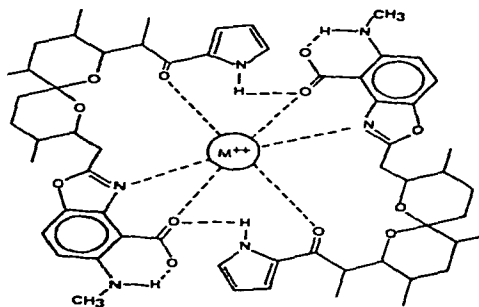
4-AMINOPIRIDINA



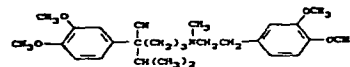
MONENSINA



VALINOMICINA



A 23 187  
(M<sup>++</sup>, se refiere a metal)



VERAPAMIL

## REFERENCIAS.

- Adam-Vizi V. y Ligeti E. (1984) Release of acetylcholine from rat brain synaptosomes by various agents in the absence of external calcium ions. *J. Physiol. (Lond.)* 353: 505-521.
- Agnew W.S., Levinson S.R., Brabson J.S. y Raftery M.A. (1978) Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from Electrophorus electricus electroplax membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 2606-2610.
- Arias C., Sitges M. y Tapia K. (1984) Stimulation of ( $^3$  H) -  $\gamma$  aminobutyric acid release by calcium chelators in synaptosomes. *J. Neurochem.* 42, 1507-1514.
- Armstrong C.M. y Binstock L. (1965) Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol.* 48, 859-872.
- Babin D.R., Watt D.D., Goos S.M. y Mlejnek R.V. (1974) Amino acid sequences of neurotoxic protein variants from the venom of Centruroides sculpturatus Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 125-134.
- Babin D.R., Watt D.D., Goos S.M. y Mlejnek R.V. (1975) Amino acid sequence of neurotoxin I from Centruroides sculpturatus Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 125-134.
- Baker P.F., Hodgkin A.L. y Ridgway E.B. (1971) Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol. (Lond.)* 218, 709-755.
- Baker P.A. y Crawford A.C. (1975) A note on the mechanism by which inhibitors of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)* 246, 209-266.
- Barchi R.L., Cohen S.A. y Murphy L.E. (1980) Purification from rat sarcolemma of the saxitoxin-binding component of the excitable membrane sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1306-1310.
- Barhanin J., Giglio J.R., Leopold P., Schmid A., Sampaio S.V. y Lazdunsky M. (1982) Tytius serrulatus venom contains two classes of toxins. *J. Biol. Chem.* 257, 12553-12558.

- Bartschat D.K. y Blaustein M.P. (1985) Calcium-activated potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J. Physiol. (Lond.)* 361, 441-457.
- Bayón A. y Drucker-Colin R. (1985) In vivo perfusion and release of neuroactive substances. *Method and Strategies*. Academic Press Inc.
- Bazolet L. (1971) "Scorpionism in the old world" En: *Venomous animals and their venoms* (eds. Bücherl W. y Buckley E.) Vol. III, Academic Press, New York, pp 349-371.
- Belleroche J.S. y Bradford H.F. (1977) On the site of origin of transmitter amino acids released by depolarization of nerve terminals in vitro. *J. Neurochem.* 29, 335-343.
- Bradford P.G., Marinetti G.V. y Abood L.G. (1983) Stimulation of phospholipase A2 and secretion of catecholamines from brain synaptosomes by potassium and A23187. *J. Neurochem.* 41, 1684-1693.
- Brazil O.V., Excell B.J. y Santana S. (1973) The importance of phospholipase A in the action of crotoxin complex at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (Lond.)* 234, 63P.
- Brown M.S. y Mosher H.S. (1963) Tarichatoxin: Isolation and purification. *Science* 140, 295-296.
- Burgen A.S.V., Dickens F. y Zatman L.J. (1949) The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)* 109, 10-24.
- Cahalan M.D. (1975) Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by Centruroides sculpturatus scorpion venom. *J. Physiol.* 244, 511-534.
- Carbone E., Wanke G., Prespitino G., Possani L.D. y Maclicke A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296, 90-91.
- Carbone E., Prespitino G., Franciolini F., Dent M.A.R. y Possani L.D. (1984) Selective modification of the squid axon Na<sup>+</sup> currents by Centruroides noxius toxin II-10. *J. Physiol. (Paris)* 79, 179-184.
- Catterall W.A. (1975) Cooperative activation of action potential Na ionophore by neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1782-1786.



- Catterall W.A. (1976) Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore. *J. Biol. Chem.* 251, 5528-5536.
- Catterall W.A. (1977) Activation of the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem.* 252, 8669-8676.
- Catterall W.A. y Beress L. (1978) Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore. *J. Biol. Chem.* 253, 7393-7396.
- Catterall W.A. (1979 a) Binding of scorpion toxin to receptor sites associated with sodium channels in frog muscle. Correlation with voltage-dependent activation. *J. Gen. Physiol.* 74, 375-392.
- Catterall W.A., Morrow C.S., y Hartshorne R.P. (1979 b) Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact lysed, and detergent solubilized brain membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 11379-11387.
- Catterall W.A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15-43.
- Catterall W.A. (1982) The emerging molecular view of the sodium channel. *Trends. Neurosci.* 5, 303-305.
- Chang C.C., Chen T.F. y Lee C.Y. (1973) Studies of the presynaptic effect of beta-bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184, 339-345.
- Chang, C.C., Lee J.D., Eaker D. y Fohlman J. (1977) The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with beta-bungarotoxin and crotoxin. *Toxicon.* 15, 571-576.
- Chicheporticke R., Vincent J.P., Kopeyan C., Schweitz H. y Lazdunski M. (1975) Structure-function relationship in the binding of snake neurotoxins to the torpedo membrane receptor. *Biochemistry* 14, 2081-2091.
- Collingridge G.L. y Davies J. (1982 a) Reversible effects of tetanus toxin on striatal-evoked responses  $^3\text{H}$ - $\gamma$ -aminobutyric acid release in the rat substantia nigra. *Br. J. Pharmacol.* 76, 403-411.
- Collingridge G.L. y Davies J. (1982 b) The in vitro inhibition of GABA release by tetanus toxin. *Neuropharmacology* 21, 851-855.

- Connor J.A. y Stevens C.F. (1971 a) Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* 213, 21.
- Connor J.A. y Stevens C.F. (1971 b) Prediction of repetitive firing behavior from voltage clamp data on an isolated neuron soma. *J. Physiol.* 213, 31.
- Couraud F., Jover E., Dubois J.M. y Rochat H. (1982) Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20, 9-16.
- Couraud F. y Jover E. (1984) Mechanism of action of scorpion toxins. in : *Insect Poisons, allergens and other invertebrate venoms* (ed. Anthony T. Tu) *Handbook of Natural Toxins*. Vol.2 , Marcel Dekker Inc. New York and Basel. pp 659-675.
- Costa M.R. y Catterall W.A. (1984) Phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of the  $Na^+$  channel by protein kinase C. *Cell Mol Neurobiol.* 4, 291-297.
- Coutinho-Netto J., Abdul-Ghani A.S., Norris P.J., Thomas A.J. y Bradford H.F. (1980) The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro. *J. Neurochem.* 35, 558-565.
- Crone H.D., Leake B., Jarvin M.W. y Freeman S.E. (1976) On the nature of maculotoxin. *Toxicon* 14, 423-426.
- Cull-Candy S.C., Fohlman J., Gustavson D., Lullman-Rauch R. y Thesleff S. (1976) The effects of taipoxin and notexin on the function and fine structure of the murine neuromuscular junction. *Neuroscience* 1, 175-180.
- Curtis D.R. y De Groat W.C. (1968) Tetanus toxin and spinal inhibition. *Brain Res.* 10, 208-212.
- Curtis D.R., Felix D., Game C.J.A. y Mc Culloch R.M. (1973) Tetanus toxin and the synaptic release of GABA. *Brain Res.* 51, 358-362.
- Darbon H., Rochat H., Kopeyan C. y Rietschoten J.V. (1982) Covalent structure of the insect toxin of Androctonus australis Hector. *Toxicon.* 20, 64.
- De Robertis E., Pellegrino de Iraldi A., Rodriguez G. y Gomez C.J. (1961) On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 229-235.

- Dodd P.R., Hardy J.A., Oakley A.E., Edwarson J.A., Perry E.K. y Delaunoy J.P. (1981) A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res.* 226, 107-118.
- Dolly J.O. (1979) Biochemistry of acetylcholine receptors from skeletal muscle. En: *International review of Biochemistry, Neurochemistry and Biochemical Pharmacology* (ed. K. Tipton) University Park Press, Baltimore 26, 257-309.
- Drouva S.V., Epelbaum J. y Kordon C. (1982) Hormonal regulation of and ionic requirements for in vitro release of hypothalamic peptides. En: *Hormonally active brain peptides, Structure and Function* (eds. Mc Kerns K.W. y Pantic V.) pp 99-123.
- Duchen L.W. y Tonge D.A. (1973) The effects of tetanus toxin on neuromuscular transmission and on the morphology of motor endplates in slow and fast skeletal muscle of the mouse. *J. Physiol.* 228, 157-172.
- Eusebi F., Molinaro M. y Caratsch C.G. (1986) Effects of phorbol ester on spontaneous transmitter release at frog neuromuscular junction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 1298-1305.
- Evans M.H. (1972) Tetrodotoxin, saxitoxin and related substances: their application in neurobiology. *Int. Rev. Neurobiol.* 15, 83-166.
- Fonnum F., Malthe-Sorensen D., Kvale I., Soreide A., Skrede K. y Walaas I. (1981) Glutamergic neurons: Localization and release of the transmitter. En: *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission*. (eds. Tapia R. y Cotman C.) Plenum Press. New York. pp 59-70.
- Frederick J.M., Hollyfield J.G. y Strittmatter W.J. (1984) Inhibitors of metalloendoprotease activity prevent  $K^+$ -stimulated neurotransmitter release from the retina of Xenopus laevis. *J. Neurosci.* 4, 3112-3119.
- Fricke U. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Analyt. Biochem.* 53, 555-558.
- García G.P. (1976) Etude des neurotoxines du venin du scorpion Mexicain "Centruroides suffusus suffusus" Ph.D. thesis, Université de Nice, France.
- García-Sainz J.A. (1985) La toxina pertussis. Un arma para la profilaxis contra la tosferina y para estudiar los mecanismos de acción de algunas hormonas. *Ciencia* 36, 97-103.
- Geduldig D. y Junge D. (1968) Sodium and calcium components of action potentials in the Aplysia giant neurons. *J. Physiol.* 199, 347.

- Gerasimov V.D., Kostyuk P.G. y Maiskii V.A. (1965) The influence of divalent cations on the electrical characteristics of membranes of giant neurons. *Biofizika*. 10, 447.
- Gillespie J.I. y Meves H. (1980) The effect of scorpion venoms on the sodium currents of the squid giant axon. *J. Physiol.* 308, 479-499.
- Gomez M.V., Diniz C.R. y Barbosa T.S. (1975) A comparison of the effects of scorpion venom tityustoxin and ouabain on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. *J. Neurochem.* 24, 331-336.
- Grishin E.V., Soldatova L.N., Soldatov, N.M., Kostetskii P.V. y Ovchinnikov Y.A. (1980) Amino acid sequence of insectotoxin 1-2 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. *Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. transl. Bioorg. Khim.)* 5, 949-956.
- Grishin E.V., Soldatova L.N., Shakhparonov M.I. y Kazakov V.K. (1981) The amino-acid sequence of neurotoxin M-10 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. *Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. transl. Bioorg. Khim.)* 6, 390-398.
- Gundersen C.B. y Jenden D.J. (1983) Spontaneous output of acetylcholine from rat diaphragm preparations declines after treatment with botulinum toxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224, 265-268.
- Hagiwara S.K., Kusano K. y Saito N. (1961) Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium rich media. *J. Physiol.* 155, 470.
- Hajós F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 136, 387-392.
- Heinonen E., Akerman K.E.O. y Kaila K. (1984) Depolarization of the mitochondrial membrane potential increases free cytosolic calcium in synaptosomes. *Neurosc. Lett.* 49, 33-37.
- Hendon R.A. y Fraenkel-Conrat H. (1971) Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68, 1560-1563.
- Henriquez M. y Gómez M.V. (1981) The effect of scorpion venom Tityus-toxin on the uptake of calcium in synaptosomes. *Brain Res.* 7, 255-259.
- Hereadero J., Korpi E.R. y Oja S.S. (1983) Tetanus toxin treatment in vitro inhibits the release of GABA from rat brain cerebral cortex slices evoked by high K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-free media. *Neurochem. Int.* 5, 137-143.

- Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952 a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 449.
- Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952 b) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 473.
- Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952 c) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 497.
- Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952 d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. y Katz B. (1949) Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch. Sci. Physiol.* 3, 129.
- Hoffmann C.C. y Vargas R. (1935) Contribuciones al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. *Inst. Hig.* 2, 182-193.
- Hoffmann C.C. (1938) Nuevas consideraciones acerca de los alacranes mexicanos. *An. Inst. Biol.* 9, 318-377.
- Howard B.D. y Gundersen Jr. C.B. (1980) Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 307-336.
- Jaimovich E., Ildefonse M., Barhanin J., Rougier O. y Lazdunski M. (1982) Centruroides toxin, a selective blocker of surface Na<sup>+</sup> channels in skeletal muscle: Voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3896-3900.
- Janicki P.K. y Habermann E. (1983) Tetanus and botulinum toxins inhibit and black widow spider venom stimulates the release of methionine-enkephalin-like material in vitro. *J. Neurochem.* 41, 395-402.
- Kaczmarek L.K. (1987) The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. *Trends in Neurosc.* 10, 30-34.
- Kandel E. (1980) The multichannel model of the nerve cell membrane: A perspective. En: *Molluscan nerve cells: from biophysics to behavior*, (eds. J. Koester y J.H. Byrne) Cold Spring Harbor, *Reports in the Neurosciences*, 1, 1-10.

- Kao C.Y. (1966) Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* 18, 997-1049.
- Katz B. y Miledi R. (1967a) Modification of transmitter release by electrical interference with motor nerve endings. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 167, 1.
- Katz B. y Miledi R. (1967b) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol. (Lond.)* 192, 407.
- Katz B. y Miledi R. (1969) Tetrodotoxin-resistant electric activity in presynaptic terminals. *J. Physiol. (Lond.)* 203, 459.
- Kim Y.H., Brown G.B., Mosher H.S. y Fuhrman F.A. (1975) Tetrodotoxin: Occurrence in Atelopid frogs of Costa Rica. *Science* 184, 151-152.
- Kita H. y Van der Kloot W. (1974) Calcium ionophore X-537 A increases spontaneous and phasic quantal release of acetylcholine at frog neuromuscular junction. *Nature* 250, 658-660.
- Kleith C., Feldman D.S., Deganello S., Glick J., Ward K.B., Jones E.D. y Sigler P.B. (1981) The 2.5 Å crystal structure of a dimeric phospholipase A2 from the venom of Crotalus atrox. *J. Biol. Chem.* 256, 8602-8607.
- Krueger B.K. y Blaustein M.P. (1980) Sodium channels in presynaptic nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* 76, 287-313.
- Kopeyan C., Martínez G. y Rochat H. (1978) Amino acid sequence of neurotoxin V from the scorpion Leiurus quinquestriatus. *FEBS Lett.* 89, 54-58.
- Kopeyan C., Martínez G. y Rochat H. (1979) Amino acid sequence of neurotoxin III of the scorpion Androctonus australis Hector. *Eur. J. Biochem.* 94, 609-615.
- Kopeyan C., Martínez G. y Rochat H. (1982) Primary structure of toxin IV of Leiurus quinquestriatus quinquestriatus and characterization of a new group of scorpion neurotoxins. *Toxicon* 20, 71.
- Lazdunski M. y Renaud J.F. (1982) The action of cardiotoxins on cardiac plasma membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 44, 463-473.

- Lee C.Y. (1979) Recent advances in chemistry and pharmacology of snake toxins. En : Neurotoxins: Tools in Neurobiology (eds. Ceccarelli B. y Clementi F.) Raven Press. New York. pp 1-16.
- Levi G., Banay-Schartz M. y Raiteri M. (1978) Uptake, exchange and release of GABA in isolated nerve endings. En: Amino acids as chemical transmitters (F. Fonnum, ed.) Plenum Press, New York pp 327-350.
- Llinás R., Walton K. y Bohr V. (1976a) Synaptic transmission in the squid giant synapse after potassium conductance blockade with external 3- 4-aminopyridine. Biophys. J. 16, 83-86.
- Llinás R., Steinberg I.Z. y Walton K. (1976b) Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: Voltage clamp study in squid giant synapse and theoretical model for the calcium gate. Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 187.
- Llinás R., Steinberg I.Z. y Walton K. (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. Biophys. J. 33, 323-351.
- Low B.W. (1979) Three-dimensional structure of erabutoxin b, prototype structure of the snake venom postsynaptic neurotoxins: Consideration of structure and function; description of the active site. En: Neurotoxins: Tools in Neurobiology. (eds. Ceccarelli B. y Clementi F.) Raven Press. New York. pp 141-147.
- Lowe D.A., Richardson B.P., Taylor P. y Donatsch P. (1976) Increasing intracellular sodium triggers calcium release from bound pools. Nature 260, 337-338.
- Lundh H., Cull Candy S.G., Leander S. y Thesleff S. (1976) Restoration of transmitter release in botulinum poisoned skeletal muscle. Brain Res. 110, 194-198.
- Macedo T.M. y Gómez M.V. (1982) Effects of Tityustoxin (TsTx) from scorpion venom on the release and synthesis of acetylcholine in brain slices. Toxicon 20, 601-606.
- Meech R.W. (1974) The sensitivity of Helix aspersa neurons to injected calcium ions. J. Physiol. 237, 259.
- Meldolesi J., Huttner W.B., Tsien R.Y. y Pozzan T. (1984) Free cytoplasmic calcium and neurotransmitter release: Studies on PC12 cells and synaptosomes exposed to -latrotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 620-624.

- Meves H., Rubbly N. y Watt D.D. (1982) Effects of toxins isolated from the venom of the scorpion Centruroides sculpturatus on the  $\text{Na}^+$  currents of the node of Ranvier. Pflugers Arch. 393, 56-62.
- Miledi R. (1973) Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. Proc. Roy. Soc. B 183, 421-425.
- Miller J.A., Agnew W.S. y Levinson S.R. (1983) Principal glycopeptide of the tetrodotoxin/saxitoxin binding protein from Electrophorus electricus: Isolation and partial chemical and physical characterization. Biochemistry 22, 462-470.
- Miranda F., Kopeyan C., Rochat C. y Lizzitzky S. (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions Androctonus australis Hector, Buthus occitanus tunetanus and Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. Europ. J. Biochem. 16, 514-523.
- Moskowitz N., Puszkin S. y Schook W. (1983) Characterization of brain synaptic vesicle phospholipase A2 activity and its modulation by calmodulin, prostaglandin E2, prostaglandin F2 $\alpha$ , cyclic AMP and ATP. J. Neurochem. 41, 1576-1586.
- Nakamura Y., Nakajima S. y Grundfest H. (1965) The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. J. Gen. Physiol. 48, 985-996.
- Narahashi T., Moore J.W. y Scott W.R. (1964) Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon. J. Gen. Physiol. 47, 965-974.
- Narahashi T., Shapiro B.I., Deguchi T., Seuka M. y Wang C.M. (1972) Effects of scorpion venom on squid axon membranes. Am. J. Physiol. 222, 850-857.
- Narahashi T. (1974) Chemicals as tools in the study of excitable membranes. Physiol. Rev. 54, 813-889.
- Neher E. (1971) Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons. J. Gen. Physiol. 58, 36.
- Noguchi T. y Hashimoto Y. (1973) Isolation of tetrodotoxin from a goby, Gobius criniger. Toxicon 11, 305-307.
- Nordmann J.J. y Dyball R.E.J. (1978) Effects of veratridine on  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and the release of oxytocin and vasopressin from the isolated rat neurohypophysis. J. Gen. Physiol. 72, 297-304.



- Norman R.I., Schmid A., Lombet A., Barhanin J. y Lazdunski M. (1983) Purification of binding protein for Tityus ♂ toxin identified with the gating component of the voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4164-4168.
- Norris P.J., Dhaliwal D.K., Druce D.P. y Bradford H.F. (1983) The suppression of stimulus-evoked release of amino acid neurotransmitters from synaptosomes by verapamil. J. Neurochem. 40, 514-521.
- Oberg S.G. y Kelly P.B. (1976) The mechanism of  $\alpha$ -bungarotoxin action. 1. Modification of transmitter release at the neuromuscular junction. J. Neurobiol. 7, 129-141.
- Osborne K.H. y Bradford H.F. (1973) Tetanus toxin inhibits amino acid release from nerve endings in vitro. Nature New Biol. 244, 157-158.
- Possani L.D., Alagon A.C., Fletcher Jr P.L. y Erickson B.W. (1977) Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Arch. Biochem. Biophys. 180, 394-403.
- Possani L.D., Ramirez G.A., Fletcher Jr.P.L. y Gurrola M.A.H. (1978) Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides elegans Thorell. F.E.B.S. Lett. 91, 261-262.
- Possani L.D., Fletcher Jr. P.L., Alagón A. C. y Juliá J.Z. (1980) Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. Toxicon 18,175-183.
- Possani L.D., Fernandez de Castro J. y Julia J.Z. (1981 a) Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion ( Centruroides noxius Hoffmann) venom. Toxicon 19, 323-328.
- Possani L.D., Martin B.M., Mochca-Morales J. y Svendsen I. (1981 b) Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Carlsberg Res. Commun. 46, 195-205.
- Possani L.D., Dent M.A., Martin B.M., Maelicke A. y Svendsen I. (1981 c) The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 46, 207-214.

- Possani L.D., Martin B.M. y Svendsen I. (1982) The primary structure of noxiustoxin : A K<sup>+</sup> channel blocker peptide , purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. commun. 47, 285-289.
- Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I., Rode G.S. y Erickson B.W. (1983) Toxins from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello: Primary structure and sequence comparison by metric analysis
- Possani L.D. (1984) Structure of scorpion toxins. En: Handbook of Natural Toxins (ed. Tu A.T.) Marcel Dekker Inc., New York and Basel pp 513-543.
- Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I., Rode G.S. y Erickson B.W. (1985) Scorpion toxins from Centruroides noxius and Tityus serrulatus . Primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochem J. 229, 739-750.
- Publicover S.J. (1985) Stimulation of spontaneous transmitter release by the phorbol ester, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, an activator of protein kinase C. Brain Res. 333, 185-187.
- Rahamimoff R., Erulkar S.D., Lev Tov A. y Meiri H. (1978) Intracellular and extracellular ions in transmitter release at the neuromuscular synapse. Ann. N.Y. Acad. Sci. 307, 583-598.
- Ramirez G.A., Fletcher Jr. P.L., Rode G.S. y Possani L.D. (1981) N-terminal sequence of toxin II.6.3 from the venom of the scorpion Centruroides elegans , VII Int. Biophys. Cong. III Pan-Am. Biochem. Cong. México City, p.157.
- Rodbell M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284, 17-22.
- Rochat H., Rochat C., Miranda F., Lissitzky S. y Edman P. (1970) The amino acid sequence of neurotoxin I of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 17, 262-266.
- Rochat H., Rochat C., Sampieri F., Miranda F. y Lissitzky S. (1972) The amino acid sequence of neurotoxin II of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 28, 381-388.
- Rochat H., Bernard P. y Couraud F. (1979) Scorpion Toxins: Chemistry and mode of action, En: Advances in Cytopharmacology (eds. Ceccarelli B. y Clementi F.) Raven Press, New York pp 325-334.
- Rogawski M.A. (1985) The A current: How ubiquitous a feature of excitable cells is it ? Trends Neurosci. 8, 214-219.

- Romey G., Chicheporticte R., Lazdunsky M., Rochat H., Miranda F. y Lissitzki S. (1975) Scorpion neurotoxin a presynaptic toxin which affects both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in axons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 115-121.
- Rosso J.P. y Rochat H. (1982) Characterization from the venom of Androctonus mauretanicus mauretanicus, of ten proteins including six neurotoxins. *Toxicon* 20, 76-77.
- Sandoval M.E. (1980) Studies on the relationship between Ca<sup>2+</sup> -efflux from mitochondria and the release of amino acid neurotransmitters. *Brain Res.* 181, 357-367.
- Sandoval M.E., Aquino G. y Chávez J.L. (1985) Sodium-dependent, calmodulin-dependent transmitter release from synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 56, 271-277.
- Schwarz J.R., Hübricht W. y Wagner H.H. (1973) The rate of action of tetrodotoxin on myelinated nerve fibres of Xenopus laevis and Rana esculenta. *J. Physiol.* 233, 167-194.
- Schroer J.A., Bender L., Feldmann R.J. y Kim K.J. (1983) Mapping epitopes on the insulin molecule using monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 13, 693-700.
- Sen I. y Cooper J.R. (1978) Similarities of beta-bungarotoxin and phospholipase A2 and their mechanism of action. *J. Neurochem.* 30, 1369-1375.
- Sheumack D.D., Howden M.E.H., Spence I. y Quinn R.J. (1978) Maculotoxin: A neurotoxin from the venom glands of the octopus Hapalochlaena maculosa identified as tetrodotoxin. *Science* 199, 188-189.
- Shira T.S., Scott I.A. y Nicholls D.G. (1984) Ionophore A23187, verapamil, protonophores, and veratridine influence the release of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid from synaptosomes by modulation of the plasma membrane potential rather than the cytosolic calcium. *J. Neurochem.* 43, 1624-1630.
- Simpson L.L. (1979) Studies on the mechanism of action of botulinum toxin. En: *Neurotoxins Tools in Neurobiology*. Vol. III (eds. Ceccarelli B. y Clementi F.) Raven Press, New York pp 27-34.
- Simpson L.L. y Dasgupta B.R. (1983) Botulinum neurotoxin type E: Studies on mechanism of action and on structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224, 135-140.

- Sitges M., Possani L.D. y Bayón A. (1986) Noxiustoxin a short-chain toxin from the mexican scorpion Centruroides noxius induces transmitter release by blocking  $K^+$  permeability. *Neurosci.*
- Sitges M., Possani L.D. y Bayon A. (1987) Characterization of the actions of toxins II-9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion Centruroides noxius on transmitter release from mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 48, 1745-1752.
- Smith C.C.T., Bradford H.F., Thompson E.J. y MacDermot J. (1980) Actions of beta-bungarotoxin on amoni acid transmitter release. *J. Neurochem.* 34, 487-494.
- Stallcup W.B. (1977) Comparative Pharmacology of voltage-dependent sodium channels. *Brain Res.* 135, 37-53.
- Tapia R. (1976) Bases bioquímicas de la transmisión sináptica: neurotransmisores. *Bol. Est. Med. Biol., Méx.* 29, 149-155.
- Tapia R. y Sitges M. (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250, 291-299.
- Tapia R., Sitges M. y Morales E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361, 373-382.
- Ulbricht W. (1969) The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.* 61, 18-71.
- Valencia M.M., Conte D. y Negro-Vilar A. (1985) Diacylglycerol and phorbol esters enhance LHRH and prostaglandin E2 secretion from median eminence nerve terminals in vitro. *Brain Res. Bull.* 15, 657-659.
- Vargas O., Gregoire J., Martin M.F., Bechis G. y Rochat H. (1982) Neurotoxins from the venoms of two scorpions: Buthus occitanus tunctanus and Buthus occitanus mardochei. *Toxicol.* 20, 79.
- Vizi E.S., Van Dijk J. y Foldes F.F. (1977) Effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release. *J. Neural. Transm.* 41, 265-274.
- Wang G.K. y Strichartz G. (1982) Simultaneous modifications of sodium channel gating by two scorpion toxins. *Biophys. J.* 40, 175-179.
- Wernicke J.F., Oberjat T. y Howard B.D. (1974) beta-Neurotoxin reduces neurotransmitter storage in brain synapses. *J. Neurochem.* 22, 781-788.
- Wernicke J.F., Vanker A.D. y Howard B.D. (1975) The mechanism of action of beta-bungarotoxin. *J. Neurochem.* 25, 483-496.

- Wilson J., Wilkin G. y Balázs R. (1975) Biochemical dissection of the cerebellum-functional properties of the glomerulus particles. En: Metabolic Compartmentation and Neurotransmission (eds. Berl S., Clarke D. y Schneider D.). Plenum Press. New York. pp 427-436.
- Wong P.Y.K. and Cheung W.Y. (1979) Calmodulin stimulates platelet phospholipase A2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 473-480.
- Wonnacott S. y Marchbanks R.M. (1976) Inhibition by botulinum toxin of depolarization-evoked release of ( $^{14}$  C)-acetylcholine from synaptosomes in vitro. Biochem. J. 156, 701-712.
- Yeh J.Z., Oxford G.S., Wu C.H. y Narahashi T. (1976) Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. Biophysical J. 16, 77-81.
- Zhdanova L.N., Adamovich T.B., Nazimov I.V., Grishin E.V. y Ovchinnikov Y.A. (1978) Amino acid sequence of insectotoxin I-1 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. transl. Bioorg. Khim.) 3,366-372.
- Zlotkin E., Miranda F. y Rochat H. (1978) Chemistry and pharmacology of Butrinae scorpion venoms. Handb. Exp. Pharm. 48, 317-369.
- Zuckerkind E. (1968) La evolución de la hemoglobina. En: La Base Molecular de la Vida. Selecciones de Scientific American. Editorial Blume, Madrid. pp. 388-397.