

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Efecto de las dihidropiridinas y  $\omega$ -Agatoxinas sobre los cambios iónicos y la liberación de neurotransmisores inducidos por despolarización”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
D O C T O R E N  
C I E N C I A S B I O M É D I C A S  
P R E S E N T A  
BIOL. CARLOS ALBERTO GALINDO ROSETE**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA SITGES BERRONDO  
COMITÉ TUTORAL: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOITIA  
DR. JULIO MORÁN ANDRADE**

**CIUDAD UNIVERSITARIA**

**OCTUBRE 2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Dedicada a:**

**Mis padres, porque siempre he contado con su amor y su buen ejemplo.**

**A toda mi familia por su apoyo incondicional.**

**A la niña que alegra mi vida.**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptorat.

NOMBRE: Carlos Alberto  
Calixto Rosete

FECHA: 26-October-2004

FIRMA: Carlos R.

## **Agradecimientos**

A la Dra. María Sitges Berrondo, por sus enseñanzas en el campo de la ciencia durante tantas horas de gimnasia mental, así como por su amistad, confianza y apoyo brindado durante el tiempo que realicé mi tesis bajo su dirección.

A los doctores Julio Morán Andrade y Ricardo Tapia Ibarguengoitia que fungieron como cotutores durante mi doctorado, por sus críticas y comentarios durante el desarrollo de mi tesis.

A los miembros del jurado Dra. Clorinda Arias Alvarez, Dra. Elvira Galarraga Palacio, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dr. Gabriel Cota Peñuelas, Dra. Limei Zhang Ji y Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis y por sus valiosas aportaciones, comentarios y sugerencias.

A los miembros del laboratorio: Dr. Vladimir Nekrassov, por sus pláticas y comentarios alegres y por su apoyo en momentos difíciles. Al Dr. Emilio J. Galvan por su amistad y tantos momentos divertidos dentro y fuera del laboratorio. A Luz María Chiu por sus enseñanzas y paciencia durante tantos experimentos. A Araceli Guarneros por su cálida amistad y todos sus consejos.

A todos aquellos que de alguna manera hicieron mas grata esta etapa de mi vida.

## INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
<b>I. Antecedentes Generales</b>	
<b>1. Papel del Ca<sup>2+</sup> en el funcionamiento de las terminales nerviosas.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Canales de Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>8</b>
a) Estructura molecular.....	8
b) Diversidad de los canales de Ca <sup>2+</sup> .....	10
c) Localización de canales de Ca <sup>2+</sup> .....	13
<b>3. Canales de Na<sup>+</sup> .....</b>	<b>14</b>
a) Estructura molecular.....	14
b) Sitios del canal de Na <sup>+</sup> sensible a voltaje.....	15
c) Localización de canales de Na <sup>+</sup> .....	19
<b>4. Estrategias para despolarizar sinaptosomas.....</b>	<b>19</b>
<b>II. Planteamiento del problema.....</b>	<b>21</b>
<b>III. Métodos.....</b>	<b>23</b>
1. Obtención de sinaptosomas.....	23
2. Determinación de Na <sub>i</sub> y Ca <sub>i</sub> en sinaptosomas.....	24
3. Liberación de neurotransmisores endógenos de sinaptosomas.....	25
4. Determinación de las concentraciones de dopamina y DOPAC.....	26
5. Determinación de las concentraciones de Glu, Asp, GABA y Glicina.....	27
6. Experimentos de liberación de [ <sup>3</sup> H]-Glu precargado.....	28
7. Estadística.....	28
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>29</b>
1. Cinéticas del aumento de Ca <sub>i</sub> inducido por K <sup>+</sup> alto y veratridina.....	29

2. Efecto de la nimodipina, nitrendipina y nifedipina sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto y por veratridina.....	31
3. Efecto de la nimodipina, nitrendipina y nifedipina sobre el aumento de $Na_i$ inducido por veratridina.....	32
4. En ausencia de $Ca^{2+}$ externo la nimodipina también inhibe el aumento de $Na_i$ inducido por veratridina.....	34
5. Efectos de la tetrodotoxina y la $\omega$ -agatoxina-IVA sobre los aumentos de $Ca_i$ inducidos por $K^+$ alto y veratridina.....	35
6. Liberación de neurotransmisores endógenos inducida por despolarización con $K^+$ alto ó veratridina.....	36
7. Efecto de la nimodipina y la nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina.....	38
8. Efecto de la nimodipina y la nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por $K^+$ alto.....	39
9. Efecto de concentraciones crecientes de $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento de $Ca^{2+}$ inducido por $K^+$ alto.....	40
10. Efectos simples y combinados de la $\omega$ -agatoxina-TK y la $\omega$ -conotoxina-GVIA sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto en sinaptosomas estriatales e hipocampales.....	42
11. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento en el $Ca_i$ inducido por la adición subsecuente de $K^+$ alto y veratridina.....	43
12. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento en el $Na_i$ inducido por veratridina.....	45
13. Efectos de la $\omega$ -agatoxina-TK y la $\omega$ -agatoxina-IVA sobre la exocitosis de Glu.....	46
<b>V. Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>VI. Conclusiones generales.....</b>	<b>53</b>
<b>VII. Bibliografía.....</b>	<b>55</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la comunicación neuroquímica.....	6
Figura 2. Movimientos y distribución del $Ca^{2+}$ en las terminales nerviosas.....	7
Figura 3. Principales mecanismos de liberación de neurotransmisores.....	8
Figura 4. Estructura del canal de calcio.....	9
Figura 5. Esquema de la subunidad $\alpha$ del canal de sodio.....	15
Figura 6. Localización de los sitios receptores a neurotoxinas en la subunidad $\alpha$ del canal de sodio de mamíferos.....	18
Figura 7. Efectos de $K^+$ alto, veratridina y de ambos sobre el $Ca_i$ .....	30
Figura 8. Efecto de la nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto y veratridina.....	32
Figura 9. Efecto de la tetrodotoxina, la nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina sobre el aumento de $Na_i$ inducido por veratridina.....	33
Figura 10. Efecto de la nimodipina sobre el aumento de $Na_i$ inducido por veratridina en ausencia de $Ca^{2+}$ externo.....	34
Figura 11. Efectos complementarios de la tetrodotoxina y la $\omega$ -agatoxina-IVA sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto y veratridina.....	35
Figura 12. La liberación de glu, asp, GABA y dopamina inducida por $K^+$ alto no es sensible a tetrodotoxina.....	37
Figura 13. La liberación de neurotransmisores inducida por veratridina es inhibida por tetrodotoxina.....	38
Figura 14. Porcentaje de inhibición por la $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por despolarización con $K^+$ alto.....	41
Figura 15. Experimentos representativos de la respuesta desarrollada de $Ca_i$ inducida por $K^+$ alto en ausencia y presencia de la $\omega$ -agatoxina-TK.....	42
Figura 16. Efectos simples y combinados de la $\omega$ -agatoxina-TK y la $\omega$ -conotoxina-GVIA sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto.....	43
Figura 17. Efectos complementarios de la $\omega$ -agatoxina-TK y la tetrodotoxina sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto y veratridina.....	44
Figura 18. Comparación de los efectos de la $\omega$ -agatoxina-TK, la $\omega$ -conotoxina-GVIA y la tetrodotoxina sobre el aumento en el $Na_i$ inducido por veratridina.....	45
Figura 19. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-TK sobre la exocitosis de $[^3H]$ -Glu.....	46
Figura 20. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-IVA sobre la exocitosis de $[^3H]$ -Glu.....	47



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ sensibles a voltaje.....	12
Tabla 2. Concentraciones de aminoácidos y catecolaminas en sinaptosomas de estriado de rata en condiciones basales y con despolarización.....	36
Tabla 3. Efecto de la nimodipina y nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina.....	39
Tabla 4. Efecto de la nimodipina y nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por $\text{K}^+$ alto .....	40

## Resumen

En esta tesis se investigó en terminales nerviosas aisladas de cerebro (estriado) de rata, la contribución relativa de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en el mecanismo subyacente a la acción de las dihidropiridinas, nimodipina, nitrendipina y nifedipina, conocidas como bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje tipo L. Las dihidropiridinas de manera similar a la tetrodotoxina, bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, no modificaron el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  interno ( $\text{Ca}_i$ , determinado con fura-2) inducido por  $\text{K}^+$  alto, pero sí inhibieron los aumentos inducidos por veratridina tanto en el  $\text{Na}^+$  interno ( $\text{Na}_i$ , determinado con SBFI) como en el  $\text{Ca}_i$ . La inhibición de los aumentos de  $\text{Ca}_i$  y  $\text{Na}_i$  inducidos por veratridina fue más efectiva con nimodipina o nitrendipina que con nifedipina. Contrariamente a la tetrodotoxina y a las dihidropiridinas, la  $\omega$ -agatoxina-IVA, que es un bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje tipo P/Q, no inhibió el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por veratridina, pero sí inhibió el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto.

La  $\omega$ -agatoxina-TK es la toxina más abundante en el veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. En esta tesis se caracterizó por primera vez en terminales nerviosas aisladas de hipocampo y estriado el efecto de la  $\omega$ -agatoxina-TK sobre los cambios inducidos por despolarización. Esta toxina inhibió el aumento de  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto de manera dependiente de dosis, con una dosis inhibidora media calculada de 60 nM para ambas estructuras. La inhibición máxima ejercida por la  $\omega$ -agatoxina-TK en los sinaptosomas estriatales fue ligeramente mayor que en los sinaptosomas hipocampales por lo que es posible que la población de canales sensibles a  $\omega$ -agatoxina-TK en las terminales nerviosas estriatales sea ligeramente mayor que en las hipocampales. En sinaptosomas de estriado, parte del aumento de  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto insensible a la  $\omega$ -agatoxina-TK fue inhibido por el bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N,  $\omega$ -conotoxina-GVIA.

Los efectos de los bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje también se estudiaron sobre la liberación de neurotransmisores. Consistentemente

con los efectos de las dihidropiridinas sobre los cambios iónicos inducidos por despolarización en sinaptosomas estriatales, la nimodipina y la nitrendipina al igual que la tetrodotoxina inhibieron la liberación (detectada por HPLC), de dopamina GABA, glutamato y aspartato evocada por veratridina, pero no la liberación de neurotransmisores inducida con  $K^+$  alto, que también es insensible a tetrodotoxina. Por otro lado, la  $\omega$ -agatoxina-IVA y la  $\omega$ -agatoxina-TK, fueron igualmente efectivas para inhibir la liberación de glutamato inducida por  $K^+$  alto en sinaptosomas hipocampales precargados con [ $^3H$ ]Glu y perfundidos en ausencia de un gradiente fisiológico de  $Na^+$ , que es una condición que garantiza la eliminación de la liberación mediada por transportadores. Ambas agatoxinas inhibieron la liberación de glutamato dependiente de  $Ca^{2+}$  externo inducida por  $K^+$  alto. La similitud entre los efectos de ambas agatoxinas, que presentan alta homología entre sí, pero difieren en su extremo amino terminal, indica que dicho extremo no es necesario para bloquear de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q.

Los resultados presentados indican que en las terminales nerviosas cerebrales los efectos de las dihidropiridinas no están relacionados con un bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  sino de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje, y que la  $\omega$ -agatoxina-TK es una herramienta farmacológica útil para estudiar las respuestas mediadas por los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q en las terminales nerviosas cerebrales.

## Abstract

In the present thesis the relative contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  channels in the mechanism underlying the action of the dihydropyridines at the brain level was investigated in nerve endings isolated from the rat striatum. The dihydropyridines, nimodipine, nitrendipine, and nifedipine are known as selective L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers. However, dihydropyridines in a similar way to tetrodotoxin which is a voltage sensitive  $\text{Na}^+$  channel blocker, does not inhibited the rise in internal  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_i$ , as determined with fura-2) induced by high  $\text{K}^+$ , but they inhibit the rise in internal  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_i$ , as determined with SBF1) and the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by the sustained activation of  $\text{Na}^+$  channels with veratridine. Nimodipine and nitrendipine are largely more potent than nifedipine. Oppositely to tetrodotoxin, and to the dihydropyridines, the P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker,  $\omega$ -Aga-IVA does not inhibit the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine, but inhibits the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^+$ .

The  $\omega$ -agatoxin-TK is the more abundant toxin in the venom of *Agelenopsis aperta*. Here was characterized for the first time in hippocampal and striatal isolated nerve endings, the effect  $\omega$ -agatoxin-TK on the ionic changes induced by depolarization. The toxin inhibited the high  $\text{K}^+$  induced rise in  $\text{Ca}_i$  dose dependently in cerebral (striatal and hippocampal) isolated nerve endings, with calculated  $\text{IC}_{50}$ 's of 60 nM for both structures. The maximal inhibition exerted by  $\omega$ -agatoxin-TK in striatal synaptosomes is slightly larger than in hippocampal synaptosomes, suggesting a larger population of  $\omega$ -agatoxin-TK sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels in striatal than in hippocampal nerve endings. In striatal synaptosomes, the N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker,  $\omega$ -conotoxin-GVIA inhibited part of the  $\omega$ -agatoxin-TK insensitive rise in  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^+$ .

The effects of voltage sensitive calcium channels blockers were also tested over neurotransmitter release.

Consistently with the effects of dihydropyridines on the ionic changes induced by depolarization of striatal synaptosomes, they inhibited, like tetrodotoxin, the release (detected by HPLC) of dopamine, GABA, glutamate, and aspartate evoked by veratridine, but not the release of the above neurotransmitters evoked by high  $K^+$ , that is also insensitive to tetrodotoxin. On the other hand, the  $Ca^{2+}$  channel blockers  $\omega$ -agatoxin-IVA, and  $\omega$ -agatoxin-TK, were equally effective to inhibit the release of glutamate induced by high  $K^+$ , in [ $^3H$ ]Glu preloaded hippocampal synaptosomes superfused in the absence of a physiological  $Na^+$  gradient, that is a condition that guarantees the elimination of neurotransmitter transporters-mediated release. Both agatoxins inhibit the external  $Ca^{2+}$ -dependent release of [ $^3H$ ]Glu induced by high  $K^+$ . The similitude of the effects of both agatoxins, which exhibit a high homology, but differ in the amino terminal moiety, suggest that this moiety is not necessary to the blocking effect of the agatoxins on P/Q type calcium channels.

The results presented here point out that in cerebral nerve endings the effects of dihydropyridines are not related to a blockade of presynaptic  $Ca^{2+}$  channels but rather to a blockade of  $Na^+$  channels, and that  $\omega$ -agatoxin-TK represents a good pharmacological tool to study P/Q type  $Ca^{2+}$  channel-mediated responses in cerebral nerve endings.

# I. Antecedentes Generales

## 1. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en el funcionamiento de las terminales nerviosas.

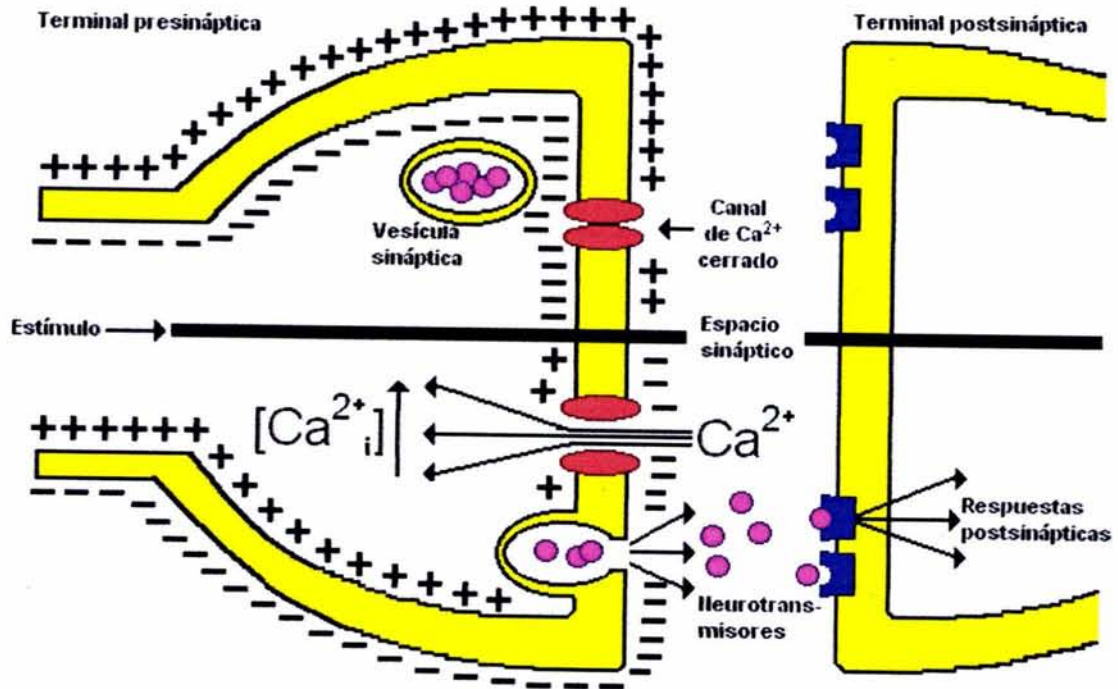
El ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es de vital importancia en la comunicación neuronal, Frankenhaeuser y Hodgkin (1957) examinaron los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  en el axón gigante de calamar y descubrieron que una disminución en la concentración externa de ese ión disminuía el umbral para el inicio de los impulsos nerviosos. Esto demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la excitabilidad de la membrana celular.

Posteriormente Katz y Miledi (1967) demostraron que cuando un potencial de acción invade la terminal nerviosa presináptica, la despolarización que genera, aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la terminal ( $\text{Ca}_i$ ). Más tarde se demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  entra en las células excitables a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, inmersos en la membrana presináptica. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la terminal a favor de su gradiente electroquímico y el aumento transitorio en la concentración de  $\text{Ca}_i$  dispara, de acuerdo con la hipótesis del calcio, la liberación de los distintos neurotransmisores.

En el sistema nervioso central la forma imperante de comunicación entre las neuronas es la comunicación química. La comunicación química consiste en la liberación de los neurotransmisores por la terminal nerviosa presináptica hacia el espacio sináptico. Ahí los neurotransmisores se encuentran con los receptores de la terminal postsináptica, que al ser activados por los neurotransmisores, transducen el mensaje químico a uno eléctrico en la neurona postsináptica (Fig. 1).

Dentro de los principales neurotransmisores clásicos se encuentran: Las catecolaminas dopamina, norepinefrina y epinefrina. La indolamina serotonina o 5-HT. Los neurotransmisores aminoácidos: aspartato (Asp) y glutamato (Glu) que son los neurotransmisores excitadores por excelencia del sistema nervioso central y el neurotransmisor GABA que es el inhibidor por excelencia del sistema nervioso

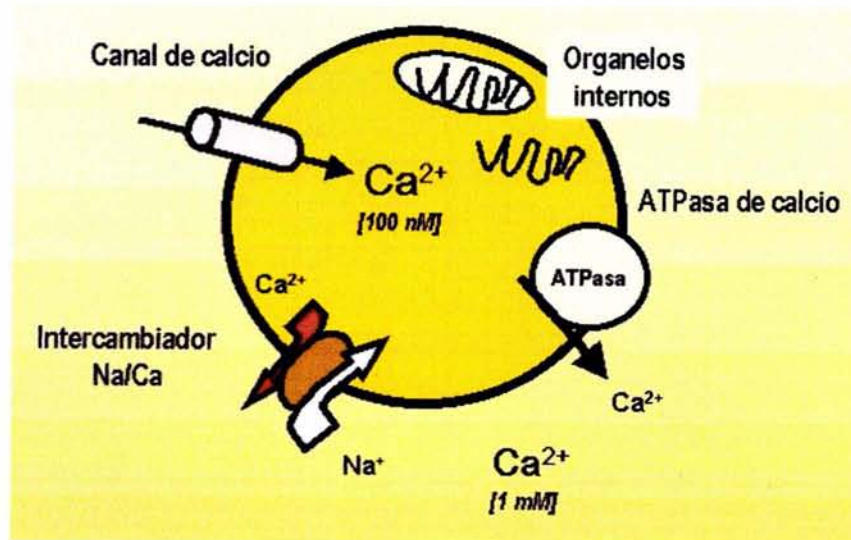
central, y el neurotransmisor glicina que es el principal inhibidor de la médula espinal.



**Figura 1. Esquema de la comunicación neuroquímica.** La mitad superior de la figura esquematiza a las membranas pre y postsináptica en estado de reposo con el interior celular de la terminal presináptica negativo con respecto al exterior, por lo que los canales de  $Ca^{2+}$  se encuentran cerrados. Mitad inferior de la figura: a la llegada de un estímulo despolarizante la polaridad de la membrana presináptica se invierte haciendo que los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje se abran, lo que permite la entrada del ión y propicia la liberación de los neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas por exocitosis. Los neurotransmisores liberados activan a los receptores postsinápticos produciendo diversas respuestas en la terminal postsináptica.

El  $Ca^{2+}$  externo se encuentra a una concentración al menos cuatro órdenes de magnitud mayor que en el interior de la terminal nerviosa cerebral. La despolarización de las terminales nerviosas aisladas propicia la apertura de los canales presinápticos de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje y el  $Ca^{2+}$ , siguiendo su gradiente de concentración, fluye al interior de las mismas.

En la mayoría de las terminales nerviosas el  $\text{Ca}_i$  está alrededor de 100 nM. Esta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantiene gracias a diferentes mecanismos como son el intercambiador Na/Ca, la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y los organelos secuestradores de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rahamimoff y col., 1980). La figura 2 es un esquema que ilustra estos puntos.



**Figura 2.** Movimientos y distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  en las terminales nerviosas.

En las terminales nerviosas además del  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Na}^+$  es otro ión de vital importancia para la comunicación neuronal, pues también el aumento en la concentración de  $\text{Na}_i$  culmina en la liberación de los neurotransmisores. El aumento en la concentración de  $\text{Ca}_i$  en las terminales nerviosas promueve la liberación exocitótica de los neurotransmisores y el aumento del  $\text{Na}_i$  en las terminales nerviosas dispara la liberación, de los neurotransmisores a través de la reversión de los transportadores específicos para cada neurotransmisor (Fig. 3).



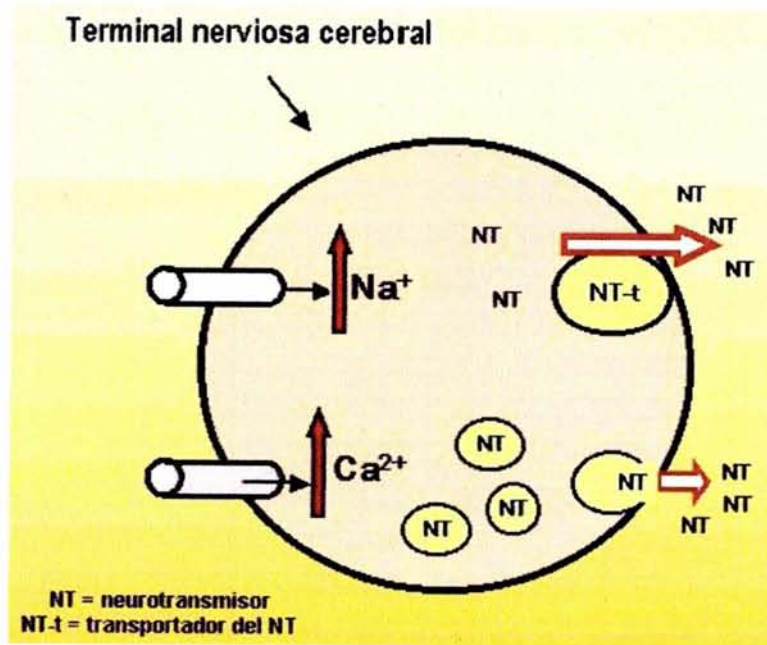


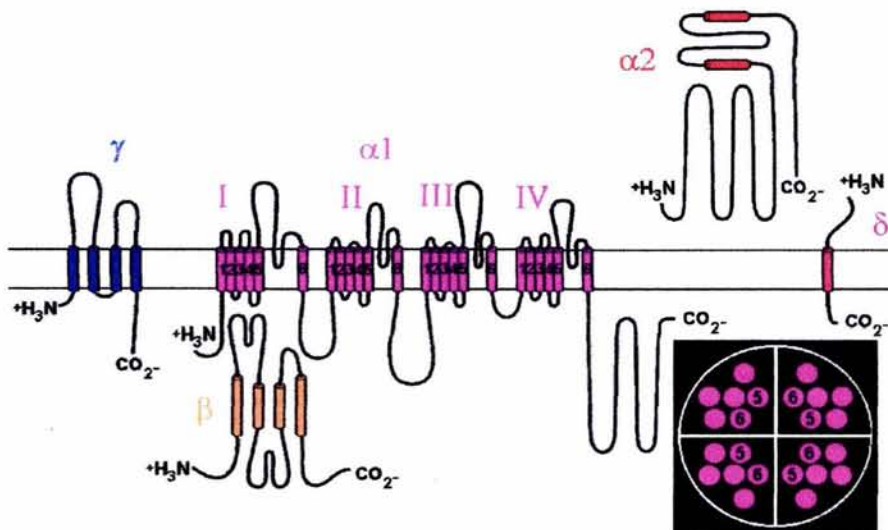
Figura 3. Principales mecanismos de liberación de neurotransmisores.

## 2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$

### a) Estructura molecular

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, como muchos otros canales iónicos, están compuestos de diferentes subunidades. Hay cuatro diferentes subunidades asociadas con la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje:  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\alpha_2$ - $\delta$ . La subunidad  $\alpha_1$  (Fig 4) constituye el poro del canal a través del cual fluyen los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Snutch y col., 1990), consta de cuatro dominios homólogos, cada uno con seis segmentos transmembranales. Las subunidades auxiliares  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\alpha_2$ - $\delta$  modifican las propiedades biofísicas de la subunidad  $\alpha_1$  y regulan su transporte (Arikath y Campbell, 2003). La subunidad  $\beta$  es completamente citosólica, por lo que interactúa intracelularmente con  $\alpha_1$ . La subunidad  $\gamma$  consta de cuatro segmentos transmembranales. Encontrada

originalmente en músculo esquelético, se ha reportado también en células neuronales. A diferencia de  $\alpha_2\text{-}\delta$  y  $\beta$ , esta subunidad no está involucrada en el transporte de  $\alpha_1$ , pero sí modula sus propiedades biofísicas. (Arikkath y Campbell, 2003). Producida por un solo gen, la subunidad  $\alpha_2\text{-}\delta$  es cortada post-traduccionalmente en los péptidos  $\alpha_2$  y  $\delta$ , que posteriormente son unidos por puentes disulfuro formando  $\alpha_2\text{-}\delta$ . Mientras que  $\delta$  tiene una sola región transmembranal con una porción intracelular muy corta,  $\alpha_2$  es completamente extracelular y es la porción que interactúa con  $\alpha_1$ .



**Figura 4. Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ .** La subunidad  $\alpha_1$  está constituida por aproximadamente 2000 aminoácidos, con una masa molecular cercana a los 240 000 daltones. Los sensores de voltaje son cargas positivas en las hélices S4, el filtro de selectividad está formado por regiones que contienen glutamato en el asa entre S5-S6, el poro conductor de iones está comprendido por las 4 repeticiones de S5 + el asa S5-S6 + S6. El recuadro muestra el posible arreglo de los segmentos transmembranales que forman el poro selectivo del ión calcio.

## b) Diversidad de los canales de $\text{Ca}^{2+}$

En las últimas dos décadas se ha demostrado que existen distintos subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje. La primera clasificación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje se basó en el umbral aparente de activación de las corrientes macroscópicas. De acuerdo con este criterio se distinguieron dos clases de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : los canales de bajo umbral de activación (LVA), que se activan a potenciales de membrana relativamente negativos, y los de alto umbral de activación (HVA) que comienzan a activarse en forma detectable a potenciales de membrana cercanos a -30 mV. El análisis mediante la técnica de "patch clamp" demostró que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  LVA pasan a través de canales de baja conductancia llamados canales T. Las corrientes HVA pasan a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de mayor conductancia (Nowycky y col., 1985). Investigaciones posteriores demostraron una variedad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA, que diferían en sus respuestas a los bloqueadores orgánicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dichos bloqueadores incluyen a las dihidropiridinas como la nifedipina, nimodipina y nitrendipina, a las fenilalquilaminas como el verapamil y a las benzotiazepinas, como el diltiazem. Así, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA fueron subdivididos farmacológicamente con base en su sensibilidad a las dihidropiridinas. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a dihidropiridinas no se inactivan y por lo tanto en respuesta a la despolarización producen corrientes de larga duración (*Long Lasting*) por lo que se denominaron tipo L.

Las neurotoxinas producidas por diferentes especies, tanto de plantas como de animales marinos o terrestres, han sido herramientas farmacológicas muy valiosas en la Neurobiología. Algunas toxinas peptídicas contenidas en el veneno de animales ponzoñosos bloquean potentemente a las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  insensibles a dihidropiridinas. Por mucho, la toxina peptídica más estudiada es la  $\omega$ -conotoxina-GVIA extraída del veneno del caracol marino *Conus geographus*. Esta toxina a concentraciones en el rango micromolar, bloquea las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L son insensibles a la  $\omega$ -conotoxina-GVIA. La  $\omega$ -agatoxina-IIIa, un péptido purificado del veneno de la araña

*Agelenopsis aperta*, bloquea en un rango de 50-100 nM, tanto canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N como tipo L (Mintz y col., 1991). En algunas neuronas del sistema nervioso central de vertebrados una fracción significativa de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  es resistente al efecto combinado de dosis supramáximas de dihidropiridinas y  $\omega$ -conotoxina-GVIA, así como  $\omega$ -agatoxina-III A. El flujo de corriente remanente pasa a través de otro tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los denominados tipo P y tipo Q. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P son bloqueados por la  $\omega$ -agatoxina-IV A, encontrada en la fracción IV del veneno de *Agelenopsis aperta* (Mintz y col., 1992) y los canales tipo Q por la  $\omega$ -conotoxina-MVIIC contenida en el veneno del caracol marino *Conus geographus* (Hillyard y col., 1992). Sin embargo, aunque la  $\omega$ -conotoxina-MVIIC es más potente sobre los canales Q también bloquea a los canales P, y aunque la  $\omega$ -agatoxina-IV A es más potente sobre los canales P, también bloquea a los canales tipo Q (Zhang y col., 1993; Sather y col., 1993). La  $\omega$ -agatoxina-TK es una toxina extraída del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, que en estudios electrofisiológicos en neuronas de hipocampo y corteza, también bloquea a los canales P/Q (Teramoto y col., 1995 y 1997). Pero sus efectos en terminales nerviosas cerebrales no han sido explorados. También se ha encontrado otro tipo de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en las neuronas de vertebrados. Estas corrientes denominadas tipo R son sensibles a los cationes divalentes níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) y cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) a concentraciones de 33  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Ellinor y col., 1993).

Los tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje presentes en distintas porciones de la neurona, tales como el soma, las dendritas, los axones y las terminales nerviosas son farmacológicamente diferentes (Timmermann y col., 2001). Los estudios en terminales nerviosas cerebrales indican que la liberación de neurotransmisores está regulada por varios tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, aunque los del tipo N, P y Q parecen ser particularmente importantes (Turner y col., 1992; Gaur y col., 1994; Sitges y Chiu, 1995a y b; Soliakov y Wonnacott, 1996).

En la tabla 1 se resumen las características de los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje.

**Tabla 1. Clasificación electrofisiológica y características de los canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje**

	Tipo T	Tipo N	Tipo L	Tipo P/Q	Tipo R
Dependencia de voltaje	LVA	HVA	HVA	HVA	HVA
Umbral de activación (mV)	-70	-20	-30 ~ -10	-30	-30
Rango de inactivación (mV)	-100 ~ -60	-120 ~ -30	-60 ~ -10		
Constante de tiempo de inactivación (ms) <sup>a</sup>	20-50	50-80	> 500		20-40
Conductancia de canal unitario (pS) <sup>b</sup>	8	13	25	10-20	14
Selectividad iónica	Ba <sup>2+</sup> =Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>
Bloqueo por iones divalentes	Ni <sup>2+</sup> > Cd <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> > Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> > Ni <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup> > Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup> > Cd <sup>2+</sup>
Isoforma	α <sub>1G</sub> , α <sub>1H</sub> , α <sub>1I</sub>	α <sub>1B</sub>	α <sub>1S</sub> , α <sub>1C</sub> , α <sub>1D</sub> y α <sub>1F</sub>	α <sub>1A</sub>	α <sub>1E</sub>
Nomenclatura estructural*	Ca <sub>v</sub> 3.1, 3.2 y 3.3	Ca <sub>v</sub> 2.2	Ca <sub>v</sub> 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4	Ca <sub>v</sub> 2.1	Ca <sub>v</sub> 2.3
Antagonistas / Bloqueadores	Mibefradil ω-Aga IIIA	ω-CTX GVIA ω-Aga IIIA	DHPs, PAAs BTZ	FTX ω-CTX-MVIIC	ω-Aga IIIA

Modificado de Hille 2001. LVA = activación con bajo voltaje; HVA = activación con alto voltaje; pS = picosiemens; DHPs = dihidropiridinas; PAAs = fenilalkilaminas; ω-CTX GVIA = ω-conotoxina-GVIA de *Conus gographus*; ω-aga IIA = ω-agatoxina IIA; FTX=toxina del veneno de *Agelenopsis aperta*; BTZs=benzotiazepinas; ω-CTX-MVIIC = conotoxina de *Conus magus*. <sup>a</sup> V<sub>m</sub> = 0 mV, en presencia de EGTA intracelular. <sup>b</sup> con 110 mM de Ba<sup>2+</sup> externo como portador de carga.\*Ertel y col. 2000

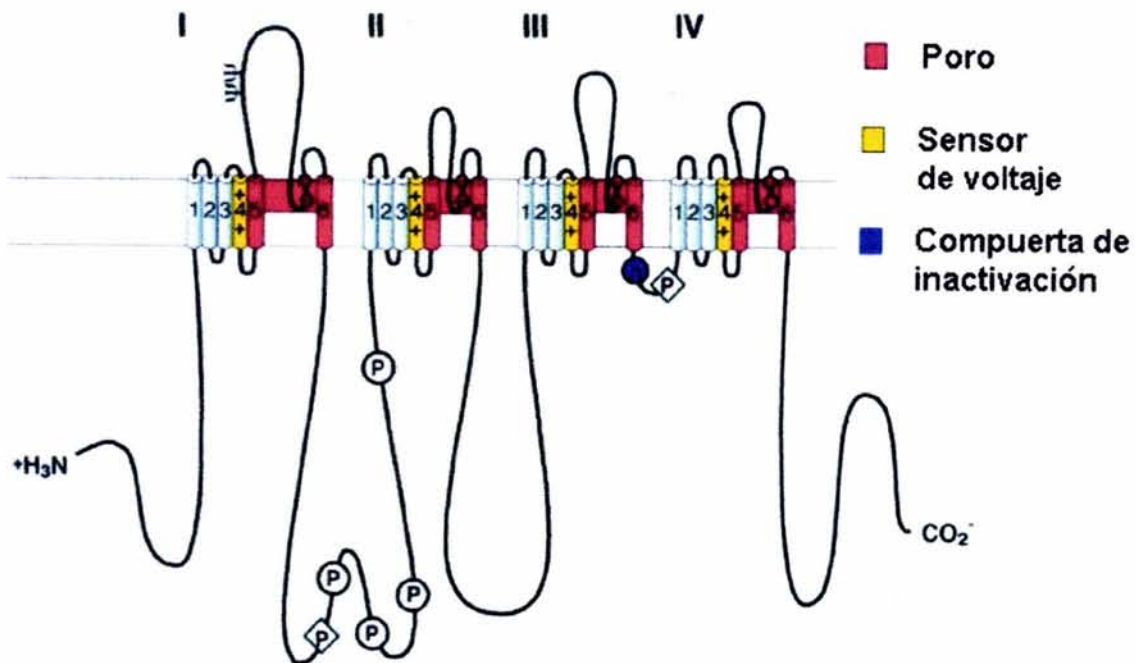
### *c) Localización de canales de $Ca^{2+}$*

Por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que existe una distribución diferencial de los canales de  $Ca^{2+}$  en las distintas subregiones neuronales. Por ejemplo, con el anticuerpo monoclonal MANC-1, que reconoce a la subunidad  $\alpha_2$  del canal de calcio del músculo esquelético sensible a dihidropiridinas, se ha reportado que en neuronas así como en interneuronas de hipocampo, los canales tipo L se encuentran concentrados principalmente en los cuerpos celulares y en la base de las dendritas mayores (Westenbroek y col., 1990). Esta misma distribución de los canales tipo L también se ha reportado en neuronas corticales en cultivo (Timmermann y col., 2002). En neuronas de hipocampo los canales tipo N se localizan principalmente en dendritas y terminales nerviosas, además de estar presentes también en el soma, de neuronas de corteza cerebral y de cerebelo aunque en densidades muy bajas (Westenbroek y col., 1992). Los canales P/Q están distribuidos principalmente en neuronas de cerebelo, presentes en somas, dendritas y terminales nerviosas, aunque con una densidad mucho mayor en terminales nerviosas (Westenbroek y col., 1995). En neuronas corticales en cultivo los canales tipo R tienen un patrón de localización somatodendrítica de manera similar a la reportada para los canales tipo L (Westenbroek y col., 1990; Timmermann y col., 2002). La localización subcelular de los canales de  $Ca^{2+}$  LVA se ha aclarado gracias a estudios funcionales de las corrientes tipo T, que sugieren que los canales tipo T están localizados preferentemente en las dendritas de diversas neuronas (Yunker y McEnery, 2003). Sin embargo, la localización inmunohistoquímica de un tipo de canal de  $Ca^{2+}$  no indica forzosamente funcionalidad. Tampoco podemos descartar que las homologías entre los distintos tipos de canales de  $Ca^{2+}$  permitan cierto grado de cruce entre los anticuerpos específicos para los distintos canales de  $Ca^{2+}$ .

### 3. Canales de Na<sup>+</sup>

#### a) Estructura molecular

Los canales de sodio están constituidos por una sola subunidad  $\alpha$  (figura 5) asociada a subunidades auxiliares  $\beta$ . Los canales de sodio en el sistema nervioso central contienen subunidades  $\beta_1$  (o  $\beta_3$ ) y  $\beta_2$ , a diferencia del canal de sodio del músculo esquelético, en el que sólo se encuentra la subunidad  $\beta_1$ . La subunidad  $\alpha$  que forma el poro del canal es suficiente para la expresión funcional del canal. El papel de las subunidades  $\beta$  se ha relacionado con la modulación de la cinética y dependencia de voltaje del canal (Goldin y col., 2000). La subunidad  $\alpha$  del canal de Na<sup>+</sup> al igual que la subunidad  $\alpha_1$  del canal de Ca<sup>2+</sup> está formada por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno formado por de 6 segmentos transmembranales (S1-S6) y un segmento re-entrante localizado entre los segmentos S5 y S6. Las uniones re-entrantes que conectan a los segmentos S5 y S6 forman el filtro de selectividad iónica y la región externa del poro. Los segmentos S4 están cargados positivamente y sirven como los sensores de voltaje. La inactivación es regulada por la unión intracelular corta que conecta a los dominios III y IV (Catterall y col., 2003).



**Figura 5.** Esquema de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio. Se representan los cuatro dominios homólogos (I-IV) con sus seis segmentos transmembranales numerados del 1 al 6. En color rojo se muestra la región que conforma al poro, el segmento 4 en amarillo es el sensor de voltaje y en azul la región de inactivación (tomado de Cestele y Catterall, 2000).

### b) Sitios del canal de $\text{Na}^+$ sensible a voltaje

Todos los fármacos y toxinas conocidos que interactúan con los canales de sodio tienen sitios receptores en las subunidades  $\alpha$ . Se han identificado al menos seis distintos sitios receptores, para neurotoxinas, para anestésicos y otros fármacos relacionados.

El **sitio 1** del canal de  $\text{Na}^+$  está formado por dos anillos de residuos aminoácidos en el segmento re-entrante entre S5 y S6, del lado intramembranal cercano a S6 en cada uno de los cuatro dominios que forman el poro del canal. El receptor es ocupado extracelularmente por dos grupos diferentes de toxinas: las



guanidinas heterocíclicas hidrosolubles, tetrodotoxina y saxitoxina extraídas del pez globo (*Fugu spp.* y *Spheroides rupripes*) y un dinoflagelado (*Gonyaulax catenella*), respectivamente y toxinas peptídicas como las  $\mu$ -conotoxinas, contenidas en el veneno del caracol marino *Conus geographus* (Cestele y Catterall, 2000), aunque también se les encuentra en cangrejos, pulpos y anfibios.

La tetrodotoxina y la saxitoxina, se unen al sitio 1 que está localizado en la porción externa del poro, previniendo así el acceso del  $\text{Na}^+$  al interior de la célula. Las  $\mu$ -conotoxinas inhiben selectivamente a las corrientes de sodio del músculo esquelético pero no las corrientes de sodio cardíacas o neuronales (Olivera, 1997).

El **sitio 2** está localizado en la región transmembranal S6 del dominio I (IS6) de la subunidad  $\alpha$ , aunque también algunos residuos aminoácidos del segmento S6 del dominio IV han sido involucrados en la formación del sitio 2. A este sitio que es el sensor de voltaje del canal de sodio, se unen varias toxinas de origen natural como: las grayanotoxinas liposolubles encontradas en plantas de la familia Ericaceae, el alcaloide veratridina de la familia Lilaceae, la aconitina de la planta *Acontinum napellus* y la batracotoxina que se encuentra en la piel de la rana dardo *Phyllobates aurotaenia*. Estas toxinas se unen al estado activado (abierto) del canal de  $\text{Na}^+$  impidiendo su inactivación. Se ha sugerido que el bloqueo de la inactivación inducida por este grupo de toxinas se debe a su interacción con el segmento transmembranal S6 del dominio IV, que es requerido para la inactivación rápida. Esto causa una activación persistente del canal de sodio que lleva el potencial de membrana en el sentido de la despolarización (Cestele y Catterall, 2000).

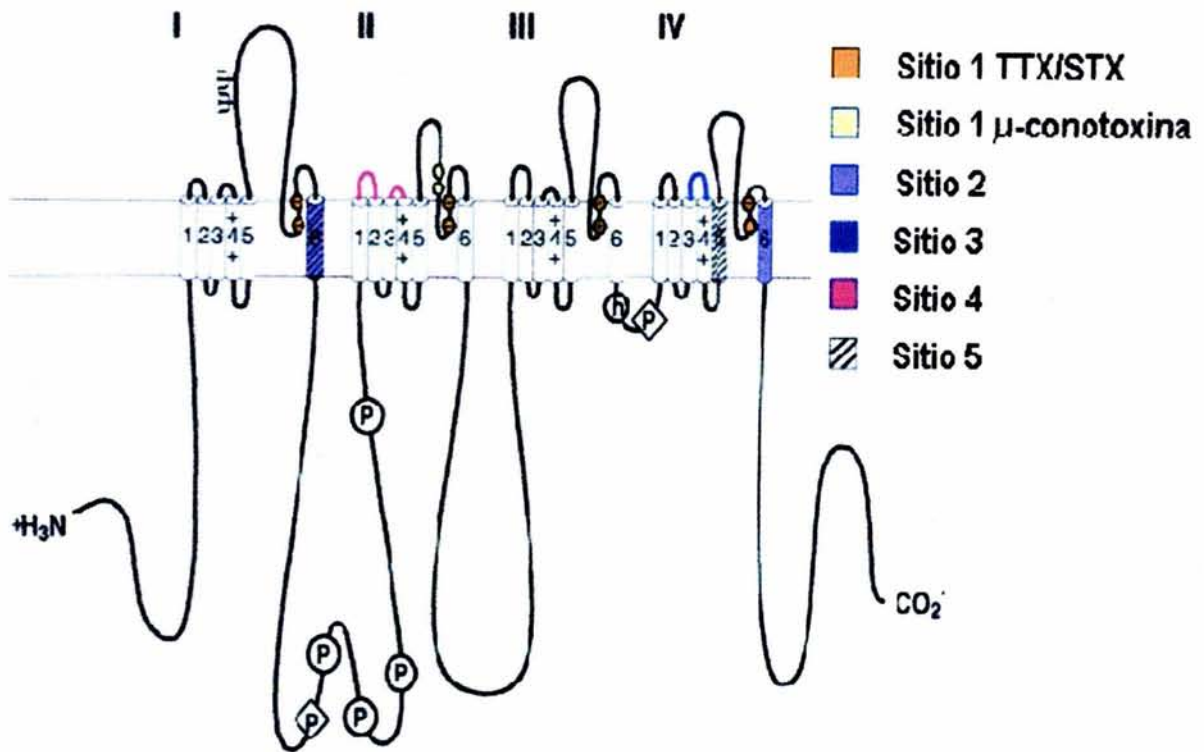
Las asas extracelulares que conectan los segmentos S5 y S6 en el dominio I del canal conforman al **sitio 3** del canal de sodio, aunque también las asas extracelulares que unen a los segmentos transmembranales S5 y S6 en el dominio IV se han involucrado en la formación del sitio 3. A este sitio se unen varias toxinas polipeptídicas, como las toxinas  $\alpha$  de escorpión, toxinas de anémonas y  $\delta$ -atracotoxinas de algunas arañas. Se presume que todas estas toxinas disminuyen

o bloquean la inactivación del canal de sodio sin afectar el estado activado del mismo. La afinidad de unión de estas toxinas es disminuida por despolarización de los canales de sodio de cerebro de rata. La acción específica de estas toxinas sobre la inactivación implica que el potencial de membrana afecta la estructura del receptor del sitio 3 y que esta región del canal es importante para el acoplamiento de la activación e inactivación. La unión de la toxina previene el cambio conformacional requerido para la inactivación rápida (Cestele y Catterall, 2000).

El **sitio 4** está localizado en las asas extracelulares S3-S4 del dominio II, de la subunidad  $\alpha$  del canal. Las toxinas  $\beta$  extraídas de los escorpiones *Centruroides suffusus* y *sculpturatus* se unen al sitio 4. Las toxinas  $\beta$  a diferencia de las toxinas  $\alpha$  de escorpión, producen una hiperexcitabilidad menor. Además las toxinas  $\beta$ , reducen la amplitud de las corrientes de sodio e inhiben la inactivación. (Strichartz y col., 1987).

En la formación del receptor del **sitio 5** participan los segmentos transmembranales IS6 y IVS5. De una manera similar a las toxinas que actúan sobre el sitio 2, las brevetoxinas y ciguatoxinas liposolubles aisladas de los dinoflagelados *Ptychodiscus brevis* y *Gambierdiscus toxicus*, respectivamente, aumentan la actividad del canal de  $\text{Na}^+$ , al inhibir la inactivación del canal y causan un cambio en la activación hacia potenciales de membrana mas negativos y el bloqueo de la inactivación (Cestele y Catterall, 2000).

La localización del **sitio 6** en el canal de sodio no ha sido definida. Este sitio es sensible a la conotoxina-TxVIA aislada del veneno del caracol *Conus textile* que aunque es muy tóxica en moluscos, presenta una toxicidad mucho menor en vertebrados, conservando su afinidad por los canales de sodio. Se presume que la conotoxina-TxVIA prolonga los potenciales de acción, al inhibir la inactivación de las corrientes de sodio. Aunque la TxVIA produce los mismos efectos fisiológicos que producen las toxinas de unión al sitio 3, su unión no es dependiente de voltaje y su modulación alostérica es distinta (Cestele y Catterall, 2000).



**Figura 6.** Localización de los sitios receptores a neurotoxinas en la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio de mamíferos. Los seis sitios identificados para cada tipo de neurotoxina están representados en diferentes colores. (Tomado de Cestele y Catterall, 2000). TTX/STX, tetrodotoxina/saxitoxina.

Finalmente, los anestésicos locales y algunos fármacos antiepilépticos y antiarrítmicos se unen a sitios receptores que se superponen en la cavidad interna del poro del canal de sodio (French y col., 1998). Los residuos aminoácidos en los segmentos S6 de al menos tres de los cuatro dominios transmembranales contribuyen a la formación de este complejo sitio receptor de dichos fármacos, con el segmento IVS6 jugando un papel dominante.

### *c) Localización de canales de Na<sup>+</sup>*

Hasta ahora se han descrito nueve estructuras homólogas de la subunidad  $\alpha$  que van desde la Na<sub>v</sub>1.1 hasta la Na<sub>v</sub>1.9 (Goldin y col., 2000). Las subunidades que forman los canales Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3 y Na<sub>v</sub>1.7 son las más relacionadas entre sí de acuerdo a la homología entre sus secuencias de aminoácidos. Estos canales son altamente sensibles a tetrodotoxina y están ampliamente expresados en neuronas. Los canales Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.8 y Na<sub>v</sub>1.9, que son el segundo grupo más relacionado entre sí son resistentes en mayor o menor grado a la tetrodotoxina y se expresan en el corazón y en el ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal. Los canales Na<sub>v</sub>1.4 se expresan principalmente en el músculo esquelético. Los Na<sub>v</sub>1.6, que se expresan principalmente en el sistema nervioso central conforman un grupo aparte (Catterall y col., 2003).

## **4. Estrategias para despolarizar sinaptosomas**

Las terminales nerviosas son las estructuras especializadas de la neurona para la liberación de los neurotransmisores. Las terminales nerviosas purificadas de cerebro completo o de alguna región cerebral de mamífero, conocidas como sinaptosomas, pueden ser aisladas por métodos bien establecidos (Hajos, 1975; Rodríguez y Sitges 1996). La obtención de la preparación sinaptosomal es el equivalente de disecar la maquinaria bioquímica cerebral necesaria para la liberación de los neurotransmisores, por lo que resulta la preparación ideal para caracterizar el mecanismo de acción de toxinas y fármacos que alteran la liberación de los neurotransmisores.

El diámetro promedio de las terminales nerviosas del cerebro del mamífero es de menos de medio micrómetro, lo que impide emplear métodos electrofisiológicos para despolarizarlas. Esta imposibilidad ha llevado a los neuroquímicos interesados en el funcionamiento de la comunicación neuronal a nivel presináptico, a idear estrategias alternativas para despolarizar a las terminales nerviosas cerebrales ó sinaptosomas.

Las estrategias más comúnmente utilizadas para despolarizar a los sinaptosomas incluyen el uso de medios extracelulares preparados con una elevada concentración de  $K^+$  ( $> 10$  mM, por lo general 30 mM) y el uso de toxinas como la veratridina, o la batracotoxina que incrementan la permeabilidad al  $Na^+$ . La liberación de neurotransmisores inducida con  $K^+$  alto requiere de la disponibilidad de los canales de  $Ca^{2+}$  pero no requiere de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje, pues depende de  $Ca^{2+}$  externo y no se inhibe en ausencia de  $Na^+$  externo o en presencia de tetrodotoxina. En cambio, la liberación de neurotransmisores que induce la veratridina es completamente dependiente de la disponibilidad de los canales de  $Na^+$ , pues es inhibida en ausencia de  $Na^+$  externo o en presencia de tetrodotoxina (Sitges y col., 1993; Sitges y Chiu, 1995a). Como se mencionó anteriormente, la veratridina aumenta la permeabilidad al  $Na^+$  de manera sostenida al impedir la inactivación del canal. Esto hace que dentro de las terminales nerviosas expuestas a veratridina, el  $Na^+$  alcance valores muy elevados capaces de liberar al neurotransmisor a través del transportador en su forma inversa de manera independiente de  $Ca^{2+}$  externo. La veratridina también eleva al  $Ca^{2+}$  interno como consecuencia de la despolarización que causa la entrada de  $Na^+$  por los canales de  $Na^+$  sensibles a veratridina (Sitges y col., 1998).

Adicionalmente a estas dos estrategias, que son las más comúnmente utilizadas para despolarizar a los sinaptosomas e inducir cambios iónicos y liberación de neurotransmisores, también se pueden utilizar bloqueadores de los canales de  $K^+$  tales como la 4-AP (Tapia y Sitges, 1982; Tibbs y col., 1989; Scheer y Lavoie, 1991; Carvalho y col., 1995) ó ionóforos tales como el A-23187, la monensina y la nigericina (Sitges, 1989; Rodríguez y Sitges, 1996). La inversión funcional de los sistemas de recaptura de neurotransmisores, así como la reversión del intercambiador Na/Ca, también aumentan la liberación de neurotransmisores (Sitges y col., 1993). Sin embargo no todos estos recursos inductores de la liberación producen una liberación excitotónica. La liberación de neurotransmisores por excitotoxicidad es la generada por el influjo transitorio del ión  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje en las terminales presinápticas. Además se puede inducir liberación de neurotransmisores sin

involucrar la participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje aumentando al  $\text{Ca}_i$  por medio de la activación de receptores de organelos intracelulares que almacenan  $\text{Ca}^{2+}$  como el receptor de rianodina ó el receptor de inositol trifosfato.

## II. Planteamiento del problema.

Como se mencionó anteriormente, la nitrendipina, nimodipina y nifedipina son dihidropiridinas que pertenecen a la familia de fármacos conocidos globalmente como bloqueadores orgánicos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que por lo común son usados indistintamente a bajas concentraciones (iguales o inferiores a  $1 \mu\text{M}$ ) como bloqueadores selectivos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Sin embargo, estudios previos han mostrado que las dihidropiridinas, a altas concentraciones, pueden interaccionar también con canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, (Yatani y Brown, 1985; Sitges, 1989; Pauwels y col., 1990). Por ejemplo, la nitrendipina, nimodipina y nifedipina desplazan la unión de la batracotoxina en las terminales nerviosas aisladas de cerebro de rata (Pauwels y col., 1990). Además la liberación de [ $^3\text{H}$ ]GABA que induce la veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo es inhibida de manera dependiente de dosis por la nitrendipina en el rango micromolar bajo ( $6\text{-}60 \mu\text{M}$ ) (Sitges, 1989).

Considerando la diversidad molecular de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los diferentes patrones electrofisiológicos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en varios tejidos (Zhang y col., 1993), así como las evidencias que sugieren importantes diferencias estructurales y funcionales entre los canales neuronales de  $\text{Na}^+$  de moluscos y los de mamíferos (Shichor y col., 1996), decidimos evaluar en terminales nerviosas cerebrales el efecto de las dihidropiridinas (nimodipina, nitrendipina y nifedipina) sobre el  $\text{Na}_i$  y  $\text{Ca}_i$ , pues estos dos cationes son determinantes en el control de la liberación de los neurotransmisores cerebrales.

Entre las múltiples clases de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  aquéllos sensibles a la  $\omega$ -agatoxina-IVA del veneno de *Agelenopsis aperta* parecen estar particularmente

implicados en la exocitosis de neurotransmisores de terminales nerviosas aisladas de varias regiones cerebrales (Turner y col., 1993; Sitges y Chiu, 1995a y 1995b; Carvalho y col., 1995). Además de la  $\omega$ -agatoxina-IVA, el veneno de *Agelenopsis aperta* contiene otro péptido conocido como  $\omega$ -agatoxina-TK que es el péptido más abundante en el veneno. La  $\omega$ -agatoxina-TK, comparte el 71% de homología con  $\omega$ -agatoxina-IVA pero presenta un grupo amino terminal cargado negativamente, que contrasta con la  $\omega$ -agatoxina-IVA (Teramoto y col., 1993). Los canales sensibles a la  $\omega$ -agatoxina-TK han sido reportados en neuronas cerebelosas de Purkinje, neuronas de hipocampo de rata en cultivo y neuronas de corteza de rata. (Teramoto y col., 1993, 1995 y 1997). En las neuronas de corteza de rata y en las neuronas cerebelosas de Purkinje la potencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK es comparable con la de la  $\omega$ -agatoxina-IVA para bloquear las corrientes de  $Ca^{2+}$  (Teramoto y col., 1993; Kuwada y col., 1994). Considerando que las corrientes registradas en neuronas en cultivo reflejan la actividad de los canales presentes en los cuerpos neuronales y no la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  presentes en terminales nerviosas cerebrales, en esta tesis también se caracterizó el efecto de la  $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento en el  $Ca_i$  ó en el  $Na_i$  inducido por despolarización en las terminales nerviosas cerebrales aisladas y se comparó con el de la  $\omega$ -agatoxina-IVA y las dihidropiridinas antes mencionadas.

Para analizar los efectos de las dihidropiridinas y las agatoxinas sobre la concentración de  $Na_i$  y  $Ca_i$ , utilizamos SBFI y Fura-2 respectivamente, que son indicadores fluorescentes sensibles a dichos iones. También estudiamos los efectos de las dihidropiridinas y las agatoxinas sobre la liberación simultánea de varios neurotransmisores endógenos, inducida por  $K^+$  alto o veratridina.

El aumento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto en sinaptosomas es independiente de los canales de  $Na^+$  sensibles a tetrodotoxina (Sitges y Chiu, 1995a; Meder y col., 1997), mientras que el incremento en la permeabilidad de los canales de  $Na^+$  inducido por veratridina no requiere de la presencia de  $Ca^{2+}$  externo (Sitges y col., 1998). Con base en las diferencias entre la despolarización de las terminales nerviosas con  $K^+$  alto y con veratridina es posible distinguir entre los efectos mediados por los canales presinápticos de  $Na^+$  y los efectos mediados

por los canales presinápticos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, al comparar los efectos de fármacos con potencial neuroprotector, como la trifluoperazina, la vinpocetina y la dizclopina sobre los flujos iónicos inducidos por  $\text{K}^+$  alto y veratridina, en sinaptosomas, se desenmascaró el efecto inhibitor de dichos fármacos sobre los canales cerebrales presinápticos de  $\text{Na}^+$  (Sitges y col., 1998; Sitges y Nekrassov, 1999; Sitges y col., 2000).

En la presente tesis esta estrategia fue usada para caracterizar la acción de los bloqueadores putativos de canales presinápticos de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (nitrendipina, nimodipina y nifedipina), así como la acción de las toxinas de *Agelenopsis aperta* sobre el aumento en el  $\text{Na}_i$  y  $\text{Ca}_i$  y la liberación de neurotransmisores inducidos por despolarización con  $\text{K}^+$  alto y con veratridina.

## **IV. Métodos**

### **1. Obtención de sinaptosomas**

La mayor parte del trabajo experimental de esta tesis se realizó en sinaptosomas estriatales como preparación modelo de sinaptosomas cerebrales, debido a que la población de terminales nerviosas en el estriado contiene a las terminales nerviosas glutamatérgicas de la vía cortico-estriatal, así como a las terminales nerviosas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal y a las terminales nerviosas GABAérgicas de las interneuronas estriatales, lo que permite estudiar simultáneamente los efectos de los bloqueadores putativos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la liberación de dopamina y de los neurotransmisores aminoácidos.

También se usó la preparación de sinaptosomas de hipocampo, que también contiene terminales nerviosas glutamatérgicas y GABAérgicas. Aunque la preparación sinaptosomal de hipocampo no contiene gran cantidad de terminales nerviosas dopaminérgicas, tiene un gran número de terminales nerviosas glutamatérgicas, lo que nos permite comparar los efectos de las diferentes  $\omega$ -agatoxinas utilizadas en el proyecto.



En cada experimento, se extraen el estriado y el hipocampo de cuatro ratas macho Wistar (250-300 g), para obtener la preparación sinaptosomal. El método consiste en homogeneizar por separado estas estructuras cerebrales en sacarosa 0.32 M (1:9 peso: volumen) a 2,000 rpm con seis golpes del pistilo del homogeneizador en el tubo de vidrio (0.15mm de espacio entre el pistilo y el tubo). El homogeneizado resultante se centrifuga a 110 g durante 10 min. El sobrenadante que resulta de esta primera centrifugación, se vuelve a centrifugar ahora a 8,200 g durante 20 min, el precipitado que se obtiene de esta segunda centrifugación constituye la fracción sinaptosomal P<sub>2</sub>, que es resuspendida en ringer estándar de Krebs con HEPES (RKH). La composición del RKH es, en mM: 127 NaCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.37 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 20 HEPES y 5.6 de dextrosa, con pH de 7.4, burbujeado con una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Todo el procedimiento anterior se realiza a 4°C.

## **2. Determinación de Na<sub>i</sub> y Ca<sub>i</sub> en sinaptosomas**

Para cuantificar las concentraciones iónicas internas se emplearon indicadores fluorescentes sensibles a iones siguiendo el método reportado previamente (Rodríguez y Sitges, 1996; Sitges y col., 1998). En breve, la fracción sinaptosomal se incubó con SBFI-AM (10µM) o Fura-2-AM (5µM) por 45 min a 37°C para propiciar la incorporación del indicador. Terminada la incubación se procedió a lavar al marcador fluorescente no incorporado a los sinaptosomas, por medio de dilución y centrifugación. Después de lavar el marcador fluorescente no incorporado, los "pellets" sinaptosomales finales, fueron suspendidos en 1 ml de RKH. La suspensión sinaptosomal se mantuvo a 4°C en oscuridad y los experimentos se realizaron dentro de las siguientes 2 horas después de obtenida la preparación. Alícuotas (200 µl) de estas resuspensiones de sinaptosomas fueron transferidas a cubetas de acrílico y diluidas 10 veces en RKH para tener un volumen final de 2 ml en agitación constante. Después de que las alícuotas fueron sometidas a diferentes condiciones experimentales, las concentraciones de Na<sub>i</sub> y Ca<sub>i</sub> se estimaron a partir de la fluorescencia emitida por los marcadores

fluorescentes. La fluorescencia se detectó con un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS-50) conectado a una computadora compatible con IBM. La  $\lambda$  de emisión se mantuvo a 505 nm y las longitudes de onda ( $\lambda$ ) de excitación fueron medidas a 340 y 380 nm. La razón de 340/380 nm se midió en condiciones control por algunos minutos, después los sinaptosomas se despolarizaron agregando las alícuotas correspondientes para obtener una concentración final de  $K^+$  30 mM ó de veratridina 10  $\mu$ M en la cubeta, esto se hizo en la ausencia o presencia del fármaco a probar (i.e. nimodipina, nitrendipina, nifedipina, tetrodotoxina,  $\omega$ -agatoxina-IVA) y la recolección de datos se realizó por otros 3-5 minutos.

Los experimentos se desarrollaron a temperatura ambiente (22-25°C). La concentración de  $Ca_i$  fue estimada siguiendo el método de la razón de 340/380nm (Grynkiewicz y col., 1985), y la concentración de  $Na_i$  se estimó siguiendo el método reportado previamente (Rodríguez y Sitges, 1996) con pequeñas modificaciones que lo mejoran. Por ejemplo, al final de cada corrida experimental los sinaptosomas fueron expuestos a una alícuota de gramicidina (3 $\mu$ M final) a fin de obtener un valor máximo de la razón de esa muestra específica a la concentración fisiológica (147 mM) de  $Na^+$  externo. Este valor fue usado después para corregir las razones obtenidas en la curva de calibración para la estimación de la concentración de  $Na_i$  en mM.

### **3. Liberación de neurotransmisores endógenos de sinaptosomas**

En el laboratorio se diseñó un método que permite estudiar la liberación simultánea de varios neurotransmisores endógenos en la misma población de sinaptosomas usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Sitges y Nekrasov 1999). Los aminoácidos endógenos, Glu, Asp, GABA y glicina, se determinan posteriormente a su derivación con un reactivo fluorescente por medio de un detector de fluorescencia. Las concentraciones de las catecolaminas (dopamina y DOPAC) en terminales de estriado se determinaron por HPLC mediante un detector electroquímico. Este método evita confundir al

neurotransmisor radioactivo precargado con sus metabolitos radioactivos. El método consiste en:

Las preparaciones sinaptosomales crudas P<sub>2</sub>, de estriado de rata (300 ± 23 µg) se resuspenden en 6,600 µl de RKH normal cada una. De estos 6,900 µl se preparan 12 tubos por preparación sinaptosomal con 500 µl cada uno, estos tubos se preincuban durante 5 min a 37°C en baño de incubación. Transcurridos 5 min, cada tubo es expuesto a una condición experimental distinta (exposición a nimodipina, nitrendipina o tetrodotoxina bajo condiciones de reposo ó condiciones despolarizadas con veratridina ó K<sup>+</sup> alto), para después volver a incubar, ahora durante 10 min a 37°C. La incubación se detiene por centrifugación durante 5 min a 1,400 r.p.m. Los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación (que contienen a los neurotransmisores liberados) fueron tratados con una alícuota de una mezcla de ácido perclórico PCA/EGTA para obtener 0.1 M/0.1 mM final respectivamente, y se almacenaron a -40°C para un análisis posterior, por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Al precipitado de la última centrifugación se le agregan 990 µl de H<sub>2</sub>O desionizada y 10 µl de ácido perclórico 10 M, estos tubos se centrifugan nuevamente a 1,400 r.p.m. durante 5 min. El sobrenadante de cada tubo se transfiere a tubos nuevos y se resuspenden en el vortex. El contenido de cada uno de estos tubos se utiliza como muestra para los análisis de neurotransmisores retenidos en los sinaptosomas, por medio de HPLC. Al precipitado de cada tubo de la última centrifugación se le agrega 1 ml de NaOH 10 mM y una vez que los sinaptosomas están resuspendidos se añade 1 ml de agua para obtener la proteína suspendida en 2 ml de NaOH 5 mM, para su posterior cuantificación (Lowry y col., 1951)

#### **4. Determinación de las concentraciones de dopamina y DOPAC**

Veinte µl de muestra suspendida en 0.1 M de PCA/0.1 mM de EDTA fueron inyectados directamente dentro del sistema de HPLC para su análisis. El sistema de HPLC consiste de una bomba de envío (modelo 600), un inyector Rheodyne una columna analítica (resolve, C18, 150 x 3.9mm de diámetro interno, tamaño de

partícula de 5  $\mu\text{m}$ ) controlada a 30°C, y un detector electroquímico (modelo DECADE) con carbono vidriado usado a un voltaje de +0.8 V comparado con un electrodo de referencia (rango de 1 nA) de KCl (3 M). Para la elución de catecolaminas se usó una fase móvil, compuesta de buffer de 50 mM de ácido orto-fosfórico/50 mM de ácido cítrico, pH 3.1 ajustado con KOH, conteniendo 5% (v/v) metanol, 100 mg/l de ácido octanosulfónico y 20mg/l de EDTA, a una tasa de flujo de 1ml/min. Las concentraciones de dopamina y DOPAC de las muestras experimentales fueron calculadas con curvas de calibración obtenidas de la inyección de concentraciones crecientes de una mezcla estándar (que contiene dopamina, DOPAC, Glu, Asp, GABA y glicina) dentro del sistema de HPLC.

## **5. Determinación de las concentraciones de Glu, Asp, GABA y Glicina**

Diez  $\mu\text{l}$  de muestra suspendida en 0.1 M PCA/0.1 EDTA fue mezclada con 20  $\mu\text{l}$  de reactivo de OPA. Después de 120 s, una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  fue inyectada dentro del sistema de HPLC. Se usó una columna analítica (Nova-pak C-18, 75 x 3.9 mm de diámetro interno, con tamaño de partícula de 10 $\mu\text{m}$ ) ajustada a 25°C y un detector de fluorescencia ajustado a 360 nm (longitud de excitación) y a 450 nm (longitud de onda de emisión). Para la elución de los aminoácidos se aplicó un programa de elución de gradiente lineal: eluyente A (30 mM de bufer de acetato de sodio, pH 6.8) de 100% a 50%, y un eluyente B (metanol) de 0% a 50%, a una tasa de flujo de 1 ml/min. Las concentraciones de Glu, Asp, GABA y glutamina en las muestras experimentales fueron calculadas con curvas de calibración obtenidas de la inyección de concentraciones crecientes de la mezcla de estándares externos después de la derivación con OPA dentro del sistema de HPLC.

## 6) Experimentos de liberación de [<sup>3</sup>H]-Glu precargado

El método usado para cargar los sinaptosomas hipocampales con un neurotransmisor marcado y para estudiar su liberación subsecuente ha sido descrito previamente (Sitges y Reyes, 1995). Brevemente, 1.5 mg de proteína sinaptosomal de hipocampo, fueron suspendidos en KRH e incubados por 25 min con [<sup>3</sup>H]-Glu (0.9  $\mu$ Ci/mg de proteína) a 37°C. Alícuotas de sinaptosomas precargados con [<sup>3</sup>H]-Glu fueron transferidos a filtros Millipore que yacen sobre cámaras multiperforadas. La radioactividad no incorporada a la preparación sinaptosomal fue removida por superfusión con KRH-bajo-Na o con KRH-bajo-Na sin Ca<sup>2+</sup>. Después de ajustar la tasa de flujo a 0.5 ml/min, las fracciones se colectaron a intervalos de 1 min. Después de 3 min, el ringer KRH-bajo-Na sin Ca<sup>2+</sup>, KRH-bajo-Na (control) o conteniendo 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK o 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-IVA fue sustituido rápidamente por el respectivo medio despolarizante de K<sup>+</sup> alto y se colectaron las fracciones de perfusión adicionales (4-7 min). La radioactividad liberada de cada fracción colectada y la remanente al final del experimento de perfusión en los filtros que sostienen a los sinaptosomas fue contada. La radioactividad total equivale a la radioactividad liberada durante los minutos de perfusión más el remanente en el filtro al final del experimento. La liberación neta se refiere al porcentaje liberado por 3 minutos con K<sup>+</sup> alto menos la liberación basal estimada para esos minutos.

## 7) Estadística

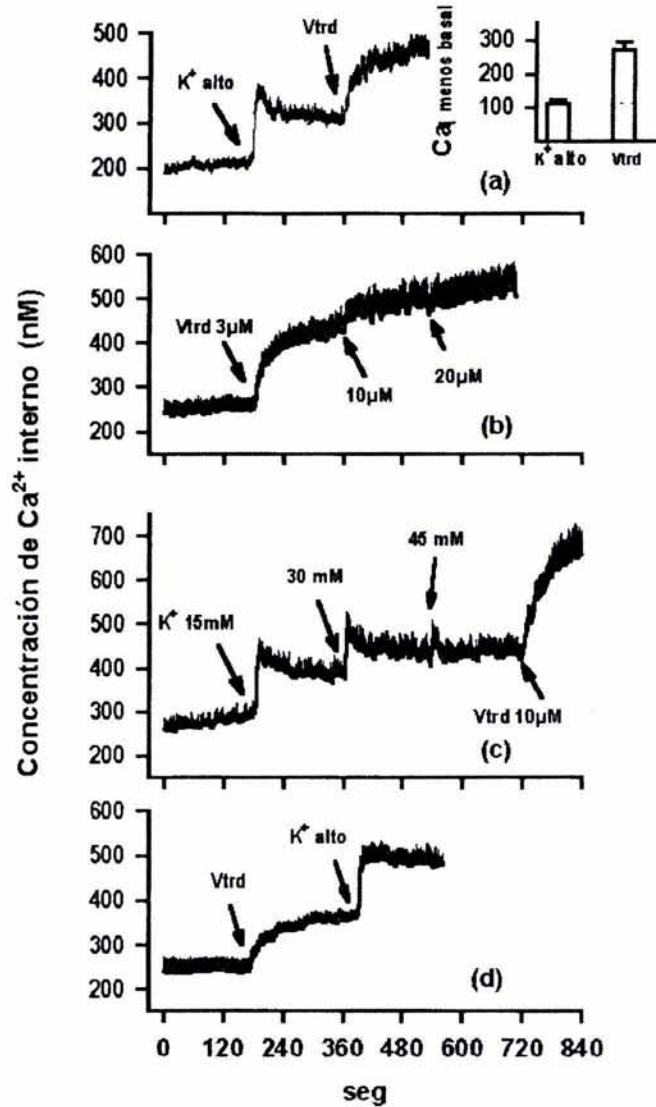
La prueba de t de Student fue usada para las evaluaciones estadísticas. Una significancia 0.05 fue considerada como estadísticamente significativa.

## V. Resultados.

### 1. Cinéticas del aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto y veratridina

La despolarización con  $K^+$  alto o con veratridina aumentan al  $Ca_i$ . Sin embargo, las cinéticas del aumento de  $Ca_i$  inducidas por cada agente despolarizante son diferentes. El incremento máximo de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto se alcanza rápidamente y después declina hacia un valor estable (meseta). El incremento máximo en la concentración de  $Ca_i$  inducido por veratridina se alcanza lenta y gradualmente. Esta cinética se repite, tanto en sinaptosomas directamente expuestos a veratridina o en sinaptosomas que han sido previamente expuestos a  $K^+$  alto (Fig. 7a). El aumento en la concentración de  $Ca_i$  inducido por veratridina sola, a concentraciones crecientes (3, 10 y 20  $\mu M$ ) se muestra en la figura 7b.

El incremento gradual en la concentración externa de  $K^+$  (15, 30 y 45 mM final) también causa incrementos mayores en la concentración de  $Ca_i$  hasta un valor máximo. Este valor es casi alcanzado con 30 mM de  $K^+$  externo, ya que el incremento adicional de  $K^+$  externo (a 45 mM) no aumenta la concentración de  $Ca_i$  mucho más allá del valor alcanzado con 30 mM de  $K^+$  externo. Sin embargo, la adición subsecuente de veratridina es capaz de incrementar aún más el aumento en la concentración de  $Ca_i$  sobre el valor máximo alcanzado con 45 mM de  $K^+$  alto (Fig. 7c). Aunque se ha dicho que la veratridina bloquea canales de  $Ca^{2+}$  en células de neuroblastoma (Romey y Lazdunski, 1982), el  $K^+$  alto eleva el  $Ca_i$  en sinaptosomas expuestos previamente a veratridina (Fig. 7d).



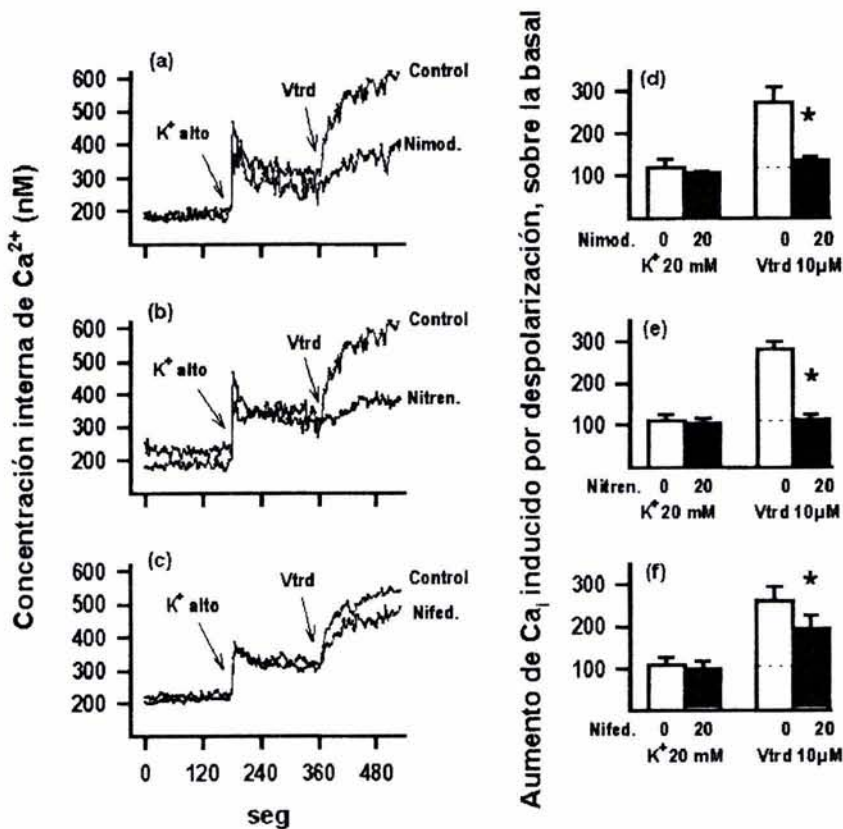
**Figura 7.** Efectos de  $K^+$  alto, veratridina y de ambos sobre el  $Ca_i$ . (a) Después de medir el valor basal de  $Ca_i$ , los sinaptosomas fueron expuestos a 20 mM final de  $K^+$  externo ( $K^+$  alto) y el valor de  $Ca_i$  fue medido por 3 min. Después los sinaptosomas fueron expuestos a 10  $\mu$ M de veratridina (Vtrd) y el valor de  $Ca_i$  fue medido por otros 3 min. Las barras en el recuadro muestran los incrementos de  $Ca_i$  inducidos por cada agente despolarizante sobre el valor basal. El aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina (Vtrd) incluye el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto. (b) Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$ , los sinaptosomas fueron expuestos a adiciones subsiguientes de veratridina (flechas). Las concentraciones finales en la cubeta son 3, 10 y 20  $\mu$ M. La concentración de  $Ca_i$  fue medida durante 3 min después de cada adición. (c) Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$ , los sinaptosomas fueron expuestos a adiciones subsiguientes de  $K^+$  alto (flechas). Las concentraciones finales en la cubeta son 15, 30 y 45  $\mu$ M. Finalmente los sinaptosomas fueron expuestos a 10  $\mu$ M de veratridina. (d) Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$ , los sinaptosomas fueron expuestos a 10  $\mu$ M de veratridina y la concentración de  $Ca_i$  fue medida por 4 min. Posteriormente estos sinaptosomas fueron expuestos a  $K^+$  alto (20 mM final) y el nivel de  $Ca_i$  fue medido por otros 3 min. Los resultados son los valores promedio  $\pm$  el error estándar de 13 (a), 4 (b), 3 (c) y 5 (d) experimentos independientes.

## 2. Efecto de la nimodipina, nitrendipina y nifedipina sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto y por veratridina

La cinética del aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina se mantiene aún en sinaptosomas preexpuestos a una concentración elevada de  $K^+$  externo. Sobre estos aumentos de  $Ca_i$  inducidos por los dos agentes despolarizantes se probaron los efectos de la nimodipina, nitrendipina y nifedipina en sinaptosomas expuestos a 20mM de  $K^+$  alto y posteriormente a 10  $\mu$ M de veratridina. Ninguna de las dihidropiridinas inhibió el aumento de  $Ca_i$  inducido por el  $K^+$  alto, pero en cambio sí inhibieron el aumento subsecuente de  $Ca_i$  inducido por veratridina (Fig. 8). Sin embargo, la nimodipina y la nitrendipina a la misma concentración (20  $\mu$ M) inhiben el aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina con mayor efectividad que la nifedipina. En la figura 8 las gráficas de la izquierda muestran experimentos representativos de los efectos causados por las dihidropiridinas sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto y veratridina. La concentración utilizada de dihidropiridinas en estos experimentos fue de 20  $\mu$ M para cada una. A una concentración mayor (60  $\mu$ M) la inhibición causada por nifedipina sobre los incrementos de  $Ca_i$  inducidos por la exposición subsecuente de los dos agentes despolarizantes fue similar a la obtenida con la concentración de 20  $\mu$ M (datos no graficados).

El aumento de  $Ca_i$  inducido por la exposición directa de los sinaptosomas a 10  $\mu$ M de veratridina (i.e. en sinaptosomas que no han sido expuestos previamente a  $K^+$  alto) es prácticamente abolido por 1  $\mu$ M de tetrodotoxina. También el aumento de  $Ca_i$  inducido por la exposición directa de los sinaptosomas a 10  $\mu$ M de veratridina es marcadamente reducido por nimodipina y nitrendipina. Por ejemplo, a una concentración de 20  $\mu$ M estas dos dihidropiridinas reducen el aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina en  $49 \pm 3 \%$  y  $57 \pm 6 \%$  (valor promedio  $\pm$  error estándar de 3 preparaciones independientes), respectivamente.





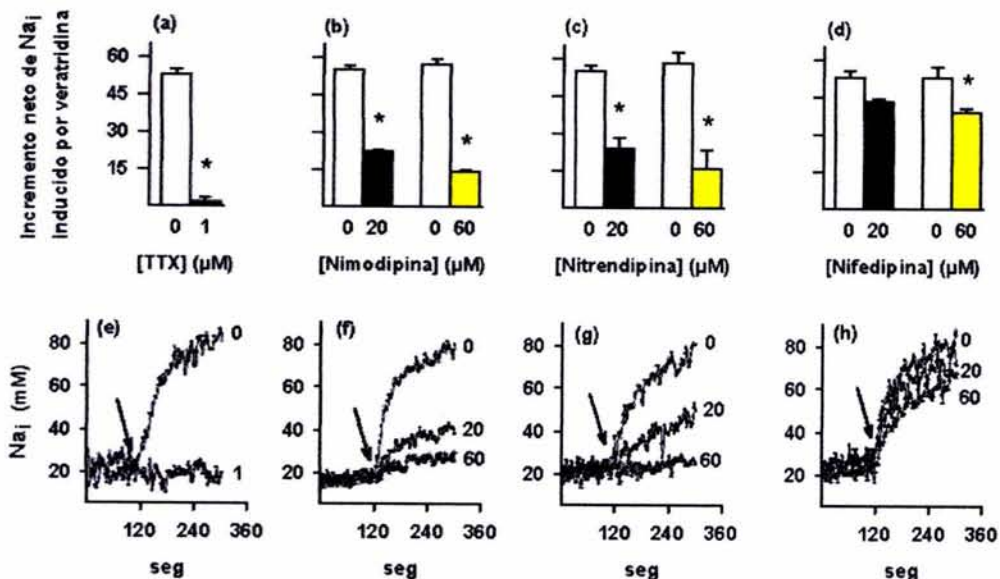
**Figura 8.** Efecto de la nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto y veratridina. Alícuotas de sinaptosomas cargados con Fura-2 suspendidos en RKH en: ausencia (Control); presencia de nimodipina 20  $\mu M$  (Nimod), presencia de nitrendipina 20  $\mu M$  (Nitren) y presencia de nifedipina 20  $\mu M$  (Nifed) fueron expuestos a una concentración de  $K^+$  externo de 20 mM ( $K^+$  alto) y subsecuentemente a veratridina 10  $\mu M$  (Vtrd). Los datos en (a), (b) y (c) son representativos de 8 (Control) o 4 (NMD, NTR y NIF) experimentos independientes, algunos de ellos por duplicado.

### 3. Efecto de la nimodipina, nitrendipina y nifedipina sobre el aumento de $Na_i$ inducido por veratridina

La despolarización con veratridina, pero no con  $K^+$  alto, eleva el  $Na_i$ . La nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina, disminuyen el aumento de  $Na_i$  que induce la veratridina. La nifedipina fue el bloqueador con menor potencia.

En sinaptosomas estriatales bajo condiciones de reposo la concentración basal de  $Na_i$  ( $15 \pm 1.8$  mM) no se incrementa (datos no mostrados) por la exposición a una concentración elevada de  $K^+$  externo (20 mM final). En contraste,

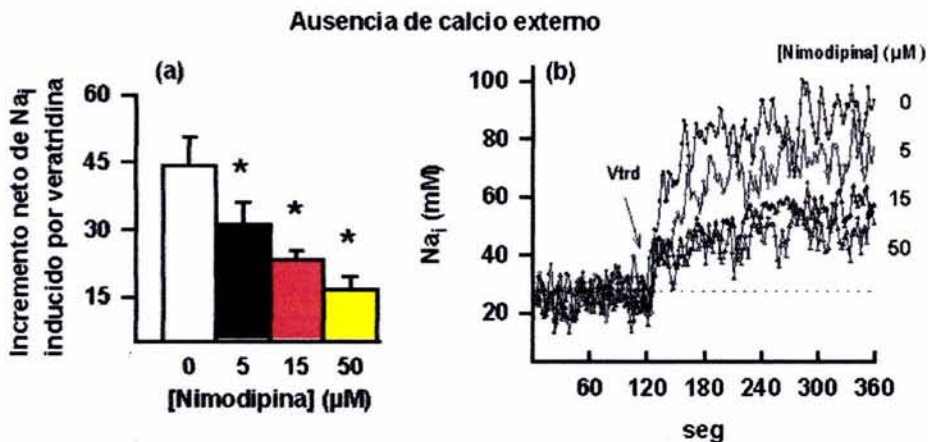
cuando los sinaptosomas fueron expuestos a 10  $\mu\text{M}$  de veratridina la concentración basal de  $\text{Na}_i$  aumentó en un valor promedio de  $70 \pm 2.7 \text{ mM}$ . Por lo tanto la veratridina aumentó  $55 \pm 1.7 \text{ mM}$  por arriba del valor basal de  $\text{Na}_i$ . Este incremento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina fue abolido en sinaptosomas expuestos a 1  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina (Fig. 9a), y se redujo un 60 y 75% por 20 y 60  $\mu\text{M}$  de nimodipina, respectivamente (Fig. 9b) y un 56 y 73% por 20 y 60  $\mu\text{M}$  de nitrendipina, respectivamente (Fig. 9c). De nuevo, la nifedipina ejerció una inhibición menor; de un 19 y 27% a concentraciones de 20 y 60  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Fig. 9d). En las gráficas inferiores de la figura 9 se ilustran experimentos representativos del aumento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina en ausencia y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina, o en ausencia y en presencia de 20 y 60  $\mu\text{M}$  de cada DHP.



**Figura 9.** Efecto de la tetrodotoxina, la nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina sobre el aumento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina. Gráficas superiores: el incremento neto de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina (Vtrd) se refiere al promedio de los puntos después de la despolarización con veratridina menos el promedio de los puntos antes de la despolarización en ausencia (barras vacías) o en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina (TTX) (a), o de nimodipina (b), nitrendipina (c) y nifedipina (d) a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  (barras negras) o 60  $\mu\text{M}$  (barras amarillas). Las barras resultantes son los valores promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 5 experimentos independientes con sus controles respectivos para cada condición. \*,  $P > 0.05$  entre el aumento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina en ausencia o presencia de 1  $\mu\text{M}$  de TTX o alguna DHP a la concentración indicada (i.e. 20 ó 60  $\mu\text{M}$ ). Gráficas inferiores: Experimentos representativos que muestran las cinéticas del aumento de  $\text{Na}_i$  inducido por 10  $\mu\text{M}$  de veratridina (flecha) en ausencia (0 en e, f, g y h) o en presencia de la concentración indicada (en  $\mu\text{M}$ ) de: TTX (e), nimodipina (f), nitrendipina (g) o nifedipina (h).

#### 4. En ausencia de $\text{Ca}^{2+}$ externo la nimodipina también inhibe el aumento de $\text{Na}_i$ inducido por veratridina

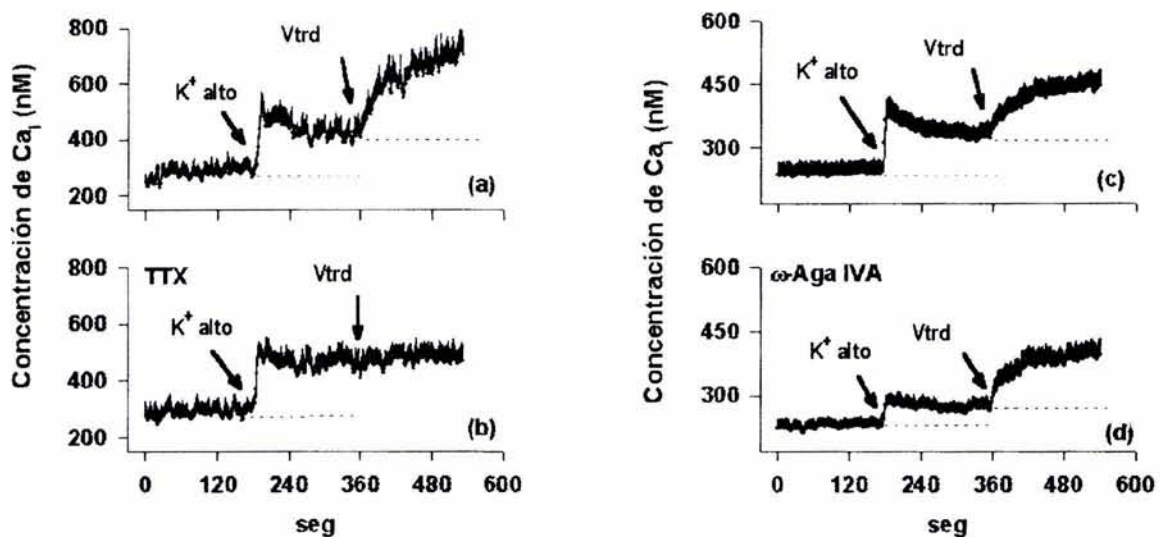
En sinaptosomas estriatales suspendidos en RKH sin  $\text{Ca}^{2+}$  y conteniendo 5  $\mu\text{M}$  de EGTA, la veratridina aumentó el  $\text{Na}_i$  a  $44 \pm 6$  mM sobre la basal. Este incremento neto en el  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo fue reducido en 22%, 50% y 59% por 5, 15 y 50  $\mu\text{M}$  de nimodipina respectivamente (Fig. 10a). En la figura 10b se ilustra un experimento representativo de la respuesta desarrollada de  $\text{Na}_i$  inducida por veratridina en ausencia y en presencia de nimodipina a concentraciones crecientes. El efecto de la nitrendipina sobre el aumento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo no fue probado, ya que en un estudio previo usando sinaptosomas de cerebro de ratón nosotros mostramos que la nitrendipina a concentraciones de 6  $\mu\text{M}$  y mayores, inhibieron de manera dependiente de dosis la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA inducida por veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo.



**Figura 10.** Efecto de la nimodipina sobre el incremento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Después de medir el nivel basal del  $\text{Na}_i$  en sinaptosomas estriatales en ausencia o presencia de nimodipina a las concentraciones indicadas durante 5 min, los sinaptosomas fueron expuestos a 5  $\mu\text{M}$  de veratridina y el nivel de  $\text{Na}_i$  fue medido por otros 5 min. (a) El incremento neto de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina se refiere al promedio de los datos de  $\text{Na}_i$  después de la adición de veratridina menos el promedio de datos de  $\text{Na}_i$  antes de la adición de veratridina en ausencia (barras vacías) o en presencia (barras en color) de nimodipina a concentraciones crecientes (5, 15 y 50  $\mu\text{M}$ ). Las barras son el promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $P > 0.05$  entre el aumento de  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina en ausencia y en presencia de nimodipina. (b) Experimento representativo que muestra la cinética del aumento de  $\text{Na}_i$  a 5  $\mu\text{M}$  de veratridina (flecha) en ausencia (0) o presencia de la concentración indicada de nimodipina.

## 5. Efectos de la tetrodotoxina y la $\omega$ -agatoxina-IVA sobre los aumentos de $Ca_i$ inducidos por $K^+$ alto y veratridina

La exposición de sinaptosomas al bloqueador de canales de  $Na^+$ , tetrodotoxina, no atenuó el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto, pero sí inhibió el aumento subsecuente de  $Ca_i$  inducido por veratridina (Fig. 11a y b). Por el contrario, la exposición de sinaptosomas al bloqueador de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA inhibió marcadamente (70%) el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto, pero falló en modificar el aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina (Fig. 11c y d).



**Figura 11.** Efectos complementarios de la tetrodotoxina y la  $\omega$ -agatoxina-IVA sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto y veratridina. Gráficas de la derecha: Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$  en sinaptosomas estriales en ausencia (a) o en presencia de 1  $\mu$ M de tetrodotoxina (TTX) (b), los sinaptosomas fueron expuestos a  $K^+$  alto (25 mM fina) y el  $Ca_i$  fue medido por 3 min. Después de este tiempo los sinaptosomas fueron expuestos a 10  $\mu$ M de veratridina (Vtrd) y el  $Ca_i$  fue medido por otros 3 min. Gráficas de la izquierda: Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$  en ausencia (c) o en presencia de 500 nM de  $\omega$ -agatoxina-IVA (d), los sinaptosomas fueron expuestos a  $K^+$  alto (20 mM final) y el  $Ca_i$  fue medido por 3 min. Después de este tiempo los sinaptosomas fueron expuestos a 5  $\mu$ M de veratridina (Vtrd) y el  $Ca_i$  fue medido por otros 3 min. Los datos experimentales son los valores promedio  $\pm$  el error estándar de 4 (a y b) o 5 (c y d) preparaciones independientes con sus controles respectivos en experimentos en paralelo.

## 6. Liberación de neurotransmisores endógenos inducida por despolarización con K<sup>+</sup> alto o veratridina

La tabla 2 muestra que tanto la despolarización por el aumento de la concentración externa de K<sup>+</sup>, como la despolarización por veratridina incrementan la liberación de los neurotransmisores Glu, Asp, GABA y dopamina, mientras que no modifican la concentración externa de la glutamina, íntimamente ligada al metabolismo de los aminoácidos neurotransmisores, ni la concentración externa del DOPAC, principal metabolito de la dopamina. La veratridina a una concentración de 10 μM es mucho más eficaz que el K<sup>+</sup> 30 mM para inducir la liberación de neurotransmisores. Es importante hacer notar que los aminoácidos neurotransmisores se encuentran a una concentración 3 órdenes de magnitud mayor que las catecolaminas.

**Tabla 2. Concentraciones de aminoácidos y catecolaminas en sinaptosomas de estriado de rata en condiciones basales y con despolarización.**

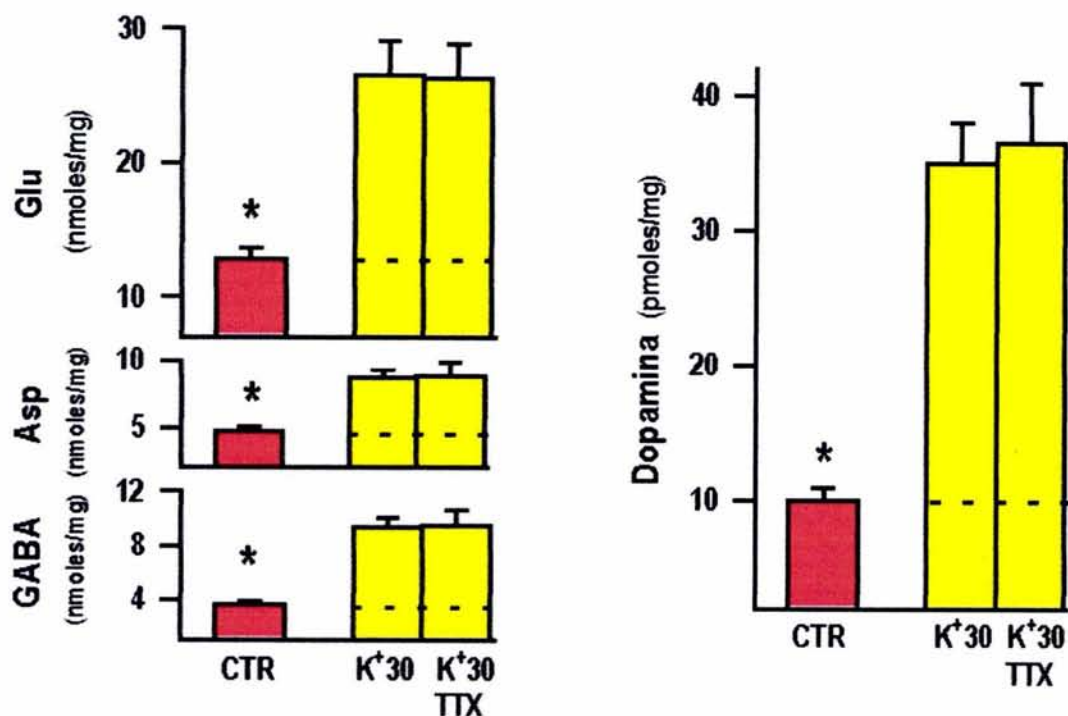
	Basal	K <sup>+</sup> alto	Basal	Veratridina
	<i>nMoles/mg</i>		<i>nMoles/mg</i>	
GABA	4 ± 1	11 ± 1 *	3 ± 1	21 ± 3 *
Aspartato	6 ± 1	11 ± 1 *	6 ± 1	23 ± 3 *
Glutamato	17 ± 3	35 ± 5 *	19 ± 5	54 ± 9 *
Glutamina	24 ± 2	23 ± 2	24 ± 3	29 ± 6
	<i>pMoles/mg</i>		<i>pMoles/mg</i>	
Dopamina	11 ± 2	46 ± 6 *	13 ± 3	141 ± 19 *
Dopac	326 ± 28	311 ± 24	353 ± 47	414 ± 62

Los resultados son el promedio ± error de 11 (K<sup>+</sup> alto) y 6 (Veratridina) experimentos independientes.

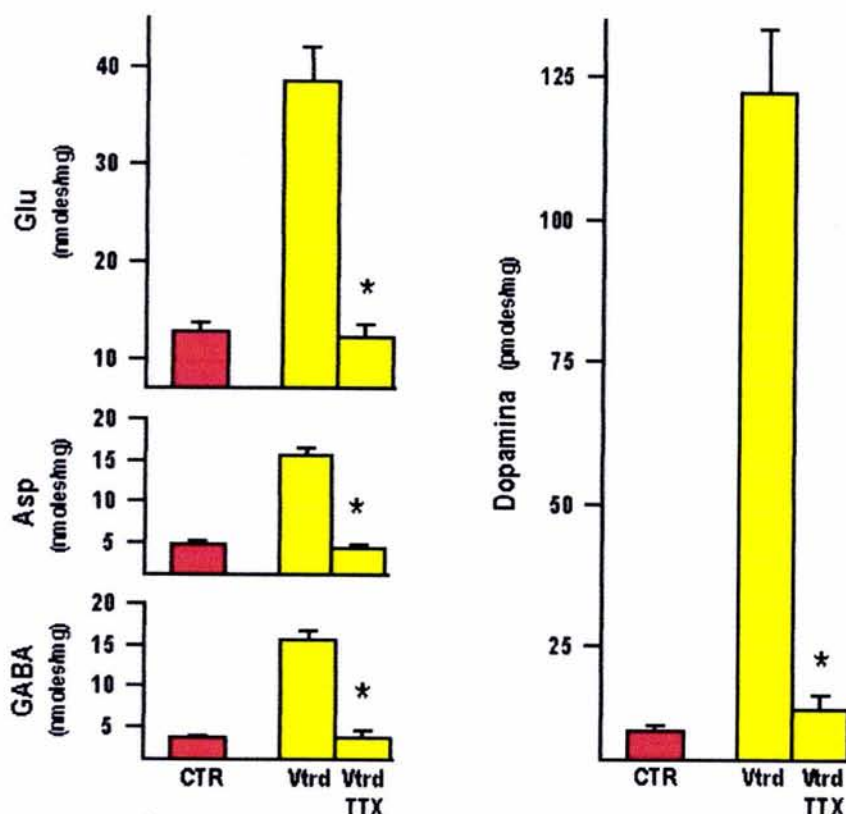
\*, *p* < 0.05 entre las respectivas condiciones de reposo y con despolarización.

La figura 12 muestra que la liberación de los neurotransmisores inducida por  $K^+$  30 mM en sinaptosomas de estriado de rata no es sensible a 1  $\mu$ M de tetrodotoxina. En cambio, la figura 13 muestra que a la misma concentración la tetrodotoxina inhibe completamente el aumento en la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina (20  $\mu$ M).

Los resultados obtenidos en las figuras 12 y 13 indican que la disponibilidad de los canales sensibles a tetrodotoxina es determinante en la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina, pero no para la liberación inducida por despolarización con  $K^+$  alto.



**Figura 12.** La liberación de glu, asp, GABA y dopamina inducida por  $K^+$  alto no es sensible a tetrodotoxina. Los sinaptosomas se incubaron en RKH (CTR) o en RKH con  $K^+$  alto (30 mM) en ausencia ( $K^+$  30) o en presencia de 1  $\mu$ M de tetrodotoxina (TTX) ( $K^+$  30, TTX). Los resultados son la media  $\pm$  error de 4 experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$  entre CTR y  $K^+$  30.



**Figura 13.** La liberación de neurotransmisores inducida por veratridina es inhibida por tetrodotoxina. Los sinaptosomas se incubaron en RKH (CTR) o en RKH conteniendo veratridina 20  $\mu$ M en ausencia (Vtrd) o en presencia de 1 $\mu$ M de tetrodotoxina (Vtrd, TTX). Los resultados son la media  $\pm$  error de 4 experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$  entre Vtrd y Vtrd, TTX.

## 7. Efecto de la nimodipina y nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina

La tabla 3 muestra el efecto de los fármacos bloqueadores de los canales de  $Ca^{2+}$  nimodipina y nitrendipina en sinaptosomas de estriado de rata despolarizados con veratridina: La nimodipina y la nitrendipina, disminuyen significativamente la liberación de dopamina, GABA, Glu y Asp inducida por veratridina. De manera similar, la tetrodotoxina inhibe la liberación de estos

neurotransmisores con la diferencia de que la inhibición es mucho más potente con la tetrodotoxina que con las dihidropiridinas.

**Tabla 3. Efecto de la nimodipina y nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina.**

	Dopamina	GABA	Glu	Asp	n
Vtrd	110 ± 19	16 ± 2	37 ± 6	15 ± 3	8
Vtrd + NMD	26 ± 6 *	10 ± 1 *	27 ± 3 *	9 ± 1 *	8
Vtrd	125 ± 16	17 ± 3	39 ± 8	17 ± 3	7
Vtrd + NTRD	60 ± 10 *	10 ± 1 *	24 ± 5 *	10 ± 2 *	7
Vtrd	107 ± 12	13 ± 2	31 ± 5	12 ± 2	4
Vtrd + TTX	1 ± 2 *	1 ± 0.1 *	0 ± 1 *	1 ± 0.3 *	4

Las concentraciones de dopamina están dadas en pMoles/mg de proteína sinaptosomal.  
 Las concentraciones de aminoácidos están dadas en nMoles/mg de proteína sinaptosomal.  
 Las concentraciones finales de veratridina (Vtrd), nimodipina (NMD), nitrendipina (NTRD), y TTX son (en µM): 10, 20, 20, y 1 respectivamente. Los resultados son los valores promedio ± el error del número indicado (n) de experimentos independientes. \*, p < 0.05 entre los sinaptosomas tratados con veratridina y con veratridina más el fármaco indicado durante 10 minutos.

### 8. Efecto de la nimodipina y nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por K<sup>+</sup> alto

La tabla 4 muestra el efecto de los fármacos bloqueadores de los canales de Ca<sup>2+</sup> nimodipina y nitrendipina en sinaptosomas de estriado de rata despolarizados con K<sup>+</sup> alto: La nimodipina no modifica la exocitosis inducida por K<sup>+</sup> alto, mientras la nitrendipina no solamente no inhibe la exocitosis inducida por K<sup>+</sup> alto sino que, en el caso de la dopamina, incluso la facilita.



**Tabla 4. Efecto de la nimodipina y nitrendipina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por K<sup>+</sup> alto**

	Dopamina	GABA	Glu	Asp	n
K <sup>+</sup> alto	48 ± 5	10 ± 1	30 ± 5	8 ± 1	6
K <sup>+</sup> alto + NMD	63 ± 10	10 ± 2	33 ± 5	9 ± 2	6
K <sup>+</sup> alto	45 ± 8	10 ± 2	27 ± 8	8 ± 2	6
K <sup>+</sup> alto + NTRD	79 ± 16 *	8 ± 1	23 ± 4	6 ± 1	6
K <sup>+</sup> alto	42 ± 5	9 ± 1	28 ± 3	9 ± 1	6
K <sup>+</sup> alto + TTX	41 ± 5	10 ± 1	29 ± 4	10 ± 1	6

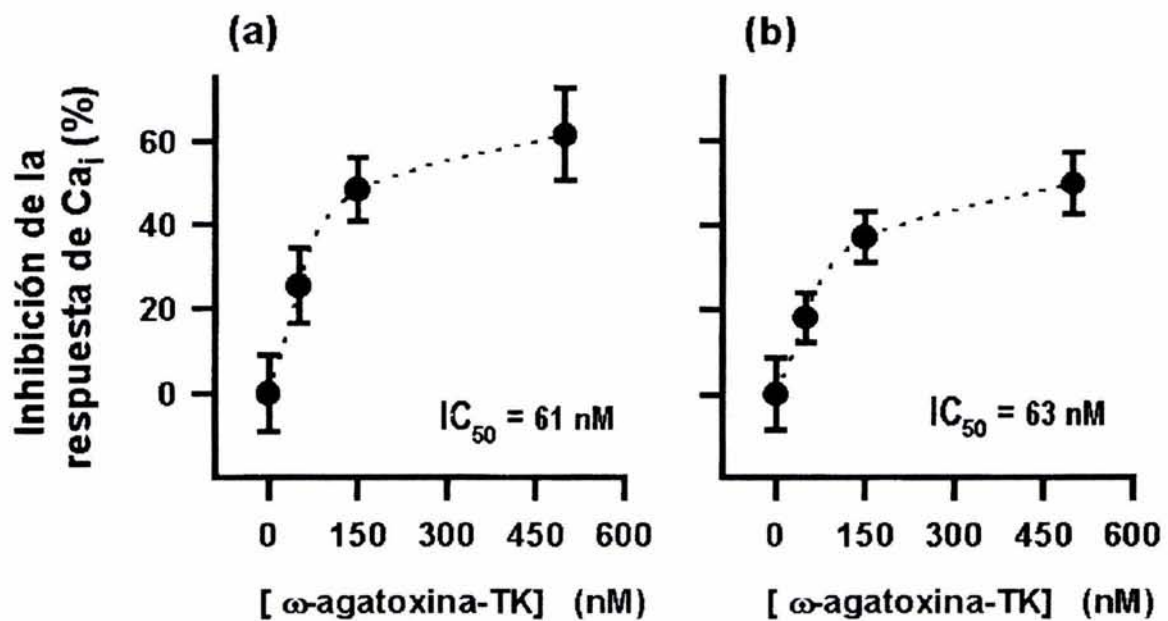
*Las concentraciones de dopamina (DA) están dadas en pMoles/mg de proteína sinaptosomal. Las concentraciones de aminoácidos están dadas en nMoles/mg de proteína sinaptosomal. K<sup>+</sup> alto se refiere a 30 mM de K<sup>+</sup> externo. Las concentraciones finales de nimodipina (NMD), nitrendipina (NTRD), y TTX son (en μM): 20, 20 y 1 respectivamente. Los resultados son los valores promedio ± el error del número indicado (n) de experimentos independientes.*

*\*, p < 0.05 entre los sinaptosomas tratados con K<sup>+</sup> alto y con K<sup>+</sup> alto más la droga indicada.*

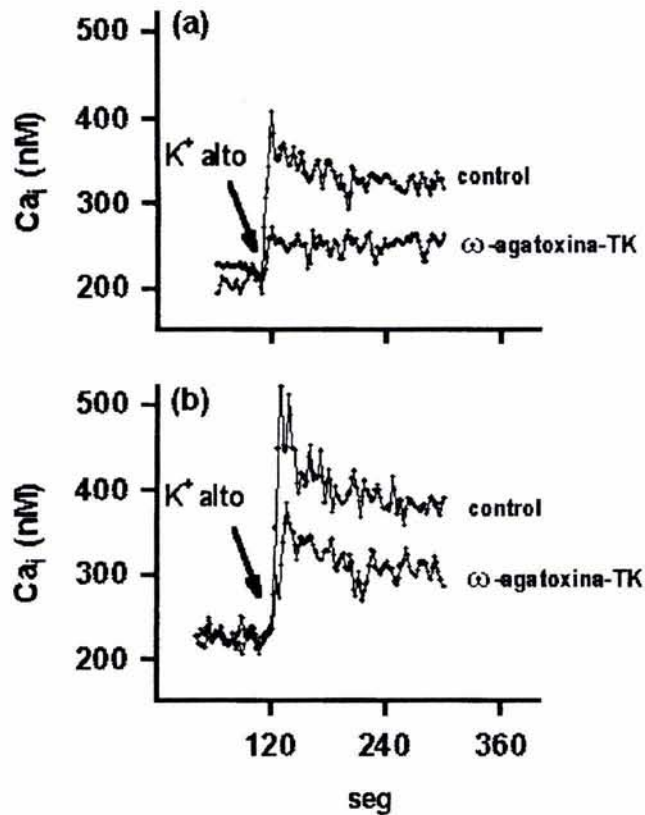
## 9. Efecto de concentraciones crecientes de ω-agatoxina-TK sobre el aumento en el Ca<sup>2+</sup> inducido por K<sup>+</sup> alto

En terminales nerviosas aisladas de hipocampo y estriado se examinó la participación de los canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a la ω-agatoxina-TK involucrados en el aumento de Ca<sub>i</sub> inducido por K<sup>+</sup> alto. La figura 14 muestra que en las terminales nerviosas aisladas de ambas regiones cerebrales, concentraciones crecientes de ω-agatoxina-TK inhiben progresivamente el incremento de Ca<sub>i</sub> inducido por K<sup>+</sup> alto. Experimentos representativos del aumento de Ca<sub>i</sub> inducido por K<sup>+</sup> alto en sinaptosomas hipocampales y estriatales en ausencia y en presencia de ω-agatoxina-TK son mostrados en las figuras 15a y 15b respectivamente.

Aunque en ambas regiones cerebrales la inhibición máxima ejercida por la  $\omega$ -agatoxina-TK casi se alcanza a la concentración de 150 nM, la toxina es ligeramente más efectiva para inhibir el incremento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto en sinaptosomas estriatales que en hipocampales. Por ejemplo, en sinaptosomas estriatales el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto fue inhibido por la  $\omega$ -agatoxina-TK a la mayor concentración probada (500 nM) en 61.4% y en sinaptosomas hipocampales sólo fue inhibido en 49.7%.



**Figura 14.** Porcentaje de inhibición por la  $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por despolarización con  $K^+$  alto. El aumento neto en el  $Ca_i$  inducido por 20 mM  $K^+$  alto durante 3 min (superior a la línea basal) fue promediado en sinaptosomas estriatales (a) o hipocampales (b) cargados con fura-2 y expuestos a concentraciones crecientes de la  $\omega$ -agatoxina-TK. Estos datos fueron usados para calcular la inhibición máxima ejercida por la toxina y para estimar su  $IC_{50}$ . Los resultados son el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes.

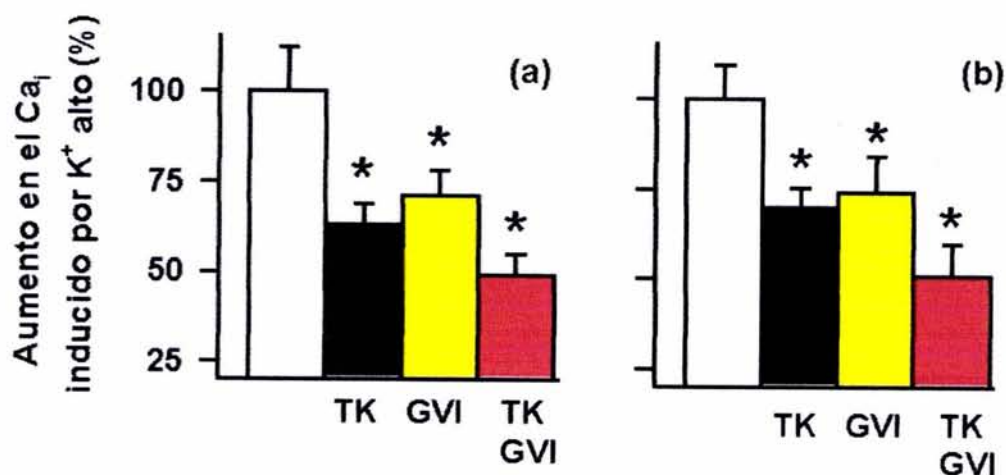


**Figura 15.** Experimentos representativos de la respuesta desarrollada de  $Ca_i$  inducida por  $K^+$  alto en ausencia y presencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK. Sinaptosomas de estriado (a) o hipocampo (b) fueron cargados con fura-2. Los puntos de los datos fueron tomados a intervalos de 1. 89 seg. Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$ , en ausencia o en presencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK (500 nM) los sinaptosomas fueron expuestos a  $K^+$  alto (25 mM final) y el  $Ca_i$  fue medido por 3 minutos.

## 10. Efectos simples y combinados de la $\omega$ -agatoxina-TK y $\omega$ -conotoxina-GVIA sobre el aumento de $Ca_i$ inducido por $K^+$ alto en sinaptosomas estriatales e hipocampales

El efecto de la  $\omega$ -agatoxina-TK fue probado en combinación con el bloqueador de canales de  $Ca^{2+}$   $\omega$ -conotoxina-GVIA, y no en combinación con bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$ , tales como nimodipina, nitrendipina o nifedipina, ya que estas no participan en el aumento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto en sinaptosomas (Figura 8).

En sinaptosomas estriatales el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto es inhibido  $37 \pm 6 \%$  por la  $\omega$ -agatoxina-TK,  $29 \pm 7 \%$  por la  $\omega$ -conotoxina-GVIA y  $51 \pm 6 \%$  por las dos toxinas en combinación (fig. 16a). Este efecto aditivo observado en los sinaptosomas estriatales expuestos simultáneamente a ambas toxinas también se observa en sinaptosomas hipocampales, donde el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto es inhibido  $30 \pm 5 \%$  por la  $\omega$ -agatoxina-TK,  $26 \pm 10 \%$  por la  $\omega$ -conotoxina-GVIA y  $49 \pm 9 \%$  por las dos toxinas en combinación (Fig. 16b).

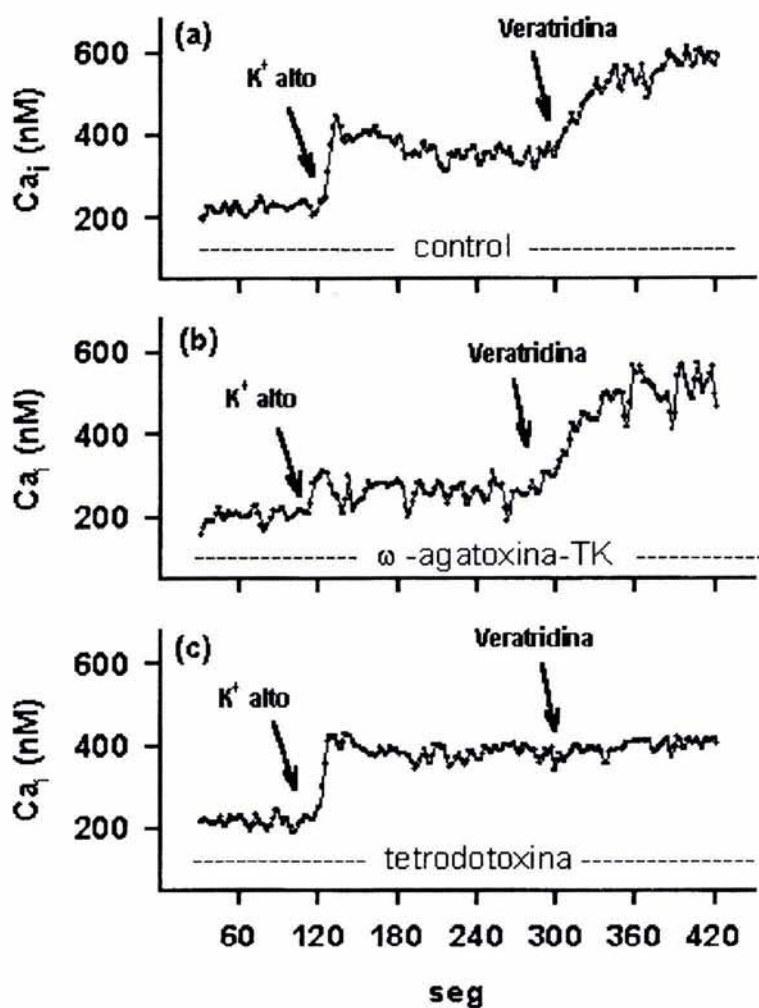


**Figura 16.** Efectos simples y combinados de la  $\omega$ -agatoxina-TK y la  $\omega$ -conotoxina-GVIA sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto. Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$  por 3 minutos en sinaptosomas estriatales (a) o hipocampales (b), los sinaptosomas fueron expuestos a  $K^+$  alto y el  $Ca_i$  fue medido por otros 3 minutos. Las barras indican el incremento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto en ausencia (barras vacías) o en presencia de 150 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK, 1  $\mu$ M de  $\omega$ -conotoxina-GVIA o ambas toxinas a las concentraciones antes mencionadas. Los resultados son el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos independientes. \*  $P < .05$  entre el incremento neto de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto en ausencia y en presencia de las toxinas indicadas. Las diferencias entre los efectos de una toxina sola y ambas toxinas en combinación también son estadísticamente significativas.

### 11. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento en el $Ca_i$ inducido por la adición subsecuente de $K^+$ alto y veratridina

De manera similar a los sinaptosomas tratados con la  $\omega$ -agatoxina-IVA (Fig. 11d), en los sinaptosomas tratados con la  $\omega$ -agatoxina-TK el aumento de  $Ca_i$

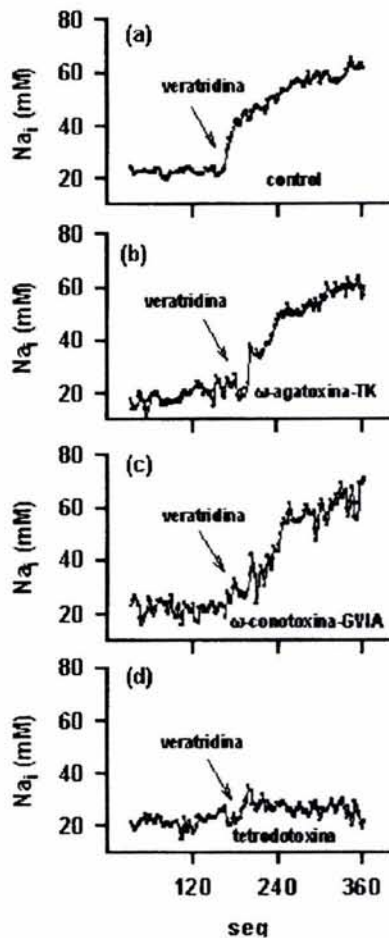
inducido por  $K^+$  alto es marcadamente inhibido mientras que el aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina permanece sin cambio (Fig. 17b). De manera complementaria a la  $\omega$ -agatoxina-TK y a la  $\omega$ -agatoxina-IVA el bloqueador de canales de  $Na^+$ , tetrodotoxina, falló en inhibir el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto pero inhibió el aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina (Figs. 11b y 17c).



**Figura 17.** Efectos complementarios de la  $\omega$ -agatoxina-TK y la tetrodotoxina sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto y veratridina. Después de medir el nivel basal de  $Ca_i$  en sinaptosomas estriales en ausencia (a) o en presencia de 500 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK (b), o 1  $\mu$ M de tetrodotoxina (c), los sinaptosomas fueron expuestos a  $K^+$  alto (25 mM final) y el  $Ca_i$  fue medido por 3 min. Después de este tiempo los sinaptosomas fueron expuestos a 10  $\mu$ M de veratridina y el  $Ca_i$  fue medido por otros 3 min. Los resultados son experimentos representativos de al menos 3 experimentos independientes.

## 12. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento en el $\text{Na}_i$ inducido por veratridina

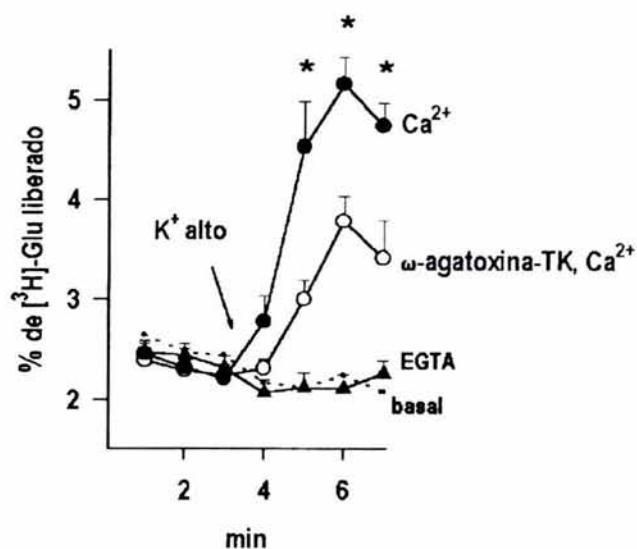
El aumento en el  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina (Fig. 18a) es insensible a la  $\omega$ -agatoxina-TK (Fig. 18b) y a  $\omega$ -conotoxina-GVIA (Fig. 18c), pero como se mostró anteriormente es altamente sensible al bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$ , con tetrodotoxina (Fig. 18d).



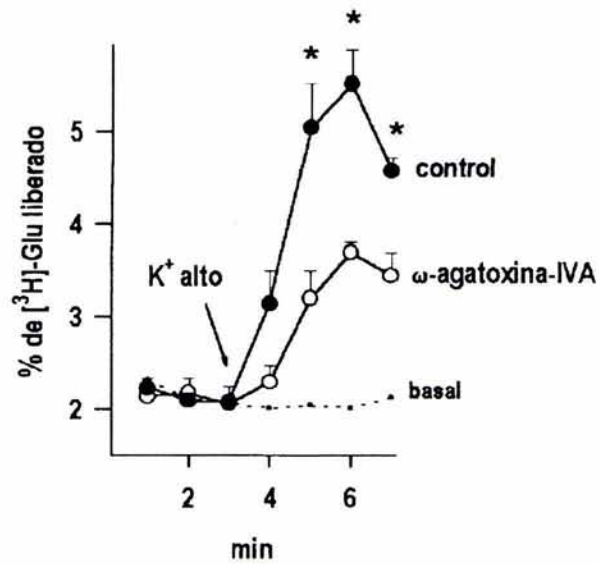
**Figura 18.** Comparación de los efectos de la  $\omega$ -agatoxina-TK, la  $\omega$ -conotoxina-GVIA y la tetrodotoxina sobre el aumento en el  $\text{Na}_i$  inducido por veratridina. Después de medir el nivel basal de  $\text{Na}_i$  en sinaptosomas estriatales en ausencia (a) o en la presencia de 500 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK (b), 1  $\mu\text{M}$  de  $\omega$ -conotoxina-GVIA (c) o 1  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina (d), los sinaptosomas fueron despolarizados con 10  $\mu\text{M}$  de veratridina y el  $\text{Na}_i$  fue medido por varios minutos. Los resultados son experimentos representativos de al menos 3 experimentos independientes.

### 13. Efecto de la $\omega$ -agatoxina-TK y la $\omega$ -agatoxina-IVA sobre la exocitosis de Glu

En sinaptosomas purificados de hipocampo en ausencia del gradiente de  $\text{Na}^+$  y previamente cargados con  $[^3\text{H}]\text{-Glu}$ , la liberación del neurotransmisor aminoácido inducida con  $\text{K}^+$  alto, es completamente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Figs 19 y 20 círculos negros) ya que el  $\text{K}^+$  alto no indujo la liberación del neurotransmisor en sinaptosomas perfundidos en ringer sin  $\text{Ca}^{2+}$ , ni tampoco indujo la liberación en sinaptosomas donde además del  $\text{Ca}^{2+}$  se agregó EGTA (Fig. 19 triángulos y líneas punteadas, Fig. 20 líneas punteadas). La liberación de  $[^3\text{H}]\text{-Glu}$  que se induce al despolarizar con  $\text{K}^+$  alto y que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  se inhibió marcadamente en presencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK ( $50 \pm 5\%$ ) o de la  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $52 \pm 4\%$ ) ambas toxinas presentes en una concentración de 200 nM (Figs. 19 y 20 círculos vacíos).



**Figura 19.** Efecto de la  $\omega$ -agatoxina-TK sobre la exocitosis de  $[^3\text{H}]\text{-Glu}$ . Sinaptosomas purificados de hipocampo fueron precargados con  $[^3\text{H}]\text{-Glu}$  y superfundidos con un medio de bajo  $\text{Na}^+$  sin (círculos negros y líneas punteadas) o conteniendo 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK (círculos vacíos), o con RKH de bajo  $\text{Na}^+$  y sin  $\text{Ca}^{2+}$  (triángulos). En donde se indica (flecha), este medio fue reemplazado rápidamente por el mismo medio (línea punteada) o por medio despolarizante de  $\text{K}^+$  alto con bajo  $\text{Na}^+$  (círculos negros) o conteniendo 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK (círculos vacíos) o con medio despolarizante de  $\text{K}^+$  alto, con bajo  $\text{Na}^+$  y sin  $\text{Ca}^{2+}$  (triángulos). Los resultados son el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes. \*,  $P < .05$  entre la liberación de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  inducida por  $\text{K}^+$  alto en ausencia y en presencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK.



**Figura 20.** Efecto de la  $\omega$ -agatoxina-IVA sobre la exocitosis de [<sup>3</sup>H]-Glu. Sinaptosomas purificados de hipocampo fueron precargados con [<sup>3</sup>H]-Glu y superfundidos con un medio de bajo Na<sup>+</sup> sin (círculos negros y líneas punteadas) o conteniendo 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-IVA (círculos vacíos). En donde se indica (flecha), este medio fue reemplazado rápidamente por el mismo medio (línea punteada) o por medio despolarizante de K<sup>+</sup> alto con bajo Na<sup>+</sup> (círculos negros) o conteniendo 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK (círculos vacíos). (b) la liberación neta (%) se refiere a la liberación de la radioactividad por K<sup>+</sup> alto en 3 minutos menos la liberación basal durante el mismo periodo. Los resultados son el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes. \*, P < .05 entre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por K<sup>+</sup> alto en ausencia y en presencia de la  $\omega$ -agatoxina-IVA.



## VI. Discusión.

El hallazgo de que las dihidropiridinas nimodipina, nitrendipina y nifedipina conocidas como bloqueadoras de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, no inhiban el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto pero sí el aumento inducido por veratridina (Fig. 8), podría interpretarse como que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L no participan en el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto pero sí en el inducido por veratridina. Sin embargo, esta interpretación parece improbable pues las dihidropiridinas también inhiben el aumento en el  $\text{Na}_i$  que induce la veratridina (Fig. 9), y éste no depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Fig. 10). En otras palabras, si la veratridina aumentara al  $\text{Ca}_i$  activando a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, se esperaría que las dihidropiridinas bloquearan el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce la veratridina, pero no tendrían por qué inhibir el aumento en el  $\text{Na}_i$  que induce la veratridina.

La incapacidad de la nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina para inhibir el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto explica el carácter controversial de la participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en la exocitosis, o cuando menos pone en duda su participación en el control de la exocitosis de las terminales nerviosas cerebrales. La similitud de efectos producidos por la tetrodotoxina sobre el aumento en el  $\text{Na}_i$  que induce la veratridina (Figs. 9a y e) y sobre el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce la adición subsecuente de  $\text{K}^+$  y veratridina (Fig 11b), con los efectos de las dihidropiridinas (Figs. 8 y 9), en las terminales nerviosas cerebrales indica que estos datos confirman la idea de que en los sinaptosomas no hay canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Massieu y Tapia, 1988). Consistentemente con esta interpretación, la liberación de todos los neurotransmisores endógenos estudiados inducida por veratridina, que depende de la activación de los canales de  $\text{Na}^+$ , es inhibida por la nimodipina y la nitrendipina así como por la tetrodotoxina (Tabla 3). Mientras que la exocitosis de neurotransmisores inducida por  $\text{K}^+$  alto, que depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, no es sensible ni a la tetrodotoxina, ni a la nimodipina o a la nitrendipina (Tabla 4).

La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo en la liberación de neurotransmisores inducida por  $\text{K}^+$  alto y la independencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo en la liberación de neurotransmisores inducida por veratridina está ampliamente documentada. (Levi y col., 1978; Adam-Vizi y Ligeti, 1984; Nicholls y Attwell, 1990; Sitges y col., 1993; Sitges y Chiu, 1995 a y b). El aumento en la liberación de neurotransmisores, independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo inducido con veratridina, se explica por la reversión del transportador tras un aumento considerable en la concentración interna de  $\text{Na}^+$ .

En contraste, la toxina bloqueadora de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA, no inhibió los aumentos en el  $\text{Na}_i$  y en el  $\text{Ca}_i$  inducidos por veratridina, pero sí el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto (Fig. 11d). Esta inhibición que produce dicha  $\omega$ -agatoxina sobre el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce la despolarización con  $\text{K}^+$  alto, indica que la despolarización con  $\text{K}^+$  alto aumenta el  $\text{Ca}_i$  propiciando la activación de los canales tipo P/Q. En cambio, el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce la veratridina no es sensible a la  $\omega$ -agatoxina-IVA estudiadas, lo que sugiere que la veratridina propicia la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por una vía diferente a la que activa la despolarización con  $\text{K}^+$  alto, ó en otras palabras, por una vía que no involucra a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a la  $\omega$ -agatoxina-IVA.

Las cinéticas del aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce el  $\text{K}^+$  alto y la veratridina son diferentes. El incremento máximo en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto se alcanza rápidamente y luego declina hacia un valor meseta, mientras que el incremento máximo en el  $\text{Ca}_i$  inducido por veratridina es alcanzado lenta y gradualmente (Fig. 7a). Es interesante que esta cinética se mantenga incluso después de que se ha alcanzado el máximo aumento en el  $\text{Ca}_i$  con  $\text{K}^+$  alto (Fig. 7c). Este hallazgo de que el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que produce la veratridina sea independiente del grado de despolarización previamente inducido por  $\text{K}^+$  alto, también sugiere que el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que produce la veratridina está mediado por una vía diferente a la activada por  $\text{K}^+$  alto. Si consideramos que a diferencia de la despolarización con  $\text{K}^+$  alto, la despolarización con veratridina aumenta al  $\text{Na}_i$ , es muy probable que la vía adicional que aumenta al  $\text{Ca}_i$  por adición subsecuente de veratridina sea el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su forma inversa.

El hallazgo de que la tetrodotoxina y las dihidropiridinas inhiban el aumento en el  $Na_i$ , que induce la veratridina no contradice la hipótesis de que el aumento en el  $Ca_i$  que induce la veratridina se deba a la entrada de  $Ca^{2+}$  por el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  en su forma inversa, ya que la tetrodotoxina y las dihidropiridinas al bloquear a los canales presinápticos de  $Na^+$  también impedirían el aumento dramático en la concentración presináptica de  $Na^+$  y la subsecuente entrada de  $Ca^{2+}$  tras la activación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  en su forma inversa (Sánchez-Armass y Blaustein, 1987; Blaustein y Lederer, 1999).

En cuanto a la caracterización de los efectos de la  $\omega$ -agatoxina-TK sobre los cambios iónicos inducidos por despolarización en sinaptosomas podríamos decir lo siguiente:

En este trabajo se estudió por primera vez el efecto de la  $\omega$ -agatoxina-TK sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por despolarización en terminales nerviosas aisladas de estriado e hipocampo cargadas con fura-2 (Fig 15). Nuestros resultados muestran que en el rango nM la  $\omega$ -agatoxina-TK inhibe el aumento en el  $Ca_i$  inducido por despolarización con  $K^+$  alto de manera dependiente de dosis (Fig. 14). La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) necesaria para que la  $\omega$ -agatoxina-TK inhiba el aumento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto tanto en los sinaptosomas estriatales como en los sinaptosomas hipocampales es de alrededor de 60 nM. Sin embargo, la inhibición máxima ejercida por la  $\omega$ -agatoxina-TK es aproximadamente 10 % mayor en los sinaptosomas estriatales que en los hipocampales, lo que sugiere que existe una población ligeramente mayor de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a  $\omega$ -agatoxina-TK en las terminales nerviosas de estriado que en las de hipocampo.

Los efectos simples o combinados de la  $\omega$ -agatoxina-TK y la  $\omega$ -conotoxina-GVIA (Fig. 16) indican que una parte del aumento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto que no es sensible a la  $\omega$ -agatoxina-TK puede ser mediado por canales tipo N. Sin embargo, los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L no están involucrados en el aumento de  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto en sinaptosomas de estriado (Fig. 8), por lo que el aumento

remanente en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto posiblemente involucra canales de  $Ca^{2+}$  de otro tipo.

Como en el caso de la  $\omega$ -agatoxina-IVA, la  $\omega$ -agatoxina-TK inhibió el aumento en el  $Ca_i$  inducido por  $K^+$  alto pero no el aumento en el  $Ca_i$  inducido por veratridina (Fig. 17b). A diferencia del  $K^+$  alto, la veratridina incrementa gradualmente el  $Na_i$  impidiendo la inactivación de los canales de  $Na^+$  hasta alcanzar un valor meseta. Esta misma cinética también se observa en el aumento de  $Ca_i$  que es inducido por veratridina, lo que indica la relación entre estas dos respuestas.

La inhibición que causa la tetrodotoxina sobre el aumento de  $Ca_i$  inducido por veratridina indica que el incremento en la permeabilidad de los canales presinápticos de  $Na^+$  causado por veratridina es absolutamente necesario para que la veratridina aumente al  $Ca_i$  y que la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por veratridina es estrictamente dependiente del aumento de  $Na_i$ . El hallazgo de que la  $\omega$ -agatoxina-TK no inhiba el aumento en el  $Ca_i$  inducido por veratridina (Fig. 17b) así como el aumento de  $Na_i$  inducido por veratridina (Fig. 18b) es consistente con la previamente reportada, incapacidad de la  $\omega$ -agatoxina-TK para inhibir la liberación de dopamina evocada por veratridina en sinaptosomas de estriado (Dobrev y col., 1998), y apoya la conclusión previa de que el influjo de  $Ca^{2+}$  activado por veratridina no involucra a los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje (Fig. 11).

El hallazgo de que al igual que la  $\omega$ -agatoxina-IVA, la  $\omega$ -agatoxina-TK también sea incapaz de inhibir el aumento en el  $Ca_i$  inducido por veratridina, concuerda con la idea de que la veratridina incrementa al  $Ca_i$  al revertir al intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , tras un influjo excesivo de  $Na^+$ . Al igual que nosotros, Meder y col., (1997) y Deffois y col., (1996), tampoco encontraron que la  $\omega$ -agatoxina-IVA inhibiera el aumento en el  $Ca_i$  inducido por veratridina en sinaptosomas de cerebro de rata.

La incapacidad de la  $\omega$ -agatoxina-TK para inhibir el aumento en el  $Na_i$  que induce la veratridina (Fig. 18b) indica que a las concentraciones utilizadas, la  $\omega$ -agatoxina-TK inhibe selectivamente a los canales presinápticos de  $Ca^{2+}$  y no

modifica la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de los canales presinápticos de  $\text{Na}^+$  como lo hacen las dihidropiridinas y la tetrodotoxina (Figs. 9 y 18d).

El  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^+$  son los dos principales cationes que controlan la liberación de los neurotransmisores por despolarización. En sinaptosomas, el incremento en la permeabilidad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje resulta en la liberación de neurotransmisores por exocitosis en tanto que el incremento en la permeabilidad de los canales presinápticos de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje resulta en la liberación de neurotransmisor del citoplasma a través de la reversión de los transportadores de neurotransmisores (Sitges y col., 1993). Para descartar la liberación de los neurotransmisores mediada por reversión del transportador, los sinaptosomas fueron perfundidos con un medio externo de bajo  $\text{Na}^+$  (Figs. 19 y 20). Los resultados indican que en ausencia del gradiente de  $\text{Na}^+$  la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-Glu inducida con  $\text{K}^+$  alto es absolutamente dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , como lo indica la incapacidad del  $\text{K}^+$  alto para inducir liberación de [ $^3\text{H}$ ]-Glu en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Esta liberación exocitótica de [ $^3\text{H}$ ]-Glu es inhibida en  $50 \pm 5 \%$  y en  $53 \pm 4 \%$  por 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK y 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-IVA, respectivamente. El hallazgo de que ambas toxinas inhiban con la misma potencia y eficacia la exocitosis de [ $^3\text{H}$ ]-Glu en los sinaptosomas purificados de hipocampo indica que tanto el extremo terminal amino de la  $\omega$ -agatoxina-TK como el de la  $\omega$ -agatoxina-IVA son irrelevantes para el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q.

Los resultados en sinaptosomas de hipocampo de rata muestran que a una concentración de 500 nM, la  $\omega$ -agatoxina-TK inhibe  $50 \pm 7\%$  el aumento en el  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto (Fig. 14) y a una concentración menor (200 nM) inhibe la exocitosis de [ $^3\text{H}$ ]-Glu en una magnitud semejante ( $50 \pm 4\%$ ) (Fig. 19). Considerando que 500 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK ejerció una inhibición máxima (50%) sobre el aumento de  $\text{Ca}_i$  inducido por  $\text{K}^+$  alto y que esta inhibición es prácticamente alcanzada con la concentración de 150 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK, no es raro que la  $\omega$ -agatoxina-TK a dos concentraciones diferentes (500 y 200 nM) inhiba ambas respuestas en la misma proporción. Sin embargo, la  $\text{IC}_{50}$  de  $\omega$ -agatoxina-TK estimada en este trabajo (60 nM) hecho en sinaptosomas hipocampales, contrasta con la  $\text{IC}_{50}$  (700 nM) de  $\omega$ -agatoxina-TK reportada para

inhibir la liberación de Glu en rebanadas de hipocampo de rata (Kimura y col., 1995). La mayor potencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK encontrada en este trabajo hecho en sinaptosomas, se puede explicar por una diferencia en el acceso de la toxina a sus receptores (canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ) existente entre sinaptosomas y rebanadas. También la superfusión continua de los sinaptosomas purificados de hipocampo en ausencia de un gradiente de  $\text{Na}^+$ , es una condición que elimina la posibilidad de la recaptura de Glu por los transportadores de neurotransmisor, lo que puede contribuir importantemente a la mayor potencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK encontrada aquí en comparación con lo reportado en rebanadas de hipocampo incubadas en presencia de un gradiente de  $\text{Na}^+$  (Kimura y col., 1995).

En resumen, en terminales nerviosas aisladas, los canales sensibles a  $\omega$ -agatoxina-TK median una porción importante del aumento en el  $\text{Ca}_i$  insensible a tetrodotoxina inducido con  $\text{K}^+$  alto, pero que no están involucrados en el aumento en el  $\text{Ca}_i$  sensible a tetrodotoxina inducido con veratridina.

## II. CONCLUSIONES GENERALES.

Es importante hacer notar que el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce el  $\text{K}^+$  alto en sinaptosomas no involucra a los canales presinápticos de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, pues no se inhibe en presencia de tetrodotoxina (Fig. 11b) ni en ausencia de  $\text{Na}^+$  externo (Sitges y Chiu, 1995a). El aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce la veratridina es en cambio absolutamente dependiente de la entrada de  $\text{Na}^+$  externo por los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, pues se inhibe con tetrodotoxina (Fig. 9e) y requiere de la presencia de  $\text{Na}^+$  externo (Sitges y Chiu, 1995a). En otras palabras, el aumento en el  $\text{Ca}_i$  que induce la veratridina parece ser disparado por el dramático aumento en el  $\text{Na}_i$  (Sitges y col., 1998; Sitges y Nekrassov, 1999), que posiblemente activa al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su forma inversa.

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es la vía adicional de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por veratridina que se

suma a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales tipo P/Q previamente activados por la despolarización con  $\text{K}^+$  alto.

Los estudios en donde se ha seguido la liberación de neurotransmisores radioactivos previamente cargados a sinaptosomas sugieren que los canales principalmente involucrados en la exocitosis son de tipo P/Q, pues la liberación inducida por  $\text{K}^+$  alto de los neurotransmisores en general es sensible a la  $\omega$ -agatoxina-IVA. Sin embargo, también hay evidencias que sugieren la contribución de otros tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la exocitosis, aunque la contribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ha sido particularmente la más controvertida (Soliakov y col., 1995; Sitges y Chiu, 1995 a y b; Turner y col., 1993; Carvalho y col., 1995; Kandasamy, 2000). Básicamente en todos los trabajos de liberación de neurotransmisores en sinaptosomas se estudia la liberación de un neurotransmisor marcado radiactivamente previamente cargado a la preparación sinaptosomal. Este método de seguimiento del neurotransmisor radioactivo sólo nos permite estudiar la liberación de un neurotransmisor a la vez. Sin embargo, cuando los sinaptosomas se preparan a partir del cerebro completo, o incluso de una región específica del mismo (como el estriado o hipocampo), la población de sinaptosomas es muy heterogénea y por consiguiente varios neurotransmisores se liberan simultáneamente.

Los resultados presentados en esta tesis en la que se caracterizaron los efectos de los bloqueadores más comunes de los canales tipo L sobre la liberación de diferentes neurotransmisores endógenos en sinaptosomas de estriado de rata demuestran que la nimodipina, la nitrendipina y la nifedipina alteran la liberación de los distintos neurotransmisores de manera particular. Por ejemplo, las dihidropiridinas no se comportan como bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , pues no inhiben la exocitosis inducida por  $\text{K}^+$  alto, pero sí se comportan como bloqueadores de los canales de  $\text{Na}^+$  pues inhiben todas las respuestas inducidas por veratridina: a saber, el aumento en el  $\text{Na}_i$ , el aumento en el  $\text{Ca}_i$  y el aumento en la liberación de los neurotransmisores.

## VII. Bibliografia

Adam-Vizi V. and Ligeti E. (1984) Release of acetylcholine from rat brain synaptosomes by various agents in the absence of external calcium ions. *J. Physiol* 353, 505-521.

Arikkath J. and Campbell K.P. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 298-307.

Barnes S. and Davies J.A. (1988) The effects of calcium channel agonists and antagonists on the release of endogenous glutamate from cerebellar slices. *Neurosci. Lett.* 92, 58-63.

Bernath S. (1992) Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog. Neurobiol.* 38, 57-91.

Blaustein M.P. (1975) Effects of potassium, veratridine, and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. *J. Physiol* 247, 617-655.

Carvalho C.M., Ferreira I.L., Duarte C.B., Malva J.O., Tretter L., Adam-Vizi V., and Carvalho A.P. (1995) Relation of  $[Ca^{2+}]_i$  to dopamine release in striatal synaptosomes: role of  $Ca^{2+}$  channels. *Brain Res.* 669, 234-244.

Carvalho C.M., Santos S.V., and Carvalho A.P. (1986) gamma-Aminobutyric acid release from synaptosomes as influenced by  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  channel blockers. *Eur. J. Pharmacol.* 131, 1-12.

Catterall W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.

Catterall W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521-555.

Catterall W.A., Goldin A.L., and Waxman S.G. (2003) International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol. Rev.* 55, 575-578.

Cestele S. and Catterall W.A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.

Dodge F.A., Jr. and Rahamimoff R. (1967) Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol* 193, 419-432.



Ellinor P.T., Zhang J.F., Randall A.D., Zhou M., Schwarz T.L., Tsien R.W., and Horne W.A. (1993) Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* 363, 455-458.

Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W., and Catterall W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.

Ferkany J.W. and Coyle J.T. (1983) Evoked release of aspartate and glutamate: disparities between prelabeling and direct measurement. *Brain Res.* 278, 279-282.

French R.J., Zamponi G.W., and Sierralta I.E. (1998) Molecular and kinetic determinants of local anaesthetic action on sodium channels. *Toxicol. Lett.* 100-101, 247-254.

Frankenhaeuser B. and Hodgkin A.L. (1957) The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol* 137, 218-244.

Galindo C.A. and Sitges M. (2004) Dihydropyridines mechanism of action in striatal isolated nerve endings. Comparison with  $\omega$ -agatoxin IVA. *Neurochem. Res.* 29, 659-669.

Gaur S., Newcomb R., Rivnay B., Bell J.R., Yamashiro D., Ramachandran J., and Miljanich G.P. (1994) Calcium channel antagonist peptides define several components of transmitter release in the hippocampus. *Neuropharmacology* 33, 1211-1219.

Goldin A.L., Barchi R.L., Caldwell J.H., Hofmann F., Howe J.R., Hunter J.C., Kallen R.G., Mandel G., Meisler M.H., Netter Y.B., Noda M., Tamkun M.M., Waxman S.G., Wood J.N., and Catterall W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368.

Graham M.E. and Burgoyne R.D. (1995) Effects of calcium channel antagonists on calcium entry and glutamate release from cultured rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 65, 2517-2524.

Grynkiewicz G., Poenie M., and Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.

Hajos F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.

Hille B. (2001) Voltage-Gated Calcium Channels. In *Ion Channels of Excitable Membranes*, pp. 95-129. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA 01375 U.S.A.

Hillyard D.R., Monje V.D., Mintz I.M., Bean B.P., Nadasdi L., Ramachandran J., Miljanich G., Azimi-Zoonooz A., McIntosh J.M., Cruz L.J., and . (1992) A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 9, 69-77.

Huston E., Scott R.H., and Dolphin A.C. (1990) A comparison of the effect of calcium channel ligands and GABA<sub>B</sub> agonists and antagonists on transmitter release and somatic calcium channel currents in cultured neurons. *Neuroscience* 38, 721-729.

Jaffe D.B., Johnston D., Lasser-Ross N., Lisman J.E., Miyakawa H., and Ross W.N. (1992) The spread of Na<sup>+</sup> spikes determines the pattern of dendritic Ca<sup>2+</sup> entry into hippocampal neurons. *Nature* 357, 244-246.

Kandasamy S.B. (2000) Possible involvement of L-type voltage-gated calcium channels in release of dopamine in the striatum of irradiated rats. *Radiat. Res.* 154, 39-43.

Katz B. and Miledi R. (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol* 192, 407-436.

Kimura M., Yamanishi Y., Hanada T., Kagaya T., Kuwada M., Watanabe T., Katayama K., and Nishizawa Y. (1995) Involvement of P-type calcium channels in high potassium-elicited release of neurotransmitters from rat brain slices. *Neuroscience* 66, 609-615.

Kingsbury A. and Balazs R. (1987) Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur. J. Pharmacol.* 140, 275-283.

Kuwada M., Teramoto T., Kumagaye K.Y., Nakajima K., Watanabe T., Kawai T., Kawakami Y., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., and . (1994) Omega-agatoxin-TK containing D-serine at position 46, but not synthetic omega-[L-Ser46]agatoxin-TK, exerts blockade of P-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *Mol. Pharmacol.* 46, 587-593.

Levi G., Banay-Schwartz M., and Raiteri M. (1981) Studies on the release of exogenous and endogenous GABA and glutamate from rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 6, 275-285.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Luebke J.I., Dunlap K., and Turner T.J. (1993) Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11, 895-902.

- Markram H., Helm P.J., and Sakmann B. (1995) Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol* 485 ( Pt 1), 1-20.
- Meder W., Fink K., and Gothert M. (1997) Involvement of different calcium channels in K<sup>+</sup>- and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356, 797-805.
- Mintz I.M., Venema V.J., Adams M.E., and Bean B.P. (1991) Inhibition of N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6628-6631.
- Mintz I.M., Venema V.J., Adams M.E., and Bean B.P. (1991) Inhibition of N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6628-6631.
- Nicholls D. and Attwell D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 462-468.
- Nicholls D.G. (1989) Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52, 331-341.
- Nicholls D.G. (1998) Strategies for receptor control of neurotransmitter release. *Adv. Pharmacol.* 42, 110-113.
- Nicholls D.G. and Sihra T.S. (1986) Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate. *Nature* 321, 772-773.
- Nowycky M.C., Fox A.P., and Tsien R.W. (1985) Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 2178-2182.
- Olivera B.M. (1997) E.E. Just Lecture, 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell* 8, 2101-2109.
- Pauwels P.J., Van Assouw H.P., Peeters L., and Leysen J.E. (1990) Neurotoxic action of veratridine in rat brain neuronal cultures: mechanism of neuroprotection by Ca<sup>++</sup> antagonists nonselective for slow Ca<sup>++</sup> channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 1117-1122.
- Rahamimoff R., Lev-Tov A., and Meiri H. (1980) Primary and secondary regulation of quantal transmitter release: calcium and sodium. *J. Exp. Biol.* 89, 5-18.

Rodriguez R. and Sitges M. (1996) Nigericin-induced Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in synaptosomes: effect on [3H]GABA release. *Neurochem. Res.* 21, 889-895.

Romey G. and Lazdunski M. (1982) Lipid-soluble toxins thought to be specific for Na<sup>+</sup> channels block Ca<sup>2+</sup> channels in neuronal cells. *Nature* 297, 79-8.

Sather W.A., Tanabe T., Zhang J.F., Mori Y., Adams M.E., and Tsien R.W. (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* 11, 291-303.

Shichor I., Fainzilber M., Pelhate M., Malecot C.O., Zlotkin E., and Gordon D. (1996) Interactions of delta-conotoxins with alkaloid neurotoxins reveal differences between the silent and effective binding sites on voltage-sensitive sodium channels. *J. Neurochem.* 67, 2451-2460.

Sitges M. (1989) Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on gamma-amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J. Neurochem.* 53, 436-441.

Sitges M. and Chiu L.M. (1995) Characterization of the type of calcium channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve endings. *Neurochem. Res.* 20, 1073-1080.

Sitges M. and Chiu L.M. (1995) omega-Aga IVA selectively inhibits the calcium-dependent fraction of the evoked release of [3H]GABA from synaptosomes. *Neurochem. Res.* 20, 1065-1071.

Sitges M., Chiu L.M., and Gonzalez L. (1993) Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [3H]GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem. Res.* 18, 1081-1087.

Sitges M. and Nekrassov V. (1999) Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochem. Res.* 24, 1585-1591.

Sitges M., Nekrassov V., and Guarneros A. (2000) Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res.* 854, 48-56.

Sitges M., Pena F., Chiu L.M., and Guarneros A. (1998) Study on the possible involvement of protein kinases in the modulation of brain presynaptic sodium channels; comparison with calcium channels. *Neurochem. Int.* 32, 177-190.

Sitges M. and Reyes A. (1995) Effects of verapamil on the release of different neurotransmitters. *J. Neurosci. Res.* 40, 613-621.

Snutch T.P., Leonard J.P., Gilbert M.M., Lester H.A., and Davidson N. (1990) Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3391-3395.

Soliakov L. and Wonnacott S. (1996) Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels involved in nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J. Neurochem.* 67, 163-170.

Strichartz G., Rando T., and Wang G.K. (1987) An integrated view of the molecular toxinology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 10, 237-267.

Takagaki G. and Konagaya H. (1985) Properties of the uptake and release of neurotransmitter glutamate in cerebral cortical tissue of guinea pigs. *Neurochem. Res.* 10, 1059-1069.

Tapia R. and Sitges M. (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250, 291-299.

Teramoto T., Kuwada M., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., and Katayama K. (1993) A novel peptide from funnel web spider venom, omega-Aga-TK, selectively blocks, P-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 134-140.

Teramoto T., Niidome T., Kimura M., Ohgoh M., Nishizawa Y., Katayama K., Mayumi T., and Sawada K. (1997) A novel type of calcium channel sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res.* 756, 225-230.

Teramoto T., Niidome T., Miyagawa T., Nishizawa Y., Katayama K., and Sawada K. (1995) Two types of calcium channels sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 1684-1688.

Tibbs G.R., Barrie A.P., Van Mieghem F.J., McMahon H.T., and Nicholls D.G. (1989) Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and glutamate release. *J. Neurochem.* 53, 1693-1699.

Timmermann D.B., Lund T.M., Belhage B., and Schousboe A. (2001) Localization and pharmacological characterization of voltage dependent calcium channels in cultured neocortical neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 1-10.

Timmermann D.B., Westenbroek R.E., Schousboe A., and Catterall W.A. (2002) Distribution of high-voltage-activated calcium channels in cultured gamma-aminobutyric acidergic neurons from mouse cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.* 67, 48-61.

- Triggle D.J. (1994) Molecular pharmacology of voltage-gated calcium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747, 267-281.
- Turner T.J., Adams M.E., and Dunlap K. (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science* 258, 310-313.
- Turner T.J., Adams M.E., and Dunlap K. (1993) Multiple Ca<sup>2+</sup> channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 9518-9522.
- Turner T.J. and Dunlap K. (1995) Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacology* 34, 1469-1478.
- Villanueva S., Frenz P., Dragnic Y., and Orrego F. (1988) Veratridine-induced release of endogenous glutamate from rat brain cortex slices: a reappraisal of the role of calcium. *Brain Res.* 461, 377-380.
- Westenbroek R.E., Ahlijanian M.K., and Catterall W.A. (1990) Clustering of L-type Ca<sup>2+</sup> channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 347, 281-284.
- Westenbroek R.E., Hell J.W., Warner C., Dubel S.J., Snutch T.P., and Catterall W.A. (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9, 1099-1115.
- Westenbroek R.E., Sakurai T., Elliott E.M., Hell J.W., Starr T.V., Snutch T.P., and Catterall W.A. (1995) Immunohistochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J. Neurosci.* 15, 6403-6418.
- Woodward J.J. and Leslie S.W. (1986) Bay K 8644 stimulation of calcium entry and endogenous dopamine release in rat striatal synaptosomes antagonized by nimodipine. *Brain Res.* 370, 397-400.
- Yatani A. and Brown A.M. (1985) The calcium channel blocker nitrendipine blocks sodium channels in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 56, 868-875.
- Yunker A.M. and McEnery M.W. (2003) Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 533-575.
- Zhang J.F., Randall A.D., Ellinor P.T., Horne W.A., Sather W.A., Tanabe T., Schwarz T.L., and Tsien R.W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32, 1075-1088.

# **SUPLEMENTO**

## Dihydropyridines Mechanism of Action in Striatal Isolated Nerve Endings: Comparison with $\omega$ -Agatoxin IVA

C. A. Galindo<sup>1</sup> and M. Sitges<sup>1,2</sup>

(Accepted August 27, 2003)

The relative contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  channels to the mechanism underlying the action of the dihydropyridines (DHPs), nimodipine, nitrendipine and nifedipine was investigated in rat striatum synaptosomes. The rise in internal  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_i$ , as determined with fura-2) induced by high  $\text{K}^{+}$  was unchanged by the DHPs, which like tetrodotoxin (TTX) inhibited both the rise in internal  $\text{Na}^{+}$  ( $\text{Na}_i$ , as determined with the  $\text{Na}^{+}$  selective indicator dye, SBFI) and the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine. Nimodipine and nitrendipine were much more potent than nifedipine. Oppositely to TTX and to the DHPs, the P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker,  $\omega$ -agatoxin IVA did not inhibit the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine, but inhibited the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^{+}$ . Veratridine-evoked release of dopamine, GABA, Glu, and Asp (detected by HPLC) was inhibited by nimodipine, nitrendipine, and TTX, while high  $\text{K}^{+}$ -evoked release was unchanged by the DHPs or TTX. It is concluded that the reduction in presynaptic  $\text{Na}^{+}$  channel permeability might contribute to the cerebral effects of DHPs.

**KEY WORDS:** Nimodipine; nitrendipine; nifedipine; calcium-channels; sodium-channels; neurotransmitter release.

### INTRODUCTION

Among the group of drugs known as organic  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers, the dihydropyridines (DHPs) nimodipine, nitrendipine, and nifedipine are the most commonly used as experimental tools for unmasking the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the L-type in biological responses. The action of these DHPs at the brain level is evidenced by studies showing their anticonvulsant properties in several animal models of experimental epilepsy (1–5), as well as by their neuroprotective action in experimental models of cerebral ischemia (6) and by their potential use in treating neuropsychiatric disorders (7–9).

The neuroprotective capacity of various anticonvulsant or antiischemic drugs, including some classified as  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers, has been proposed to involve, a “negative modulation” of voltage-sensitive  $\text{Na}^{+}$  channels (10–15). In this respect, some studies suggest that presynaptic voltage-dependent  $\text{Na}^{+}$  channels could be one molecular site of action of DHPs (16–20). For example, in brain isolated nerve endings (synaptosomes) nimodipine, nitrendipine, and nifedipine all show binding affinity for the batrachotoxin binding site of the  $\text{Na}^{+}$  channel (19), and nitrendipine inhibits dose dependently the external  $\text{Ca}^{2+}$  independent release of the neurotransmitter [ $^3\text{H}$ ]GABA induced by veratridine (18), that like batrachotoxin binds to site 2 on the  $\text{Na}^{+}$  channel, which is located in the hydrophobic moiety of the  $\alpha$ -1 subunit of the channel (21).

The primary function of cerebral nerve endings is to release neurotransmitters, including the excitatory amino acids glutamate and aspartate that subserve

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México.

<sup>2</sup>Address reprint requests to: M. Sitges, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F. Tel: 5622-38-66; Fax: 5622-38-97; E-mail address: sitges@servidor.unam.mx



postsynaptic excitatory responses.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  are the two main cations controlling cerebral neurotransmitter release upon depolarization. Voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the membrane of the small ( $<0.3 \mu\text{m}$ ) cerebral nerve endings can be approached using the fluorescent indicator dyes, SBFI and fura-2, which change their emission in response to the  $\text{Na}^+$  and the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in their vicinity, respectively. Also, the extensive characterization of the differences between high  $\text{K}^+$  and veratridine depolarization in cerebral synaptosomes allows the design of strategies for distinguishing between presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  channel-mediated effects. For instance, by comparing the effects of potential neuroprotective drugs, such as trifluoperazine, vinpocetine, and dizclopine on the ion fluxes induced by high  $\text{K}^+$  and veratridine, their inhibitory action on cerebral presynaptic  $\text{Na}^+$  channel permeability has been unmasked in previous studies in synaptosomes (22–26). Thus the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  channel permeability induced by high  $\text{K}^+$  is independent of TTX-sensitive  $\text{Na}^+$  channels and does not require the presence of external  $\text{Na}^+$  (27,28). In contrast, the increase in  $\text{Na}^+$  channel permeability induced by veratridine does not require the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (23).

In the present study the effects of nimodipine, nitrendipine, and nifedipine on the increase in  $\text{Ca}_i$ ,  $\text{Na}_i$ , and neurotransmitter release induced by high  $\text{K}^+$  and veratridine in striatal synaptosomes was compared to investigate the relative contribution of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  channels on the cerebral actions of these drugs. We chose striatal synaptosomes as a model preparation because the population of nerve endings in the striatum contains the glutamatergic nerve endings of the corticostriatal pathway, the dopaminergic nerve endings of the nigrostriatal pathway, and the GABAergic nerve endings from striatal interneurons. Therefore in striatal synaptosomes the effects of DHPs on the release of the amino acid neurotransmitters and dopamine can be simultaneously tested.

The present results show that these DHPs reduce the TTX-sensitive elevation of  $\text{Na}_i$  and  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine and are not capable of reducing the  $\omega$ -agatoxin IVA-sensitive elevation of  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^+$ .

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

*Preparation of Striatal Synaptosomes.* Dissected striata of four male Wistar rats (250–300 g) were immediately placed in cold isotonic sucrose (1:10, wt/vol) and homogenized (6 strokes at 2000 rpm, 0.15-mm pestle-vessel clearance). The resulting suspensions were centrifuged at  $1100 \times g$

for 10 min, and supernatants obtained from this centrifugation were centrifuged for another 20 min at  $8200 \times g$ . The resulting pellets containing striatal synaptosomes were resuspended in standard Krebs' Ringer HEPES (KRH). The composition of the KRH is 127 mM NaCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.37 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.18 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM HEPES, and 5.6 mM dextrose, pH 7.4, bubbled with a  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  mixture.

*$\text{Na}_i$  and  $\text{Ca}_i$  Experiments.* The methods used to load synaptosomes with fura-2 or with SBFI and to monitor their fluorescence were previously reported (29,30). Briefly, striatal synaptosomes were incubated with SBFI-AM (10  $\mu\text{M}$ ) or with fura-2 (5  $\mu\text{M}$ ) for 45 min at  $37^\circ\text{C}$ . Incubation was stopped by dilution and centrifugation. After washing out the unincorporated fluorescent dye, the final synaptosome pellets were suspended in 1 ml of KRH. The synaptosome suspensions were kept at  $4^\circ\text{C}$  in the dark and used within 2 h. Aliquots (200  $\mu\text{l}$ ) of these suspensions were transferred to acrylic cuvettes, diluted 10-fold to a final volume of 2 ml with KRH (or in calcium-free KRH containing 100  $\mu\text{M}$  EGTA for the experiments shown in Fig. 4) and stirred continuously.  $\text{Na}_i$  and  $\text{Ca}_i$  were estimated from fluorescence monitored online, in a Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorometer interfaced with an IBM-compatible computer. Excitation wavelengths were set at 340 and 380 nm, emission wavelength at 505 nm, and slit widths at 10 nm. Experiments were performed at room temperature ( $22$ – $25^\circ\text{C}$ ). Data points were collected at 1.8-s intervals. After monitoring the 340/380 nm baseline ratio for 3–5 min in the absence or in the presence of the drug to be tested (i.e., nimodipine, nitrendipine, nifedipine, TTX,  $\omega$ -agatoxin IVA), synaptosomes were depolarized by adding an aliquot of a concentrated solution of veratridine or KCl to the cuvette to obtain the desired final concentration. After each addition, data points were collected for another 3–5 min.  $\text{Ca}_i$  was estimated following the ratio method (31), and  $\text{Na}_i$  following the method previously reported (30) with minor modifications that improved it. For instance, at the end of each experimental run, synaptosomes in the cuvette were exposed to an aliquot of gramicidin (3  $\mu\text{M}$  final) in order to obtain the maximal ratio value of that specific sample at the physiological concentration (147 mM) of external  $\text{Na}^+$ . This value was then used to correct the ratios obtained in the calibration curve for estimation of the  $\text{Na}_i$  concentration in mM.

*Release Experiments.* Rat striatal synaptosomes ( $300 \pm 23 \mu\text{g}$ ) suspended in 500  $\mu\text{l}$  of KRH were preincubated at  $37^\circ\text{C}$  for 5 min before exposure to the experimental conditions to be studied (exposure to nimodipine, nitrendipine, or TTX under resting conditions or under veratridine or high- $\text{K}^+$  depolarized conditions), and then incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. The incubation was stopped by centrifugation. The supernatants resulting from this centrifugation (containing the released neurotransmitters) were treated with an aliquot of a perchloric acid (PCA)/EGTA mixture to obtain 0.1 M and 0.1 mM final, respectively, and stored at  $-40^\circ\text{C}$  for later analysis. To standardize neurotransmitter release per milligram of synaptosomal protein, the resulting pellets were used for protein determination. The samples containing the released neurotransmitters were injected into the HPLC system within 2 weeks after the experiment.

*Determination of the Concentrations of Dopamine and DOPAC.* Twenty microliters of sample suspended in 0.1 M PCA/0.1 mM EDTA were injected directly into a Waters HPLC system for analysis. The HPLC system consists of a delivery pump (model 600), a Rheodyne injector, an analytical column (resolve, C18,  $150 \times 3.9$  mm internal diameter, particle size 5  $\mu\text{m}$ ) controlled at  $30^\circ\text{C}$ , and an electrochemical detector (Antec model DECADE) with glassy carbon used at a voltage of +0.8 V versus a KCl (3 M) reference electrode (range 1 nA). A mobile phase composed of 50 mM orthophosphoric acid/50 mM citric acid buffer, pH 3.1, adjusted with KOH, containing 5% (v/v) methanol, 100 mg/L octanesulfonic acid and 20 mg/L EDTA, at a flow rate of 1 ml/min, was applied for catecholamine elution. Dopamine and

DOPAC concentrations in the experimental samples were calculated with calibration curves obtained from the injection of increasing concentrations of the external standard mixture (containing dopamine, DOPAC, Glu, Asp, GABA, and glutamine) into the HPLC system.

**Determination of the Concentrations of Glu, Asp, GABA, and Glutamine.** Ten microliters of sample suspended in 0.1 M PCA/0.1 mM EDTA were mixed with 20  $\mu$ l of *O*-phthalaldehyde reagent. After 120 s precisely, a 10- $\mu$ l aliquot was injected into the HPLC system. An analytical column (Nova-pak C-18, 75  $\times$  3.9 mm internal diameter, particle size 10  $\mu$ m) set at 25°C and a fluorescence detector set at 360 nm (excitation wavelength) and at 450 nm (emission wavelength) were used. A linear gradient elution program performed over 30 min was applied for amino acid elution: eluent A (30 mM sodium acetate buffer, pH 6.8) from 100% to 50%, and eluent B (methanol) from 0% to 50%, at a flow rate of 1 ml/min. The concentrations of Glu, Asp, GABA, and glutamine in the experimental samples were calculated with calibration curves obtained from the injection into the HPLC of increasing concentrations of the external standard mixture after *O*-phthalaldehyde reagent derivatization.

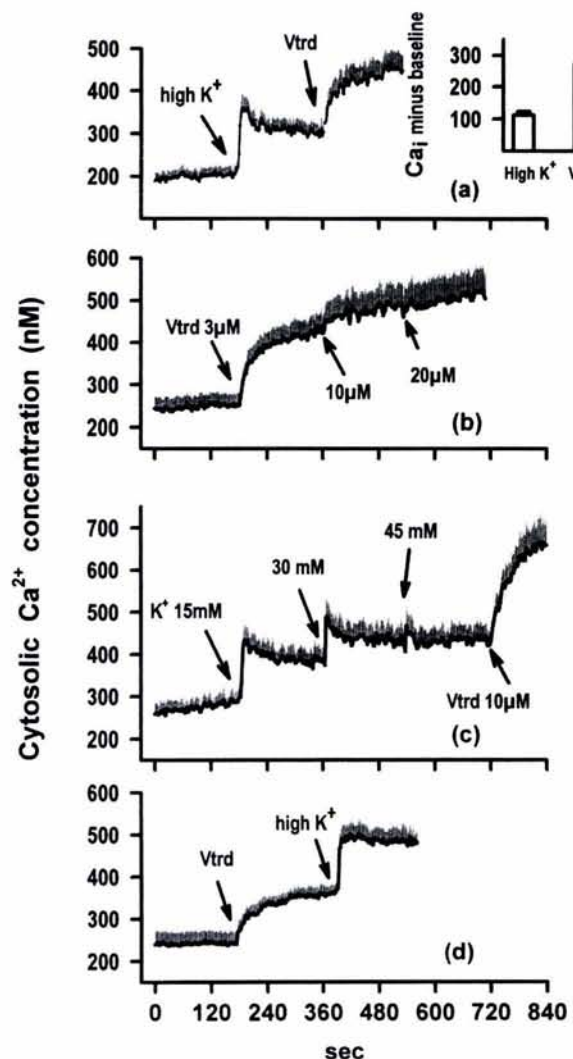
**Statistics.** Student's *t* test was used for statistical evaluations. From  $P < .05$  differences between data were considered statistically significant.

**Materials.** Nimodipine and  $\omega$ -agatoxin IVA were from Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA). Nifedipine and tetrodotoxin (TTX) were obtained from Research Biochemicals International (RBI/Sigma, Natick, MA, USA). Nitrendipine was a gift from Miles Laboratories (Mexico City, Mexico). Veratridine, 1-octanesulfonic acid, gramicidin D, digitonin, and probenecid were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The *o*-phthalaldehyde reagent solution was from Pierce (Rockford, IL, USA). Sodium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl ester (SBFI-AM), 1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (fura-2AM), and pluronic acid F-127 were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). All other reagents were of analytical grade.

## RESULTS

### Kinetics of the Elevation of Ca<sub>i</sub> Induced by High K<sup>+</sup> and Veratridine

High K<sup>+</sup> and veratridine depolarization both increased Ca<sub>i</sub>. However, the kinetics of the rise in Ca<sub>i</sub> induced by each depolarizing agent was different. The maximal increase in Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> was reached rapidly and then declined to a plateau value. The maximal increase in Ca<sub>i</sub> induced by veratridine was reached slowly and gradually, either in synaptosomes that were previously exposed to high K<sup>+</sup> (Fig. 1a) or to veratridine directly; the Ca<sub>i</sub> response induced by veratridine alone at increasing concentrations (3, 10, and 20  $\mu$ M) is shown in Figure 1b. The gradual increase in the external concentration of K<sup>+</sup> (to 15, 30, and 45 mM final) also caused higher increases in Ca<sub>i</sub> until a maximum value. This value was reached with 30 mM external K<sup>+</sup>, as the additional increase of external K<sup>+</sup> (to 45 mM) did not elevate Ca<sub>i</sub> significantly over the plateau value reached with 30 mM external K<sup>+</sup>. However, the subsequent addition of veratridine was



**Fig. 1.** Single and combined effects of high K<sup>+</sup> and veratridine on Ca<sub>i</sub>. Synaptosomes purified from rat striatum were loaded with fura-2. Ca<sub>i</sub> was estimated by the ratio technique described in Materials and Methods. Data points were taken at 1.8-s intervals. (a) After measuring the basal level of Ca<sub>i</sub>, synaptosomes were exposed to high K<sup>+</sup> (20 mM final) and Ca<sub>i</sub> was measured for 3 min. After this time synaptosomes were exposed to 10  $\mu$ M veratridine (Vtrd) and the Ca<sub>i</sub> level was measured for another 3 min. The bars are the increase in Ca<sub>i</sub> above baseline induced by each depolarizing agent; note that the rise in Ca<sub>i</sub> induced by veratridine above baseline includes the rise in Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> at the plateau (dashed line). (b) After measuring the basal level of Ca<sub>i</sub>, synaptosomes were exposed to sequential additions of veratridine (arrows) that gave the indicated final concentrations in the cuvette. The Ca<sub>i</sub> level was measured for about 3 min after each addition. (c) After measuring the basal level of Ca<sub>i</sub>, synaptosomes were exposed to sequential additions of high K<sup>+</sup> (arrows) that gave the indicated final concentrations in the cuvette and then to 10  $\mu$ M veratridine. The Ca<sub>i</sub> level was measured for about 3 min after each addition. (d) After measuring the basal level of Ca<sub>i</sub>, synaptosomes were exposed to 10  $\mu$ M veratridine (Vtrd) and the Ca<sub>i</sub> level was measured for 4 min. After this, synaptosomes were exposed to high K<sup>+</sup> (20 mM final) and the Ca<sub>i</sub> level was measured for another 3 min. Results are the mean  $\pm$  SEM values of 13 (a), 4 (b), 3 (c), and 5 (d) independent preparations.

capable of further increasing  $Ca_i$  over the maximal value reached with 45 mM high  $K^+$  (Fig. 1c). Although veratridine has been claimed to block  $Ca^{2+}$  channels in neuroblastoma cells (32), high  $K^+$  still elevated  $Ca_i$  in synaptosomes previously exposed to veratridine (Fig. 1d).

### Effect of Nimodipine, Nitrendipine, and Nifedipine on the Elevation of $Ca_i$ Induced by High $K^+$ and Veratridine

In synaptosomes pre-exposed to a high level of external  $K^+$  the rise in  $Ca_i$  induced by veratridine was maintained; thus the effects of nimodipine, nitrendipine, and nifedipine on the elevation of  $Ca_i$  induced by the two depolarizing agents were tested in synaptosomes exposed to 20 mM high  $K^+$  and then to 10  $\mu$ M veratridine. None of the DHPs tested inhibited the high  $K^+$ -induced increase in  $Ca_i$ , but they inhibited the subsequent veratridine-induced increase in  $Ca_i$  (Fig. 2). However, at the same concentration (20  $\mu$ M) nimodipine and nitrendipine markedly inhibited the veratridine-induced  $Ca_i$  response while nifedipine only exerted a modest effect. Representative experiments of the effects caused by the DHPs at a concentration of 20  $\mu$ M on the elevation of  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  and veratridine are shown in the left graphs in Figure 2. At a higher concentration (60  $\mu$ M) the inhibition caused by nifedipine on the  $Ca_i$  response induced by the subsequent exposure to the two depolarizing agents was similar to that observed with the lower (20  $\mu$ M) nifedipine concentration (data not shown). At lower (5 and 10  $\mu$ M) concentrations, DHPs also failed to modify the rise in  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  (data not shown).

The rise in  $Ca_i$  induced by direct exposure of synaptosomes to 10  $\mu$ M veratridine (i.e., synaptosomes that were not previously depolarized with high  $K^+$ ) was practically abolished by 1  $\mu$ M TTX (27) and also markedly reduced by nimodipine and nitrendipine. At a concentration of 20  $\mu$ M these two DHPs reduced the  $Ca_i$  response to veratridine by  $49 \pm 3\%$  and  $57 \pm 6\%$  (mean  $\pm$  SEM of three independent preparations), respectively. The difference between the  $Ca_i$  response to veratridine in the absence and presence of 20  $\mu$ M nifedipine did not reach statistical significance in the experiments done in synaptosomes that were not previously depolarized with high  $K^+$  (data not shown).

### Effect of Nimodipine, Nitrendipine, and Nifedipine on the Elevation of $Na_i$ Induced by Veratridine

The baseline concentration of  $Na_i$  ( $15 \pm 1.8$  mM) of striatal synaptosomes under resting conditions was not increased by exposure to a high (20 mM final) level

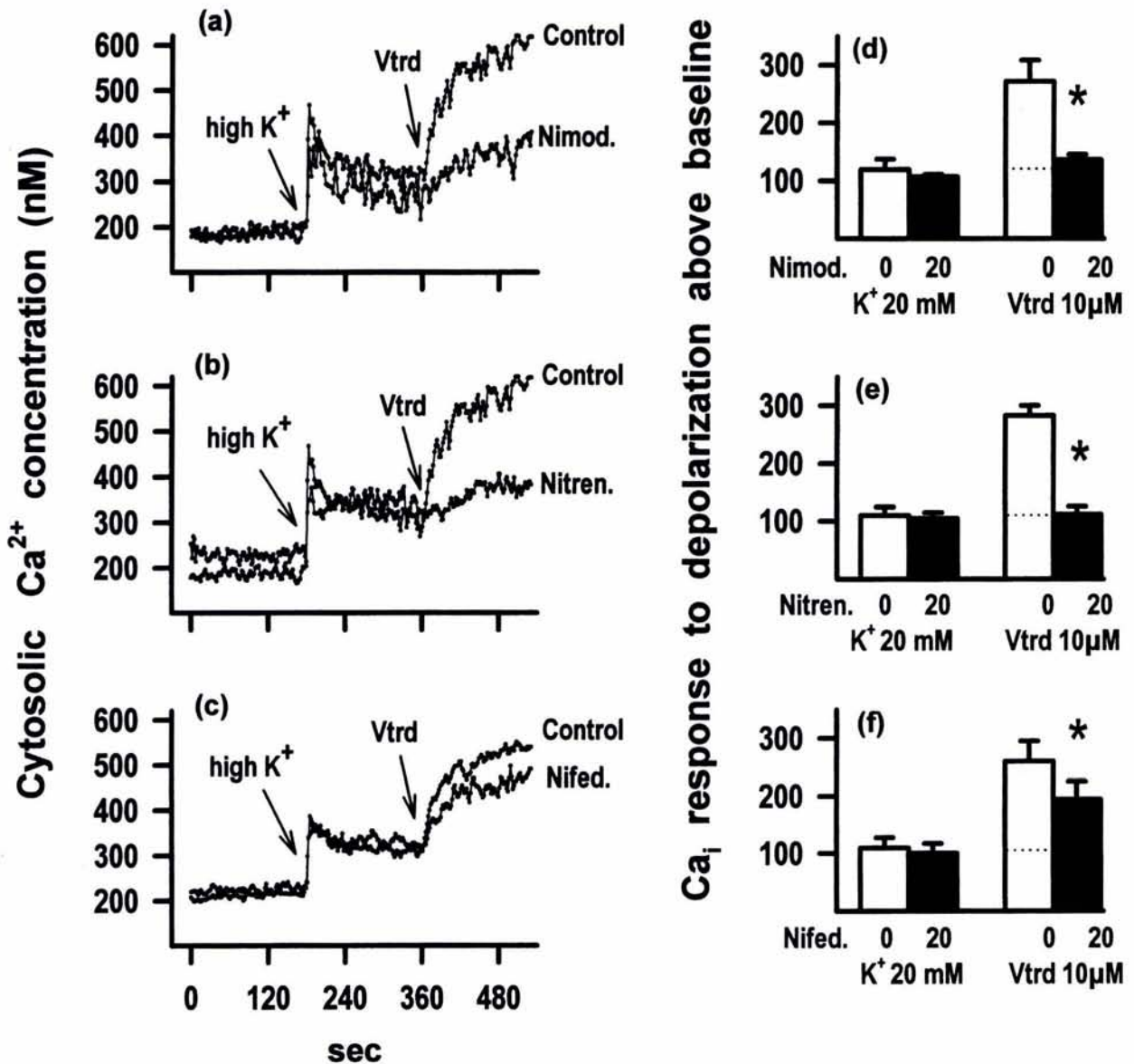
of external  $K^+$  (data not shown). In contrast, it increased to an average value of  $70 \pm 2.7$  mM when synaptosomes were exposed to 10  $\mu$ M veratridine. Therefore veratridine increased  $Na_i$  by  $55 \pm 1.7$  mM above the baseline. This net increase in  $Na_i$  induced by veratridine was almost completely attenuated by 1  $\mu$ M TTX (Fig. 3a), and was reduced 60% and 75% by 20 and 60  $\mu$ M nimodipine, respectively (Fig. 3b), and 56%, 61%, and 73% by 10, 20, and 60  $\mu$ M nitrendipine, respectively (Fig. 3c). Nifedipine again produced a smaller attenuation; 19% and 27% at 20 and 60  $\mu$ M, respectively (Fig. 3d). Representative experiments of the  $Na_i$  response to veratridine in the absence and in the presence of 1  $\mu$ M TTX, or in the absence and in the presence of each DHP at various concentrations, are illustrated in the bottom graphs of Figure 3.

### Nimodipine Also Inhibits the $Na_i$ Response Induced by Veratridine Under External $Ca^{2+}$ Free Conditions

In striatal synaptosomes suspended in a  $Ca^{2+}$ -free KRH containing EGTA, 5  $\mu$ M veratridine increased  $Na_i$  to  $44 \pm 6$  mM above the baseline. This net increase in  $Na_i$  induced by veratridine in the absence of external  $Ca^{2+}$  was reduced 22%, 50%, and 59% by 5, 15, and 50  $\mu$ M nimodipine, respectively (Fig. 4a). A representative experiment of the developed  $Na_i$  response to veratridine in the absence and in the presence of nimodipine at increasing concentrations is illustrated in Fig. 4b. We did not test the effect of nitrendipine on the  $Na_i$  response to veratridine in the absence of external  $Ca^{2+}$  because in a previous study using mouse brain synaptosomes we have already shown that nitrendipine at concentrations of 6  $\mu$ M and greater dose dependently inhibited the release of  $^3H$ -GABA induced by veratridine in the absence of external  $Ca^{2+}$  (18).

### Effects of TTX and $\omega$ -Agatoxin IVA on the Increase in $Ca_i$ Induced by High $K^+$ and Veratridine

Exposure of synaptosomes to the  $Na^+$  channel blocker TTX failed to attenuate the elevation of  $Ca_i$  induced by high  $K^+$ , but inhibited the subsequent elevation of  $Ca_i$  induced by veratridine (Fig. 5a and b). Conversely, exposure of synaptosomes to the P/Q type  $Ca^{2+}$  channel blocker  $\omega$ -agatoxin IVA markedly inhibited (70%) the elevation of  $Ca_i$  induced by high  $K^+$ , but failed to attenuate the elevation of  $Ca_i$  induced by veratridine (Fig. 5c and d).

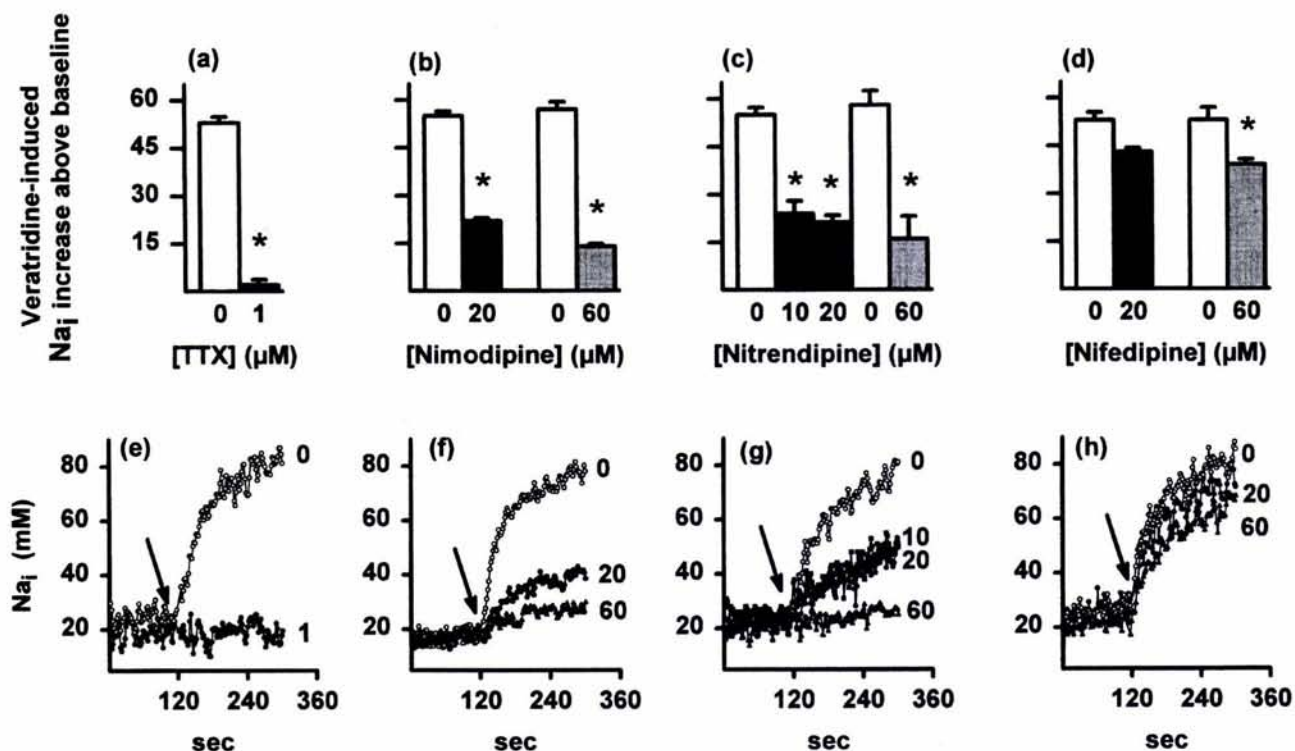


**Fig. 2.** Effects of DHPs on the Ca<sub>i</sub> responses induced by the subsequent addition of high K<sup>+</sup> and veratridine. Left: Representative experiments of the effects of DHPs on the rise in Ca<sub>i</sub> elicited by the two depolarizing agents. After measuring the basal level of Ca<sub>i</sub> in the absence (control, in a, b, and c) or in the presence of (a) 20 μM nimodipine (Nimod), (b) 20 μM nitrendipine (Nitren), or (c) 20 μM nifedipine (Nifed), synaptosomes were exposed (first arrow) to a higher level (20 mM final) of external K<sup>+</sup> and the Ca<sub>i</sub> level was measured for 3 min. After this time, synaptosomes were exposed (second arrow) to 10 μM veratridine (Vtrd) and the Ca<sub>i</sub> level was measured for another 3 min. Right: Ca<sub>i</sub> response (nM) to depolarization above baseline was calculated from the average of points after each depolarizing agent minus the average of points before the addition of each depolarizing agent in the absence (empty bars) or presence of 20 μM of the indicated DHP (dark bars). Bars are the mean ± SEM values of 7 (d and e) or 8 (f) independent experiments. \*P > .05 between the Ca<sup>2+</sup> response induced by high K<sup>+</sup> or by veratridine above baseline in the absence and in the presence of the indicated DHP.

**Effect of Nimodipine and Nitrendipine on Neurotransmitter Release Evoked by High K<sup>+</sup> and Veratridine**

At a concentration of 20 μM nimodipine and nitrendipine markedly reduced the veratridine-evoked release of all the neurotransmitters tested. However, some dif-

ferences among their effectiveness on each transmitter were observed. For instance, nimodipine was a more effective inhibitor of the veratridine-induced release of dopamine than of the veratridine-induced release of the amino acid neurotransmitters. Nevertheless, the veratridine-evoked release of all the neurotransmitters



**Fig. 3.** Effects of TTX and DHPs on the  $\text{Na}_i$  response induced by veratridine. Striatal synaptosomes were loaded with SBFI.  $\text{Na}_i$  was estimated by the ratio technique described in Materials and Methods. Data points were taken at 1.8-s intervals. After measuring the basal level of  $\text{Na}_i$  in the absence or in the presence of TTX or of the indicated DHP at the indicated concentrations for 5 min, synaptosomes were exposed to 10  $\mu\text{M}$  veratridine and  $\text{Na}_i$  was measured for another 5 min. Top graphs: Veratridine-induced increase in  $\text{Na}_i$  above baseline refers to the average of points after veratridine depolarization minus the average of points before depolarization in the absence (empty bars) or in the presence of 1  $\mu\text{M}$  TTX (a), or of nimodipine (b), nitrendipine (c), and nifedipine (d) at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  (dark bars) or 60  $\mu\text{M}$  (gray bars). Bars are the mean  $\pm$  SEM values from at least five independent preparations with their respective controls for each condition. \* $P > .05$  between the  $\text{Na}_i$  response to veratridine in the absence and presence of TTX or the specified DHP at the indicated concentration. Bottom graphs: Representative experiments showing the kinetics of the  $\text{Na}_i$  response to 10  $\mu\text{M}$  veratridine (arrow) in the absence or in the presence of the indicated concentration (in  $\mu\text{M}$ ): TTX (e), nimodipine (f), nitrendipine (g), or nifedipine (h).

tested was reduced on average about 45% by both DHPs, whereas 1  $\mu\text{M}$  TTX completely abolished veratridine-evoked release of all of the neurotransmitters (Table I).

Although high  $\text{K}^+$  was a less effective releaser than veratridine, particularly for dopamine, nimodipine, nitrendipine, and TTX were unable to inhibit the high  $\text{K}^+$ -evoked release of any of the neurotransmitters tested. Instead, nitrendipine facilitated high  $\text{K}^+$ -evoked release of dopamine (Table II).

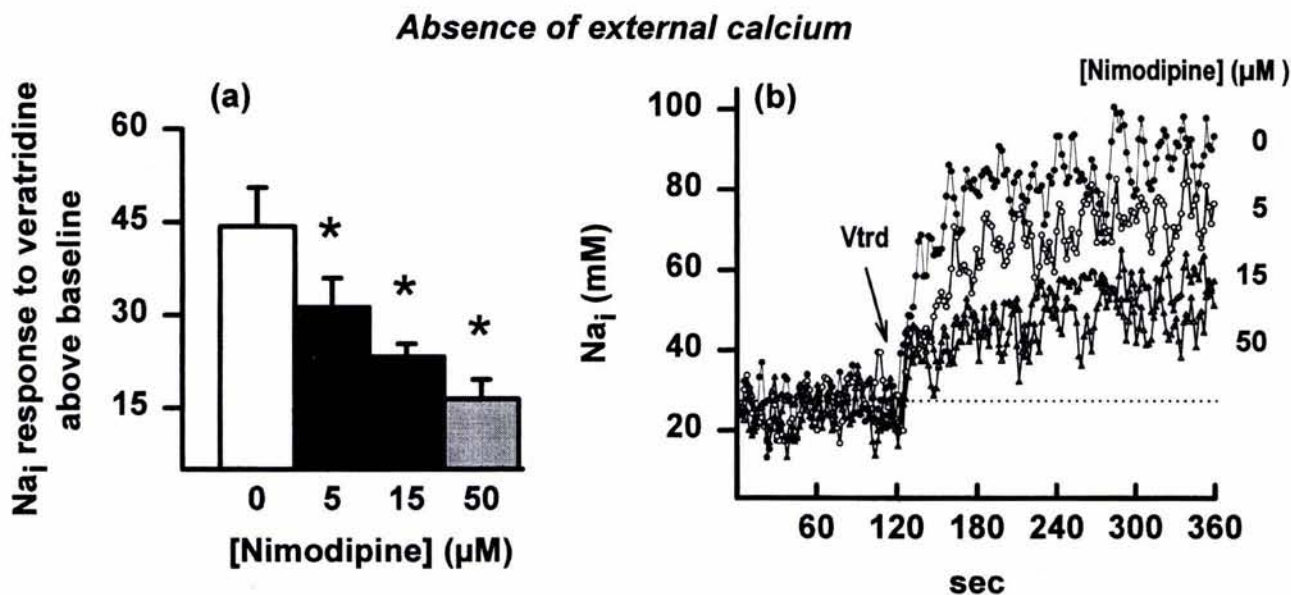
The effects of nifedipine on depolarization-evoked neurotransmitter release are not presented here because, although 20  $\mu\text{M}$  nifedipine also decreased the net release of dopamine induced by veratridine (i.e., from  $110 \pm 19$  pmoles/mg to  $71 \pm 13$  pmoles/mg) without modifying the high  $\text{K}^+$ -induced release of dopamine, this particular DHP (nifedipine), exerted other effects on the distribution of neurotransmitters inside and outside nerve endings that are unlikely to be related to its action on presynaptic  $\text{Na}^+$  or  $\text{Ca}^{2+}$  channels. For instance in high  $\text{K}^+$ -depolarized

synaptosomes, 20  $\mu\text{M}$  nifedipine dramatically decreased (>60%) the concentration of dopamine retained by the synaptosomal preparation and reduced the external concentration of the nontransmitter amino acid glutamine. We are now working to test a hypothesis that may possibly explain these specific changes induced by nifedipine.

The external concentrations of the nontransmitter amino acid glutamine and of the main dopamine metabolite DOPAC remained constant upon veratridine or high  $\text{K}^+$  depolarization, either in the absence or presence of nimodipine, nitrendipine, and TTX (data not shown).

## DISCUSSION

In the current study the relative contributions of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  channels to the action of nimodipine, nitrendipine, and nifedipine at the cerebral presynaptic level were analyzed. For this purpose the effects of



**Fig. 4.** Effect of nimodipine on the rise in  $\text{Na}_i$  induced by veratridine in the absence of external calcium. After measuring the basal level of  $\text{Na}_i$  in SBF1 preloaded striatal synaptosomes in the absence or presence of nimodipine at the indicated concentrations for 5 min, synaptosomes were exposed to  $5 \mu\text{M}$  veratridine and the  $\text{Na}_i$  level was measured for another 5 min. (a)  $\text{Na}_i$  response to veratridine above baseline refers to the average of points after the addition of veratridine minus the average of points before veratridine depolarization in the absence (empty bar) or in the presence of nimodipine at increasing concentrations (5, 15, and  $50 \mu\text{M}$ ). Bars are mean  $\pm$  SEM of three independent preparations. \* $P > .05$  between the  $\text{Na}_i$  response to veratridine in the absence and in the presence of nimodipine. (b) Representative experiment showing the kinetics of the  $\text{Na}_i$  response to  $5 \mu\text{M}$  veratridine (arrow) in the absence (○) or presence of the indicated concentration of nimodipine.

DHPs on the increase in  $\text{Ca}_i$ , the increase in  $\text{Na}_i$ , and the release of various neurotransmitters induced by two depolarizing agents, namely high  $\text{K}^+$  and veratridine, were determined. This allowed us to differentiate presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  channel-mediated responses, as determined in rat striatal synaptosomes.

This is the first time that the effect of DHPs on the elevation of  $\text{Na}_i$  induced by veratridine has been tested. The effect of nimodipine and nitrendipine on the elevation of  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine also has not been tested before, and the effect of nifedipine on the veratridine-induced increase in  $\text{Ca}_i$  has been tested at a lower concentration ( $1 \mu\text{M}$ ) than that used here, with controversial results. For instance, in rat cerebral cortical synaptosomes  $1 \mu\text{M}$  nifedipine failed to inhibit the veratridine-induced increase in  $\text{Ca}_i$  (28), whereas in human synaptosomes  $1 \mu\text{M}$  nifedipine reduced the veratridine-induced increase in  $\text{Ca}_i$  (33), similar to our results using rat striatal synaptosomes and  $20 \mu\text{M}$  nifedipine. This suggests that veratridine-activated channels may be more sensitive to DHPs in human than in rat synaptosomes.

Our findings that the DHPs failed to inhibit high  $\text{K}^+$ -induced increases in  $\text{Ca}_i$ , but inhibited veratridine-induced increase in  $\text{Ca}_i$  (Fig. 2), might suggest that L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels mediate the elevation of  $\text{Ca}_i$  induced by vera-

tridine, but not that induced by high  $\text{K}^+$ . However, this interpretation is unlikely, because the DHPs also inhibited the elevation of  $\text{Na}_i$  induced by veratridine (Fig. 3), which does not depend on the entrance of external  $\text{Ca}^{2+}$ , as indicated by the lack of effect of  $\text{Ca}^{2+}$ -free media on the increase in  $\text{Na}_i$  induced by veratridine (Fig. 4).

In view of the high hydrophobicity of DHPs (34), nonspecific actions on membrane proteins could be expected from these drugs at the concentrations tested here. However, the present data show that DHPs selectively inhibit the veratridine-induced increase in  $\text{Na}_i$  (Fig. 3), in  $\text{Ca}_i$  (Fig. 2) and in neurotransmitter release (Table I), without changing the basal concentrations of  $\text{Na}_i$  and  $\text{Ca}_i$  or the high  $\text{K}^+$ -induced increase in  $\text{Ca}_i$  (Fig. 2) and in neurotransmitter release (Table II). The most straightforward explanation for this selective inhibition by DHP of all the veratridine-induced responses and, with a higher potency and effectiveness, also by TTX is that the DHPs are interfering with the same population of channels that are sensitive to TTX. This interpretation is further supported by the lack of effect of DHPs and TTX on neurotransmitter metabolites and by the correlation between the efficacy of the DHPs and TTX in reducing the rise in  $\text{Na}_i$  induced by veratridine and their efficacy in inhibiting the release of the

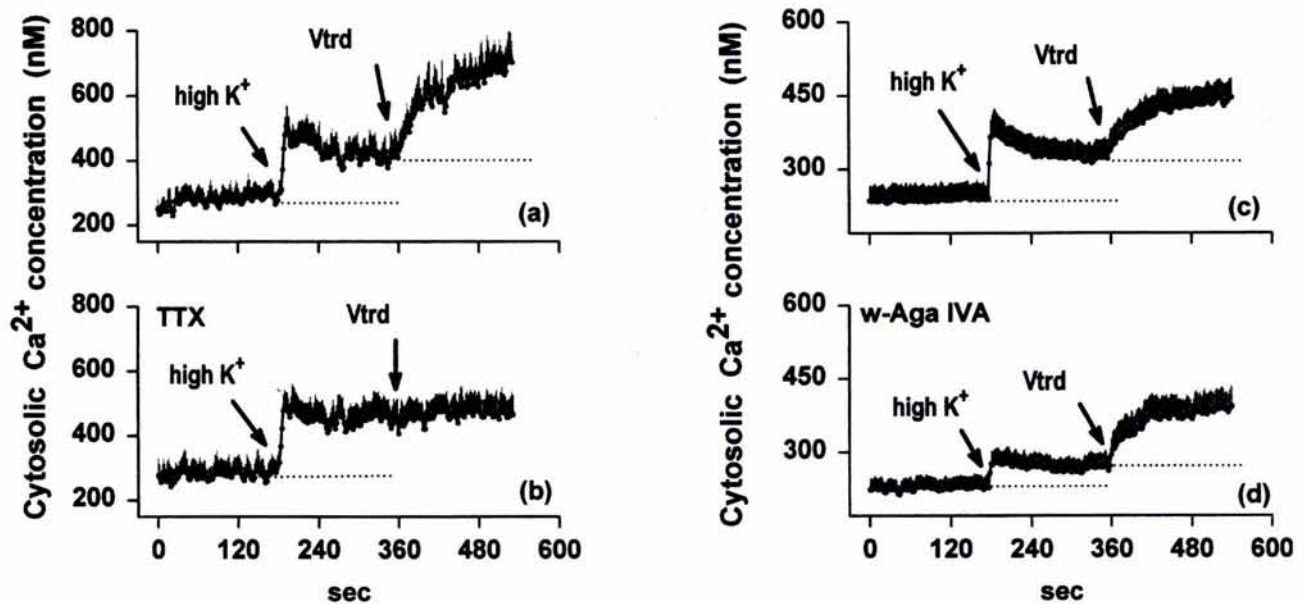


Fig. 5. Opposite effects of TTX and of  $\omega$ -agatoxin IVA on high  $K^+$ - and veratridine-induced  $Ca_i$  responses. Left graphs: After measuring the basal level of  $Ca_i$  in fura-2-loaded striatal synaptosomes in the absence (a) or in the presence of  $1 \mu M$  TTX (b), the preparation was exposed to high  $K^+$  (25 mM final) and  $Ca_i$  was measured for 3 min. After this time, synaptosomes were exposed to  $10 \mu M$  veratridine (Vtrd) and  $Ca_i$  was measured for another 3 min. Right graphs: After measuring the basal level of  $Ca_i$  in the absence (c) or in the presence of  $500 \text{ nM}$   $\omega$ -agatoxin IVA (w-Aga IVA) (d), synaptosomes were exposed to high  $K^+$  (20 mM final) and  $Ca_i$  was measured for 3 min. Then synaptosomes were exposed to  $5 \mu M$  veratridine (Vtrd) and  $Ca_i$  was measured for another 3 min. Data points are the mean  $\pm$  SEM values of four (a and b) or five (c and d) independent preparations with their respective controls in parallel experiments.

endogenous neurotransmitters dopamine, GABA, Glu, and Asp evoked by veratridine (Table I). In GH3 cells the prolonged exposure (4–5 days) to  $0.5 \mu M$  nimodipine decreases (50%–60%) the peak amplitude of whole cell  $Na^+$  currents recorded with the patch clamp technique (20). On the basis of these data the authors have proposed that the entry of  $Ca^{2+}$  through L-type channels increases the number of functional  $Na^+$  channels in GH3

cells either by stimulating  $Na^+$  channel gene expression or the expression of a regulatory protein that promotes translocation of preassembled  $Na^+$  channels into the plasma membrane (20). However, a reduced number of functional  $Na^+$  channels or gene expression is unlikely to underlie the decrease of the veratridine-induced rise in  $Na_i$  observed in synaptosomes exposed to nimodipine only a few seconds before veratridine.

Table I. Net Neurotransmitter Release Induced by Veratridine in Striatal Synaptosomes for 10 Min

	DA	GABA	Glu	Asp	n
Vtrd	$110 \pm 19$	$16 \pm 2$	$37 \pm 6$	$15 \pm 3$	8
Vtrd + NMD	$26 \pm 6^*$	$10 \pm 1^*$	$27 \pm 3^*$	$9 \pm 1^*$	8
Vtrd	$125 \pm 16$	$17 \pm 3$	$39 \pm 8$	$17 \pm 3$	7
Vtrd + NTRD	$60 \pm 10^*$	$10 \pm 1^*$	$24 \pm 5^*$	$10 \pm 2^*$	7
Vtrd	$107 \pm 12$	$13 \pm 2$	$31 \pm 5$	$12 \pm 2$	4
Vtrd + TTX	$1 \pm 2^*$	$1 \pm 0.1^*$	$0 \pm 1^*$	$1 \pm 0.3^*$	4

Note: Dopamine (DA) concentrations are in pmoles/mg of synaptosomal protein. Amino acids concentrations are in nmoles/mg of synaptosomal protein. Veratridine (Vtrd), nimodipine (NMD), nitrendipine (NTRD), and TTX final concentrations are (in  $\mu M$ ): 10, 20, 20, and 1, respectively. Results are the mean  $\pm$  SEM values of the indicated number (n) of independent experiments.

\*  $P < .05$  between synaptosomes treated with veratridine and with veratridine plus the indicated drug.

Table II. Net Neurotransmitter Release Induced by high  $K^+$  in Striatal Synaptosomes for 10 Min

	DA	GABA	Glu	Asp	n
High $K^+$	$48 \pm 5$	$10 \pm 1$	$30 \pm 5$	$8 \pm 1$	6
High $K^+$ + NMD	$63 \pm 10$	$10 \pm 2$	$33 \pm 5$	$9 \pm 2$	6
High $K^+$	$45 \pm 8$	$10 \pm 2$	$27 \pm 8$	$8 \pm 2$	6
High $K^+$ + NTRD	$79 \pm 16^*$	$8 \pm 1$	$23 \pm 4$	$6 \pm 1$	6
High $K^+$	$42 \pm 5$	$9 \pm 1$	$28 \pm 3$	$9 \pm 1$	6
High $K^+$ + TTX	$41 \pm 5$	$10 \pm 1$	$29 \pm 4$	$10 \pm 1$	6

Note: Dopamine (DA) concentrations are in pM/mg of synaptosomal protein. Amino acids concentrations are in nM/mg of synaptosomal protein. High  $K^+$  refers to 30-mM external  $K^+$ . Nimodipine (NMD), nitrendipine (NTRD), and TTX final concentrations are (in  $\mu M$ ): 20, 20, and 1, respectively. Results are the mean  $\pm$  SEM values of the indicated number (n) of independent experiments.

\*  $P < .05$  between synaptosomes treated with high  $K^+$  and with high  $K^+$  plus the indicated drug.

The failure of DHPs and TTX to inhibit the high K<sup>+</sup>-induced increase in neurotransmitter release (Table II) and in Ca<sub>i</sub> (Fig. 2 and Fig. 5b), confirms previous findings showing that nitrendipine and TTX fail to inhibit the release of <sup>3</sup>H-GABA induced by high K<sup>+</sup> in synaptosomes (27,35,36) and is consistent with the lack of effect of nifedipine on the high K<sup>+</sup>-induced increase in Ca<sub>i</sub> previously reported in rat and in human synaptosomes (28,33). The marked reduction exerted by ω-agatoxin IVA on the increase in Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> (Fig. 5d), also confirms previous data showing that P/Q type Ca<sup>2+</sup> channels largely mediate the increase in Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> in synaptosomes (27,28,33) and is consistent with data showing that the release of neurotransmitters evoked by high K<sup>+</sup> is primarily dependent on ω-agatoxin IVA-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in synaptosomes (27,36,37).

Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels are the obvious route for Ca<sup>2+</sup> entry under circumstances in which excessive Na<sup>+</sup> influx depolarizes the cellular membrane. However, ω-agatoxin IVA failed to modify the elevation of Ca<sub>i</sub> in response to veratridine (Fig. 5c and d) suggesting that under the present experimental conditions veratridine is promoting the entrance of Ca<sup>2+</sup> into the terminal via a different route than that activated by high K<sup>+</sup>. Moreover, this veratridine-induced increase in Ca<sub>i</sub> is likely to be independent of the previous degree of depolarization because veratridine still increased Ca<sub>i</sub> even after a maximal increase in Ca<sub>i</sub> has been induced by high K<sup>+</sup> (Fig. 1c). Considering that in contrast to high K<sup>+</sup>, veratridine markedly increases Na<sub>i</sub> (Fig. 3a) and that the increase in Ca<sub>i</sub> induced by veratridine is abolished by TTX (Fig. 5a and b) and by the absence of external Na<sup>+</sup>, while the increase in Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> does not (Fig. 1 in reference 27), it is very likely that the additional route of Ca<sup>2+</sup> influx activated by veratridine is the Na/Ca exchanger in its reverse form. Under resting conditions, the Na/Ca exchanger contributes to the preservation of low cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> by extruding Ca<sup>2+</sup> in exchange for Na<sup>+</sup>, a process driven by the large transmembrane Na<sup>+</sup> gradient, but when a marked elevation of Na<sub>i</sub> occurs, the exchanger can reverse its operation (38,39). The excessive Na<sup>+</sup> influx provoked by veratridine action on presynaptic voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, evidenced by the large rise in Na<sub>i</sub> evoked by veratridine shown here, is likely to increase Ca<sub>i</sub> by reversing the Na/Ca exchanger.

It is important to mention that our finding that the veratridine-induced increase in Ca<sub>i</sub> is resistant to ω-agatoxin IVA (Fig. 5c and d), although consistent with other data (28,40), contrasts with other reports of a partial inhibition of the veratridine-induced Ca<sub>i</sub> response by

ω-agatoxin IVA (33,41). Nevertheless, if we assume that the rise in Ca<sub>i</sub> induced by veratridine is due at least partially to a reversal of the Na/Ca exchanger, the inhibition of the Ca<sub>i</sub> response to veratridine by the DHPs could be interpreted as resulting from an inhibition of the Na/Ca exchanger by DHPs, as has been previously suggested (42). This interpretation is, however, unlikely because the DHPs, and particularly nitrendipine and nimodipine, markedly inhibit the elevation of Na<sub>i</sub> induced by veratridine, and this later response does not involve the Na/Ca exchanger. In contrast, a negative modulation of the veratridine-induced increase in Na<sub>i</sub> by DHPs (and TTX) is expected to inhibit the concomitant influx of Ca<sup>2+</sup> as a result of reversal of the Na/Ca exchanger, because the exchanger cannot be reversed when the increase in Na<sub>i</sub> elicited by veratridine is prevented.

In accordance with the idea that the neurotoxicity resulting from an excessive Na<sup>+</sup> influx, such as that provoked by severe energy depletion or veratridine, includes a Ca<sup>2+</sup> component, which may result from Na<sup>+</sup> movement, in the anoxic heart intracellular Ca<sup>2+</sup> loading subsequent to reversal of the Na/Ca exchanger has been documented (43). Reversal of Na/Ca exchange under situations that "mimic" hypoxia or energy depletion also has been reported in neurons (44) and synaptosomes (45–47).

## SUMMARY

It is concluded that DHPs inhibit the increase in Ca<sub>i</sub> and the neurotransmitter release in response to veratridine by reducing presynaptic Na<sup>+</sup> channel permeability and not by blocking DHP-sensitive calcium channels or the Na/Ca exchanger.

If DHPs reach higher concentrations in the membranes than in the extracellular medium, it can be speculated that the selective negative modulation of brain presynaptic Na<sup>+</sup> channels caused by DHPs at concentrations in the low micromolar range shown here could take place when high doses of DHPs are administered to patients with cardiovascular diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Luz María Chiu and Araceli Guarneros for their excellent technical assistance. This work was financially supported by project IN201300 from PAPIIT, UNAM and by project P42046352-Q from SEP-CONACYT.



## REFERENCES

- Wurpel, J. N., and Iyer, S. N. 1994. Calcium channel blockers verapamil and nimodipine inhibit kindling in adult and immature rats. *Epilepsia* 35:443-449.
- Sills, G. J., Carswell, A., and Brodie, M. J. 1994. Dose-response relationships with nimodipine against electroshock seizures in mice. *Epilepsia* 35:437-442.
- Marinho, M. M., de Bruin, V. M., de Sousa, F. C., Aguiar, L. M., de Pinho, R. S., and Viana, G. S. 1997. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. *Neurosci. Lett.* 235:13-16.
- Zapater, P., Javaloy, J., Roman, J. F., Vidal, M. T., and Horga, J. F. 1998. Anticonvulsant effects of nimodipine and two novel dihydropyridines (PCA 50922 and PCA 50941) against seizures elicited by pentylentetrazole and electroconvulsive shock in mice. *Brain Res.* 796:311-314.
- Zupan G., Erakovic V., Simoncic A., Kriz J., and Varljen J. 1999. The influence of nimodipine, nifedipine and amlodipine on the brain free fatty acid level in rats with penicillin-induced seizures. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23:951-961.
- Kobayashi, T., and Mori, Y. 1998.  $Ca^{2+}$  channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 363:1-15.
- Tollefson, G. D. 1990. Short-term effects of the calcium channel blocker nimodipine (Bay-e-9736) in the management of primary degenerative dementia. *Biol. Psychiatry* 27:1133-1142.
- Pazzaglia, P. J., George, M. S., Post, R. M., Rubinow, D. R., and Davis, C. L. 1995. Nimodipine increases CSF somatostatin in affectively ill patients. *Neuropsychopharmacology* 13:75-83.
- Forette, F., Seux, M. L., Staessen, J. A., Thijs, L., Birkenhager, W. H., Babarskiene, M. R., Babeanu, S., Bossini, A., Gil-Extremera, B., Gierd, X., Laks, T., Lilov, E., Moiseyev, V., Toumilehto, J., Vanhanen, H., Webster, J., Yodfat, Y., and Fagard, R. 1998. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled systolic hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* 352:1347-1351.
- Taylor, C. P., and Meldrum B. S. 1995.  $Na^+$  channels as targets for neuroprotective drugs. *TIPS* 16:309-316.
- Urenjak, J., and Obrenovitch, T. P. 1996. Pharmacological modulation of voltage-gated  $Na^+$  channels: A rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol. Rev.* 48:21-67.
- Taylor, C. P., and Narasimhan, L. S. 1997. Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. *Adv. Pharmacol.* 39:47-98.
- Ragsdale, D. S., and Avoli, M. 1998. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res. Rev.* 26:16-28.
- Bönöczk, P., Gulyás, B., Adam-Vizi, V., Nemes, A., Kárpáti, E., Kiss, B., Kapás, M., Szántay, C., Koncz, I., Zelles, T., and Vas, A. 2000. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: Effect of vinpocetine. *Brain Res. Bull.* 53:245-254.
- Lopachin, R. M., Gaughan, C. L., Lehning, E. J., Weber, M. L., and Taylor, C. P. 2001. Effects of ion channel blockade on the distribution of Na,K,Ca and other elements in oxygen-glucose deprived CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience* 103:971-983.
- Litzinger, M. J., and Brennehan, D. E. 1984. TTX displacement of  $^3H$ -nitrendipine binding in developing spinal cord neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124:979-987.
- Yatani, A., and Brown, A. M. 1985. The calcium channel blocker nitrendipine blocks sodium channels in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 57:868-875.
- Sitges, M. 1989. Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on  $\gamma$ -amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J. Neurochem.* 53:436-441.
- Pauwels, P. J., Van Assouw, H. P., Peeters, L., and Leysen, J. E. 1990. Neurotoxic action of veratridine in rat brain neuronal cultures: Mechanism of neuroprotection by  $Ca^{++}$  antagonists non-selective for slow  $Ca^{++}$  channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:1117-1122.
- Monjaraz, E., Navarrete, A., López-Santiago, L. F., Vega, A. V., Arias-Montaño, J. A., and Cota, G. 2000. L-Type calcium channel activity regulates sodium channel levels in rat pituitary GH3 cells. *J. Physiol.* 523:45-55.
- Catterall, W. A. 1975. Activation of the action potential  $Na^+$  ionophore of cultured neuroblastoma cells by veratridine and batrachotoxin. *J. Biol. Chem.* 250:4053-4059.
- Tretter, L., and Adam-Vizi, V. 1998. The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine induced  $[Na^+]_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  rise in synaptosomes. *Neuroreport* 9:1849-1853.
- Sitges, M., Peña, F., Chiu, L. M., and Guarneros, A. 1998. Study on the possible involvement of protein kinases in the modulation of brain presynaptic sodium channels: Comparison with calcium channels. *Neurochem. Int.* 32:177-190.
- Sitges, M., and Nekrassov, V. 1999. Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochem. Res.* 24:1585-1591.
- Sitges, M., Nekrassov, V., and Guarneros, A. 2000. Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res.* 854:48-56.
- Trejo, F., Nekrassov, V., and Sitges, M. 2001. Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings. *Brain Res.* 909:59-67.
- Sitges, M., and Chiu, L. M. 1995.  $\omega$ -Agatoxin-IVA selectively inhibits the calcium dependent fraction of the evoked release of  $[^3H]GABA$  from synaptosomes. *Neurochem. Res.* 20:1065-1071.
- Meder, W., Fink, K., and Gothert, M. 1997. Involvement of different calcium channels in  $K^+$  and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356:797-805.
- Sitges, M., and Talamo, B. R. 1993. Sphingosine, W-7 and trifluoperazine inhibit the elevation in the cytosolic calcium induced by high  $K^+$  depolarization in synaptosomes. *J. Neurochem.* 61:443-450.
- Rodríguez, R., and Sitges, M. 1996. Nigericin-induced  $Na^+/H^+$  and  $K^+/H^+$  exchange in synaptosomes: Effect on  $[^3H]GABA$  release. *Neurochem. Res.* 21:889-895.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
- Romey, G., and Lazdunski, M. 1982. Lipid-soluble toxins thought to be specific for  $Na^+$  channels block  $Ca^{2+}$  channels in neuronal cells. *Nature* 297:79-80.
- Meder, W., Fink, K., Zentner, J., and Gothert, M. 1999. Calcium channels involved in  $K^+$ - and veratridine-induced increase of cytosolic calcium concentration in human cerebral cortical synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:1126-1131.
- Pang, D. C., and Sperelakis, N. 1984. Uptake of calcium antagonistic drugs into muscles as related to their lipid solubilities. *Biochem. Pharmacol.* 33:821-826.
- Massieu, L., and Tapia, R. 1988. Relationship of dihydropyridine binding sites with calcium-dependent neurotransmitter release in synaptosomes. *J. Neurochem.* 51:1184-1189.
- Sitges, M., and Chiu, L. M. 1995b. Characterization of the type of calcium channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve endings. *Neurochem. Res.* 20:1073-1080.
- Turner, T. J., Adams, M. E., and Dunlap, K. 1992. Calcium channels coupled to glutamate release identified by  $\omega$ -agatoxin-IVA. *Science* 258:310-313.
- Sánchez-Armass, S., and Blaustein, M. P. 1987. Role of sodium-calcium exchange in regulation of intracellular calcium in nerve terminals. *Am. J. Physiol.* 252:C595-C603.
- Blaustein, M. P., and Lederer, W. J. 1999. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79:763-854.

40. Deffois, A., Fage, D., and Carter, C. 1996. Inhibition of synaptosomal veratridine-induced sodium influx by antidepressants and neuroleptics used in chronic pain. *Neurosci. Lett.* 220:117–120.
41. Bicalho, A. F. X., Guatimosim, C., Prado, M. A. M., Gomez, M. V., and Romano-Silva, M. A. 2002. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. *Neuroscience* 113:115–123.
42. Carvalho, C. A., Coutinho, O. P., and Carvalho, A. P. 1986. Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on Ca<sup>2+</sup> translocation across synaptosomal membranes. *J. Neurochem.* 47:1774–1784.
43. Haigney, M. C., Miyata, H., Lakatta, E. G., Stern, M. D., and Silverman, H. S. 1992. Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ. Res.* 71:547–557.
44. Wakade, A. R., Przywara, D. A., Bhave, S. V., Chowdhury, P. S., Bhave, A., and Wakade, T. D. 1993. Massive exocytosis triggered by sodium-calcium exchange in sympathetic neurons is attenuated by co-culture with cardiac cells. *Neuroscience* 55:813–821.
45. Nachshen, D. A., and Kongsamut, S. 1989. 'Slow' K<sup>+</sup>-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx is mediated by Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange: A pharmacological study. *Biochim. Biophys. Acta* 979:305–310.
46. Tagliatela, M., Di Renzo, G., Annunziato, L. 1990. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange activity in central nerve endings: I. Ionic conditions that discriminate <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake through the exchanger from that occurring through voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol. Pharmacol.* 38:385–392.
47. Dagani, F., Ferrari, R., and Canevari, L. 1990. A pharmacological model for studying the role of Na<sup>+</sup> gradients in the modulation of synaptosomal free [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels and energy metabolism. *Brain Res.* 530:261–266.



## $\omega$ -Agatoxin-TK is a useful tool to study P-type $\text{Ca}^{2+}$ channel-mediated changes in internal $\text{Ca}^{2+}$ and glutamate release in depolarised brain nerve terminals

María Sitges\*, Carlos Alberto Galindo

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510, México, DF

Received 7 April 2004; received in revised form 30 June 2004; accepted 2 July 2004

### Abstract

The present study shows that  $\omega$ -agatoxin-TK, a toxin of the venom of *Agelenopsis aperta*, which is 10 times more concentrated than the P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker,  $\omega$ -agatoxin-IVA in the venom, inhibits the high  $\text{K}^+$  depolarisation-induced rise in internal  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_i$ , as determined with fura-2) dose dependently in cerebral (striatal and hippocampal) isolated nerve endings, with calculated  $\text{IC}_{50}$ 's of about 60 nM. The maximal inhibition exerted by  $\omega$ -agatoxin-TK in striatal synaptosomes ( $61 \pm 11\%$ ) is 10% larger than in hippocampal synaptosomes, suggesting a larger population of  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels in striatal than in hippocampal nerve endings. The N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker,  $\omega$ -conotoxin-GVIA (1  $\mu\text{M}$ ), inhibits part of the  $\omega$ -agatoxin-TK-insensitive rise in  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^+$ . In contrast to the inhibition exerted by  $\omega$ -agatoxin-TK on the  $\text{Ca}_i$  response to high  $\text{K}^+$ ,  $\omega$ -agatoxin-TK failed to inhibit the tetrodotoxin-sensitive elevations in  $\text{Ca}_i$  and in internal  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_i$ , as determined with SBFI) induced by veratridine, indicating that the  $\text{Ca}^{2+}$  influx activated by veratridine does not involve  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive channels. High  $\text{K}^+$  does not increase  $\text{Na}_i$ . In [ $^3\text{H}$ ]Glu preloaded hippocampal synaptosomes super-fused with low  $\text{Na}^+$  Krebs Ringer HEPES (a condition that guarantees the elimination of neurotransmitter transporters-mediated release), the release of [ $^3\text{H}$ ]Glu induced by high  $\text{K}^+$  is absolutely dependent on the entrance of external  $\text{Ca}^{2+}$ . This exocytotic release of [ $^3\text{H}$ ]Glu attained in the absence of a chemical  $\text{Na}^+$  gradient is inhibited with the same potency and efficacy by  $\omega$ -agatoxin-TK and by  $\omega$ -agatoxin-IVA, which is known to differ from  $\omega$ -agatoxin-TK in its amino terminal moiety. These results indicate that  $\omega$ -agatoxin-TK represents a good pharmacological tool to study P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channel-mediated responses in cerebral nerve endings.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

$\text{Ca}^{2+}$  channels play critical roles in many aspects of neuronal function. Brain presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels localized in the membrane of nerve endings are of special interest. Their opening allows  $\text{Ca}^{2+}$  to enter into the terminal increasing the internal concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ , a step that importantly participates in the primary function of cerebral nerve endings, that is to promote neurotransmitter exocytosis and thus activate the postsynaptic target neurons in the brain.

Electrophysiological and pharmacological studies have shown that among the several types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in neurons, those sensitive to  $\omega$ -agatoxin-IVA, a peptide

isolated from the venom of *Agelenopsis aperta*, are particularly implicated in neurotransmitter release from the cerebral nerve endings (Turner et al., 1993; Sitges and Chiu, 1995a,b; Carvalho et al., 1995). In addition to  $\omega$ -agatoxin-IVA, the venom of *A. aperta* contains another peptide known as  $\omega$ -agatoxin-TK, which is 10 times more concentrated than  $\omega$ -agatoxin-IVA in the venom (Teramoto et al., 1993).  $\omega$ -agatoxin-TK shares 71% of homology with  $\omega$ -agatoxin-IVA but presents a negatively charged N-terminus that contrasts with the positively charged N-terminus of  $\omega$ -agatoxin-IVA (Teramoto et al., 1993).  $\text{Ca}^{2+}$  currents sensitive to  $\omega$ -agatoxin-TK (30 nM–1  $\mu\text{M}$ ) have been found in primary cultures of neurons from the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum (Teramoto et al., 1995, 1997). However, the  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive

\* Corresponding author. Tel.: +52 5622 3866; fax: +52 5622 3897.  
E-mail address: sitges@biomedicas.unam.mx (M. Sitges).

currents recorded from cultured neurons mainly reflect the channel activity present in the neuronal soma and the types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the different neuronal sub-regions (i.e. soma, nerve endings, etc.) are pharmacologically different (Timmermann et al., 2001). The small size of cerebral isolated nerve endings ( $< 0.3 \mu\text{m}$ ) impedes to approach them with electrophysiological methods. Nevertheless, by using compounds such as fura-2, which changes its emission fluorescence in response to the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in its vicinity, the changes in the internal concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_i$ ) can be measured in synaptosomes.

High  $\text{K}^+$  and veratridine, which are the most commonly used strategies to depolarise synaptosomes, both increase the  $\text{Ca}_i$ . However, the underlying mechanisms are different. While the entrance of external  $\text{Na}^+$  via tetrodotoxin-sensitive  $\text{Na}^+$  channels is strictly required for the increase in  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine, the increase in  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^+$  is insensitive to the absence of external  $\text{Na}^+$  or to the presence of tetrodotoxin (Sitges and Chiu, 1995a; Sitges et al., 1998).

The cloned neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_{1A}$  subunit that encodes  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the P/Q type is localized at a high density in presynaptic nerve terminals of many neurons (Westenbroek et al., 1995). Although P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are pharmacologically characterized by their sensitivity to  $\omega$ -agatoxin-IVA and the novel toxin  $\omega$ -agatoxin-TK (Teramoto et al., 1995, 1997), no study on the effects of  $\omega$ -agatoxin-TK on the ionic changes induced by depolarisation in synaptosomes loaded with ion-selective indicator dyes is available.

## 1. Materials and methods

### 1.1. Materials

$\omega$ -agatoxin-TK,  $\omega$ -agatoxin-IVA, and  $\omega$ -conotoxin-GVIA were from Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA). Tetrodotoxin was obtained from Research Biochemical's International. Veratridine, gramicidin D, digitonin, and probenecid were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl ester (SBFI-AM), 1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (fura-2AM) and pluronic acid F-127 were from molecular probes. L-[3, 4- $^3\text{H}$ ]-glutamic acid (spec. act. 51 Ci mmol $^{-1}$ ) was obtained from Perkin Elmer, Life Sciences Inc. (Boston, MA).

### 1.2. Preparation of synaptosomes and buffers composition

The striata and hippocampi of four male Wistar rats (250–300 g) were dissected, immediately placed in cold isotonic sucrose (1:10, wt/vol) and homogenized (six strokes at

2000 rpm, 0.15 mm pestle-vessel clearance). The resulting suspensions were centrifuged at  $1100 \times g$  for 10 min, and supernatants obtained from this centrifugation were centrifuged for another 20 min at  $8200 \times g$ . The resulting pellets containing the P2 fractions of striatal and hippocampal synaptosomes were resuspended in oxygenated standard Krebs Ringer HEPES (KRH). For the Glu release experiments, the P2 fraction of hippocampal synaptosomes was purified further following the method previously described in Rodríguez and Sitges (1996). The composition of the standard KRH is: (in mM) 127 NaCl, 1.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.37 KCl, 1  $\text{CaCl}_2$ , 1.18  $\text{MgSO}_4$ , 20 HEPES- $\text{Na}^+$  and 5.6 mM dextrose, pH 7.4. In addition to this standard KRH containing  $\text{Na}^+$  at a physiological concentration (147 mM), a low (20 mM)  $\text{Na}^+$  medium (low-Na-KRH), in which 127 n-methyl-glucamine chloride was substituted for 127 mM NaCl was prepared. In the Glu release experiments synaptosomes were first super-fused with the low-Na-KRH, or with a Ca-free, low-Na-KRH, in which  $\text{CaCl}_2$  was omitted and 100  $\mu\text{M}$  EGTA was added, and then depolarised with high  $\text{K}^+$ . The composition of the high  $\text{K}^+$  and the Ca-free, high- $\text{K}^+$  super-fusion buffers was the same of the low-Na-KRH, or the Ca-free, low-Na-KRH, except that 30 mM KCl replaced an equimolar concentration of n-methyl-glucamine chloride. Where indicated the above media also contained  $\omega$ -agatoxin-TK or  $\omega$ -agatoxin-IVA.

### 1.3. $\text{Na}_i$ and $\text{Ca}_i$ experiments

The methods used to load synaptosomes with fura-2 or with SBFI and to monitor their fluorescence were previously reported (Rodríguez and Sitges, 1996; Sitges et al., 1998). Briefly, P2 striatal or hippocampal synaptosomes were incubated with SBFI-AM (10  $\mu\text{M}$ ) or with fura-2 (5  $\mu\text{M}$ ) for 45 min at 37 °C. Incubation was stopped by dilution and centrifugation. After washing out the unincorporated fluorescent dye, the final synaptosomal pellets were suspended in 1 ml of KRH. The suspensions were kept at 4 °C in the dark and used within 2 h. Aliquots (70  $\mu\text{l}$ ) of these suspensions were transferred to acrylic cuvettes, diluted 10-fold with KRH and stirred continuously.  $\text{Na}_i$  and  $\text{Ca}_i$  were estimated from fluorescence monitored online in a Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorometer interfaced with an IBM-compatible computer. Excitation wavelengths were set at 340 and 380 nm, emission wavelength at 505 nm and slit widths at 10 nm. Experiments were performed at room temperature. Data points were collected at 1.8 s intervals. After monitoring the 340/380 nm baseline ratio for a few minutes in the absence or in the presence of the toxin to be tested (i.e.  $\omega$ -agatoxin-TK,  $\omega$ -agatoxin-IVA,  $\omega$ -conotoxin-VIA, tetrodotoxin) synaptosomes were depolarised by adding an aliquot of a concentrated solution of KCl or veratridine to the cuvette in order to obtain the desired final concentration. After each addition data points were collected for another 2–4 min.  $\text{Ca}_i$  was estimated following the ratio method (Gryniewicz et al., 1985), and  $\text{Na}_i$

159 following the method previously reported (Rodríguez and  
160 Sitges, 1996) with minor modifications that improved it  
161 (Galindo and Sitges, 2004).

#### 162 1.4. Preloaded [<sup>3</sup>H]Glu release experiments

163 The method used to load the purified hippocampal  
164 synaptosomes with a labelled neurotransmitter and to study  
165 its subsequent release has been described previously (Sitges  
166 and Reyes, 1995). Briefly, about 1.5 mg of purified  
167 hippocampal synaptosomes suspended in KRH (1 mg/ml)  
168 was incubated with [<sup>3</sup>H]Glu (0.9 μCi/mg protein) at 37 °C  
169 for 25 min. Aliquots of the [<sup>3</sup>H]Glu preloaded hippocampal  
170 synaptosomes were then transferred to millipore filters lying  
171 on multiperforated chambers. The radioactivity not incor-  
172 porated into the preparation was removed by super-fusion  
173 with low-Na-KRH or Ca-free, low-Na-KRH. After adjusting  
174 the flow rate to 0.5 ml/min, fractions were collected at 1 min  
175 intervals. After 3 min, the Ca-free low-Na-KRH, the low-  
176 Na-KRH without (control) or containing 200 nM ω-  
177 agatoxin-TK or 200 nM ω-agatoxin-IVA were rapidly  
178 substituted for the respective high K<sup>+</sup> depolarising medium  
179 and additional (4–7 min) perfusate fractions were collected.  
180 The radioactivity released in each collected fraction and that  
181 remaining at the end of the perfusion experiment in the  
182 filters holding the synaptosomes was counted. Results are  
183 expressed as the percentage released per min of total  
184 radioactivity. Total radioactivity equals the radioactivity  
185 released during the minutes of perfusion plus that remaining  
186 in the filter at the end of the experiment.

#### 187 1.5. Statistics

188 Student's *t*-test was used for statistical evaluations. From  
189 *P* < 0.05 differences between data were considered  
190 statistically significant.

## 191 2. Results

### 192 2.1. ω-agatoxin-TK inhibits the elevation of Ca<sub>i</sub><sup>2+</sup> 193 induced by high K<sup>+</sup> dose dependently

194 The extent of ω-agatoxin-TK-sensitive channels involved  
195 in the mechanism whereby high K<sup>+</sup> rises Ca<sub>i</sub> in brain isolated

196 nerve endings was examined in striatal and hippocampal  
197 synaptosomes. The averages of the net Ca<sub>i</sub> changes (over  
198 baseline Ca<sub>i</sub>) for 3 min following exposure of synaptosomes  
199 to high K<sup>+</sup> in synaptosomes exposed to increasing  
200 concentrations of ω-agatoxin-TK are shown in Table 1.  
201 These results demonstrate that the increase in Ca<sub>i</sub> induced by  
202 high K<sup>+</sup> in the nerve endings isolated from both brain regions  
203 is progressively inhibited by the toxin. Representative  
204 experiments of the developed Ca<sub>i</sub> response induced by high  
205 K<sup>+</sup> in striatal and hippocampal synaptosomes in the absence  
206 and presence of ω-agatoxin-TK are shown in Fig. 1a and b,  
207 respectively.

208 Also the Ca<sub>i</sub> changes at the peak and at the plateau phase  
209 have been quantified separately. The plateau phase is defined  
210 as the average of data points after the end of the descending  
211 phase. The net (over baseline) high K<sup>+</sup>-induced increases in  
212 Ca<sub>i</sub> (in nM) reached at the peak and at the plateau phases in  
213 striatal and hippocampal synaptosomes are shown in Fig. 2a  
214 and c, respectively. The right graphs on Fig. 2 show that the  
215 percentage of inhibition caused by the increasing concentra-  
216 tions of ω-agatoxin-TK at the peak and at the plateau  
217 phase are similar.

218 For estimating the IC<sub>50</sub> of ω-agatoxin-TK to inhibit the  
219 Ca<sub>i</sub> response to high K<sup>+</sup> in striatal and hippocampal  
220 synaptosomes, we used the percentages of inhibition  
221 calculated from the averages of the Ca<sub>i</sub> changes during  
222 the 3 min following exposure of synaptosomes to high K<sup>+</sup>  
223 shown in Table 1. Because these results include data points  
224 at the "peak", the descending phase and some points at the  
225 plateau phase. Fig. 3 shows that in both cerebral regions the  
226 maximal inhibition exerted by ω-agatoxin-TK is almost  
227 reach at the concentration of 150 nM. However, comparison  
228 of Fig. 3a and b (or Fig. 2b and d) indicate that ω-agatoxin-  
229 TK is slightly more effective for inhibiting the increase in  
230 Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> in striatal than in hippocampal  
231 synaptosomes.

### 232 2.2. Simple and combined effects of ω-agatoxin-TK and 233 ω-conotoxin-GVIA on the elevation of Ca<sub>i</sub> induced by 234 high K<sup>+</sup> in striatal and hippocampal synaptosomes

235 The effect of ω-agatoxin-TK was tested in combination  
236 with the N-type Ca<sub>v</sub><sup>2+</sup> channel blocker, ω-conotoxin-GVIA,  
237 and not in combination with calcium channel blockers, such  
238 as nimodipine, nitrendipine, or nifedipine, because in a

Table 1

Dose-dependent effect of ω-agatoxin-TK on the net increase in Ca<sub>i</sub> induced by high K<sup>+</sup> in the striatal and hippocampal synaptosomes

	Striatal synaptosomes	(n)	Hippocampal synaptosomes	(n)
High K <sup>+</sup>	145 ± 13	6	167 ± 14	9
High K <sup>+</sup> + ω-agatoxin-TK 50 nM	108 ± 13*	4	137 ± 10	4
High K <sup>+</sup> + ω-agatoxin-TK 150 nM	75 ± 11*	8	105 ± 10*	4
High K <sup>+</sup> + ω-agatoxin-TK 300 nM	67 ± 6*	3		
High K <sup>+</sup> + ω-agatoxin-TK 500 nM	56 ± 16*	3	84 ± 12*	4

Ca<sub>i</sub>, refers to the internal Ca<sup>2+</sup> concentration in nM. High K<sup>+</sup> final concentration is in the cuvette 25 mM. Results are the mean ± S.E.M. values of the indicated number (n) of independent experiments.

\* *P* < 0.05 between synaptosomes treated with high K<sup>+</sup> and high K<sup>+</sup> plus ωAga-TK at the indicated concentration.

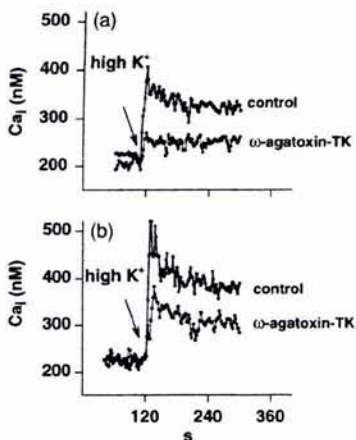


Fig. 1. Representative experiments of the developed  $Ca_i$  response to high  $K^+$  in the absence and presence of  $\omega$ -agatoxin-TK. Striatal (a) or hippocampal (b) synaptosomes were loaded with fura-2.  $Ca_i$  was estimated by the ratio technique described in section 1. Data points were taken at 1.8 s intervals. After measuring the basal level of  $Ca_i$ , in the absence and in the presence of  $\omega$ -agatoxin-TK (500 nM) synaptosomes were exposed to high  $K^+$  (25 mM final) and  $Ca_i$  was measured for 3 min.

239 recent study we found that L-type, dihydropyridines-  
 240 sensitive  $Ca^{2+}$  channels do not participate in the rise in  
 241  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  in synaptosomes (Galindo and  
 242 Sitges, 2004).

243 In striatal synaptosomes the  $Ca_i$  response to high  $K^+$  is  
 244 inhibited  $37 \pm 6\%$  by  $\omega$ -agatoxin-TK,  $29 \pm 7\%$  by  $\omega$ -

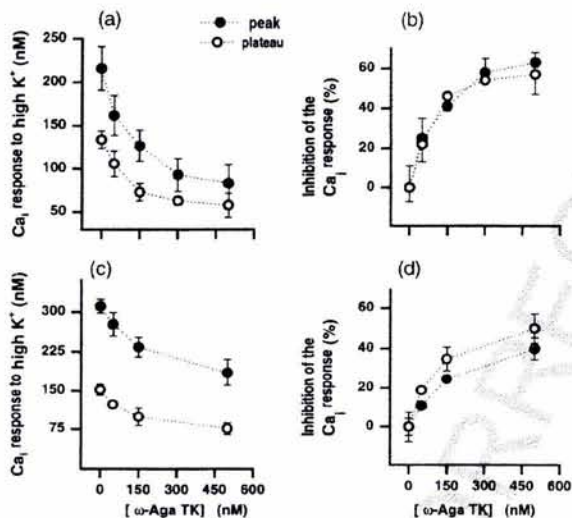


Fig. 2. Effect of  $\omega$ -agatoxin-TK on the high  $K^+$ -induced  $Ca_i$  elevations at the peak and at the plateau phase. Left graphs: net (minus baseline) rise in  $Ca_i$  (in nM) induced by high  $K^+$  at the peak (black circles) and at the plateau phase (empty circles) in striatal (a) and hippocampal (c) synaptosomes exposed to increasing concentrations of  $\omega$ -agatoxin-TK. Right graphs: percentage of inhibition at the peak (black circles) and at the plateau phase (empty circles) caused by  $\omega$ -agatoxin-TK on the rise in  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  in striatal (b) and hippocampal (d) synaptosomes. Results are the mean  $\pm$  S.E.M. values of four independent experiments.

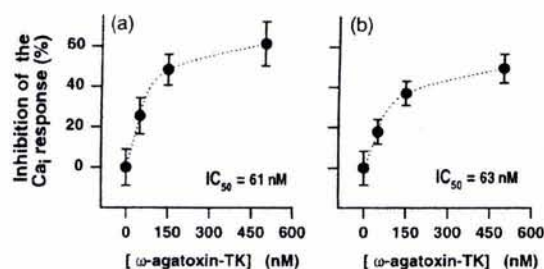


Fig. 3. Dose-dependent inhibition exerted by  $\omega$ -agatoxin-TK on the rise in  $Ca_i$  induced by high  $K^+$ . Inhibition (in %) of the net rise in  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  during the 3 min following exposure of synaptosomes to high  $K^+$  in striatal (a) and hippocampal (b) synaptosomes exposed to increasing concentrations of  $\omega$ -agatoxin-TK. These data were used to calculate the maximal inhibition exerted by the toxin and to estimate its  $IC_{50}$ . Results are the mean  $\pm$  S.E.M. values of four independent experiments.

conotoxin-GVIA and  $51 \pm 6\%$  by the two toxins in combination (Fig. 4a). This pattern observed in striatal synaptosomes exposed simultaneously to both toxins is also observed in hippocampal synaptosomes, where the  $Ca_i$  response to high  $K^+$  is inhibited  $30 \pm 5\%$  by  $\omega$ -agatoxin-TK,  $26 \pm 10\%$  by  $\omega$ -conotoxin-GVIA and  $49 \pm 9\%$  by the two toxins in combination (Fig. 4b).

2.3. Effect of  $\omega$ -agatoxin-TK on the elevation of  $Ca_i$  induced by the sequential addition of high  $K^+$  and veratridine

Although with different kinetics depolarisation with both, high  $K^+$  and veratridine raise  $Ca_i$ . The maximal increase in  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  (peak) is reached rapidly and then declines to a plateau value, while the maximal increase in  $Ca_i$  induced by veratridine is reached slowly and gradually (Fig. 5a). In synaptosomes treated with  $\omega$ -agatoxin-TK the elevation of  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  is markedly inhibited while the elevation of  $Ca_i$  induced by veratridine remains unchanged (Fig. 5b). Oppositely to  $\omega$ -agatoxin-TK, the  $Na^+$

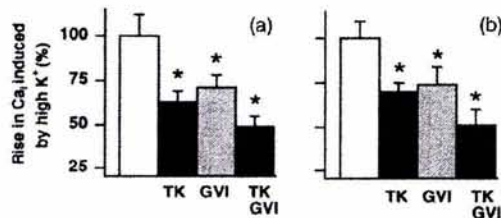


Fig. 4. Single and combined effects of  $\omega$ -agatoxin-TK and  $\omega$ -conotoxin-GVIA on the elevation of  $Ca_i$  induced by high  $K^+$ . After measuring the basal level of  $Ca_i$  for 3 min in striatal (a) or in hippocampal (b) synaptosomes, the preparation was exposed to high  $K^+$  and  $Ca_i$  was measured for another 3 min. The bars indicate the increase in  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  in the absence (empty bars) or in the presence of 150 nM  $\omega$ -agatoxin-TK (TK), 1  $\mu$ M  $\omega$ -conotoxin-GVIA (GVI) or both toxins at the above concentrations (TK/GVIA). Results are the mean  $\pm$  S.E.M. values of five independent experiments. \* $P < 0.05$  between the net  $Ca_i$  response to high  $K^+$  in the absence and presence of the indicated calcium toxins. The differences between the effects of a single toxin and both toxins in combination are also statistically significant.

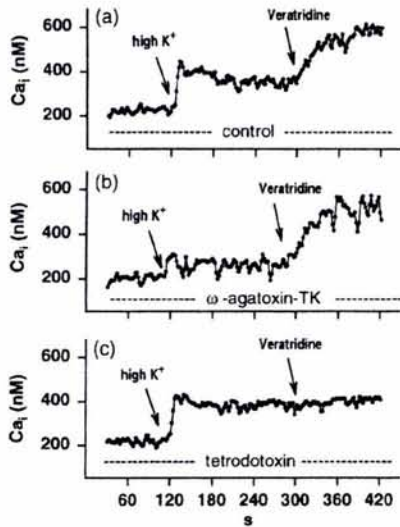


Fig. 5. Effects of  $\omega$ -agatoxin-TK and of tetrodotoxin on the  $Ca_i$  responses induced by high  $K^+$  and veratridine. After measuring the basal level of  $Ca_i$  in fura-2-loaded striatal synaptosomes in the absence (a) or in the presence of 500 nM  $\omega$ -agatoxin-TK (b) or 1  $\mu$ M tetrodotoxin (c) the preparation was exposed to high  $K^+$  (25 mM final) and  $Ca_i$  was measured for 3 min. After this time synaptosomes were exposed to 10  $\mu$ M veratridine and  $Ca_i$  was measured for another 3 min. Results are representative experiments of at least three independent experiments.

264 channel blocker, tetrodotoxin, fails to inhibit the elevation of  
 265  $Ca_i$  induced by high  $K^+$  and inhibits the elevation of  $Ca_i$   
 266 induced by veratridine (Fig. 5c).

267 2.4. Effect of  $\omega$ -agatoxin-TK on the elevation of  $Na^+$   
 268 induced by veratridine

269 The internal concentration of  $Na^+$  ( $Na_i$ ) in synaptosomes  
 270 under resting conditions is increased by veratridine  
 271 depolarisation (Fig. 6a). This increase in  $Na_i$  induced by  
 272 veratridine is insensitive to  $\omega$ -agatoxin-TK (Fig. 6b) and to  
 273  $\omega$ -conotoxin-GVIA (Fig. 6c), but is highly sensitive to the  
 274  $Na^+$  channel blocker, tetrodotoxin (Fig. 4d). High  $K^+$   
 275 depolarisation does not increase the baseline concentration  
 276 of  $Na_i$  (data not shown).

277 2.5. Effect of  $\omega$ -agatoxin-TK on glutamate exocytosis

278 In the absence of the  $Na^+$  gradient, the release of [ $^3H$ ]Glu  
 279 induced by high  $K^+$  depolarisation from purified hippocampal  
 280 synaptosomes preloaded with the labelled amino acid  
 281 neurotransmitter (dark circles in Fig. 7) is completely  
 282 dependent on external  $Ca^{2+}$ , as none release was induced  
 283 by the exposure of synaptosomes to the high  $K^+$  depolarising  
 284 medium in which  $CaCl_2$  was omitted and EGTA was added  
 285 (dotted line in Fig. 7). This external  $Ca^{2+}$ -dependent  
 286 exocytotic release of [ $^3H$ ]Glu induced by high  $K^+$  depolarisation  
 287 is markedly inhibited (50  $\pm$  5%) by  $\omega$ -agatoxin-TK at a  
 288 concentration of 200 nM (empty circles in Fig. 7).

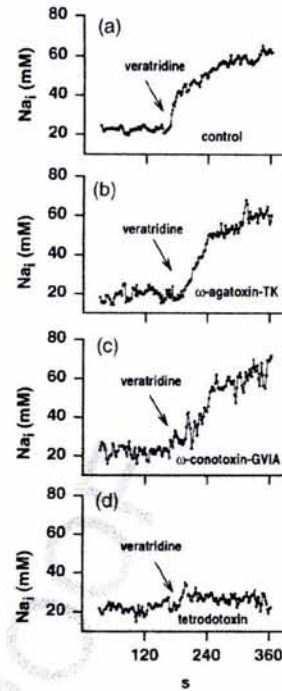


Fig. 6. Comparison of the effects of  $\omega$ -agatoxin-TK,  $\omega$ -conotoxin-GVIA and tetrodotoxin on the  $Na_i$  response induced by veratridine. After measuring the basal level of  $Na_i$  in SBFI-loaded striatal synaptosomes in the absence (a) or in the presence of 500 nM  $\omega$ -agatoxin-TK (b) 1  $\mu$ M  $\omega$ -conotoxin-GVIA (c) or 1  $\mu$ M tetrodotoxin (d) synaptosomes were depolarised with 10  $\mu$ M veratridine (arrows) and  $Na_i$  was measured for several minutes. Results are representative experiments of at least three independent experiments.

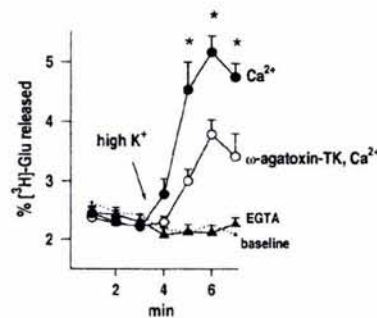


Fig. 7. Effect of  $\omega$ -agatoxin-TK on glutamate exocytosis. Purified hippocampal synaptosomes preloaded with [ $^3H$ ]Glu were super-fused with low-Na-KRH without (dark circles and dotted line) or containing 200 nM  $\omega$ -agatoxin-TK (empty circles), or with Ca-free, low-Na-KRH (dark triangles). Where indicated (arrow), these media were rapidly replaced by the same medium (dotted line) or by the low-Na-high  $K^+$  depolarising medium without (dark circles) or containing 200 nM  $\omega$ -agatoxin-TK (empty circles) or with the Ca-free, low-Na high  $K^+$  depolarising medium (dark triangles). Results are the mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. \* $P > 0.05$  between [ $^3H$ ]Glu release induced by high  $K^+$  in the absence and in the presence of  $\omega$ -agatoxin-TK.

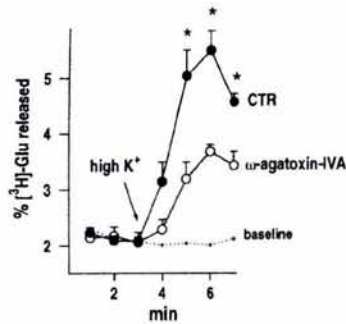


Fig. 8. Effect of  $\omega$ -agatoxin-IVA on glutamate exocytosis. Purified hippocampal synaptosomes preloaded with [ $^3$ H]Glu were superfused with low-Na-KRH without (dark circles and dotted line) or containing 200 nM  $\omega$ -agatoxin-IVA (empty circles). Where indicated (arrow), these media were rapidly replaced by the same medium (dotted line) or by the low-Na-high K $^+$  depolarising medium without (dark circles) or containing 200 nM  $\omega$ -agatoxin-IV (empty circles). Results are the mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. \* $P > 0.05$  between [ $^3$ H]Glu release induced by high K $^+$  in the absence and in the presence of  $\omega$ -agatoxin-IVA.

Fig. 8 shows the reduction ( $52 \pm 4\%$ ) exerted by 200 nM  $\omega$ -agatoxin-IVA on the high K $^+$ -induced exocytosis of [ $^3$ H]Glu.

### 3. Discussion

In this study the participation of  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive Ca $^{2+}$  channels on the elevation of Ca $_i$  induced by depolarisation in fura-2 loaded cerebral (striatal and hippocampal) isolated nerve endings was investigated for the first time. The present study shows that in the nM range  $\omega$ -agatoxin-TK inhibits the elevation of Ca $^{2+}$  induced by high K $^+$  depolarisation dose dependently. In nerve terminals the initial peak Ca $_i$  elevation due to high K $^+$  depolarisation may reflect better Ca $^{2+}$  entry through voltage-dependent Ca $^{2+}$  channels. However, at the moment of aliquots addition (including the KCl aliquot) it occasionally appears an artifact (that goes up and down for 4–6 s). Therefore, the Ca $_i$  peak value to high K $^+$  is not very trustable, as sometimes it can be unmasked by the artifact. Consequently, the IC $_{50}$  for  $\omega$ -agatoxin-TK to inhibit the rise in Ca $_i$  induced by high K $^+$  in striatal and hippocampal synaptosomes was calculated using the average of the Ca $_i$  changes during the 3 min following exposure of synaptosomes to high K $^+$  that includes data points at the “peak”, the descending phase and some points at the plateau phase.

Even though selective indicator dyes, such as fura-2, do not resolve the very rapid synaptic events that occur in milliseconds, they can detect Ca $_i$  changes and resolve fairly rapid kinetic events. Thus, using this technique the inhibition caused by  $\omega$ -agatoxin-TK on the rise in Ca $_i$  to high K $^+$  has been characterized here. Our results indicate that the calculated IC $_{50}$  for  $\omega$ -agatoxin-TK in striatal and hippocampal synaptosomes is similar (60 nM). However, results on Figs. 2 and 3 indicate that the maximal inhibition exerted

by  $\omega$ -agatoxin-TK in striatal synaptosomes is slightly larger than in hippocampal synaptosomes. Nevertheless, whether or not this small difference is due to the presence of a larger population of  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive Ca $^{2+}$  channels in striatal than in hippocampal nerve endings is a matter of future studies.

The inhibition exerted by  $\omega$ -conotoxin-GVIA on the rise in Ca $_i$  induced by high K $^+$  in striatal synaptosomes indicates that part of the  $\omega$ -agatoxin-TK-insensitive rise in Ca $_i$  induced by high K $^+$  is mediated by N-type Ca $^{2+}$  channels. However, since L-type Ca $^{2+}$  channels are not involved in the elevation of Ca $_i$  induced by high K $^+$  in striatal synaptosomes (Duarte et al., 1996; Galindo and Sitges, 2004), the remaining rise in Ca $_i$  induced by high K $^+$  may involve Ca $^{2+}$  channels of another type. In line with this interpretation in striatal synaptosomes both, P- and N-type Ca $^{2+}$  channel blockers have shown to partially inhibit the release of [ $^3$ H]DA induced by high K $^+$ , whereas the L-type Ca $^{2+}$  channel blockers were unable to inhibit the release of [ $^3$ H]DA induced by high K $^+$  (Sitges et al., 1990; Turner et al., 1993; Carvalho et al., 1995; Soliakov and Wonnacott, 1996).

The high density of functional  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive Ca $^{2+}$  channels indicated by the marked reduction exerted by  $\omega$ -agatoxin-TK on the Ca $_i$  response to high K $^+$  depolarisation contrasts with the failure of  $\omega$ -agatoxin-TK to inhibit the rise in Ca $_i$  induced by veratridine. Veratridine blockage of Na $^+$  channel inactivation increases Na $^+$  influx gradually until a plateau value is reached. Interestingly also the elevation of Ca $_i$  induced by veratridine follows this kinetics, suggesting a close relationship between these two responses. Moreover, the inhibition by tetrodotoxin of the veratridine-induced elevation of Ca $_i$  indicates that the increase in presynaptic Na $^+$  channels permeability caused by veratridine is absolutely required for the elevation of Ca $_i$ , and that the entrance of Ca $^{2+}$  induced by veratridine is strictly dependent on the rise in Na $_i$ . Our finding that  $\omega$ -agatoxin-TK failed in modifying the elevation of Ca $_i$  induced by veratridine (Fig. 5b) as well as the elevation of Na $_i$  induced by veratridine (Fig. 6b) is consistent with the previously reported failure of  $\omega$ -agatoxin-TK to inhibit the veratridine evoked release of DA in striatal synaptosomes (Dobrev et al., 1998), and further supports our previous conclusion that the Ca $^{2+}$  influx activated by veratridine does not involve voltage gated Ca $^{2+}$  channels (Galindo and Sitges, 2004). In contrast to high K $^+$ , veratridine markedly increases Na $_i$  and the increase in Ca $_i$  induced by veratridine is abolished by tetrodotoxin (Fig. 5c), whereas the increase in Ca $_i$  induced by high K $^+$  that is inhibited by  $\omega$ -agatoxin-TK as well as by  $\omega$ -agatoxin-IVA (Sitges and Chiu, 1995a; Galindo and Sitges, 2004) is insensitive to tetrodotoxin (Fig. 5c). Therefore, the Ca $^{2+}$  influx activated by veratridine may be mediated by the Na/Ca exchanger in its reverse form.

Under resting conditions, the Na/Ca exchanger contributes to the preservation of low cytoplasm Ca $^{2+}$  by extruding Ca $^{2+}$  in exchange for Na $^+$ , a process driven by the large transmembrane Na $^+$  gradient, but when a marked



378 elevation of  $\text{Na}_i$ , occurs the exchanger can reverse its  
 379 operation (Sánchez-Armass and Blaustein, 1987; Blaustein  
 380 and Lederer, 1999). Therefore, the excessive  $\text{Na}^+$  influx  
 381 provoked by veratridine action on  $\text{Na}^+$  channels, evidenced  
 382 by the rise in  $\text{Na}_i$  evoked by veratridine, may increase  $\text{Ca}_i$  by  
 383 reversing the  $\text{Na}/\text{Ca}$  exchanger in an  $\omega$ -agatoxin-TK-  
 384 insensitive manner. In agreement with this interpretation,  
 385 also  $\omega$ -agatoxin-IVA has been reported to fail in modifying  
 386 the veratridine-induced increase in  $\text{Ca}_i$  in rat brain  
 387 synaptosomes (Meder et al., 1997; Deffois et al., 1996;  
 388 Galindo and Sitges, 2004).

389 The failure of  $\omega$ -agatoxin-TK and  $\omega$ -conotoxin-GVIA to  
 390 inhibit the rise in  $\text{Na}_i$  induced by veratridine depolarisation  
 391 also indicates that  $\omega$ -agatoxin-TK selectively inhibits  
 392 presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels and does not modify the entrance  
 393 of  $\text{Na}^+$  via presynaptic  $\text{Na}^+$  channels like tetrodotoxin (Fig.  
 394 6d) and other presumed  $\text{Ca}^{2+}$  channels blockers (Galindo  
 395 and Sitges, 2004).

396  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  are the two main cations controlling  
 397 cerebral neurotransmitter release upon depolarisation. In  
 398 synaptosomes, the increase in presynaptic voltage sensitive  
 399  $\text{Ca}^{2+}$  channels permeability results in neurotransmitter  
 400 exocytosis and the increase in presynaptic voltage-sensitive  
 401  $\text{Na}^+$  channels permeability results in neurotransmitter  
 402 release from the cytoplasm via reversal of the neurotransmitter  
 403 transporters (Sitges et al., 1993). In order to guarantee  
 404 none possible contribution of the neurotransmitter trans-  
 405 porter-mediated release, synaptosomes were super-fused  
 406 with low  $\text{Na}^+$  KRH media. Our results indicate that in the  
 407 absence of a  $\text{Na}^+$  gradient glutamate release induced by high  
 408  $\text{K}^+$  depolarisation is absolutely dependent on the entrance of  
 409  $\text{Ca}^{2+}$ , as indicated by the complete failure of high  $\text{K}^+$  to  
 410 induce Glu release in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ . This  
 411 exocytotic release of Glu is inhibited in  $50 \pm 5\%$  and in  $53$   
 412  $\pm 4\%$  by 200 nM  $\omega$ -agatoxin-TK and 200 nM  $\omega$ -agatoxin-  
 413 IVA, respectively. Our finding that both toxins inhibited with  
 414 the same potency and efficacy Glu exocytosis in purified  
 415 hippocampal synaptosomes indicates that the amino  
 416 terminal moieties of  $\omega$ -agatoxin-TK and  $\omega$ -agatoxin-IVA  
 417 is irrelevant for the blockade of P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

418 The marked inhibition of the high  $\text{K}^+$  evoked release of  
 419 [ $^3\text{H}$ ]Glu caused by the  $\omega$ -agatoxins in hippocampal  
 420 synaptosomes found here is in agreement with previous  
 421 studies, indicating that the  $\text{Ca}^{2+}$  channels that play the more  
 422 prominent role on the high  $\text{K}^+$  evoked release of [ $^3\text{H}$ ]Glu in  
 423 hippocampal synaptosomes are of the P-type (Lüebke et al.,  
 424 1993; Turner et al., 1993).

425 Our results in hippocampal synaptosomes shows that at a  
 426 concentration of 200 nM,  $\omega$ -agatoxin-TK inhibits  $50 \pm 4\%$   
 427 glutamate exocytosis and that at a higher concentration  
 428 (500 nM) it inhibits the  $\text{Ca}_i$  response to high  $\text{K}^+$  in a similar  
 429 extent ( $50 \pm 7\%$ ). Taking into consideration that the  
 430 maximal inhibition (50%) exerted by 500 nM  $\omega$ -agatoxin-  
 431 TK on the  $\text{Ca}_i$  response to high  $\text{K}^+$  is almost reached at the  
 432 concentration of 150 nM, the finding that  $\omega$ -agatoxin-TK at  
 433 a concentration of 200 nM causes the same inhibition on the

434 release of glutamate induced by high  $\text{K}^+$  than the  
 435 concentration of 500 nM on the rise in  $\text{Ca}_i$  induced by high  
 436  $\text{K}^+$  is not rare. However the  $\text{IC}_{50}$  of  $\omega$ -agatoxin-TK for  
 437 inhibiting the  $\text{Ca}_i$  response to high  $\text{K}^+$  estimated here  
 438 (60 nM) in hippocampal synaptosomes is an order of  
 439 magnitude lower than the reported  $\text{IC}_{50}$  (700 nM) of  $\omega$ -  
 440 agatoxin-TK for inhibiting glutamate release in slices of rat  
 441 hippocampus (Kimura et al., 1995), suggesting a higher  
 442 potency of the  $\omega$ -agatoxin-TK in synaptosomes than in  
 443 slices. The better access of the toxin to its receptors ( $\text{Ca}^{2+}$   
 444 channels) in synaptosomes than in slices may explain these  
 445 differences. Also the continuous super-fusion of the purified  
 446 hippocampal synaptosomes with the low  $\text{Na}^+$  medium,  
 447 which is a condition that completely cancels the possibility  
 448 of glutamate reuptake by the neurotransmitter transporters,  
 449 may importantly contribute to the higher potency of  $\omega$ -  
 450 agatoxin-TK found here in comparison to that reported in the  
 451 hippocampal slices incubated in the presence of a  $\text{Na}^+$   
 452 gradient (Kimura et al., 1995).

453 In summary,  $\omega$ -agatoxin-TK-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels  
 454 mediate an important proportion of the tetrodotoxin  
 455 insensitive elevation of  $\text{Ca}_i$  induced by high  $\text{K}^+$  depolarisa-  
 456 tion in cerebral isolated nerve endings, but are not involved  
 457 in the elevation of  $\text{Ca}_i$  induced by veratridine, that is  
 458 abolished by tetrodotoxin.

## Acknowledgments

459  
 460 The authors thank Luz Maria Chiu for her excellent  
 461 technical assistance. This work was financially supported by  
 462 project P42046352-Q from SEP-CONACYT.

## References

- 463  
 464 Blaustein, M.P., Lederer, W.J., 1999. Sodium/calcium exchange: its phy-  
 465 siological implications. *Physiol. Rev.* 79, 763–854.  
 466  
 467 Carvalho, C.M., Ferreira, I.L., Duarte, C.B., Malva, J.O., Tretter, L., Adam-  
 468 Vizi, V., Carvalho, A.P., 1995. Relation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  to dopamine release in  
 469 striatal synaptosomes: role of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Brain Res.* 669, 234–244.  
 470  
 471 Deffois, A., Fage, D., Carter, C., 1996. Inhibition of synaptosomal vera-  
 472 tridine-induced sodium influx by antidepressants and neuroleptics used  
 473 in chronic pain. *Neurosci. Lett.* 220, 117–120.  
 474  
 475 Dobrev, D., Milde, A.S., Andreas, K., Ravens, U., 1998. Voltage-activated  
 476 calcium channels involved in veratridine-evoked [ $^3\text{H}$ ] dopamine release  
 477 in rat striatal slices. *Neuropharmacology* 37, 973–982.  
 478  
 479 Duarte, C.B., Cristovao, A.J., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., 1996.  
 480 Voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat striatal synaptosomes: role on  
 481 the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  responses to membrane depolarisation. *Neurochem. Int.* 28,  
 482 67–75.  
 483  
 484 Galindo, C., Sitges, M., 2004. Dihydropyridines mechanism of action in  
 485 striatal isolated nerve endings: Comparison with  $\omega$ -agatoxin IVA. *Neu-  
 486 rochem. Res.* 29, 659–669.  
 487  
 488 Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$   
 489 indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*  
 490 260, 3440–3450.  
 491  
 492 Kimura, M., Yamanishi, Y., Hanada, T., Kagaya, T., Kuwada, M., Watanabe,  
 493 T., Katayama, K., Nishizawa, Y., 1995. Involvement of P-type calcium

- 487 channels in high potassium-elicited release of neurotransmitters from rat  
488 brain slices. *Neuroscience* 66, 609–615.
- 489 Luebke, J.I., Dunlap, K., Turner, T.J., 1993. Multiple calcium channel types  
490 control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neu-*  
491 *ron* 11, 895–902.
- 492 Meder, W., Fink, K., Gothert, M., 1997. Involvement of different calcium  
493 channels in K<sup>+</sup> and veratridine-induced increases of cytosolic calcium  
494 concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn-Schmiede-*  
495 *berg's Arch. Pharmacol.* 356, 797–805.
- 496 Rodríguez, R., Sitges, M., 1996. Nigericin-induced Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>  
497 exchange in synaptosomes: effect on [<sup>3</sup>H]GABA release. *Neurochem.*  
498 *Res.* 21, 889–895.
- 499 Sánchez-Armass, S., Blaustein, M.P., 1987. Role of sodium–calcium  
500 exchange in regulation of intracellular calcium in nerve terminals.  
501 *Am. J. Physiol.* 252, C595–C603.
- 502 Sitges, M., Chiu, L.M., 1995a.  $\omega$ -Aga IVA selectively inhibits the calcium  
503 dependent fraction of the evoked release of [<sup>3</sup>H]GABA from synapto-  
504 somes. *Neurochem. Res.* 20, 1065–1071.
- 505 Sitges, M., Chiu, L.M., 1995b. Characterization of the type of calcium  
506 channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve end-  
507 ings. *Neurochem. Res.* 20, 1072–1079.
- 508 Sitges, M., Chiu, L.M., González, L., 1993. Vesicular and carrier-mediated  
509 depolarisation-induced release of [<sup>3</sup>H]GABA: inhibition by amiloride  
510 and verapamil. *Neurochem. Res.* 18, 1081–1087.
- 511 Sitges, M., Peña, F., Chiu, L.M., Guarneros, A., 1998. Study on the possible  
512 involvement of protein kinases in the modulation of brain presynaptic  
513 sodium channels; comparison with calcium channels. *Neurochem. Int.*  
514 32, 177–190.
- Sitges, M., Reyes, A., 1995. Effects of verapamil on the release of different  
515 neurotransmitters. *J. Neurosci. Res.* 40, 613–621.
- 516 Soliakov, L., Wonnacott, S., 1996. Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels involved  
517 in nicotinic receptor-mediated [<sup>3</sup>H] dopamine release from rat striatal  
518 synaptosomes. *J. Neurochem.* 67, 163–170.
- 519 Teramoto, T., Kuwada, M., Niidome, T., Sawada, K., Nishizawa, Y.,  
520 Katayama, K., 1993. A novel peptide from funnel web spider venom,  
521 omega-Aga-TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem.*  
522 *Biophys. Res. Commun.* 196, 134–140.
- 523 Teramoto, T., Niidome, T., Kimura, M., Ohgoh, M., Nishizawa, Y.,  
524 Katayama, K., Mayumi, T., Sawada, K., 1997. A novel type of calcium  
525 channel sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical  
526 neurons. *Brain Res.* 756, 225–230.
- 527 Teramoto, T., Niidome, T., Miyagawa, T., Nishizawa, Y., Katayama, K.,  
528 Sawada, K., 1995. Two types of calcium channels sensitive to omega-  
529 agatoxin-TK in cultured rat hippocampal neurones. *Neuroreport* 6,  
530 1684–1688.
- 531 Timmermann, D.B., Lund, T.M., Belhage, B., Schousboe, A., 2001. Loca-  
532 lization and pharmacological characterization of voltage dependent  
533 calcium channels in cultured neocortical neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.*  
534 19, 1–10.
- 535 Turner, T.J., Adams, M.E., Dunlap, K., 1993. Multiple Ca<sup>2+</sup> channel types  
536 coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc. Natl.*  
537 *Acad. Sci.* 90, 9518–9522.
- 538 Westenbroek, R.E., Sakurai, T., Elliott, E.M., Hell, J.W., Starr, T.V., Snutch,  
539 T.P., Catterall, W.A., 1995. Immunochemical identification and sub-  
540 cellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels.  
541 *J. Neurosci.* 15, 6403–6418.
- 542  
543

UNCORRECTED PR