



153
240

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACION DE LOS CANALES DE SODIO SENSIBLES
A VERATRIDINA EN SINAPTOSOMAS.**

T E S I S
que para obtener el título de
BIOLOGO
Presenta:
José Fernando Peña Ortega

Director de tesis: Dra. María Sitges Berrondo

México, D.F. 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Regulación de los canales de sodio sensibles a veratridina en sinaptosomas

realizado por José Fernando Peña Ortega

con número de cuenta 8805794-9 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. María Sitges Berrondo

Handwritten signature: María Sitges Berrondo

Propietario Dr. Julio Morán Andrade

Propietario Dr. Mauricio Díaz Muñoz *M. Díaz Muñoz*

Suplente Dra. Herminia Pasantes Morales

Handwritten signature: H. Pasantes Morales

Suplente Dr. Jesús Manuel León Cázares

Handwritten signature: J. M. León Cázares

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de Asesoría de Biología

Large handwritten signature: Alejandro Martínez Mena

M. en C. Alejandro Martínez Mena

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

**A mi familia toda, en particular a Catalina
por su ejemplo de solidez y perseverancia
y simplemente por ser mi madre.**

Deseo hacer patente mi agradecimiento:

**A la Dra. María Sitges Berrondo, por sus enseñanzas invaluable, por su
paciencia y comprensión y por su apoyo incondicional, no únicamente en la
elaboración de este trabajo.**

**Al Dr. Ricardo Rodríguez, a la Biol. Luz María Chiu y a la Q.F.B. Araceli
Guarneros por el gran apoyo teórico, técnico y humano, que sin reservas me brindaron**

**A los miembros del jurado: Dr. Julio Morán, Dr. Mauricio Díaz, Dra. Herminia
Pasantes y Dr. Jesús Manuel León Cázares por los valiosos comentarios y sugerencias
que le hicieron a este trabajo durante su cuidadosa revisión.**

**A los compañeros con los que compartí los E.T.E.C.C. de la Facultad de Ciencias
(José, Argelia, Higinio, Mayra, Luis, Yolanda, Janet, Vinicio, Elizabeth y anexas) por el
encontrar juntos un sentido para nuestra labor cotidiana.**

INDICE

I- Antecedentes Generales	1
Ia- Canal de Sodio Sensible a Voltaje (CSSV)	3
Ib- Farmacología del CSSV	6
Ic- Regulación del CSSV	11
II- Introducción	22
III- Materiales y Métodos	25
IV- Resultados	30
V- Discusión	39
VI- Conclusiones	44
VII- Bibliografía	45

I- ANTECEDENTES GENERALES

La comunicación entre las células nerviosas se lleva a cabo en ciertas zonas denominadas sinapsis. En estas estructuras se pueden dar tres tipos de transmisión: eléctrica, química o ambas.

En la sinapsis química, el espacio entre las membranas pre y postsináptica (espacio intersináptico), evita la difusión directa de la corriente despolarizante propagada por el axón, hacia la siguiente neurona. En su lugar, las terminales nerviosas liberan a la hendidura sináptica, una sustancia denominada neurotransmisor; que a su vez, incidirá sobre receptores específicos ubicados en la región postsináptica (Kuffler y cols, 1984).

La invasión de la terminal nerviosa por un potencial de acción, conlleva una onda despolarizante de la membrana de la terminal (Bradford, 1988). Este potencial de acción consta de dos etapas secuenciales. La primera, es un incremento de la conductancia al Na^+ , por la apertura de los canales de sodio sensibles a voltaje (CSSV), lo que provoca la despolarización de la membrana por la entrada de Na^+ al interior celular; posteriormente un incremento de la conductancia al K^+ por la apertura de los canales de potasio sensibles a voltaje y la salida de K^+ de la célula, revierte el efecto despolarizante derivado del aumento en la permeabilidad al Na^+ . Finalmente, las concentraciones de Na^+ y K^+ en ambos lados de la membrana, es restablecida por la bomba Na^+/K^+ , pues ésta mete al K^+ y saca al Na^+ del interior celular, a contragradiente, con gasto de ATP (Kandel y cols, 1991).

Por lo general, la comunicación entre las neuronas es de naturaleza electroquímica. La parte eléctrica de la comunicación nerviosa está relacionada con las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana por medio de canales, que modifican el potencial de ésta y la parte química se relaciona con los neurotransmisores que se liberan de las terminales nerviosas en respuesta a los

I- ANTECEDENTES GENERALES

La comunicación entre las células nerviosas se lleva a cabo en ciertas zonas denominadas sinapsis. En estas estructuras se pueden dar tres tipos de transmisión: eléctrica, química o ambas.

En la sinapsis química, el espacio entre las membranas pre y postsináptica (espacio intersináptico), evita la difusión directa de la corriente despolarizante propagada por el axón, hacia la siguiente neurona. En su lugar, las terminales nerviosas liberan a la hendidura sináptica, una sustancia denominada neurotransmisor; que a su vez, incidirá sobre receptores específicos ubicados en la región postsináptica (Kuffler y cols, 1984).

La invasión de la terminal nerviosa por un potencial de acción, conlleva una onda despolarizante de la membrana de la terminal (Bradford, 1988). Este potencial de acción consta de dos etapas secuenciales. La primera, es un incremento de la conductancia al Na^+ , por la apertura de los canales de sodio sensibles a voltaje (CSSV), lo que provoca la despolarización de la membrana por la entrada de Na^+ al interior celular; posteriormente un incremento de la conductancia al K^+ por la apertura de los canales de potasio sensibles a voltaje y la salida de K^+ de la célula, revierte el efecto despolarizante derivado del aumento en la permeabilidad al Na^+ . Finalmente, las concentraciones de Na^+ y K^+ en ambos lados de la membrana, es restablecida por la bomba Na^+/K^+ , pues ésta mete al K^+ y saca al Na^+ del interior celular, a contragradiante, con gasto de ATP (Kandel y cols, 1991).

Por lo general, la comunicación entre las neuronas es de naturaleza electroquímica. La parte eléctrica de la comunicación nerviosa está relacionada con las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana por medio de canales, que modifican el potencial de ésta y la parte química se relaciona con los neurotransmisores que se liberan de las terminales nerviosas en respuesta a los

cambios en el potencial eléctrico de la membrana. Estos transmisores químicos, tienen receptores específicos que producen una respuesta en la postsinapsis.

En cuanto a las propiedades eléctricas de la membrana de las neuronas, éstas resultan de una diferencia de potencial transmembranal. La diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la membrana depende de los gradientes de concentración iónica y de la permeabilidad relativa de la membrana a los distintos iones. En la membrana en reposo, la permeabilidad al K^+ es mucho mayor que al Na^+ , por lo tanto, los iones K^+ tienden a abandonar la célula a favor de su gradiente electroquímico, lo que produce un potencial eléctrico negativo en el interior celular con respecto al exterior. Es la disposición de los iones de K^+ , en ambos lados de la membrana, lo que determina en gran medida la diferencia de potencial de ésta. Pero otros iones como el Na^+ , el Cl^- y el Ca^{2+} también contribuyen de manera secundaria en la determinación de este potencial. En ese sentido, la ecuación de Goldman considera tanto las concentraciones como las permeabilidades relativas de todos los iones en conjunto (Kuffler y cols, 1984) para calcular el potencial de membrana de la siguiente manera:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}[Na]_o + P_K[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$$

Donde E es el potencial de membrana, R es la constante de los gases (8.31 joules(J)/deg/mol), T es la temperatura absoluta en grados kelvin ($^{\circ}C -273.2$), F es la constante de Faraday (96,500 coulombs(C)/mol) y P es la permeabilidad relativa (Hille y Catterall, 1994).

La diferencia de potencial de una membrana en reposo puede perturbarse en dos sentidos: hiperpolarizarse, cuando el interior se hace aun más negativo con respecto al exterior y despolarizarse, cuando el interior se hace positivo con respecto al exterior. Además del estímulo eléctrico, la despolarización puede provocarse experimentalmente por (véase la ecuación de Goldman): 1) aumento de la

concentración externa de K^+ , 2) disminución de la permeabilidad al K^+ (noxiustoxina, 4-aminopiridina), 3) aumento en la permeabilidad al Na^+ (monensina, veratridina, toxinas de escorpiones) y 4) aumento en la permeabilidad al Ca^{2+} (ionóforo A23187). Todas estas condiciones producen o aumentan la liberación de neurotransmisores (Sitges, 1993).

El concepto tradicional de los fenómenos que conducen a la liberación de los neurotransmisores, establece que la fusión de la membrana presináptica con membranas de las vesículas en las que se almacena el neurotransmisor, en zonas delimitadas de contacto, provoca la expulsión de paquetes o "cuantos" de muchos miles de moléculas de neurotransmisor a la hendidura sináptica mediante un proceso denominado exocitosis (Bradford, 1988). Cuando la membrana de la terminal se despolariza por la entrada de Na^+ vía los CSSV, las proteínas que conforman a los canales de calcio sensibles a voltaje, sufren un cambio conformacional, que permite a los iones Ca^{2+} entrar al citoplasma desde el exterior, a favor de su gradiente electroquímico. Según la "hipótesis del calcio", el aumento en la concentración intraterminal de este catión, dispara la liberación del mensajero químico (Katz y Miledi, 1967).

Como se puede ver, en los fenómenos de propagación del impulso nervioso a través del axón, así como en la despolarización de las terminales sinápticas que desencadena la liberación del neurotransmisor, participan de manera determinante los CSSV (Fig 1), entidad molecular que a continuación se describe:

Ia- CANAL DE SODIO SENSIBLE A VOLTAJE

El CSSV es el responsable del flujo de Na^+ durante la fase inicial del potencial de acción en las células nerviosas, en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco. Las características del CSSV fueron descritas inicialmente en 1952 por Hodgkin y Huxley.

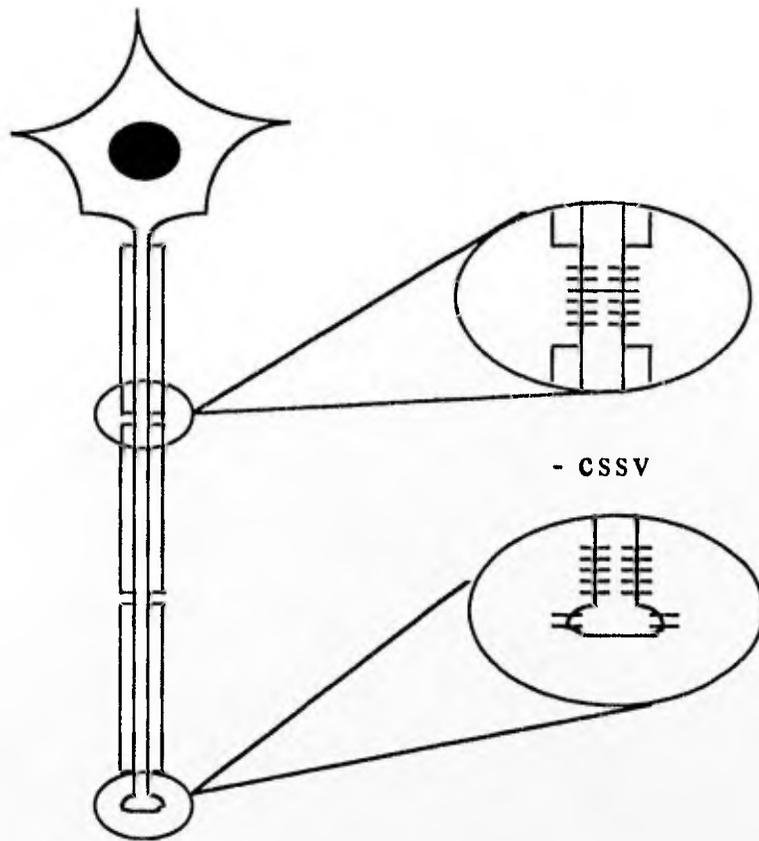


Figura 1. Localización de las zonas con mayor densidad de canales de sodio sensibles a voltaje en las neuronas.

El incremento en la permeabilidad al Na^+ durante la despolarización en el axón gigante de calamar, es bifásica. Es decir, cuando el axón es despolarizado, la permeabilidad al Na^+ se incrementa de manera importante para después de 1 milisegundo regresar a su nivel basal. Hodgkin y Huxley (1952) describen esta conducta bifásica en términos de dos procesos que controlan la función del CSSV: el primero, la activación, controla la dependencia al voltaje del incremento de la permeabilidad al Na^+ durante la despolarización, y el segundo, la inactivación, controla la tasa del retorno subsecuente de la permeabilidad al Na^+ a su nivel basal durante una despolarización mantenida.

De esta manera, puede decirse que el CSSV presenta tres estados o grupos de estados: en reposo, activo e inactivo. El estado en reposo y el inactivo, son no conducentes de la corriente de Na⁺. Los experimentos de fijación de voltaje definen tres propiedades funcionales esenciales del CSSV: activación e inactivación dependientes de voltaje y transporte iónico selectivo (Catterall, 1986).

El análisis electroforético de la preparación purificada del CSSV en gel con dodecil sulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol reveló que el CSSV está constituido de tres subunidades: la subunidad α de 260 kDa, la $\beta 1$ de 36 kDa y la $\beta 2$ de 33.3 kDa. La comparación de geles con SDS de muestras desnaturalizadas con y sin reducción de puentes disulfuro por β -mercaptoetanol, mostraron que la subunidad α y la subunidad $\beta 2$ están unidas covalentemente por puentes disulfuro. Los tres polipéptidos comigran como un complejo de 329 kDa bajo condiciones nativas con una estequiometría de 1:1:1 (Catterall y cols, 1988).

Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ son similares en tamaño, pero difieren en otros aspectos. La $\beta 1$ puede ser marcada por derivados de toxinas de escorpión mientras que la $\beta 2$ no (Sharkey y cols, 1984). La $\beta 2$ está unida a la subunidad α por puentes disulfuro mientras que la $\beta 1$ no. Finalmente, los mapas proteolíticos de las dos subunidades por medio de cuatro diferentes proteasas, muestran patrones de digestión distintos (Messner y Catterall, 1985).

Numerosas evidencias giran en torno a manifestar que la subunidad α es un polipéptido transmembranal y que además su superficie extracelular es glucosilada. Todas las secuencias conocidas de esta subunidad contienen cuatro dominios de 231 a 237 aminoácidos con una gran homología, cada uno de los cuales, por análisis de hidrofobicidad, presenta seis segmentos transmembranales (Kallen y cols, 1994). Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ también son altamente glucosiladas (alrededor del 30% de su masa son carbohidratos) y al parecer sólo están expuestas al medio extracelular (Messner y Catterall, 1985), aunque recientemente por el análisis del DNAC que

codifica para la subunidad $\beta 1$, se observó la presencia de una secuencia líder y un único segmento transmembranal, lo cual sugiere que una porción pequeña de esta subunidad se extiende hacia el citoplasma (Isom y cols, 1992).

Todo parece indicar que la subunidad α , es el canal por el que el Na^+ atraviesa la membrana plasmática. Entre los cationes inorgánicos monovalentes, el orden de permeabilidad a través del CSSV, es el siguiente: $\text{Na}^+ \approx \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ (Hille, 1972).

Ib- FARMACOLOGIA DEL CSSV

Las técnicas de fijación de voltaje proveen de información detallada sobre la naturaleza de la corriente de Na^+ mediada por el CSSV, pero estas técnicas son solamente aplicables a membranas intactas. El estudio bioquímico del canal de sodio ha sido facilitado por el uso de numerosas neurotoxinas que se unen con alta afinidad y especificidad al CSSV y alteran sus propiedades (Catterall, 1986).

Un gran número de toxinas biológicas ejercen sus efectos tóxicos al modificar las propiedades del CSSV. Estas incluyen a las guanidinas heterocíclicas tetrodotoxina y saxitoxina; a los compuestos policíclicos liposolubles veratridina, aconitina, batracotoxina y grayanotoxinas; y a polipéptidos tóxicos aislados del veneno de escorpiones, nematocistos de anémonas y corales y de algunos moluscos (Catterall, 1980; Kallen y cols, 1994).

TOXINAS QUE INHIBEN AL CSSV

La tetrodotoxina (TTX) (Fig 2) es una guanidina heterocíclica encontrada originalmente en los ovarios y el hígado de peces del género Gymnodontes y más recientemente en algunas especies de tritones, pulpos, ranas y gobios (Brown y Mosher, 1963; Crone y cols, 1976; Kim y cols, 1975; Sheumack y cols, 1978; Noguchi y Hashimoto, 1973). *In vivo*, la TTX tiene efectos tóxicos sobre los sistemas neuromuscular, cardiovascular y respiratorio (Kao, 1966; Evans, 1972; Narahashi,

1974). Es probable que estos efectos se deban al bloqueo del potencial de acción por la toxina. Algunos experimentos en el axón gigante del calamar mostraron que en bajas concentraciones (10^{-7} M) la TTX bloquea selectivamente la permeabilidad al Na^+ causada por la despolarización, sin afectar la permeabilidad al K^+ (Narahashi y cols, 1964; Nakamura y cols, 1965). La acción de la TTX es reversible después de lavada la preparación (Narahashi y cols, 1964). La toxina es inactiva cuando es perfundida dentro del axón gigante, lo que indica que el receptor se encuentra únicamente en la parte externa del canal (Narahasi y cols, 1966). Estos hallazgos son consistentes con una interacción reversible de la TTX con un sitio receptor localizado en la cara extracelular del CSSV. Las curvas de inhibición hiperbólicas indican que la unión de una molécula de toxina es suficiente para inhibir un CSSV (Catterall, 1980).

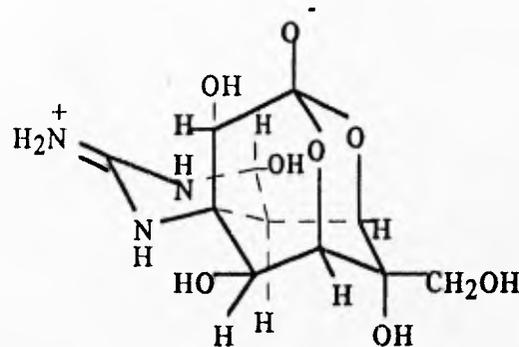


Figura 2. Estructura de la tetrodotoxina (TTX).

La saxitoxina (STX), como la TTX, es una guanidina heterocíclica. La saxitoxina es producida por dinoflagelados del género *Gonyaulax* sp. y se encuentra en grandes concentraciones en almejas, mejillones y otros moluscos que los consumen. En términos generales, la STX presenta los mismos efectos y características de la TTX (Catterall, 1980).

La unión de [^3H]-TTX a su sitio receptor, es desplazada por STX (Colquhoun y cols, 1972; Barnola y cols, 1973), y la unión de [^3H]-STX también es desplazada por TTX (Henderson, 1973). Estos experimentos proveen de evidencia sólida acerca de que

estas dos toxinas se unen al mismo sitio en el CSSV. Múltiples resultados indican que la TTX y la STX se unen de la misma manera al CSSV en su estado en reposo, activo o inactivo, lo que sugiere que el sitio receptor a estas toxinas no está en el componente sensible a voltaje (Catterall, 1980). Estos resultados refuerzan la hipótesis de Kao y Nishiyama (1965) en la cual proponen que la STX y la TTX bloquean el transporte iónico directamente.

Un polipéptido pequeño aislado del molusco Conus geographicus, la μ -conotoxina también al parecer se une a este mismo sitio en el canal y provoca los mismos efectos que las toxinas anteriores (Kallen y cols, 1994).

TOXINAS LIPOSOLUBLES QUE MODIFICAN LA ACTIVACION E INACTIVACION DEL CSSV

Varios compuestos liposolubles aislados de diversas especies de plantas y de ranas tropicales, han demostrado efectos muy notorios sobre las membranas excitables. Los más profundamente estudiados son la veratridina, la batracotoxina, la aconitina y las grayanotoxinas (Catterall, 1980).

El alcaloide esferoideo veratridina (Fig. 3), es el más potente de una mezcla de alcaloides producidos por plantas de la familia *Lilaceae*. La veratridina tiene un amplio espectro farmacológico: causa contracción muscular, impulsos nerviosos repetitivos y arritmias cardiacas (Kramer y Acheson, 1946). Los efectos pueden adscribirse a la alteración del CSSV, que provoca una hiperexcitabilidad y despolarización de membranas excitables. Straub (1954) mostró que la veratridina causa despolarización de células nerviosas por incremento de la permeabilidad al Na^+ . Después se demostró que la veratridina, modifica las propiedades de la fracción sensible a voltaje del CSSV (Ulbricht, 1969) y aumenta la $[\text{Na}^+]_i$ (Deri y Adam-Vizi, 1993). Por las modificaciones en las propiedades dependientes del voltaje del canal, la veratridina hace la inactivación 100 veces más lenta, y cambia la dependencia al voltaje de la activación a valores más negativos del potencial de membrana, de tal forma, que una fracción de los CSSV

modificados, son activos al potencial de membrana en reposo. Así, la despolarización de células excitables por la veratridina, se debe a dos efectos: al bloqueo de la inactivación y al cambio de la activación a valores más negativos del potencial de membrana. La permeabilidad inducida por la veratridina, es bloqueada por TTX de manera no competitiva (Ulbricht, 1969; Straub, 1954; Catterall, 1975a), lo que da sustento a la conclusión de que la veratridina modifica las propiedades de la fracción de los canales de Na⁺ que participan en la generación del potencial de acción en las neuronas, además del hecho de que la TTX y la veratridina se unen a sitios diferentes en el CSSV.

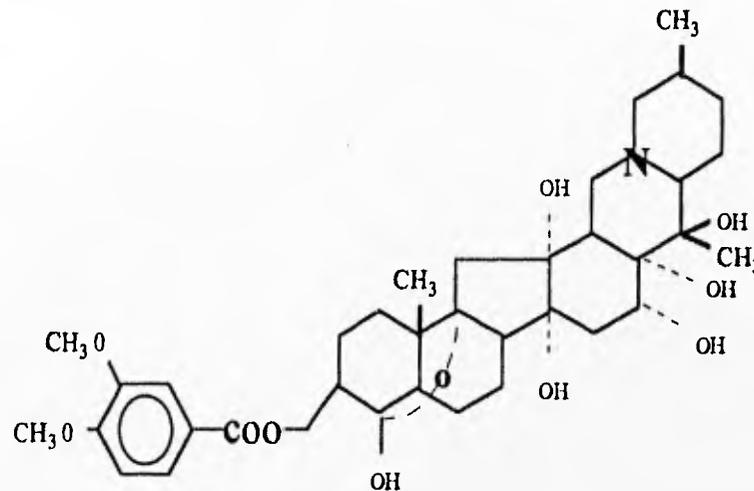


Figura 3. Estructura de la veratridina

La batracotoxina es un alcaloide esteroideo que se encuentra en la piel de la rana colombiana *Phyllobates aurotaenia* y especies relacionadas. La aconitina, es un alcaloide producido por la planta *Aconitum napellus* y las grayanotoxinas I, II y III son toxinas contenidas principalmente en plantas miembros de la familia *Ericaceae* (Catterall, 1980).

Los mecanismos de acción de todas estas toxinas liposolubles, incluyendo a la veratridina, son semejantes. En todos los casos la dependencia al voltaje de la activación del CSSV se cambia a valores más negativos del potencial de membrana (Khodorov, 1978; Ulbricht, 1969; Seyama y Narahashi, 1973;). La veratridina, la

batracotoxina, la aconitina y las grayanotoxinas, bloquean completamente la inactivación de los canales transformados y alteran la selectividad iónica del CSSV (Khodorov, 1978; Mozhayeva y cols, 1977; Ulbricht, 1969; Hironaka y Narahashi, 1977). Además, por experimentos en células de neuroblastoma en los que se han demostrado interacciones competitivas entre estas cuatro toxinas liposolubles (Catterall, 1977; Catterall, 1975b), se sabe que actúan sobre el mismo sitio en el CSSV.

En resumen, hasta hoy se propone que el CSSV presenta seis sitios de unión a toxinas. El sitio receptor I, une TTX, STX y μ -conotoxina, lo cual inhibe el transporte iónico. Este sitio puede localizarse dentro o en el extremo externo del poro (subunidad α) del CSSV. El sitio receptor II, une a la veratridina, a la batracotoxina, a la aconitina y a las grayanotoxinas. Puesto que estas toxinas alteran tanto la activación como la inactivación, este sitio puede ser localizado sobre una región del CSSV importante para estos dos procesos dependientes del voltaje. El sitio receptor II, puede cambiar de conformación durante la activación e inactivación del canal, ya que los ligandos para este sitio, modifican la activación, bloquean la inactivación y causan activación persistente por unirse más fuertemente al estado (o estados) activo del CSSV (Catterall, 1980).

El sitio receptor III, une polipéptidos aislados del veneno de escorpiones norafricanos (α -toxinas) y de nematocistos de anémonas. Estas toxinas disminuyen o bloquean la inactivación del CSSV. También aumentan la activación persistente por las toxinas liposolubles que actúan sobre el sitio II. La afinidad de unión de estas toxinas marcadas con ^{125}I es reducida por despolarización. Estos resultados indican que las toxinas se unen a una parte del canal de sodio que participa en la inactivación.

Las β -toxinas aisladas de escorpiones americanos, tal como la *Tityus*- γ -toxina, se unen al sitio IV del canal (Catterall, 1986), que se postula, se localiza en la parte extracelular. La unión de estas toxinas con su sitio receptor en el CSSV, provoca alteraciones en la dependencia del voltaje de la activación del mismo (Kirsch y cols,

1989). En contraste, con las toxinas que se unen al sitio III, las β -toxinas de escorpión, no afectan alostéricamente la acción de las toxinas que se unen al sitio II.

Los sitios V y VI, se les asigna a aquellas toxinas que no se unen a los otros sitios antes mencionados. La brevetoxina se une externamente al sitio V, y aumenta los efectos de las toxinas que se unen al sitio II y no compiten con los polipéptidos que actúan sobre el sitio III (Atchinson y cols, 1986; Poli y cols, 1986). Una toxina aislada del coral Goniopora sp se une al sitio VI y evita la inactivación, sin competir con las toxinas que se unen al sitio II (Gonoi y cols, 1986).

Se sabe también que los anestésicos locales y los antiarrítmicos tipo I, interactúan sobre uno o varios sitios receptores localizados en la fase acuosa o lipídica de la membrana. En ambos casos, estas drogas provocan una inhibición de la actividad del canal de sodio, este efecto se aumenta cuando las membranas son estimuladas repetidamente (Hille, 1977; Woosley, 1991).

Ic- REGULACION DEL CSSV

Las neuronas, como todas las células en general, presentan múltiples mecanismos que les permiten controlar su repertorio proteico. Dichos mecanismos van desde el control mismo de la expresión de proteínas, hasta interacciones covalentes o no covalentes de estas moléculas cuando ya están expresadas. Hasta la fecha, se ha planteado que dos mecanismos celulares, que actúan cuando la proteína ya está expresada, tienen efectos sobre la actividad del CSSV. Uno, es el del proceso de fosforilación-desfosforilación de proteínas y el otro es el de una modulación alostérica a partir de interacciones con otras proteínas, que hoy se piensa, es un mecanismo controlado principalmente por la calmodulina y/o el citoesqueleto. A continuación se describen estos dos procesos y su influencia sobre los CSSV.

FOSFORILACION DE PROTEINAS

La fosforilación de proteínas es un mecanismo generalizado en la regulación de la actividad biológica (Nestler y Greengard, 1994). Una proteína cinasa, su sustrato y una fosfatasa, constituyen un sistema de fosforilación de proteínas. Las estructuras sinápticas son muy ricas en tales sistemas y existen múltiples evidencias de que muchos aspectos de la función sináptica son regulados por fosforilación reversible de proteínas sinápticas (Rodnight y Wofchuk, 1992).

Las proteínas cinasas son clasificadas de diferentes maneras. Una clasificación se hace a partir del aminoácido al cual estas enzimas unen covalentemente el grupo fosfato. De esta manera se conocen como proteínas cinasas de serina y treonina, las que fosforilan sustratos proteicos sobre residuos de serina y treonina, o como proteínas cinasas de tirosina, aquellas que fosforilan a sus sustratos en residuos de tirosina. La mayoría de la fosforilaciones de proteínas, ocurren en residuos de serina (más del 95%), una pequeña cantidad sobre residuos de treonina (3 a 4%); y muy poca (menos del 1%) en residuos de tirosina. En todos los casos, la cinasa cataliza la transferencia del grupo fosfato γ -terminal del ATP, al grupo hidroxilo del residuo de aminoácido respectivo con requerimiento de Mg^{2+} para que se lleve a cabo la reacción. En la mayoría de los casos, las cinasas de serina/treonina se activan por segundos mensajeros, tales como el monofosfato de adenina cíclico (AMP_c), el monofosfato de guanina cíclico (GMP_c), el Ca^{2+} , y algunos fosfolípidos (Nestler y Greengard, 1994). Y es a partir de estos requerimientos, que se constituye otra clasificación, que aquí se toma como base para describir a las cinasas siguientes, principalmente aquellas que presentan mayor importancia para la fisiología del cerebro:

PROTEINAS CINASAS DEPENDIENTES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

En el cerebro de los mamíferos existen dos tipos distintos de proteínas cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, la proteína cinasa dependiente de AMP_c (PKA) y la proteína cinasa dependiente de GMP_c (PKG) (Nairn y cols, 1985).

Proteína cinasa dependiente de AMP.

La PKA existe como un tetrámero compuesto de dos tipos diferentes de subunidades. Dos reguladoras (R) y dos catalíticas (C). La unión del AMP, a las subunidades R provoca su disociación del tetrámero, lo que libera las dos subunidades con capacidad catalítica. El cerebro contiene altos niveles de esta enzima y entre las proteínas neuronales fosforiladas por ella están: la sinapsina I, la proteína III, el DARP-32, el receptor nicotínico de acetilcolina, el receptor β -adrenérgico, la tirosina hidroxilasa, neurofilamentos, la guanilato ciclasa, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y la GABA-modulina. Así como también, canales de potasio y el CSSV (Nairn y cols, 1985).

Proteína cinasa dependiente de GMP.

La PKG es un dímero con dos subunidades idénticas que contienen un dominio de unión a GMP, y un sitio catalítico. La unión del GMP, no conduce a la disociación de las dos subunidades. La PKG presenta una baja distribución en el tejido nervioso y pocos sustratos conocidos (Nestler y Greengard, 1994).

PROTEINAS CINASAS DEPENDIENTES DE CALCIO

Entre las proteínas cinasas dependientes de calcio se encuentran, las activadas por Ca^{2+} en unión con calmodulina, llamadas proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, y las proteínas cinasas que también dependen de Ca^{2+} pero además de fosfolípidos tales como el diacilglicerol, la fosfatidilserina y otros.

Proteínas cinasas dependiente de Ca^{2+} y calmodulina

El cerebro contiene 5 tipos de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, con diferentes propiedades. Estas son, la fosforilasa cinasa, la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y

calmodulina I, II y III. Estas enzimas, a excepción de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina II (CAMPK II), fosforilan un número limitado de sustratos bajo condiciones fisiológicas y por lo tanto, intervienen en pocas de las respuestas mediadas por Ca^{2+} en el sistema nervioso (Nestler y Greengard, 1994)

La CAMPK II tiene una amplia distribución en el cerebro y se le denomina "proteína cinasa multifuncional", ya que regula gran parte de las respuestas mediadas por calcio en buen número de tipos neuronales. Esta enzima contiene un dominio regulador, que en estado de reposo, se une e inhibe al sitio catalítico. Esta inhibición desaparece cuando el complejo Ca^{2+} /calmodulina se une al dominio regulador. Se han encontrado varias isoformas de esta enzima con masa entre 50 kDa y 60 kDa (Nestler y Greengard, 1994).

En contraste con las otras cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, las isoenzimas de la CAMPK II presentan muchos sustratos específicos asignados. Los sustratos de esta enzima incluyen a la sinapsina I, la proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2), la glicógeno sintetasa, la proteína tau, las tirosina y triptofano hidroxilasas, la proteína mielínica básica, la proteína ribosomal S6 y la fosfodiesterasa de nucleótidos sensible a Ca^{2+} y calmodulina (Nairn y cols, 1985).

Proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos

Las otras proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} , las activadas por Ca^{2+} junto con diacilglicerol, fosfatidilserina u otros fosfolípidos, se denominan proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y diacilglicerol o proteínas cinasas C (PKC). Se han clonado múltiples formas de PKC y se conoce que en el cerebro existen, al menos siete subespecies de esta enzima. Estas variantes presentan diferentes propiedades reguladoras y distribución celular. Por ejemplo, tienen distinta afinidad por Ca^{2+} y diacilglicerol. Sin embargo, estas enzimas son consideradas isoformas, ya que presentan la misma especificidad de sustratos. La PKC, existe bajo condiciones fisiológicas como un polipéptido de 80 kDa. Cada polipéptido contiene un dominio

regulador, que en estado de reposo se une al dominio catalítico, y lo inhiben. Esta inhibición es revertida cuando el Ca^{2+} y el diacilglicerol se unen al dominio regulador (Nestler y Greengard, 1994).

Además de las proteínas cinasas reguladas por Ca^{2+} , AMP, y GMP, se han identificado otras clases de proteínas cinasas de serina/treonina (Nairn y cols, 1985). Estas son reconocidas regularmente por los sustratos que fosforilan, pero no han mostrado tener influencia significativa en los fenómenos de regulación neuronal. Ejemplos de estas proteínas cinasas son: las cinasas de caseína I y II, las cinasas asociadas a microtúbulos I, II y III, la cinasa de rodopsina, la cinasa de neurofilamentos, etc. (Nestler y Greengard, 1994).

Finalmente se hará mención de las cinasas de tirosina. En este grupo existen tanto enzimas citosólicas como la *src*, proteínas nucleares, como la cinasa de la descarboxilasa de ornitina y proteínas que son receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de tirosina. Estos últimos, son los mejores caracterizados de la familia y tienen una topología molecular similar. Esto es, presentan un dominio extracelular de unión al ligando, una sola región transmembranal hidrófoba y un dominio citoplásmico, en el que reside la actividad de cinasa de tirosina (Robles-Flores, 1993).

INHIBIDORES DE LAS PROTEÍNAS CINASAS

Una de las estrategias más utilizadas para determinar el papel de la fosforilación en distintas respuestas celulares, es la utilización de inhibidores de la actividad de las cinasas y las fosfatasas (Hidaka y Kobayashi, 1994).

A la fecha, existe una gran diversidad de inhibidores de proteínas cinasas. Dentro de estos inhibidores podemos encontrar a la 1-(5-isoquinolinesulfonil)-2-metilpiperazina (H-7), la cual exhibe una selectividad relativa por la PKC, con una K_i de 6 μM (Hidaka y cols, 1984), pero también inhibe a la PKA (K_i de 3 μM) y a la PKG (K_i de

5.8 μM), entre otras. El H-7 no presenta efecto inhibitor sobre la CAMPK II (Hidaka y Kobayashi, 1994). Los análisis cinéticos revelan que la inhibición de la PKC por H-7, es competitiva con ATP; lo que demuestra que el H-7 inhibe a las cinasas, directamente sobre el sitio catalítico y no por medio de una interacción con el sitio regulatorio de la enzima (Hidaka y Kobayashi, 1992).

De gran relevancia en el estudio de la CAMPK II, el inhibidor sintético KN-62 [1-[N,O-bis(1,5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenil-piperazina], ha resultado ser un inhibidor específico de esta enzima (K_i de 0.9 μM). Para determinar el mecanismo de la inhibición de la proteína cinasa, fue medida la habilidad del KN-62 para competir con la unión de la calmodulina y el ATP con la enzima. Las pruebas doble-recíprocas, demostraron que el KN-62 inhibe a la enzima de una manera competitiva con calmodulina y no competitiva con ATP (Hidaka y Kobayashi, 1992).

Otro inhibidor de proteínas cinasas es la estaurosporina (alcaloide aislado de Streptomyces sp.). La estaurosporina, es un inhibidor muy efectivo de la PKC. La K_i de la estaurosporina para esta enzima es de 1 nM a 3 nM. (Kase y cols, 1987; Iida y cols, 1989 y Kobayashi y cols, 1989b). Sin embargo, la estaurosporina inhibe otras proteínas cinasas, que incluyen a la PKA (K_i de 8 nM) (Kobayashi y cols, 1989a), a la fosforilasa cinasa (Hannun y cols, 1986), a la pp60v-src (K_i de 6 nM) (Kobayashi y cols, 1989a) y a las cinasas de los receptores a EGF e IGF (Hannun y cols, 1986).

También existen compuestos catalogados como anticalmodulínicos, que presentan efectos inhibitorios sobre distintas cinasas. Obviamente, por su propia actividad anticalmodulínica, inhiben a las cinasas dependientes de esta proteína, pero como se verá en detalle más adelante, a concentraciones relativamente altas, estos compuestos también inhiben a la PKC.

DESFOSFORILACION DE PROTEINAS

El estado de fosforilación de los sustratos, depende tanto de la actividad de las cinasas como de la actividad de las fosfatasas. Con base en el residuo aminoácido

sobre el cual actúan, las fosfatasas como las cinasas, se dividen en dos tipos: las que hidrolizan el fosfato unido a serina o treonina y las que hidrolizan al fosfato unido a tirosina. Estas últimas, fueron descritas recientemente y el conocimiento que se tiene de ellas es escaso. Además, la subunidad catalítica de la familia de las fosfatasas de serina y treonina es totalmente diferente a la de las fosfatasas de tirosina, y por ende, no parecen estar relacionadas (Robles-Flores, 1993).

Una fosfatasa de proteínas, es una fosfoesterasa. Esta enzima, cataliza la hidrólisis de un grupo fosfato unido a un residuo de aminoácido hidroxilado de una proteína. Las fosfatasas de serina y treonina se agrupan en dos clases: las fosfatasas de proteínas tipo 1 y las tipo 2. Las fosfatasas tipo 1, desfosforilan selectivamente la subunidad β de la fosforilasa cinasa y son inhibidas por concentraciones nanomolares del inhibidor de fosfatasas tipo 1 o 2, mientras que las fosfatasas de proteínas tipo 2, desfosforilan selectivamente la subunidad α de la fosforilasa cinasa y son insensibles a los inhibidores tipo 1 y 2. Este tipo de fosfatasas, también son identificables por sus requerimientos de cationes divalentes (Nairn y cols, 1985).

Cohen y su grupo (1982) que habían determinado cuatro tipos de actividad de fosfatasas en el músculo, también las encontraron en el cerebro (Cohen, 1982; Ingebristen y cols 1983). Se han aislado cuatro fosfatasas del cerebro, entre las cuales está una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (posiblemente fosfatasa 2B) y una dependiente de Mg^{2+} y ATP (presumiblemente fosfatasa 1) (Nestler y Greengard, 1994).

La fosfatasa mejor caracterizada en el cerebro es la fosfatasa 2B, también llamada calcineurina. La calcineurina ha sido aislada de homogenados de cerebro de bovino. Tiene una masa molecular de aproximadamente 80,000 daltones y está compuesta de dos subunidades, una subunidad de 60,000 daltones y otra subunidad de 15,000 daltones. La subunidad de 60 kDa se une a la proteína de 15 kDa (aceptora de Ca^{2+}) pero también puede unirse a la calmodulina. Se ha sugerido que la subunidad de 60 kDa es la subunidad catalítica de la enzima y que puede ser activada de dos formas:

por calcio en interacción con la subunidad de 15 kDa o por un complejo Ca^{2+} /calmodulina; en cuyo caso, este complejo se une directamente a la subunidad catalítica, es decir, la de 60 kDa.

El ácido okadaico es un ácido graso poliéter producido por varias especies de dinoflagelados (*Dinophysis fortii* y *Dinophysis ocuminata*), que es extraído de esponjas marinas que los consumen como *Halichondria okadaii* (de ahí su nombre) y *Halichondria melanodocia*. Este compuesto inhibe potentemente, a las fosfatasa 1 y 2A a concentraciones nanomolares, y a una concentración mayor (5 μM) también inhibe a la fosfatasa 2B (Cohen y cols, 1990).

CALMODULINA

La calmodulina es una proteína termo y ácido estable, que se caracteriza por ser una molécula receptora de Ca^{2+} . La calmodulina se encuentra en todas las células eucariontes y su secuencia de aminoácidos ha permanecido conservada a través de la evolución. Esta proteína participa en el control de un gran número de enzimas activadas por Ca^{2+} .

El complejo Ca^{2+} /calmodulina actúa por dos vías: directamente sobre un sistema efector, tal como la ATPasa de Ca^{2+} o indirectamente sobre un sistema regulador, como pudiera ser una proteína cinasa (Klee y cols, 1980).

Aunque la calmodulina es ahora identificada con este nombre, había sido referida como: *proteína activadora*, *proteína moduladora*, o como *proteína reguladora dependiente de Ca^{2+}* . La calmodulina ha sido purificada y caracterizada de múltiples tejidos de mamíferos, entre los que se incluye el cerebro. La masa molecular de esta proteína inferida de su secuencia de aminoácidos es de 16,970 daltones y existe primariamente como un monómero (Klee y cols, 1980).

Los primeros en demostrar que el Ca^{2+} se une a la calmodulina fueron Teo y Wang (1973). Los estudios posteriores demostraron que la calmodulina une 4 moles de Ca^{2+} por mol de proteína con alta afinidad. Los valores de K_d , para la unión Ca^{2+} -calmodulina, son generalmente cercanos a 10^{-6} M aunque en condiciones de baja fuerza iónica, se encuentra una K_d de 10^{-7} . Es conocido que la calmodulina puede adquirir múltiples conformaciones según el número de iones Ca^{2+} a los que se encuentre unida. En teoría, existen 16 diferentes estados conformacionales de la calmodulina, lo cual aunado al hecho de que la estructura de la calmodulina se encuentre muy conservada, indica que los cuatro dominios de unión a Ca^{2+} son importantes para las distintas funciones de la proteína. Es decir, que diferentes clases de proteínas efectoras, interactúan con la calmodulina en diferentes grados de ocupación por Ca^{2+} (Klee, 1988).

Existen evidencias de que la calmodulina actúa como un regulador Ca^{2+} dependiente del metabolismo de los nucleótidos cíclicos, el transporte de calcio, la fosforilación y desfosforilación de proteínas y la función del citoesqueleto. Para ello, la calmodulina activa isoenzimas de la adenilato ciclasa, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, la Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPasa, la calcineurina, la óxido nítrico sintetasa y diversas proteínas cinasas. Entre las proteínas del citoesqueleto a las cuales se une predominantemente la calmodulina están: la MAP-2, la fodrina (espectrina), las MARCKS, la neuromodulina, la neurogranina, el caldesmon, la aducina, la proteína tau y la tubulina (Gnegy, 1993).

Anticalmodulínicos

Existen diferentes fármacos que interactúan con la calmodulina e interfieren con su actividad. Entre estos se encuentra, la [N-(6-aminoheptil)-5-cloro-1-naftalenesulfonamida] (W-7) (Fig 4), que se une a la calmodulina de una manera calcio dependiente y así inhibe procesos que requieren de calmodulina (Hidaka y cols, 1981). En altas concentraciones, el W-7 también inhibe a la PKC de manera competitiva con fosfolípidos (K_i de $60 \mu\text{M}$) (Tanaka y cols, 1982; Schatzmann y cols, 1983).

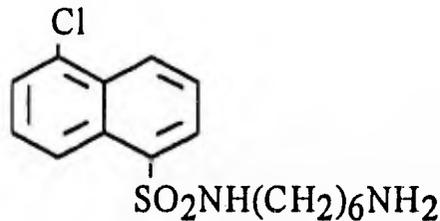


Figura 4. Estructura de la [N-(6-aminohexil)-5cloro-1-naftalenesulfonamida] (W-7)

Otro anticalmodulínico es la esfingosina (Fig 5), lípido de 18 carbonos habitualmente utilizado como inhibidor de la PKC (IC_{50} de 80 μ M) (Ogawara y cols, 1986; Hannun y Bell, 1989). Ahora se sabe que la esfingosina también inhibe funciones dependientes de calmodulina. Por ejemplo, inhibe a la CAMPK II (IC_{50} en presencia de 100 nM de calmodulina = 4.8 μ M), a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, estas dos últimas con una IC_{50} cercana a 35 μ M (Jefferson y Schulman, 1988).

Aunque la esfingosina es estructuralmente muy diferente a los otros anticalmodulínicos, como las fenotiazinas, los antihistamínicos, los agentes α -adrenérgicos o los anestésicos locales, todos estos poseen un carácter hidrófobo y un residuo básico, características también presentes en la esfingosina (Jefferson y Schulman, 1988).

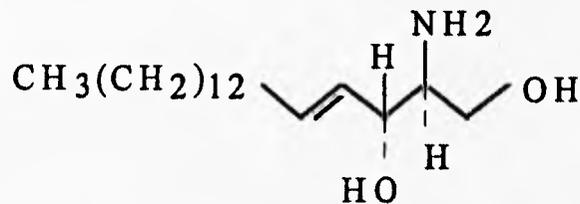


Figura 5. Estructura de la esfingosina

La trifluoperazina (Fig 6) es una fenotiazina, generalmente utilizada como anticalmodulínico. La trifluoperazina en presencia de Ca^{2+} se une a la calmodulina por 4 equivalentes con un intervalo de afinidad entre 4.5 μ M y 5.8 μ M (Massom y cols, 1990).

La unión de este fármaco sintético a la calmodulina, determina un cambio conformacional en ésta y por lo tanto, una inhibición de procesos activados por calmodulina (Klee, 1988). La trifluoperazina, también inhibe a la PKC con un IC_{50} de 35 μ M, y al igual que los anticalmodulínicos antes descritos, bloquea la actividad de esta enzima al interactuar con su dominio regulatorio (Schatzmann y cols, 1981).

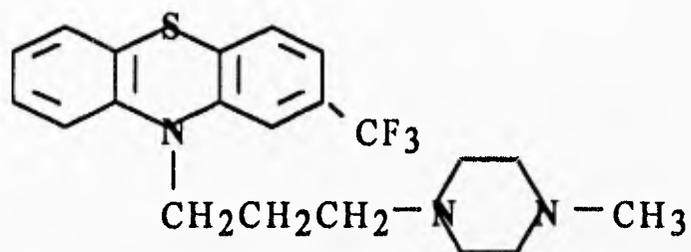


Figura 6. Estructura de la trifluoperazina

II- INTRODUCCION

El CSSV es una proteína transmembranal de gran importancia para la fisiología de las células excitables y en particular, para las neuronas. En las células nerviosas, los CSSV se encargan de propagar el potencial de acción a través del axón, además de promover, finalmente, la despolarización de las terminales nerviosas, que deriva en la liberación del neurotransmisor. Existen múltiples evidencias que indican que el CSSV está sujeto a modulación por distintos mecanismos de control celular.

La subunidad α del CSSV es fosforilada en cinco distintos sitios por la PKA (Costa y cols, 1982). Estos sitios también se han encontrado en canales de sodio de sinaptosomas (Costa y Catterall, 1984a) y de neuronas (Rossie y cols, 1987). También la PKC fosforila tanto a subunidades α purificadas, como a CSSV de sinaptosomas (Costa y Catterall, 1984b). No se encontró evidencia de que la CAMPK II fosforile la subunidad α del CSSV (Costa y cols, 1982).

Pero aunque es muy precisa la información acerca de donde se ubican los sitios de fosforilación de la subunidad α de los CSSV; no se sabe cuál o cuáles son las consecuencias de este proceso. No se ha podido establecer con toda claridad, de que manera afecta la fosforilación a la actividad fundamental del CSSV, que es la de promover la entrada de Na^+ al interior celular, despolarizando a la membrana plasmática. Existe evidencia de que la captura de $^{22}\text{Na}^+$ provocada por toxinas se reduce en presencia de activadores de la PKA en sinaptosomas (Costa y Catterall, 1984a) y que la fosforilación del canal por esta enzima, provoca una reducción de la corriente de sodio, entre un 40% y un 80%, en el nodo de Ranvier (Seelig y Kending, 1982) y también en neuronas (Li y cols, 1992). Pero cuando las subunidades α del CSSV se expresan en oocitos de *Xenopus* sp, se ha encontrado de manera contrapuesta, tanto un aumento (Smith y Goldin, 1992), como una disminución (Gershon y cols, 1992) de la corriente de sodio, debido a la activación de la PKA.

En cuanto a la activación de la PKC, ésta resulta en una reducción de la corriente de sodio en neuronas (Numann y cols, 1991), en células de neuroblastoma (Linden y Routtenberg, 1989), en células satélite de ratón (Numann y cols, 1994) y en subunidades α expresadas en oocitos de *Xenopus* sp (Schreibmayer y cols, 1991). Pero por otra parte, los anticalmodulínicos trifluoperazina y W-7, en altas concentraciones (en las cuales inhiben la actividad de la PKC), bloquean la corriente de sodio, en el axón gigante del calamar (Ichikawa y cols, 1991). Aunque también se ha visto que la cloropromazina bloquea al CSSV por una interacción con el mecanismo de compuerta (Bolotina y cols, 1992) y que el CGS 9343B bloquea la corriente de Na^+ en células PC12 (Neuhaus y Reber, 1992), ambos compuestos también presentan actividad anticalmodulínica, pero no inhiben a la PKC.

Finalmente, en cuanto a la desfosforilación del CSSV, en estudios *in vitro* se encontró que el CSSV es desfosforilado por diferentes actividades fosfatasas de una fracción soluble aislada del cerebro de la rata (Chen y cols, 1995), sin establecerse, hasta ahora, la relevancia fisiológica de este proceso.

Como se ve, no se termina de establecer claramente cómo se regulan los CSSV, o bien, si existen distintos CSSV sobre los cuales, los mecanismos regulatorios antes descritos, presentan una influencia diferencial. En este sentido, el que pudieran existir distintos CSSV, ya es sugerido, por el hecho de la diversidad de subunidades α clonadas (Kallen, 1994).

En virtud de que la fosforilación y desfosforilación de proteínas, así como la calmodulina juegan un papel muy importante en la fisiología de la sinapsis, y debido a que el CSSV es una proteína transmembranal muy importante para el funcionamiento de la parte presináptica; el objetivo de este trabajo es el de determinar cuál es el efecto de la activación e inhibición de las proteínas cinasas y de los anticalmodulínicos sobre los cambios en la $[\text{Na}^+]$, que provoca la veratridina en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) del cerebro de ratón. Este objetivo general se desglosa en dos objetivos particulares:

1- Determinar los efectos de la activación e inhibición de las proteínas cinasas A y C, sobre los cambios en la $[Na^+]_i$, provocados por la veratridina, en terminales nerviosas de ratón.

2- Caracterizar los efectos de los anticalmodulínicos sobre la modificación de la $[Na^+]_i$, inducida por la veratridina en sinaptosomas.

III- MATERIALES Y METODOS

Obtención de los sinaptosomas puros de cerebro de ratón

Los sinaptosomas para cada ensayo, fueron obtenidos del cerebro sin cerebelo de cuatro ratones albinos, cepa CD1 (machos), con una edad entre 9 y 13 semanas; siguiendo, con ligeras modificaciones, el método de Hajós (1975).

Después de sacrificar a cada animal, se extrajo el cerebro y se colocó en una solución isotónica de sacarosa 0.32 M previamente enfriada en hielo. Posteriormente, los cerebros se pesaron y se homogeneizaron con sacarosa 0.32 M en un homogenizador Thomas tipo B de vidrio con pistón de teflón, con espacio libre de 0.13 a 0.18, con 6 golpes a 2,000 revoluciones por minuto (rpm), en hielo.

El homogenado cerebral se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, en una centrífuga Sorvall RC 5B Plus con rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante se vertió en un nuevo tubo, desechando el botón y se centrifugó a 9,500 rpm durante 20 minutos. El botón resultante, se disolvió en 4.5 ml de sacarosa 0.32 M, los cuales se vertieron lentamente en un cojín de 20 ml de sacarosa 0.8 M y se centrifugaron a 8,500 rpm durante 25 minutos. Se obtuvo un gradiente del que se eliminaron inicialmente las dos bandas más superficiales, es decir, la banda de sacarosa 0.32 M y la banda de mielina. Posteriormente se extrajeron 15 ml de la banda sinaptosomal y se mezclaron lentamente con 45 ml de sacarosa 0.32 M, en hielo. Como último paso de separación, esta mezcla que contenía los sinaptosomas purificados, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos.

Medios de suspensión

Se preparó un medio Ringer completo (MC) que contenía (en mM): 147 de NaCl, 1.18 de KH_2PO_4 , 3.73 de KCl, 1.8 de CaCl_2 , 1.18 de MgSO_4 , 20 de HEPES pH 7.4 y 11.20 de glucosa. También se preparó un medio Ringer sin sodio (MSS) en el cual el sodio fue

sustituido por n-metil-D-glucamina y otro medio carente de calcio donde además se agregó 200 μM de EGTA (MSCE).

Cargado de los sinaptosomas con SBFI

El botón de sinaptosomas se resuspendió en 2.125 ml de MSS. De estos, se tomó una alícuota de 1.5 ml a la que se les añadieron 500 μl de una solución de albúmina sérica bovina al 0.4%. Posteriormente, los sinaptosomas, fueron cargados con SBFI (*sodium-binding benzofuran isophthalate*), un indicador fluorescente de la $[\text{Na}^+]_i$. (Minta y Tsien, 1989) de acuerdo al método descrito por Deri y Adam-Vizi (1993), con ligeras modificaciones.

El SBFI, se agregó a la suspensión sinaptosomal, en su forma acetoximetilester (SBFI/AM), pues ésta es permeable a la membrana plasmática y posteriormente hidrolizada en el citoplasma (Fig 7). El SBFI/AM, se encontraba disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) con ácido plurónico al 10%. Este último, facilita la incorporación de la sonda. De esta solución, se agregó una alícuota a los sinaptosomas, a fin de obtener una concentración final de 5 μM de SBFI/AM, para después dejarse incubando durante 45 minutos a 37°C.

De igual forma, los 625 μl restantes de sinaptosomas resuspendidos originalmente en MSS, se procesaron, para medir la autofluorescencia. Para ello, se mezclaron con 375 μl de la solución de albúmina sérica bovina al 0.4% más 10 μl de la solución de ácido plurónico en DMSO al 10% y también se incubaron 45 minutos a 37°C.



Figura 7. Cargado de los sinaptosomas con SBFi-AM

El cargado de la sonda se detuvo, por dilución de la suspensión de sinaptosomas 1:10 en MSS. Esta dilución, se centrifugó inmediatamente a 7,000 rpm por 10 minutos, a 4°C. El botón se volvió a resuspender en 20 ml de MSS y se centrifugó nuevamente a 7,000 rpm por 10 minutos. El botón final, con los sinaptosomas cargados con SBFi, fue por último resuspendido en 2 ml de MSS.

En el caso de los sinaptosomas para autofluorescencia, éstos también se diluyeron 1:10 en MSS, se centrifugaron de la misma manera que los cargados y se resuspendieron en 1 ml de MSS.

Medición de la fluorescencia

La fluorescencia de los sinaptosomas depositados en cubetas de cuarzo, fue cuantificada en un espectrofluorómetro Luminescente Perkin Elmer LS 50 adaptado a una computadora personal. El espectro de emisión se ubicó a 510 nm y se colectaron los puntos cada 1.89 segundos. Para prevenir errores ocasionados por la posible pérdida de la sonda, la intensidad de fluorescencia, se tomó como una proporción

entre la fluorescencia a 340 nm y la fluorescencia a 380 nm, a fin de cuantificar la fluorescencia tanto dependiente como independiente de sodio, respectivamente; como se ha sugerido en estudios previos (Harootunian y cols, 1989; Borin y Siffert, 1990). Para ésto, simplemente se dividieron los datos obtenidos para la intensidad de fluorescencia a 340 nm entre los obtenidos para 380 nm.

Estimación de la $[Na^+]_i$, a partir de la fluorescencia

Para poder correlacionar la intensidad de la fluorescencia con la $[Na^+]_i$, fue necesario realizar curvas de calibración, donde se midió la fluorescencia provocada por diferentes $[Na^+]_i$.

Para esto, los sinaptosomas cargados con SBF1, se suspendieron en medios con diferentes concentraciones conocidas de sodio. Para poder manipular la $[Na^+]_i$, los sinaptosomas fueron sometidos al ionóforo gramicidina D 10 μM , el cual hace permeable la membrana a cationes monovalentes (Pressman y cols, 1967; Podleski y Changeux, 1969; Keen y White, 1971) y no afecta la membrana de orgánulos intracelulares (Rink y cols, 1980; Medoff, 1983). Para los cálculos, se supuso que la gramicidina D, iguala la $[Na^+]_i$ con la concentración externa.

Para tal efecto, las alícuotas de 100 μl de sinaptosomas cargados con SBF1 fueron suspendidas en 1.9 ml de medio que contenían (en mM): 1.18 de KH_2PO_4 , 3.73 de KCl, 1.8 de $CaCl_2$, 1.18 de $MgSO_4$, 20 de HEPES pH 7.4, 11.20 de glucosa y 0, 20, 40, 60, 80 y 127 de NaCl, donde el NaCl faltante, fue sustituido por KCl.

A cada una de estas muestras, se les midió la intensidad de fluorescencia a 340/380 nm durante 2 minutos en estado basal, para después medírsela 4 minutos más, después de ser sometidas a gramicidina D 10 μM .

Muestras de autofluorescencia

Las alícuotas de 100 μ l de sinaptosomas de autofluorescencia (no cargados con SBFI), fueron suspendidas en 1.9 ml de MC o MSCE. Posteriormente se midió su intensidad de fluorescencia a 340/380 nm, durante 3 minutos.

Muestras experimentales

Las alícuotas de 100 μ l de sinaptosomas cargados con SBFI fueron suspendidas en 1.9 ml de MC o MSCE. A estas muestras, se les midió la intensidad de fluorescencia en estado basal (de 2 a 4 minutos), posteriormente en presencia de los distintos fármacos utilizados (2 a 4 minutos) y/o con veratridina a concentración de 20 μ M final (3 a 4 minutos).

Cálculos

Para hacer las curvas de calibración; el procedimiento fue el siguiente: Se tomó la diferencia entre la fluorescencia a 340/380 nm obtenida, antes y después de agregar la gramicidina D, es decir, se cuantificó el incremento producido en la fluorescencia por la gramicidina D. A los incrementos obtenidos con diferentes concentraciones de sodio externo, se les sumó la autofluorescencia y se graficaron contra la $[Na^+]$. De lo anterior, se obtuvo una curva del tipo $y=mx+b$, a la cual se le aplicó una regresión lineal, para obtener los valores de m y b para cada uno de los experimentos y finalmente, en estas curvas, se interpolaron los valores de fluorescencia a 340/380 nm, obtenidos en las muestras experimentales.

Para el análisis estadístico, los datos fueron sometidos a la prueba de "t" de Student, a fin de encontrar diferencias entre las medias de las distintas condiciones y se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

IV.- RESULTADOS.

Efecto de la veratridina sobre la $[Na^+]_i$ de los sinaptosomas

Con este método fluorométrico, se encontró que la $[Na^+]_i$ basal, en los sinaptosomas, es de 24.15 ± 0.87 mM, y como se puede ver en la Figura 8, la veratridina

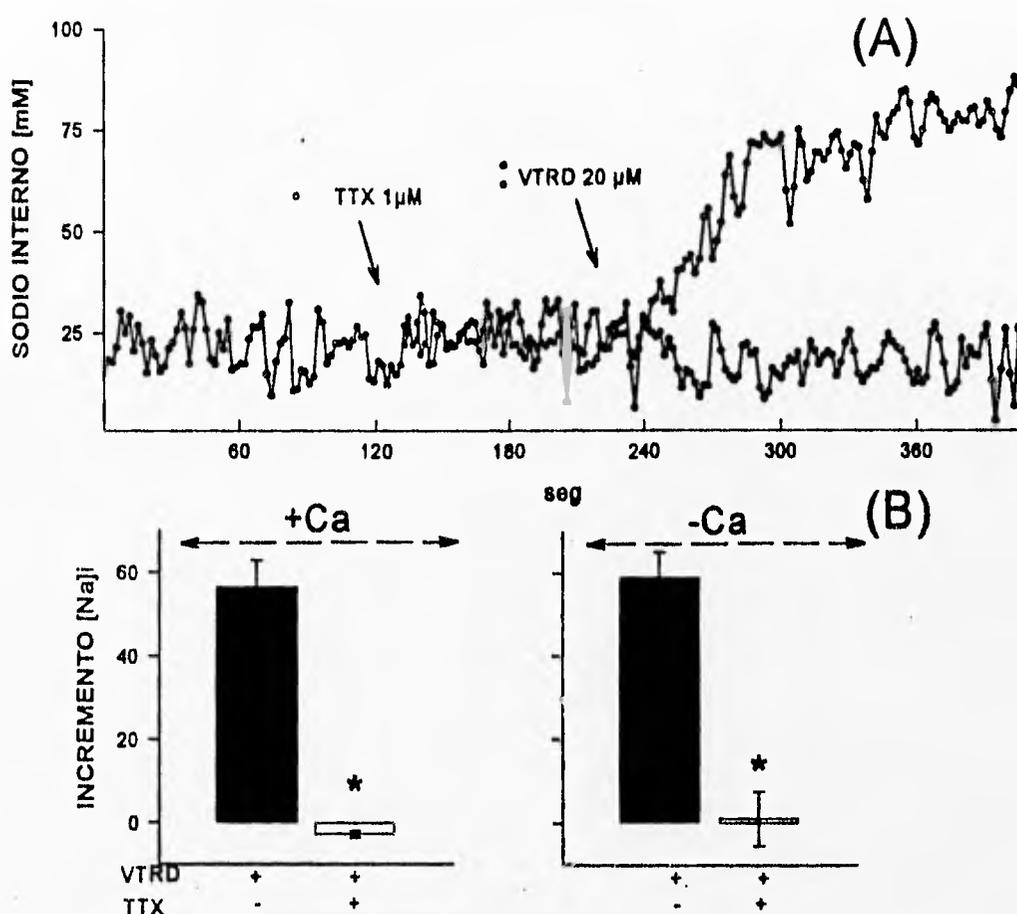


Figura 8. Incremento en la $[Na^+]_i$ producido por veratridina en presencia y en ausencia de Ca^{2+} y TTX. Aliquotas de 100 μ l de sinaptosomas precargados con SBF1 durante 45 minutos fueron suspendidos en 1.9 ml de medios con Ca^{2+} y sin Ca^{2+} según se indica. (A) Las muestras fueron sometidas a veratridina 20 μ M en presencia (o) y en ausencia (◻) de TTX 1 μ M. Las adiciones se indican con las flechas. (B) Incremento en la $[Na^+]_i$ producido por la veratridina en las muestras sin pretratamiento (barras negras) y con pretratamiento con TTX durante 2 minutos (barras en blanco). Los datos son la media (A) o la media \pm error estándar (B) de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

a una concentración de 20 μM , provoca un incremento promedio sobre este nivel basal, de $41.70 \pm 4.33 \text{ mM}$ ($n= 14$). Este aumento se caracteriza por no ser súbito, sino que se va produciendo gradualmente hasta llegar a un máximo, donde se estabiliza.

Asimismo se observó que este aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, que provoca la veratridina, se bloquea completamente cuando se agrega a la preparación TTX 1 μM (Fig 8A). Lo que significa que el aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, que provoca la veratridina, se lleva a cabo vía canales de sodio sensibles a TTX, o lo que es lo mismo, CSSV. En esta misma figura, también se puede ver que este fenómeno se da de igual manera, en presencia o en ausencia de Ca^{2+} (Fig 8B)

Efecto de los activadores e inhibidores de cinasas, sobre el aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, provocado por la veratridina

Para explorar los efectos que pudieran tener, tanto la PKC como la PKA, sobre la actividad de los canales de sodio sensibles a TTX y veratridina, ubicados en las terminales nerviosas, se midió el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, que provoca la veratridina 20 μM , en presencia de activadores e inhibidores de estas proteínas cinasas.

La activación de la PKC con 50 μM de dioctanoilglicerol (DOG) (Numann y cols, 1991), no modificó la respuesta en la $[\text{Na}^+]_i$, que provoca la veratridina (Fig 9), pues al agregar la veratridina a sinaptosomas pretratados durante 4 minutos con DOG en MC; se observó un incremento muy similar al control obtenido de muestras paralelas, en las que se agregó la veratridina a sinaptosomas, sin previo pretratamiento con DOG. No encontramos tampoco, modificaciones en la cinética de este aumento.

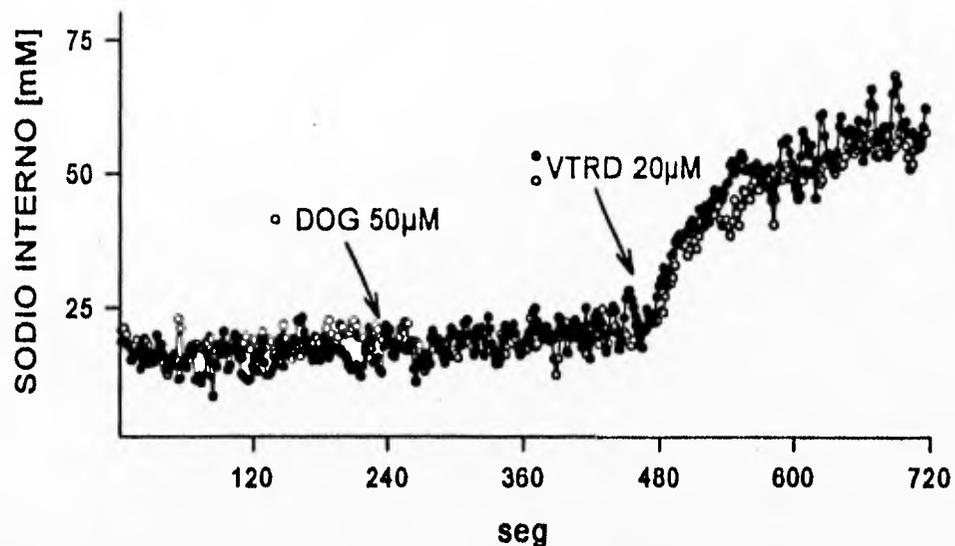


Figura 9. Efecto del diocanoilglicerol (DOG) sobre el incremento en la $[Na^+]_i$ producido por veratridina. Los sinaptosomas fueron suspendidos en MC como se indica en "Materiales y Métodos". Las muestras fueron sometidas a veratridina $20 \mu M$ en presencia (o) y en ausencia (•) de DOG $50 \mu M$, el cual se agregó 4 minutos antes. Los datos son la media de tres experimentos independientes.

Por otra parte, al aumentar los niveles de AMP_c (lo que estimularía a la PKA), al activar a la adenilato ciclasa con forskolina $30 \mu M$ (Gershon, 1992), también durante 4 minutos, no observamos modificaciones significativas en el incremento en la $[Na^+]_i$ provocado por veratridina $20 \mu M$ (Fig. 10). Tampoco la activación de la PKA con 8-Br- AMP_c altera el incremento en la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina (Fig. 10). Cabe mencionar, que estos experimentos se llevaron a cabo en MSCE, para que los efectos observados, se debieran exclusivamente, a la activación de la PKA y no existiera la participación de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} .

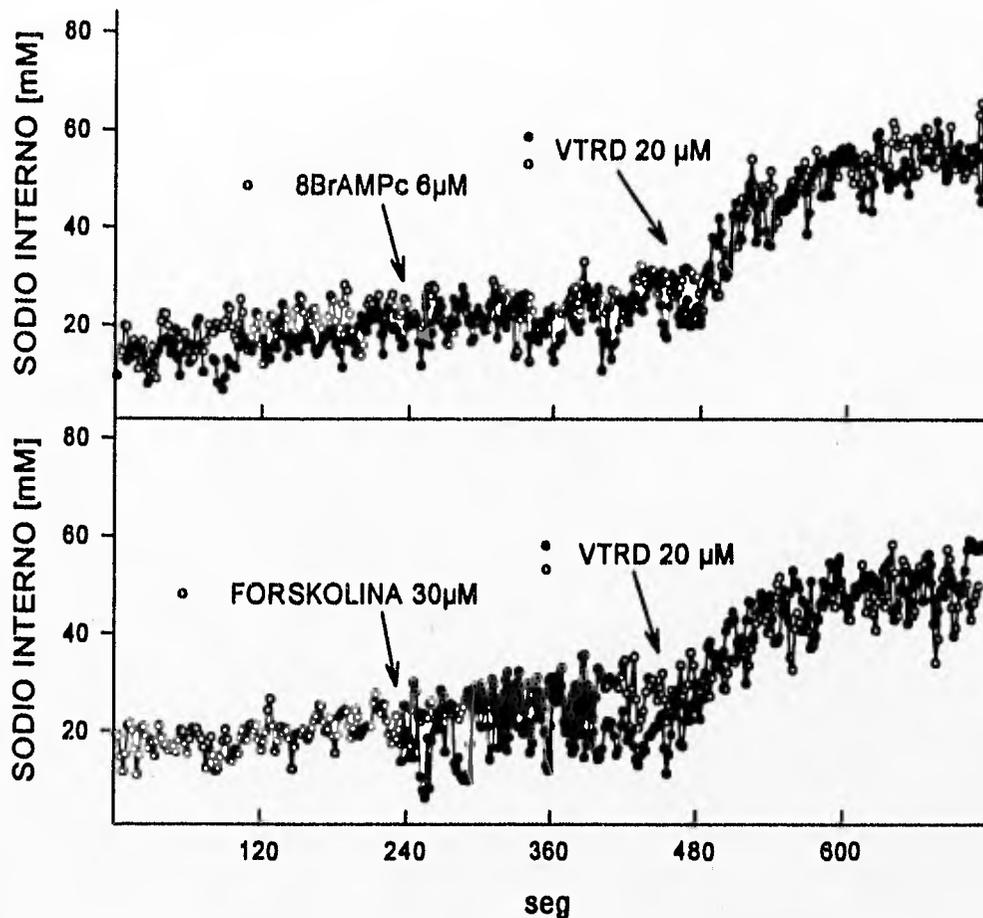


Figura 10. Incremento en la $[Na^+]_i$ producido por veratridina en presencia y en ausencia de 8-Bromo-AMP, 6 μM o Forskolina 30 μM . Los sinaptosomas fueron suspendidos en MSCE como se indica en "Materiales y Métodos". Las muestras fueron sometidas a veratridina 20 μM en presencia (o) y en ausencia (•) de 8-Bromo-AMP 6 μM o Forskolina 30 μM , los cuales se agregaron 4 minutos antes, como lo indican las flechas. Los datos son muestras representativas de tres experimentos independientes, para cada uno de los casos.

Por otra parte, como se ve en la Figura 11, los inhibidores de proteínas cinasas, H-7 10 μM y estaurosporina 1 μM , provocan una disminución de la cinética inicial del incremento en la $[Na^+]_i$ que lleva a cabo la veratridina. Esto, fundamentalmente en

ausencia de calcio externo, y sólo de manera significativa en el caso de la estaurosporina, cuya inhibición llega al 25% con respecto a su control ($p < 0.038$). En el caso de los sinaptosomas sometidos a estos inhibidores, en presencia de calcio externo, no se observan diferencias significativas en el incremento provocado por 20 μM de veratridina en correspondencia con sus controles.

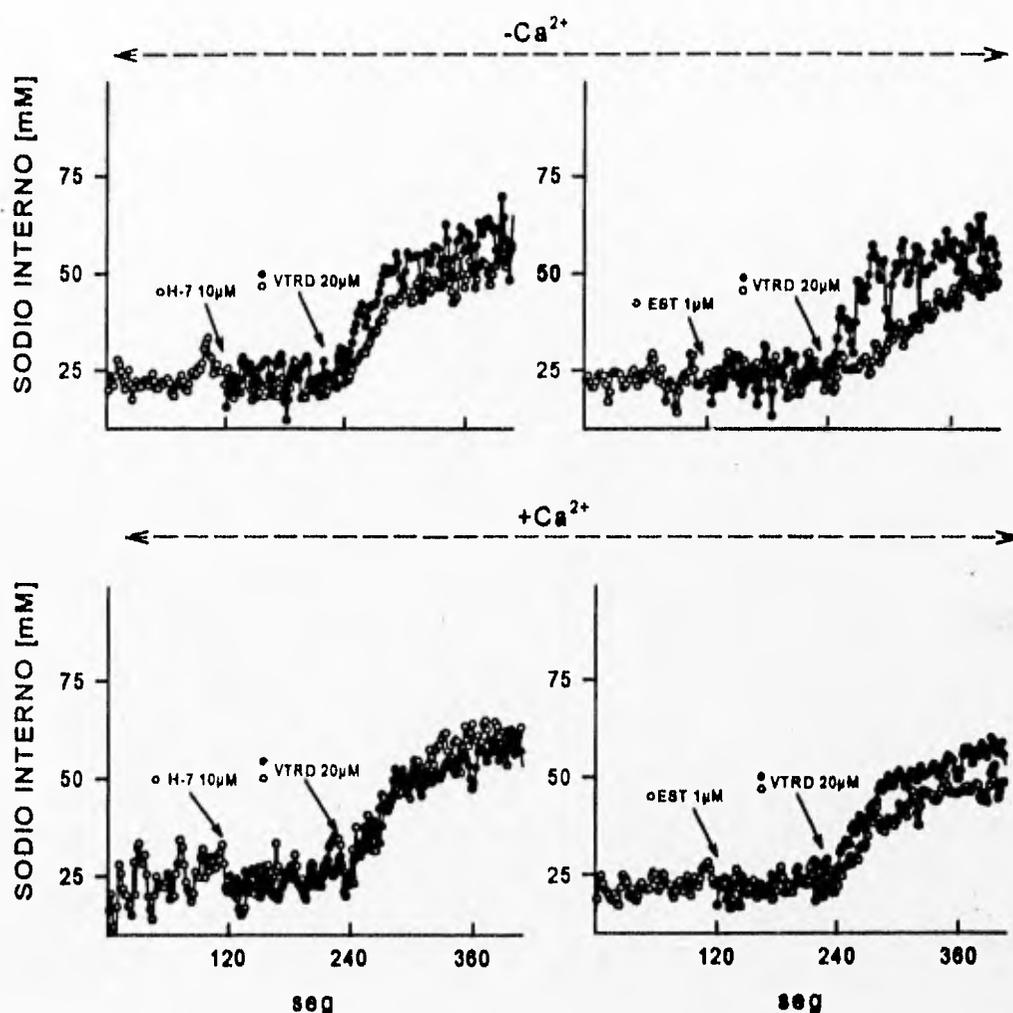


Figura 11. Efecto del H-7 y la estaurosporina sobre el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ producido por la veratridina. Los sinaptosomas fueron suspendidos igual que en la Figura 8. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y en ausencia de Ca^{2+} según se indica (línea punteada). Las muestras fueron sometidas a veratridina 20 μM en presencia (○) y en ausencia (◻) de H-7 10 μM o estaurosporina (EST) 1 μM , los cuales se agregaron 2 minutos antes, como lo indican las flechas. Los datos son el promedio de tres a cuatro experimentos independientes.

En vista de que la inhibición de la fosforilación provoca cambios en la activación del CSSV, se exploró el papel de la desfosforilación en el proceso regulatorio de la actividad del CSSV en las terminales nerviosas. Cuando se exponen los sinaptosomas a ácido okadaico 300 nM, en presencia de calcio, se observa un ligero aumento, no significativo ($p=0.067$), de la respuesta a veratridina en la $[Na^+]$, (Fig. 12). Cabe resaltar que este comportamiento no se observa en aquellas terminales suspendidas en MSCE.

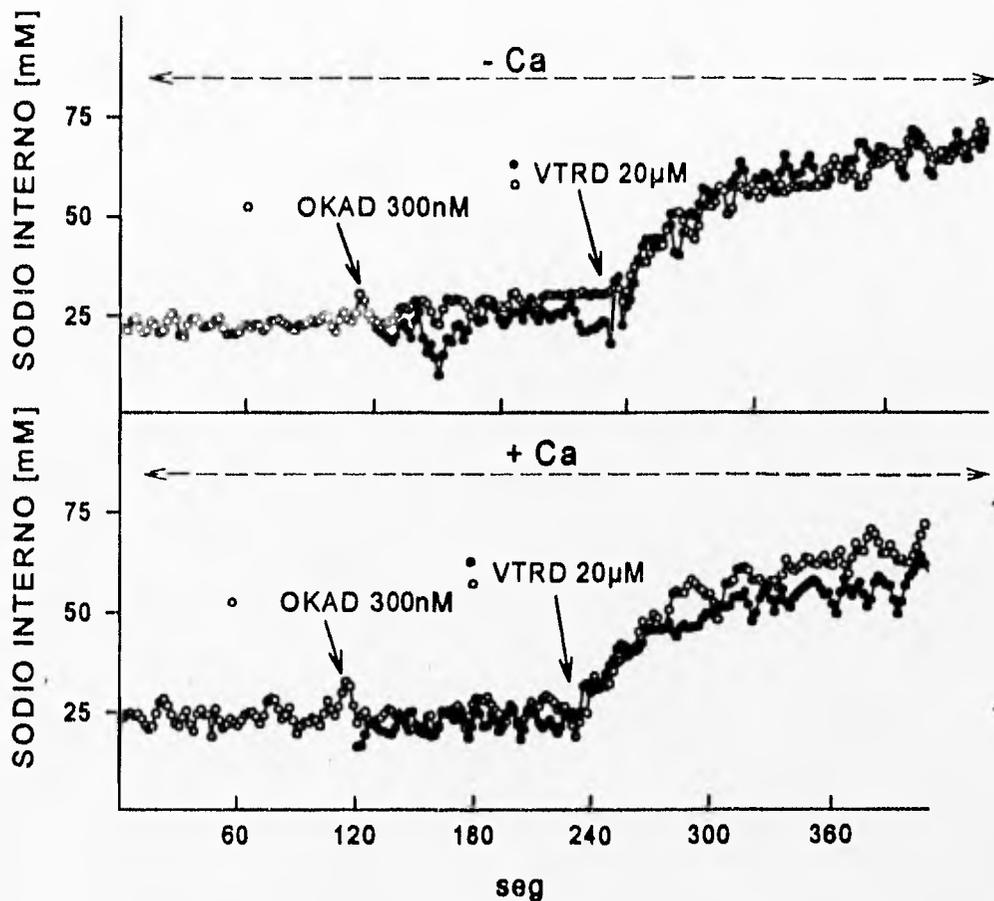


Figura 12. Efecto del ácido okadaico sobre el incremento en la $[Na^+]$, producido por veratridina. Los sinaptosomas fueron suspendidos igual que en la Figura 8. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y en ausencia de Ca^{2+} , según se indica (línea punteada). Las muestras fueron sometidas a veratridina $20 \mu M$ en presencia (o) y en ausencia (•) de ácido okadaico $300 nM$ que se agregó 2 minutos antes, como lo indica la flecha. Los datos son el promedio de tres a cinco experimentos independientes.

Efecto de los anticalmodulínicos, sobre el aumento en la $[Na^+]_i$, provocado por la veratridina.

En la Figura 13 se muestra claramente que la trifluoperazina, el W-7 y la esfingosina, compuestos con función anticalmodulínica, inhiben completamente el aumento en la $[Na^+]_i$, que provoca la veratridina. La trifluoperazina 5 μM , disminuye de manera significativa el incremento en la $[Na^+]_i$, tanto en presencia ($p < 7.33 \times 10^{-4}$) como en ausencia ($p < 0.0012$) de calcio; lo mismo sucede con el W-7 10 μM ($p < 0.0051$ con calcio y $p < 0.00025$ sin calcio) y con la esfingosina 10 μM ($p < 0.0063$ con calcio y $p < 0.0057$ sin calcio).

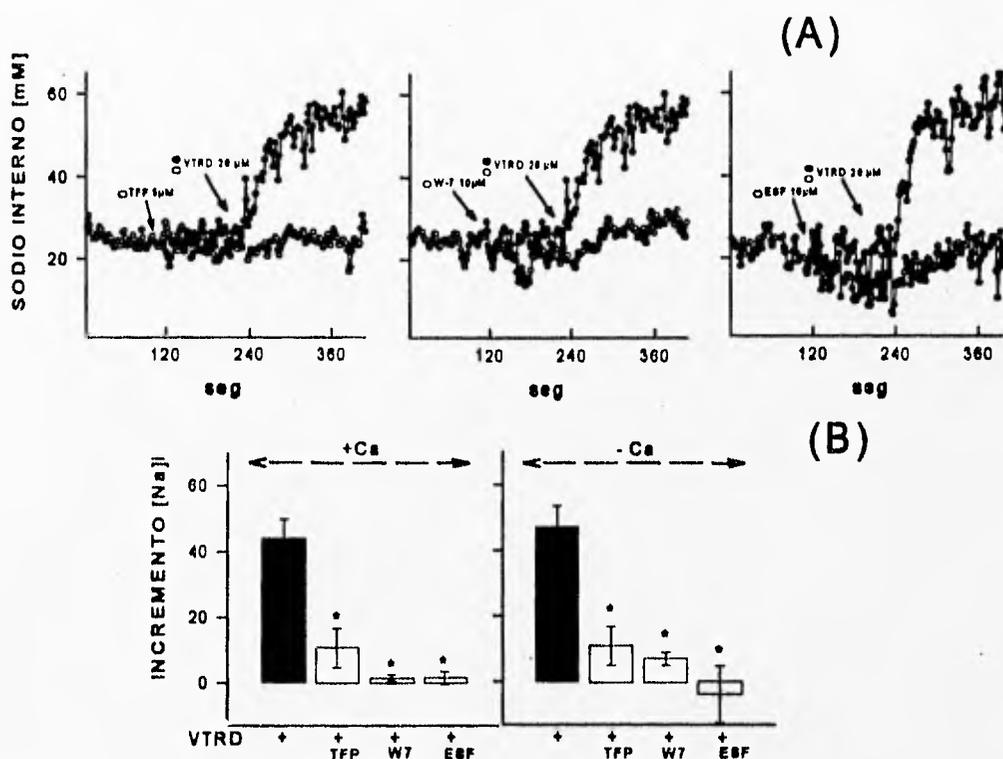


Figura 13. Efecto de los anticalmodulínicos sobre el incremento en la $[Na^+]_i$, producido por veratridina. Los sinaptosomas fueron suspendidos igual que en la Figura 8 en medios con y sin Ca^{2+} según se indica. Las muestras fueron sometidas a veratridina 20 μM en presencia (o) y en ausencia (•) de trifluoperazina (TFP) 5 μM o W-7 10 μM o esfingosina (ESF) 10 μM los cuales se agregaron 2 minutos antes, como lo indican las flechas. Los datos son muestras representativas (A) o la media \pm error estándar (B) de tres a seis experimentos independientes.

Para descartar la posibilidad de que estos efectos anticalmodulínicos se debiesen a una inhibición de la CAMPK II, exploramos el efecto del KN62, un inhibidor selectivo de la CAMPK II, sobre el aumento en la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina. La Figura 14 muestra que aunque el KN62 10 μM aumenta la $[Na^+]_i$ basal, no modifica la respuesta a la veratridina ni en los sinaptosomas suspendidos en MC, ni en los suspendidos en MSCE.

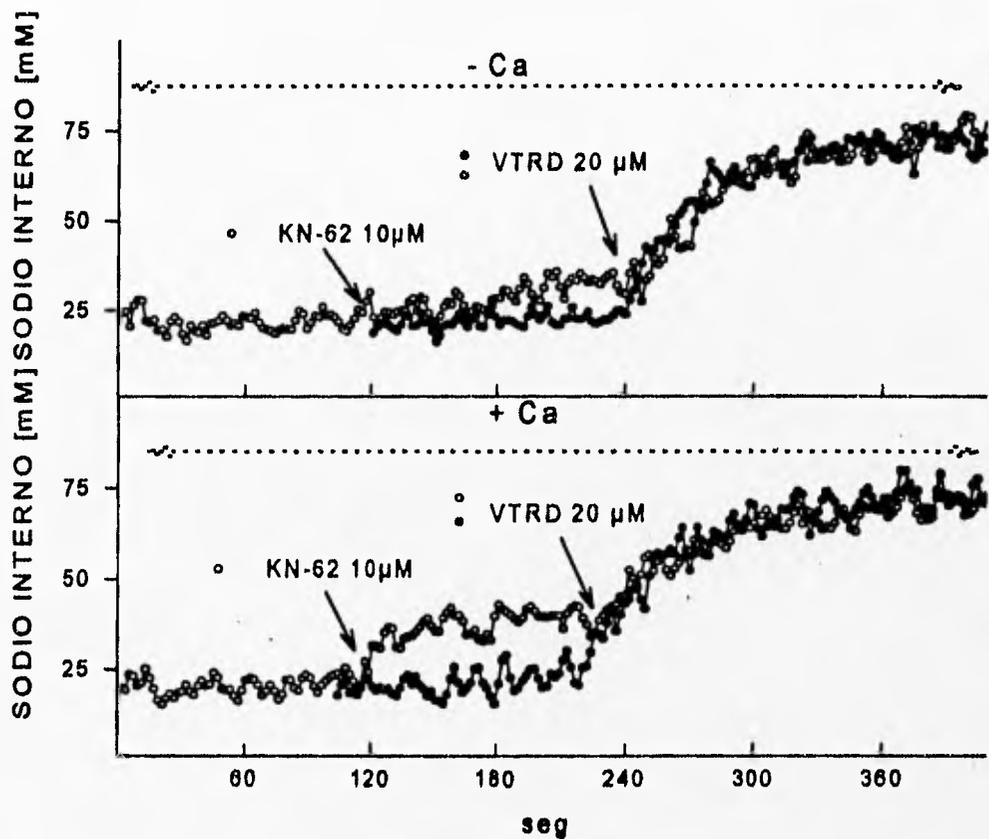


Figura 14. Efecto del KN62 sobre el incremento en la $[Na^+]_i$ producido por veratridina. Los sinaptosomas fueron suspendidos igual que en la Figura 8, como se indica en "Materiales y Métodos". Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y en ausencia de Ca^{2+} según se indica (línea punteada). Las muestras fueron sometidas a veratridina 20 μM en presencia (o) y en ausencia (o) de KN62 10 μM que se agregó 2 minutos antes, como lo indica la flecha. Los datos son el promedio de siete experimentos independientes.

Finalmente en la Figura 15 vemos que el aumento en la $[Na^+]_i$ basal que provocan por sí solos, la forskolina y el KN62 (Fig 10 y Fig 14), no son vía los CSSV, pues estos aumentos se dan aún en presencia de tetrodotoxina, lo cual indica que estos compuestos alteran otras vías de transporte de Na^+ , como pudieran ser receptores asociados a canales de sodio, lo cual es un motivo muy interesante para posteriores trabajos de experimentación.

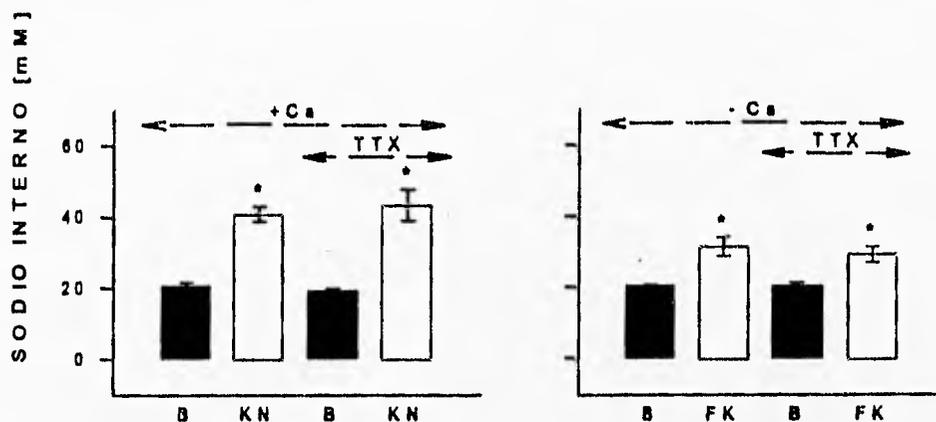


Figura 15. Efecto de la TTX sobre el incremento en la $[Na^+]_i$ basal producido por KN62 y forskolina. Los sinaptosomas fueron suspendidos igual que en la Figura 8. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y en ausencia de Ca^{2+} y TTX $1 \mu M$ según se indica (líneas punteadas). Después de ser cuantificada la $[Na^+]_i$ basal (B) (barras oscuras) se agregó KN62 $10 \mu M$ (KN) o forskolina $30 \mu M$ (FK) (barras claras).

V- DISCUSION.

En este trabajo, por medio de un indicador fluorescente sensible a Na^+ (SBFI), se encontró que la $[\text{Na}^+]_i$ basal en los sinaptosomas del cerebro del ratón es de 24 ± 0.87 mM, similar a la previamente reportada para sinaptosomas aislados de la corteza cerebral de la rata por Deri y Adam-Vizi (1993) con un método semejante. Con el uso de técnicas electrofisiológicas (Ulbricht, 1969; Catterall, 1977) y fluorométricas (Blaustein y Goldring, 1975), desde hace 2 décadas se sabía que la veratridina activa un flujo de Na^+ hacia el interior celular. Sin embargo hasta recientemente, al aprovechar la sensibilidad del SBFI, fue posible cuantificar los cambios en la concentración de sodio dentro de los sinaptosomas que inducen diferentes agentes, entre ellos la veratridina. (Deri y Adam-Vizi, 1993; Rodríguez y Sitges, 1996). En sinaptosomas cargados con SBFI, en este trabajo encontramos que la veratridina a una concentración de $20 \mu\text{M}$ provoca un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ de aproximadamente 42 mM. La inhibición por TTX de este incremento provocado por veratridina, indica que está mediado por la activación de los CSSV. Estos resultados demuestran la confiabilidad del método fluorométrico, usado en este trabajo, para cuantificar los efectos de diferentes fármacos sobre el aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ mediado por el CSSV en terminales nerviosas aisladas de cerebro de mamífero.

Efecto de inhibidores y activadores de proteínas cinasas sobre el aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ mediado por el CSSV de los sinaptosomas

Los resultados que obtuvimos al explorar el papel que juegan las proteínas cinasas sobre la activación por veratridina de los CSSV en sinaptosomas, difieren de reportes previos presentados por el grupo de Catterall, quien por medio de técnicas electrofisiológicas, concluyó que la fosforilación mediada tanto por la PKC (Numann y cols, 1991), como por la PKA (Costa y Catterall, 1984a) reduce la actividad de los CSSV. Asimismo usando el método de captura de $^{22}\text{Na}^+$, Costa y Catterall (1984a), encontraron que un pretratamiento con 8-bromo-AMP, 8 mM reduce la captura de $^{22}\text{Na}^+$ inducida por veratridina en sinaptosomas de cerebro de rata. Sin embargo nuestros

hallazgos de que los inhibidores de PKC y PKA, estaurosporina y H-7, disminuyen el aumento en la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina, no indican que sea la estimulación sino más bien la inhibición de esas cinasas, la que provoca el decremento en la activación por veratridina de los canales de sodio de los sinaptosomas.

Catterall (1977) propone que la veratridina tiene menor afinidad por los estados cerrados del canal de sodio. Esta proposición es congruente con la cinética que observamos en el incremento en la $[Na^+]_i$ que provoca la veratridina. Es decir, vemos que la veratridina va aumentando de manera paulatina la $[Na^+]_i$, pues al inicio, activa ligeramente a unos cuantos canales, los cuales al irse abriendo, provocan mayor unión de la toxina y por lo tanto, mayor activación. Esto lleva a un mayor flujo de Na^+ , que va despolarizando progresivamente a la membrana y provocando la transición de los mismos CSSV hacia estados más cercanos al estado abierto; con ésto la probabilidad de activación por veratridina de estos canales aumenta y así, finalmente, se llega a una meseta que indica el máximo del aumento en la $[Na^+]_i$ que induce una concentración dada de veratridina.

El hecho de que el efecto inhibitorio de la estaurosporina sobre el aumento en la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina, se dé fundamentalmente sobre la fase inicial y no sobre la respuesta máxima a la veratridina, sugiere que los CSSV de las terminales nerviosas del cerebro del mamífero, posiblemente se encuentran en un cierto grado de fosforilación, mismo que debe permitir que se mantenga la conformación óptima, para ser activada por la veratridina. En otras palabras, el grado de fosforilación del canal en estado basal, debe ser importante para mantener las propiedades funcionales de esta proteína. Esta hipótesis se ve apoyada por los hallazgos de que el CSSV es en sí una fosfoproteína (Rossie y Catterall, 1987).

Nuestros hallazgos de que la estaurosporina y el H-7, inhiben en mayor o menor grado el aumento inicial de la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina, no nos permiten aclarar cuál proteína cinasa está participando en la regulación de los CSSV de los

sinaptosomas, pues la estaurosporina y el H-7 inhiben tanto al sitio catalítico de la PKC como al de la PKA. Con objeto de distinguir entre esas cinasas, también exploramos los efectos de activadores específicos para cada una de ellas. Sin embargo, al promover la actividad de la PKC con DOG, o la actividad de la PKA con forskolina y 8-bromo-AMP, no se alteró el incremento en la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina. Nuestra interpretación de los efectos inhibitorios ejercidos por los inhibidores de PKC y PKA y de la falta de efecto de los activadores de las mismas, es que el CSSV de las terminales nerviosas se encuentra fosforilado en su estado basal y que este grado de fosforilación es ya suficiente para su adecuada activación por veratridina.

Inhibición por trifluoperazina, W-7 y esfingosina de la activación de los CSSV provocada por veratridina

Para analizar los efectos de los anticalmodulínicos sobre el aumento en la $[Na^+]_i$ que induce la veratridina, se utilizaron diferentes compuestos, que presentan en común su actividad anticalmodulínica a bajas concentraciones, aunque también inhiben a la PKC, a nivel de su dominio regulatorio a concentraciones relativamente más altas. Cuando analizamos los efectos en la $[Na^+]_i$ al agregar veratridina 20 μM a sinaptosomas pretratados con anticalmodulínicos, observamos una completa abolición de la respuesta a la veratridina, tanto en presencia como en ausencia de calcio. Varias son las razones que nos llevan a pensar que estos efectos no se deben a la inhibición de la PKC por estos compuestos. La primera, es que los efectos de los anticalmodulínicos, en nada se asemejan a los provocados por los otros inhibidores de esta cinasa que interactúan con su sitio catalítico, como la estaurosporina y el H-7, que causan una ligera inhibición de la tasa inicial del incremento en la $[Na^+]_i$ provocado por la veratridina, mientras que los anticalmodulínicos definitivamente impiden que la veratridina incremente la $[Na^+]_i$; y la segunda razón, es que las concentraciones utilizadas (trifluoperazina 5 μM , W-7 10 μM y esfingosina 10 μM) en los ensayos, son menores a las necesarias para inhibir a la PKC (Tanaka y cols, 1982; Schatzmann y cols, 1983; Jefferson y Schulman, 1988; Schatzmann, 1981) y concuerdan con las que

se requieren para inhibir procesos dependientes de calmodulina (Schatzmann, 1981; Klee, 1988; Jefferson y Schulman, 1988).

La posibilidad de que los anticalmodulínicos ejerzan su efecto inhibitorio sobre el aumento en la $[Na^+]$, que induce la veratridina al regular la actividad de la CAMPK II, es improbable, pues el inhibidor específico de esta enzima, el KN62, no afecta la respuesta a la veratridina, lo cual descarta la participación de la CAMPK II en la regulación de los CSSV. Esta interpretación concuerda con estudios previos que muestran que la CAMPK II no fosforila a la subunidad α del CSSV (Costa y cols, 1982). Es interesante mencionar que la CAMPK II en cambio participa en la regulación de la actividad de los canales de calcio sensibles a voltaje en terminales nerviosas, a juzgar por la inhibición del aumento en la $[Ca^{2+}]$, inducido por despolarización en sinaptosomas "cargados" con el indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} , Fura 2 (Sitges y cols, 1995).

Aunque por un lado, existen fosfatasas dependientes de calmodulina como la calcineurina, y por el otro, se ha reportado que el CSSV es desfosforilado por diferentes actividades fosfatasas aisladas de una fracción soluble proveniente del cerebro de la rata (Chen y cols, 1995), la posibilidad de que la inhibición que ejercen los anticalmodulínicos sobre el incremento en la $[Na^+]$, que induce la veratridina, se deba a una inhibición de la desfosforilación del canal por alguna fosfatasa es improbable, pues la inhibición de la desfosforilación, por el ácido okadalco, no altera dicha respuesta.

Tampoco la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, otra proteína dependiente de calmodulina, cuya función consiste en la hidrólisis del AMP_c , parece estar involucrada en los efectos inhibitorios de la respuesta a la veratridina que inducen los anticalmodulínicos, pues los niveles de AMP_c tienen su efecto principalmente sobre la actividad de la PKA, y ya mostramos en este trabajo, que ni la activación (forskolina y 8-Br- AMP_c) ni la inhibición de esta cinasa (H-7 y estaurosporina) provocan efectos similares a los obtenidos con trifluoperazina, W-7 y esfingosina.

Después de descartar la participación de la PKC, la CAMPK II, las fosfatasa y la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, en los efectos inhibitorios de los anticalmodulínicos sobre la respuesta a veratridina en sinaptosomas, las opciones abiertas son las siguientes:

a) Se ha encontrado que la subunidad α del CSSV, se encuentra anclada al citoesqueleto por medio de la ankirina (Srinivasan y cols, 1988; 1992), y la ankirina se une a varias proteínas del citoesqueleto (espectrina, proteína 4.9, actina, tropomiosina, aducina, la proteína 4.1, y MAP-2) que presentan sitios de unión a la calmodulina (Scaramuzzino y Morrow, 1993; Bennett, 1989), formando un complejo que se asocia a la membrana. Existe evidencia, de que este complejo citoesquelético es regulado por fosforilación e interacciones Ca^{2+} /calmodulina (Bennett, 1989) y se ha propuesto que ésta podría ser una opción que explique el efecto inhibitorio de los anticalmodulínicos sobre la corriente de Na^+ en el axón gigante del calamar, previamente reportado por Ichikawa y colaboradores (1991).

b) La regulación positiva mediada por la interacción directa de la calmodulina con el CSSV, también podría explicar los efectos inhibitorios de los anticalmodulínicos sobre la respuesta a veratridina observada en este trabajo. Esta posibilidad está sustentada por varios trabajos que indican que los canales de Na^+ y de K^+ de Paramecium y Drosophila, canales asociados a foto y olfatoreceptores de vertebrados, así como el canal de calcio asociado al receptor de ryanodina (Saimi y Kung, 1994; Hinrichsen y cols, 1990) son regulados por una interacción directa con la calmodulina. Más aún, Johnson (1984) ha propuesto que un canal de calcio sensible a voltaje, presenta un receptor a calcio muy parecido a la calmodulina.

c) Finalmente, otra posibilidad que no se puede descartar, es que los anticalmodulínicos (W-7, trifluoperazina y esfingosina), se unan directamente al canal de sodio e inhiban así su activación por veratridina. Esta posibilidad es consistente con los sitios hipotéticos para los anestésicos locales en el CSSV, pues muchos anestésicos locales, inhiben al CSSV (Frenkel y Urban, 1992; Barber y cols, 1992;

Wendt y cols, 1996; Grant, 1992) y por otro lado, también tienen actividad anticalmodulínica (Sabandam y Gunasekaran, 1993). La trifluoperazina es una fenotiazina y derivados de éstas, como la etmozina, la etacizina, la clorpromazina y la clorazicina se ha demostrado que bloquean al CSSV (Bolotina y cols, 1992).

La naturaleza química de los diferentes compuestos anticalmodulínicos, es muy distinta. No obstante, tanto la esfingosina, las fenotiazinas, los antihistamínicos, como los agentes α -adrenérgicos y los anestésicos locales, todos ellos, compuestos con actividad anticalmodulínica, poseen en su estructura química un carácter hidrófobo y un residuo básico que los relaciona (Jefferson y Schulman, 1988).

VI- CONCLUSIONES.

- 1- Con el uso del indicador fluorescente sensible a sodio SBFI, en este estudio fue posible cuantificar los cambios en la $[Na^+]$, en terminales nerviosas aisladas del cerebro de ratón, mediados tanto por los canales de sodio sensibles a voltaje como por otros mecanismos.
- 2- Una posible fosforilación, sensible a estaurosporina, regula la activación de los CSSV, pues el aumento en la $[Na^+]$, inducido por veratridina es inhibido, principalmente en su fase inicial, por concentraciones micromolares de estaurosporina.
- 3- El bloqueo prácticamente total que ejercen los anticalmodulínicos sobre el incremento en la $[Na^+]$, que induce la veratridina en sinaptosomas, no parece estar relacionado con la inhibición de la PKC, de la CAMPK II, de alguna fosfatasa, ni con la inhibición de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. Una interacción de los anticalmodulínicos con el canal de manera directa, o indirecta a través de la calmodulina o de proteínas del citoesqueleto que unen calmodulina, parece subyacer a estos efectos.

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Atchison, W. D., V. S. Luke, T. Narahashi, y S. M. Vogel. 1986. Nerve membrane sodium channels as the target site of brevetoxins at neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.* 89:731-738.
- Barber, M. J., D. J. Wendt, C. F. Starmer, y A. O. Grant. 1992. Blockade of sodium channels. Competition between the permeant ion and antiarrhythmic drugs. *J. Clin. Invest.* 90:368-381.
- Barnola, F. V., R. Villegas, y G. Camejo. 1973. Tetrodotoxin receptors in plasma membranes isolated from lobster nerve fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 298:84-94.
- Bennett, V. 1989. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim. Biophys. Acta* 988:107-121.
- Blaustein, M. P. y J. M. Goldring. 1975. Membrane potential in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J. Physiol. (Lond.)* 247: 589-615.
- Bolotina, V., K. R. Courtney, y B. Khodorov. 1992. Gate-dependent blockade of sodium channels by phenothiazine derivatives: Structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 42:423-431.
- Borin, M. y W. Siffert. 1990. Stimulation by thrombin increases the cytosolic free Na⁺ concentration in human platelets. *J. Biol. Chem.* 265:19543-19550.
- Bradford, H. F. 1988. *Fundamentos de neuroquímica*. Ed. Labor. Barcelona, España. 483 pp.
- Brown, M. S. y H. S. Mosher. 1963. Tarichatoxin: isolation and purification. *Science* 140:295-296.
- Catterall, W. A. 1975a. Activation of the action potential Na⁺ ionophore of cultured neuroblastoma cells by veratridine and batrachotoxin. *J. Biol. Chem.* 250:4053-4059.
- Catterall, W. A. 1975b. Cooperative activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1782-1786.
- Catterall, W. A. 1977. Activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem.* 252:8669-8676.
- 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. 1986. Molecular properties of the voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55:953-985.
- Catterall, W. A., D. Gordon, S. Rossie, M. Seagar, y M. Takahashi. 1988. Molecular properties of voltage-sensitive sodium and calcium channels. En *Voltage-sensitive ion channels: modulation by neurotransmitters and drugs*. G. Biggio, P. F. Spano, G. Toffano, y G. L. Gessa, editores. Liviana Press, New York.11-24.
- Chen, T., B. Law, T. Kondratyuk, y S. Rossie. 1995. Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage-sensitive sodium channels in rat brain. *J. Biol. Chem.* 270:7750-7756.
- Cohen, P. 1982. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296:613-620.
- Cohen, P., C. F. B. Holmes, y Y. Tsukitani. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *TIBS* 15:98-102.
- Colquhoun, D., R. Henderson, y J. M. Ritchie. 1972. The binding of labelled tetrodotoxin to nonmyelinated nerve fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 227:95-126.
- Costa, M. R. C., J. E. Casnellie, y W. A. Catterall. 1982. Selective phosphorylation of the α -subunit of the sodium channel by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257:7918-7921.
- Costa, M. R. C. y W. A. Catterall. 1984a. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the α -subunit of the sodium channel in synaptic nerve ending particles. *J. Biol. Chem.* 259:8210-8218.
- Costa, M. R. C. y W. A. Catterall. 1984b. Phosphorylation of the α -subunit of the sodium channel by protein kinase C. *Cell Mol. Neurobiol.* 4:291-298.
- Crone, H. D., B. Leake, M. W. Jarvis, y S. E. Freeman. 1976. On the nature of maculotoxin. *Toxicon* 14:423-426.
- Deri, Z. y V. Adam-Vizi. 1993. Detection of intracellular free Na^+ concentration of synaptosomes by a fluorescent indicator, Na^+ -binding benzofuran isophthalate: The effect of veratridine, ouabain, and α -latrotoxin. *J. Neurochem.* 61:818-825.
- Evans, M. H. 1972. Tetrodotoxin, saxitoxin and related substances: their applications in neurobiology. *Int. Rev. Neurobiol.* 15:83-166.
- Frenkel, C. y B. W. Urban. 1992. Molecular actions of racemic ketamine on human CNS sodium channels. *Br. J. Anaesth.* 69:292-297.

- Gershon, E., L. Weigl, I. Lotan, W. Schreiber, y N. Dascal. 1992. Protein kinase A reduces voltage-dependent Na⁺ current in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 12:3743-3752.
- Gnegy, M. E. 1993. Calmodulin in neurotransmitter and hormone action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:45-70.
- Gonoi, T., K. Ashida, D. Feller, J. Schmidt, M. Fujiwara, y W. A. Catterall. 1986. Mechanism of action of a polypeptide neurotoxin from the coral *Goniopora* on sodium channels in mouse neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 29:347-354.
- Grant, A. O. 1992. On the mechanism of action of antiarrhythmic agents. *Am. Heart. J.* 123:1130-1136.
- Hajós, F. 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 136:387-392.
- Hannun, Y. A., C. R. Loomis, A. H. Merrill, y R. M. Bell. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261:12604-12609.
- Hannun, Y. A. y R. M. Bell. 1989. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* 243:500-507.
- Harootunian, A. T., J. P. Y. Kao, B.K. Eckert, y R.T. Tsien. 1989. Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na⁺ in individual fibroblasts and lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 264:19458-19467.
- Henderson, R., J. M. Ritchie, y G. R. Strichartz. 1973. The binding of labelled saxitoxin to the sodium channel in nerve membranes. *J. Physiol. (Lond.)* 235:783-804.
- Hidaka, H., M. Inagaki, S. Kawamoto, y Y. Sasaki. 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23:5036-5041.
- Hidaka, H. y R. Kobayashi. 1992. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:377-397.
- Hidaka, H. y R. Kobayashi. 1994. Protein kinase inhibitors. *Essays Biochem.* 28:73-97.
- Hidaka, H., Y. Sasaki, T. Tanaka, T. Endo, S. Ohno, Y. Fujil, y T. Nagata. 1981. N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4354-4357.
- Hille, B. 1972. The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol.* 59:637-658.

- Hille, B. 1977. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 69:497-515.
- Hille, B. y W. A. Catterall. 1994. Electrical excitability and ion channels. En *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, y P. B. Molinoff, editores. Raven Press, New York. 75-95.
- Hinrichsen, R., E. Wilson, T. Lukas, T. Craig, J. Schultz, y M. Watterson. 1990. Analysis of the molecular basis of calmodulin defects that affect ion channel-mediated cellular responses: site-specific mutagenesis and microinjection. *J. Cell Biol.* 111:2537-2542.
- Hironaka, T. y T. Narahashi. 1977. Cation permeability ratios of sodium channels in normal and grayanotoxin-treated squid axon membranes. *J. Memb. Biol.* 31:359-381.
- Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. 1952. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116:473-496.
- Ichikawa, M., M. Urayama, y G. Matsumoto. 1991. Anticalmodulin drugs block the sodium gating current of squid giant axons. *J. Membrane Biol.* 120:211-222.
- Iida, T., E. Kobayashi, M. Yoshida, y H. Sano. 1989. Calphostins, novel and specific inhibitors of protein kinase C. II. Chemical structures. *J. Antibiot.* 42:1475-1481.
- Ingebritsen, T. S., A. A. Stewart, y P. Cohen. 1983. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur. J. Biochem.* 132:297-307.
- Isom, I. I., K. S. Dejongh, D. E. Patton, B. F. X. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, A. L. Goldin, y W. A. Catterall. 1992. Primary structure and functional expression of the β 1-subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256:839-842.
- Jefferson, A. B. y H. Schulman. 1988. Sphingosine inhibits calmodulin-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 263:15241-15244.
- Johnson, J. D. 1984. A calmodulin-like Ca^{2+} receptor in the Ca^{2+} channel. *Biophys. J.* 45:134-136.
- Kallen, R. G., S. A. Cohen, y R. L. Barchi. 1994. Structure, function and expression of voltage-dependent sodium channels. *Mol. Neurobiol.* 7:383-428.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, y A. R. Martin. 1991. *Principles of neural science*. Ed. Sinauer. Massachusset, U.S.A. 651 pp.
- Kao, C. Y. 1966. Tetrodotoxin, saxitoxin, and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* 18:997-1049.

- Kao, C. Y. y A. Nishiyama. 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuro-muscular systems. *J. Physiol. (Lond.)* 180:50-66.
- Kase, H., K. Iwahashi, S. Nakanishi, Y. Matsuda, K. Yamada, M. Takahashi, C. Murakata, A. Sato, y M. Kaneko. 1987. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142:436-440.
- Katz, B. y R. Miledi. 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J. Physiol. (Lond.)* 189:535-544.
- Keen, P. y T. D. White. 1971. The permeability of pinched-off nerve endings to sodium, potassium, and chloride and the effects of gramicidin. *J. Neurochem.* 18:1097-1103.
- Khodorov, B. I. 1978. Chemicals as tools to study nerve fiber sodium channels. En *Membrane transport processes*. D. C. Tosteson, Y. A. Ovchinnikov, y R. Latorre, editores. Raven, New York. 153-174.
- Kim, Y. H., G. B. Brown, H. S. Mosher, y F. A. Fuhrman. 1975. Tetrodotoxin: ocurrence in atelupid frogs of Costa Rica. *Science* 184:151-152.
- Kirsch, G. E., A. Skattebol, L. D. Possani, y A. M. Brown. 1989. Modification of Na channel gating by β -scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *J. Gen. Physiol.* 93:67-83.
- Klee, C. B. 1988. Interaction of calmodulin with Ca^{2+} and target proteins. En *Calmodulin*. P. Cohen y C. B. Klee, editores. Elsevier, Holanda. 35-56.
- Klee, C. B., T. H. Crouch, y P. G. Richman. 1980. Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.* 49:489-515.
- Kobayashi, E., K. Ando, H. Nakano, T. Iida, y H. Ohno. 1989a. Calphostins (UCN-1028), novel and specific inhibitors of protein kinase C. I. Fermentation, isolation, physicochemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* 42:1470-1474.
- Kobayashi, E., K. Ando, H. Nakano, y T. Tamaoki. 1989b. UCN-1028A, a novel and specific inhibitor of protein kinase C, from *Cladospodium*. *J. Antibiot.* 42:153-155.
- Krayer, O. y G. J. Acheson. 1946. The pharmacology of veratrum alkaloids. *Physiol. Rev.* 26:383-446.
- Kuffler, S. W., J. G. Nicholls, y A. R. Martin. 1984. *From the neuron to the brain: a cellular approach to the function of the nervous system*. Ed. Elsevier, North-Holland. Massachuset, U.S.A.. 651 pp.
- Li, M., J. W. West, Y. Lai, T. Scheuer, y W. A. Catterall. 1992. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* 8:1151-1159.

- Linden, D. J. y A. Routtenberg. 1989. *Cis*-fatty acids, which activate protein kinase C, attenuate Na⁺ and Ca²⁺ currents in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol. (Lond.)* 419:95-119.
- Massom, L., H. Lee y H. W. Jarrett. 1990. Trifluoperazine binding to porcine brain calmodulin and skeletal muscle troponin C. *Biochem.* 29:671-681.
- Medoff, G. 1983. Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23:303-330.
- Messner, D. J. y W. A. Catterall. 1985. The sodium channel from rat brain: separation and characterization of subunits. *J. Biol. Chem.* 260:10597-10604.
- Minta, A y Tsien R. Y. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J. Biol. Chem.* 264:19449-19457.
- Mozhayeva, G. N., A. P. Naumov, Y. A. Negulyaev, y E. D. Nosyreva. 1977. Permeability of aconitine-modified sodium channels to univalent cations in myelinated nerve. *Biochim. Biophys. Acta* 446:461-473.
- Nairn, A. C., H. C. Hemmings, y P. Greengard. 1985. Protein kinases in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* 54:931-976.
- Nakamura, Y., S. Nakajima, y H. Grundfest. 1965. The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 48:985-996.
- Narahashi, T. 1974. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.* 54:813-889.
- Narahashi, T., J. W. Moore, y W. R. Scott. 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon. *J. Gen. Physiol.* 47:965-974.
- Narahashi, T., N. C. Anderson, y J. W. Moore. 1966. Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane. *Science* 153:765-767.
- Nestler, E. J. y P. Greengard. 1994. Protein phosphorylation and the regulation of neural function. En *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, y P. B. Molinoff, editores. Raven Press, New York. 449-474.
- Neuhaus, R. y B. F. Reber. 1992. Inhibition of membrane currents and rises of intracellular Ca²⁺ in PC12 cells by CGS 9343B, a calmodulin inhibitor. *Europ. J. Pharmacol.* 226:183-185.
- Noguchi, T. y Y. Hashimoto. 1973. Isolation of tetrodotoxin from a goby, *Gobius criniger*. *Toxicon* 11:305-307.

- Numann, R., W. A. Catterall, y T. Scheuer. 1991. Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science* 254:115-118.
- Numann, R., S. D. Hauschka, W. A. Catterall, y T. Scheuer. 1994. Modulation of skeletal muscle sodium channels in a satellite cell line by protein kinase C. *J. Neurosci.* 14:4226-4236.
- Ogawara, H., T. Akiyama, J. Ishida, S. Watanabe, y K. Suzuki. 1986. A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from *Pseudomonas*. *J. Antibiot.* 39:606-608.
- Poli, M. A., T. J. Mende, y D. G. Baden. 1986. Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* 30:129-135.
- Pressman, B. C., E. J. Harris, W. S. Jagger, y J. H. Johnson. 1967. Antibiotic-mediated transport of alkali ions lipid barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:1949-1956.
- Rink, T. J., C. Montecucco, T. R. Hesketh, y R. Y. Tsien. 1980. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* 595:15-30.
- Podeleski, T. y J. P. Changeux. 1969. Effects associated with permeability changes caused by gramicidin A in Electroplex membrane. *Nature* 221:541-545.
- Robles-Flores, M. 1993. Las cinasas y fosfatasas de proteínas: enzimas clave en la regulación de la actividad celular. En *Comunicación neuroendocrina: bases celulares y moleculares*. C. Clapp y G. Martínez de la Escalera, editores. SMCF y Conacyt. Mexico. 137-148.
- Rodnight, R. y S. T. Wofchuck. 1992. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays Biochem.* 27:91-102.
- Rodríguez, R. y M. Sitges. 1996. Nigericin-induced Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ exchange in synaptosomes: effect on [³H]gaba release. *Neurochem. Res.* 21:895-901.
- Rossie, S. y W. A. Catterall. 1987. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels in primary cultures of rat brain neurons. *J. Biol. Chem.* 262:12735-12744.
- Rossie, S., D. Gordon, y W. A. Catterall. 1987. Identification of an intracellular domain of the sodium channel having multiple cyclic AMP-dependent phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 262:17530-17535.
- Sabandam, T. y M. Gunasekaran. 1993. Purification and properties of calmodulin from *Phymatotrichum omnivorum*. *Microbios* 73:61-74.

- Saimi, Y. y C. Kung. 1994. Ion channel regulation by calmodulin binding. *FEBS* 350:155-158.
- Scaramuzzino, D. A. y J. S. Morrow. 1993. Calmodulin-binding domain of recombinant erythrocyte beta-adducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3398-3402.
- Schatzmann, R. C., R. L. Raynor, y J. F. Kuo. 1983. N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7), a calmodulin antagonist, also inhibits phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 755:144-147.
- Schatzmann, R. C., B. C. Wise, y J. F. Kuo. 1981. Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase: inhibition by antipsychotic drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98:669-676.
- Schreibmayer, W., N. Dascal, I. Lotan, M. Wallner, y L. Weigl. 1991. Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel α -subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS* 291:341-344.
- Seelig, T. L. y J. J. Kending. 1982. Cyclic nucleotide modulation of sodium and potassium currents in the isolated node of Ranvier. *Brain Res.* 245:144-147.
- Seyama, I. y T. Narahashi. 1973. Increase in sodium permeability of squid axon membranes by α -dihydrograyanotoxin II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184:299-307.
- Sharkey, R. G., D. A. Beneski, y W. A. Catterall. 1984. Differential labeling of the α and β 1 subunits of the sodium channel by photoreactive derivatives of scorpion toxin. *Biochemistry* 23:6078-6086.
- Sheumack, D. D., M. E. H. Howden, I. Spence, y R. J. Quinn. 1978. Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. *Science* 199:188-189.
- Sitges, M. 1993. Comunicacion entre las celulas nerviosas. Sinapsis. En *Comunicacion neuroendocrina: bases celulares y moleculares.*, C. Clapp y G. Martínez de la Escalera editores. SMCF y Conacyt. Mexico. 47-70.
- Sitges, M., P. R. Dunkley y L. M. Chiu. 1995. A role for calcium/calmodulin kinase(s) in the regulation of gaba exocytosis. *Neurochem. Res.* 20:245-252.
- Smith, R. D. y A. L. Golding. 1992. Protein kinase A phosphorylation enhances sodium channel currents in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 263:C660-C666.
- Srinivasan, Y., L. Elmer, J. Davis, V. Bennett, y K. Angelides. 1988. Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature* 333:177-180.
- Srinivasan, Y., M. Lewallen, y K. Angelides. 1992. Mapping the binding sites on ankyrin for the voltage-dependent sodium channel from brain. *J. Biol. Chem.* 267:7483-7489.

Straub, R. 1954. Die wirkun von veratridin auf das membran potential von markhaltigen nervenfasern des frosches. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 14:1-28.

Tanaka, T., T. Ohmura, T. Yamakado, y H. Hidaka. 1982. Two types of calcium-dependent protein phosphorylation madulated by calmodulin antagonists: naphthalenesulfonamide derivates. *Mol. Pharmacol.* 22:408-812.

Teo, T. S. y J. H. Wang. 1973. Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3',5' monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca^{2+} -binding protein. *J. Biol. Chem.* 248:5950-5955.

Ulbricht, W. 1969. The effects of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmakol.* 61:18-71.

Wendt, D. J., C. F. Starmer, y A. O. Grant. 1996. Kinetics of interaction of the lidocaine metabolite glycylylidide with the cardiac sodium channel. *Circ. Res.* 70:1254-1273.

Woosley, R. L. 1991. Antiarrhythmic drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:427-455.