

# Toxinas naturales como "herramientas experimentales" en Neurobiología

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

## Abstract

The venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* contains several neurotoxic peptides, which 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  $\text{Na}^+$  channel blocker, tetrodotoxin. In contrast, the release of GABA evoked by the short chain peptide ( $\approx 4000$  M. w.) II-II called noxiustoxin (NTX) is not modified by tetrodotoxin.  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (verapamil or  $\text{Co}^{2+}$ ) or the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  prevents the releasing effects of the 3 toxins. In synaptosomes, the two long chain toxins increase  $^{22}\text{Na}^+$  permeability and NTX decreases  $^{86}\text{Rb}^+$  permeability. The  $\text{K}^+$  ionophore valinomycin completely inhibits the release induced by NTX, as well as that evoked by the  $\text{K}^+$  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  $\text{K}^+$  permeability, and that transmitter release in response to toxins II-9 and II-10 to a depolarization mediated by the increase in  $\text{Na}^+$  permeability. The external  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of the 3 toxins to evoked release is related to the activation of voltage sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  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 alacrán 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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Ca}^{2+}$  externo. En sinaptosomas, los dos péptidos "largos" aumentan la permeabilidad al  $^{22}\text{Na}^+$  y el II-11 o NTX disminuye la permeabilidad al  $^{86}\text{Rb}^+$ . La NTX, al igual que el blo-

queador de los canales de  $\text{K}^+$ , 4-aminopiridina, no evoca liberación de GABA de sinaptosomas previamente tratados con el ionóforo de  $\text{K}^+$  valinomicina. Con base en estos resultados, se propone que la liberación del transmisor evocada con NTX, está mediada por una despolarización en respuesta a la disminución de la permeabilidad al  $\text{K}^+$  y la evocada por las toxinas II-9 ó II-10 por una despolarización como resultado del aumento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ . La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo que exhiben las 3 toxinas para inducir liberación es secundaria y se relaciona con la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como consecuencia de la despolarización. 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.

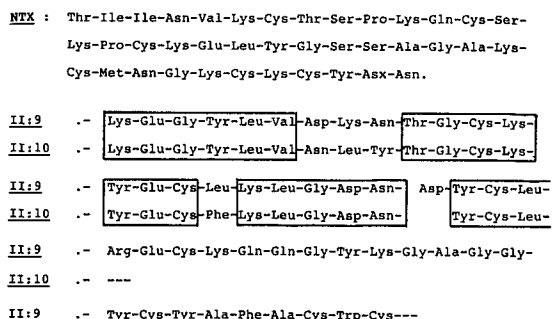
Antes de iniciar cualquier estudio con una toxina potencialmente interesante, es necesario que la toxina en cuestión haya sido purificada.

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 Possani<sup>(6, 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>(6, 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).



**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* Hoffmann.

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<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> y la NTX bloqueando la de K<sup>+</sup><sup>(5)</sup>.

Por mucho tiempo se pensó que el modelo de 2 canales, uno de Na<sup>+</sup> y otro de K<sup>+</sup>, 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>+</sup><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<sup>+</sup>.

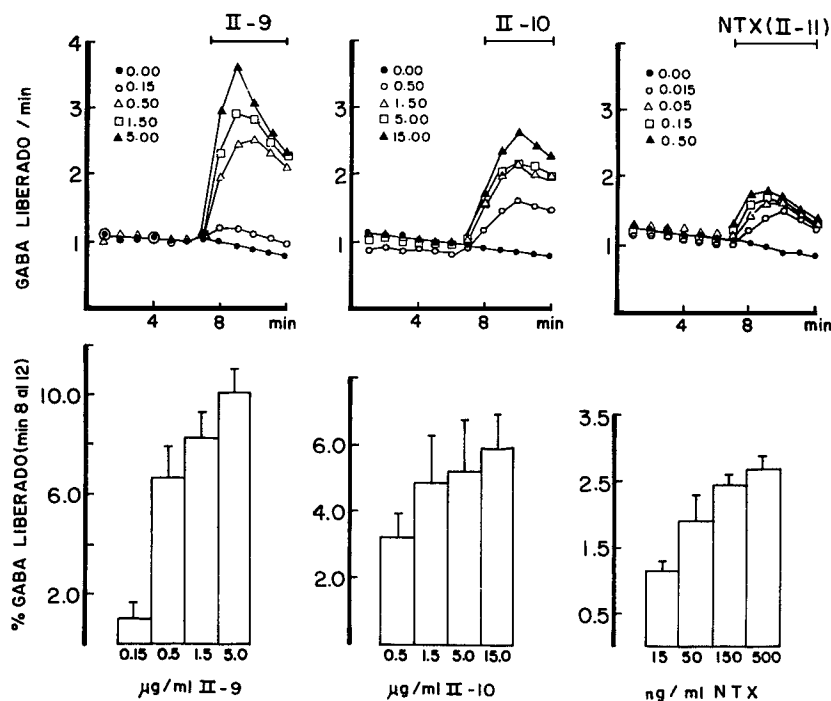
Esta diferencia hacía interesante conocer el tipo de efecto que pudiera ejercer la toxina II-10 de *C. noxius* sobre la liberación de neurotransmisores y sobre los movimientos de Na<sup>+</sup> directamente en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas). Considerando que también la toxina II-9, que 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<sup>+</sup> 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>+</sup><sup>(5)</sup>, en la liberación de transmisores y en los movimientos de K<sup>+</sup> 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>3</sup>H] 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-oxiacético 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 eflujo de  $^{86}\text{Rb}^+$  según el método de Sitges y col.<sup>(23)</sup> y para los movimientos de  $\text{Na}^+$  se midió el eflujo 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 podría 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

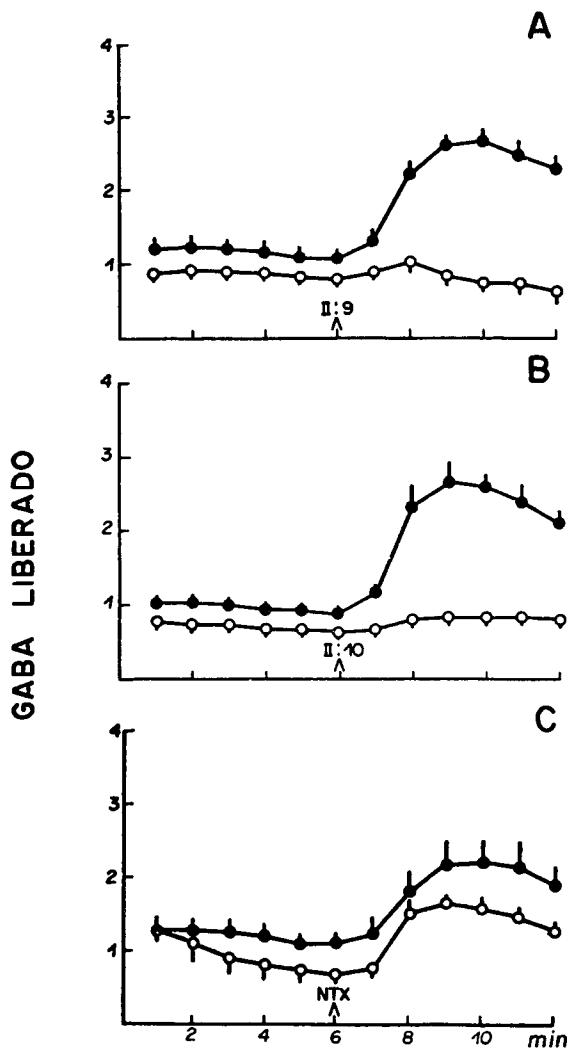
permeabilidades relativas a ciertos iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y pasivamente la de  $\text{Cl}^-$ ) era posible que una alteración selectiva de dichas permeabilidades, por efecto de las toxinas, fuera la causa que estaba desencadenando la liberación del transmisor.

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 e 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. CARACTERIZACION 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 eflujo de  $^{22}\text{Na}^+$  de sinaptosomas previamente cargados con el ión 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 ión, 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*

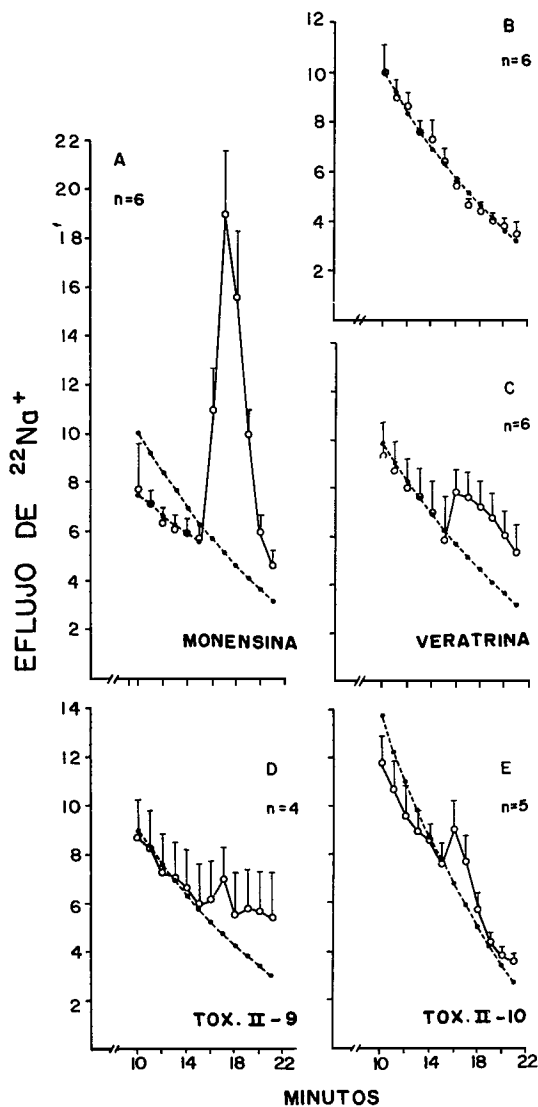
Para bloquear los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  contenidos en las membranas de sinaptosomas, éstos fueron perfundidos con un Ringer normal que contenía un bloqueador orgánico (verapamil) o un bloqueador inorgánico (cobalto). La presencia de cualquiera de dichos bloqueadores impidió a las 3 toxinas de *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. CARACTERIZACION DEL EFECTO LIBERADOR EVOCADO POR NTX

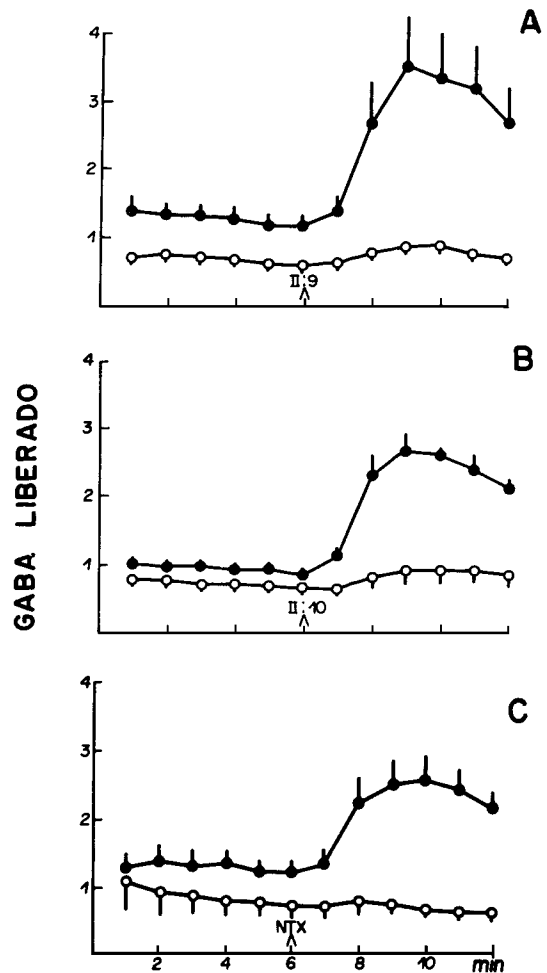
La posibilidad de que la NTX estimulara la libera-



**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 Tris. Esta suspensión sinaptosomal (1.5 mg/ml) se cargó con 25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  (radioact. esp. 13 mCi/mmol) de  $^{22}\text{Na}^+$  durante una hora. Trascurrido 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 portafiltros Millipore conectado a una bomba de vacío de 3/4 HP. Los filtros con los sinaptosomas cargados con  $^{22}\text{Na}^+$  se trasladaron rápidamente a las cámaras de perfusión conectadas a una bomba peristáltica. Se precedió 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 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , (D) toxina II-9 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , (E) toxina II-10 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , (minutos 16 a 22) se expresa como % del contenido total de ra-

dioactividad en los sinaptosomas en el momento de la adición del fármaco. Las líneas punteadas representan el eflujo 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.

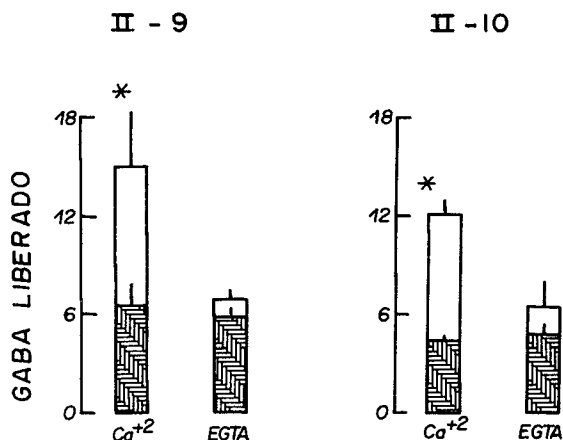
ción de GABA, aumentando la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  a través de los canales sensibles a voltaje, estaba descartada con base en los resultados obtenidos con TTX (Fig. 3).



**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. noxius*. Los sinaptosomas fueron perfundidos con el Ringer normal (o) o con un Ringer normal en el cual el  $\text{CaCl}_2$  fue sustituido por  $\text{CoCl}_2$  (o). En el minuto indicado por la flecha ambos ringers contenían 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina II-9 (A), 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina II-10 (B) ó 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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 inhibía 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  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales sensibles a verapamil y a  $\text{Co}^{2+}$ . Había entonces que determinar si la NTX activaba directamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{K}^+$  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.

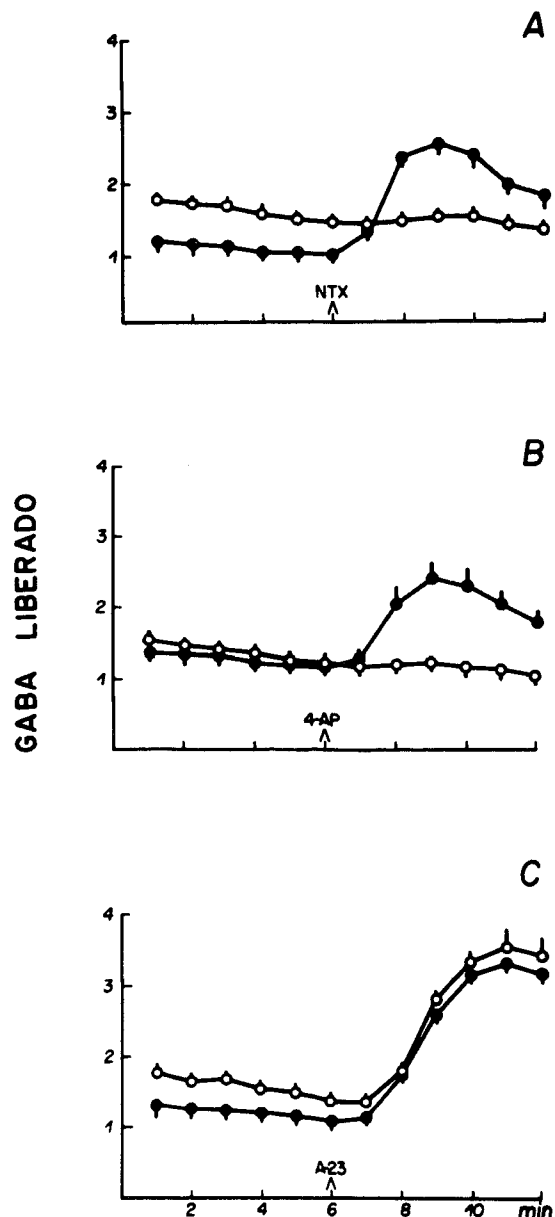


**Figura 6.** La liberación de GABA en respuesta a las toxinas II-9 y II-10 se inhibe en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. La zona blanca de las barras expresa el % de  $^3\text{H}$ -GABA liberado durante 5 minutos de exposición de los sinaptosomas a las toxinas II-9 o II-10, disueltas en un Ringer normal ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o en un Ringer sin  $\text{CaCl}$  y con EGTA  $50 \mu\text{M}$  (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 $\text{K}^+$

Para distinguir entre la liberación mediada por un aumento directo de la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  o una disminución directa de la permeabilidad al  $\text{K}^+$  (que despolarizaría la membrana y activaría la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ), los sinaptosomas fueron tratados con el ionóforo de  $\text{K}^+$  valinomicina para aumentar, en forma independiente de canales, su permeabilidad al  $\text{K}^+$ . Si el efecto de la NTX sobre la liberación de GABA estaba mediado por una disminución de la permeabilidad al  $\text{K}^+$  por canales de  $\text{K}^+$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\text{K}^+$ ), fue capaz de inducir liberación en presencia de valinomicina. En contraste, la liberación de GABA evocada por un aumento en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (inducido por el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , A-23 187), no se inhibió con valinomicina.

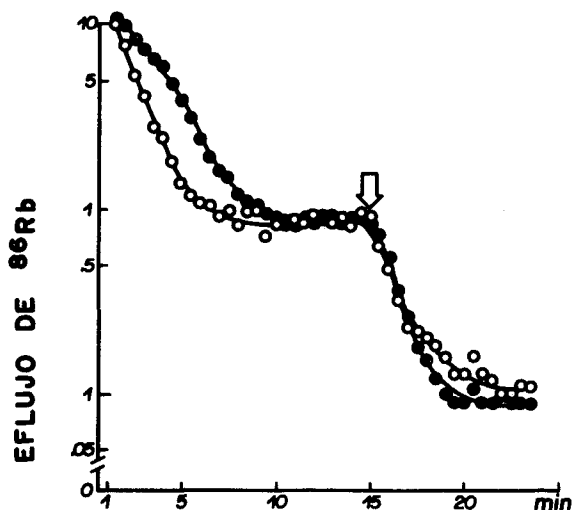


**Figura 7.** Modificación de la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA inducida por NTX, 4-AP y A-23187 de sinaptosomas tratados con el ionóforo de  $\text{K}^+$  valinomicina. Los sinaptosomas fueron perfundidos con un Ringer normal sin (o) valinomicina (o). En el minuto indicado por  $\uparrow$  se añadió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

#### Efecto de la NTX en la permeabilidad al $\text{K}^+$ de los sinaptosomas

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

contestar esto, se estudió la acción de la NTX en el eflujo 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 eflujo 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 eflujo 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 nuevo, 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 veratridina<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 mas 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 pozas 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 mas 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  $\text{K}_d$  de  $300\ \text{nM}$  para disminuir la corriente de  $\text{K}^+$ <sup>(5)</sup>, mientras que la 4-AP y el tetraetilamonio (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<sup>(23)</sup>. 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 interactuando 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 Miguel Alemán.

#### REFERENCIAS

1. AGNEW W S, LEVINSON S R, BRABSON J S, RAFTERY 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.
2. ARMSTRONG C M, BINSTOCK L: Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol* 48: 859-872, 1965.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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 París* 79: 179-184, 1984.
7. 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.
8. CATTERALL W A: The emerging molecular view of the sodium channel. *Trends. Neurosci* 5: 303-305, 1982.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. HAJOS F: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res* 136: 387-392, 1975.
14. HOWARD B D, GUNDERSEN Jr C B: Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 20: 307-336, 1980.
15. 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.
16. KRUEGER B K, BLAUSTEIN M P: Sodium channels in presynaptic nerve terminals. *J Gen Physiol* 76: 287-313, 1980.
17. 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.
18. 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.
19. 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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, 1976.