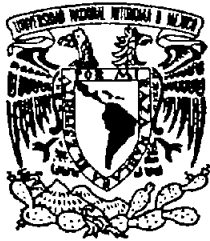


00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la Vinpocetina sobre los cambios en la concentración interna de los iones sodio, calcio y potasio inducidos por el agente convulsivante 4-AP en terminales nerviosas cerebrales

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. EMILIO JAVIER GALVÁN ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS: DOCTORA MARÍA SÍLGES BERRONDO



MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2005

COORDINACIÓN

m. 340408



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

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

NOMBRE: Emilio Javier Galván Espinosa
FECHA: 26 Enero - 2005
FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de octubre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno GALVÁN ESPINOSA EMILIO JAVIER con número de cuenta 89215122 y número de expediente 71991152, con la tesis titulada: "Efecto de la Vinpocetina sobre los cambios en la concentración interna de los iones sodios, calcio y potasio inducidos por el agente convulsivante 4-AP en terminales nerviosas cerebrales", bajo la dirección del Dra. María Sitges Berrondo.

- Presidente: Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoytia
- Vocal: Dra. Herminia Pasantes Morales
- Vocal: Dr. Julio Morán Andrade
- Vocal: Dr. Miguel Angel Morales Mendoza
- Secretario: Dra. María Sitges Berrondo
- Suplente: Dra. Laura Escobar Pérez
- Suplente: Dra. Luis Alfonso Vaca Domínguez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de enero del 2005.

[Firma manuscrita]

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

La presente tesis se realizó en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Sitges Berrondo y con el apoyo de una beca-crédito del CONACyT y una beca de la DGEP, UNAM.

Miembros del Jurado

- DR. RICARDO TAPIA IBARGUENGOYTIA
- DRA. HERMINIA PASANTES MORALES
- DR. JULIO MORÁN ANDRADE
- DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA
- DRA. MARÍA SITGES BERRONDO
- DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ
- DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mis Padres:
Emilio Galván y Teresa Espinoza,
de los que siempre recibí apoyo
en todos los proyectos que he realizado.
Un ejemplo de bondad único

Gracias!

Agradecimientos

A la Dra. María Sitges Berrondo por permitirme realizar mis estudios de doctorado bajo su dirección, y por haberme aguantado durante tantos y tantos momentos de tensión. A final de cuentas, siempre conté con su apoyo.

Los Doctores Miguel Morales y Laura Escobar de mi comité tutorial, que aportaron valiosos consejos a lo largo de mis estudios.

También agradezco a los miembros del laboratorio: El Dr. Vladimir Nekrassov y las técnicas académicas, Araceli Guarneros y Luz María Chiu, que siempre me apoyaron cuando lo necesite.

Agradezco también a mi más cercano grupo de amigos, con quienes pude contar siempre, en las buenas y en las malas, en muchos viajes y en muchas fiestas: Los alegres doctores: Alex Gene Castellanos y Dr. Carli Goats Galindo. A una de las personas más dulces y buenas que he conocido en mucho tiempo: Ana Elisa Peña. Mi amiga durante casi toda la carrera, Araceli Bonilla y también, de toda la carrera y el doctorado, Dr. Txavier Mungarro. Además, Mi amiga del CCH Ma.Elena Medina. Agradezco mucho a Evelin Rodríguez por todas sus recomendaciones literarias y su amistad incondicional, así como al inverosímil Tigre Gaytan.

*Y mientras siga mi viaje en esta naiv de fous, aversiva Narrenschiff,
seguiré al frente de ella...*

Indice

Indice de figuras	4
Resumen	6
Abstract	7
Abreviaturas	8
1. Antecedentes generales	9
1.1. Mecanismos de liberación de neurotransmisores.....	10
1.2. Generalidades sobre los tres iones que controlan la fisiología de las terminales nerviosas aisladas.	12
1.2.1. Canales de sodio sensibles a voltaje	13
1.2.2. Canales de potasio sensibles a voltaje	15
1.2.3. Canales de calcio sensibles a voltaje.....	18
1.3. Papel de la ATPasa de Na^+/K^+ en las terminales nerviosas	20
1.4. La sobreactivación de los canales de sodio y el daño neuronal	22
1.5. Vinpocetina.....	24
2. Métodos	27
2.1. La preparación sinaptosomal.....	27
2.1.1. Estrategias para despolarizar a los sinaptosomas.....	28
2.2. Obtención de los sinaptosomas.....	27
2.3. Determinación de la concentración interna de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en los sinaptosomas.....	28
2.4. Experimentos de liberación de neurotransmisores endógenos	31
2.5. Determinación de la concentración de DA.....	32

2.6. Determinación de la concentración de Glu y GABA	32
2.7. Estadística	33
3. Estudio I: Caracterización de la participación de los canales de sodio sobre el aumento en el Na^+ inducido por 4-aminopiridina en sinaptosomas	34
3.1. Generalidades del mecanismo de acción de la 4-AP	34
3.2. Resultados.....	38
3.2.1. Efectos de la 4-AP sobre la Na_i	38
3.2.2. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i inducida por 4-AP	39
3.2.3. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i inducida con veratridina y ouabaina	41
3.2.4. Efectos de ouabaina, 4-AP y veratridina sobre la K_i	43
3.2.5. Efecto de los bloqueadores de canales de sodio y de calcio sobre el aumento en la Ca_i inducida por 4-AP	45
3.2.6. Efecto de la tetrodotoxina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por diferentes agentes	47
4. Estudio II: Efectos de la vinpocetina sobre las respuestas inducidas por 4-AP en sinaptosomas de estriado de rata.	49
4.1.1. Acción de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i inducido por varias concentraciones de 4-AP.	49
4.1.2. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i inducida por 0.1 mM de 4-AP y por veratridina en ausencia de calcio externo.	52
4.1.3. Efecto de la vinpocetina en sinaptosomas predespolarizados.	53
4.1.4. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i inducida con 4-AP. ...	55
4.1.5. Efecto de la vinpocetina sobre la Ca_i en sinaptosomas predespolarizados.	57
4.1.6. Acción de la vinpocetina sobre el aumento de la Ca_i inducida por la adición secuencial de 4-AP y K^+ alto.	58
5. Discusión.....	60
5.1.1. Efectos de la 4-AP sobre la Na_i y la K_i	60

5.1.3. Efectos de la 4-AP sobre la Ca_i	65
5.1.4. Efectos de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores.	66
5.2.1. Efectos de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i y la Ca_i que induce la 4-AP.....	68
6. Conclusión.....	72
7. Bibliografía	73
8. Artículo Publicado.....	85

Índice de figuras

Fig. 1. La región de contacto entre neuronas es la sinapsis.....	9
Fig. 2. Principales mecanismos de liberación de neurotransmisores	11
Fig. 3. Sitios de modulación farmacológica de los canal de sodio sensible a voltaje	14
Fig. 4. La ATPasa de Na ⁺ /K ⁺	21
Fig. 5. La activación sostenida de los canales presinápticos de sodio	23
Fig. 6. Estructura de la vinpocetina	24
Fig. 7. La vinpocetina inhibe selectivamente las respuestas inducidas por la activación de los canales de sodio presinápticos	25
Fig. 8. Estructura de la 4-Aminopiridina (4-AP)	34
Fig. 9. La 4-AP estimula la liberación de glutamato endógeno.....	35
Fig. 10. La 4-AP induce liberación de [³ H]DA.....	36
Fig. 11. Efectos de concentraciones crecientes de 4-AP sobre la Na _i	38
Fig. 12. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na _i que induce la 4-AP	40
Fig. 13. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na _i que induce la veratridina y la ouabaina.....	42
Fig. 14. Efecto de la ouabaina, veratridina y 4-AP sobre la K _i	44
Fig. 15. Efectos de la tetrodotoxina y de la ω-AGA IVA en combinación con ω-CnTx GVIA sobre el aumento en la Ca _i que induce la 4-AP.....	46
Tabla 1. Comparación de los efectos de la tetrodotoxina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por alto potasio, veratridina y 4-AP en sinaptosomas estriatales	48
Fig. 16. Efectos de la vinpocetina y la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na _i que induce la 4-AP	50
Fig. 17. Efecto de la vinpocetina y la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na _i que induce 1 mM de 4-AP	51

Fig. 18. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i por 4-AP y VTRD	52
Fig. 19. Efecto de la vinpocetina sobre la Na_i y la despolarización inducida con veratridina o 4-AP	54
Fig. 20. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP.....	56
Fig. 21. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP o la veratridina	57
Fig. 22. La vinpocetina elimina el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP pero no modifica el aumento en la Ca_i que induce el alto potasio	59

Resumen

En la presente tesis se investigó la acción de la vinpocetina sobre los cambios iónicos de la Na_i y Ca_i inducidos por el agente convulsivante 4-AP en sinaptosomas de estriado de rata. El trabajo experimental comienza con una re-evaluación del mecanismo de acción de la 4-AP en la que se explora la participación de los canales de sodio sensibles a voltaje sobre los cambios en la Na_i , Ca_i y K_i y sobre la liberación de neurotransmisores inducida por diferentes concentraciones de 4-AP. A continuación se presenta una imagen más comprensible del mecanismo subyacente a la acción anticonvulsivante de la vinpocetina. Para determinar como afecta la vinpocetina a la excitabilidad neuronal, se estudió el efecto de la vinpocetina sobre los cambios en la Na_i y la Ca_i inducidos por diferentes concentraciones de 4-AP en sinaptosomas de estriado y los efectos se compararon con los resultados obtenidos con tetrodotoxina. La vinpocetina como la tetrodotoxina, inhibe el aumento en la Na_i que induce 0.1 mM de 4-AP y solo inhibe 30% del aumento en la Na_i que induce 1 mM de 4-AP. En contraste con la sensibilidad a la tetrodotoxina o la vinpocetina del aumento en la Na_i inducido por la 4-AP, el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP (0.1 mM y 1 mM), se inhibe marcadamente por tetrodotoxina o por vinpocetina, así como por las toxinas de canales de calcio ω -Aga IVA en combinación con ω -CnTx-GVIA, lo que indica que solo la fracción sensible a tetrodotoxina o vinpocetina del aumento en la Na_i que induce la 4-AP está ligada a la activación de los canales presinápticos de calcio. En contraste con el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP y que es sensible a tetrodotoxina o vinpocetina, el aumento en la Ca_i que induce el K^+ alto (30 mM) es insensible a vinpocetina o tetrodotoxina. Se concluye que la modulación negativa que ejerce la vinpocetina sobre los cambios iónicos en la Na_i y la Ca_i , se debe a la disminución de la permeabilidad de los canales de sodio sensibles a voltaje. Además, la inhibición de los canales presinápticos de sodio puede subyacer a la acción anticonvulsivante reportada *in vivo* para la vinpocetina.

Abstract

The action of the nootropic drug vinpocetine on the internal changes of sodium and calcium induced by the convulsivant agent 4-AP was investigated in isolated nerve endings of the striatum of the rat. The experimental work begins with a re-evaluation of the participation of voltage sensitive sodium channels on the changes on internal (i) concentrations of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and on DA, GLU and GABA release caused by different concentrations of 4-AP, and continue with a more understandable depict of the mechanism underlying the anticonvulsivant action of vinpocetine. To determine how the neuronal excitability is affected by vinpocetine, the effects of vinpocetine on Na_i and Ca_i induced by different concentrations of 4-AP was investigated in striatal synaptosomes and the effects were compared with the results obtained with tetrodotoxin. Vinpocetine as tetrodotoxin inhibits the rise in the Na_i induced by 0.1 mM of 4-AP and only inhibits $\approx 30\%$ of the rise in Na_i induced by 1 mM of 4-AP. Contrasting with the sensibility to tetrodotoxin or vinpocetine on the rise in Na_i induced by 4-AP, the rise in Ca_i induced by the two 4-AP concentrations (0.1 and 1 mM) tested, was marked inhibited by tetrodotoxin, vinpocetine or the applied combination of ω -Aga IVA with ω -CnTx GVIA, indicating that only the tetrodotoxin-sensitive fraction of the rise in Na_i induced by 4-AP is linked with the activation of presynaptic calcium channels. Moreover, in contrast to the rise in Ca_i induced by 4-AP-tetrodotoxin and vinpocetine sensitive, the rise in Ca_i induced by high K^+ was completely insensitive to tetrodotoxin and vinpocetine.

It was concluded that the down-modulation exerted by vinpocetine on the internal changes on Na_i and Ca_i was due to the diminished permeability of the voltage sensitive sodium channels. Also, the inhibition of sodium channels may underlie the anticonvulsant action previously reported *in vivo* of vinpocetine.

Abreviaturas

4-AP.....	4-Aminopiridina
SNC.....	Sistema Nervioso Central
Na _i	Concentración interna de sodio
K _i	Concentración interna de potasio
Ca _i	Concentración interna de calcio
SBFI.....	Sodium-Binding benzofuran isophtalate
PBFI.....	Potassium-Binding benzofuran isophtalate
fura-2.....	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
KRH.....	Krebs Ringer Hepes
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta presión)
DA	Dopamina
Dopac	Ácido dihidroxifenilacético

1. Antecedentes generales

La unidad de procesamiento del sistema nervioso central es la neurona. Las neuronas se comunican entre sí a través de zonas de contacto altamente especializadas llamadas sinapsis, las cuales pueden ser de naturaleza eléctrica (que contienen poros intercelulares que permiten el paso de corriente eléctrica) o química (que liberan sustancias químicas o neurotransmisores), siendo estas últimas las predominantes en el SNC. La sinapsis se divide en dos regiones: la pre y la postsinapsis. De manera simplificada, se puede decir que la presinapsis es la región donde arriba el potencial de acción y se induce la liberación de neurotransmisores y la postsinapsis la región donde actúan estos transmisores a través de receptores específicos que a su vez, permiten la transducción de esta señal (Fig. 1).

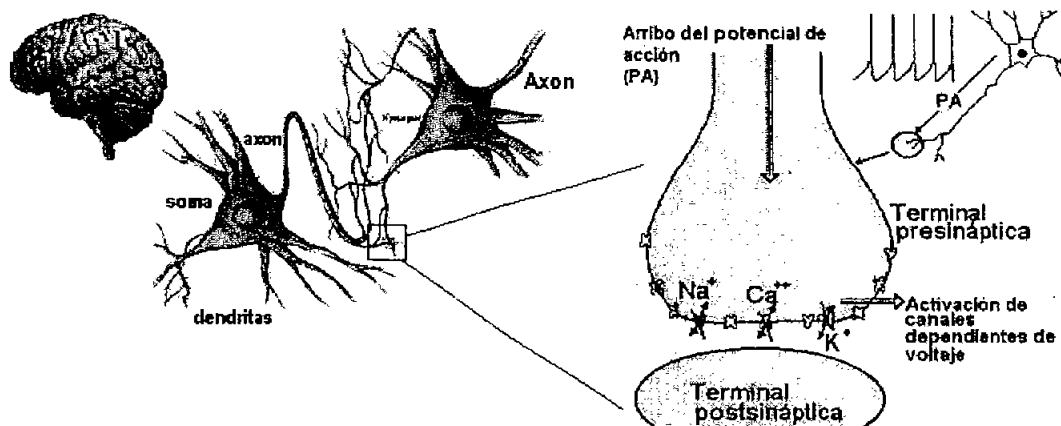


Fig. 1. La región de contacto entre neuronas es la sinapsis. La sinapsis es una zona de contacto altamente especializada entre dos neuronas donde se propagan las señales de una célula (presináptica) a otra célula (postsináptica) con alta velocidad y precisión espacial. Las sinapsis se definen eléctricas o químicas dependiendo de si la transmisión ocurre vía la propagación directa del estímulo eléctrico o química, si hay de por medio un intermediario químico.

En las terminales nerviosas, los canales de sodio sensibles a voltaje desempeñan un papel fundamental en la propagación de los impulsos

eléctricos, ya que la activación de estos canales permite la propagación del potencial de acción, y cuando éste invade la terminal nerviosa, permite la activación de otros canales sensibles a voltaje (i.e. Na^+ K^+ y Ca^{2+}) y se presenta la liberación de neurotransmisores.

1.1. Mecanismos de liberación de neurotransmisores

Los neurotransmisores pueden ser liberados en las terminales nerviosas del SNC a través de dos mecanismos ampliamente descritos: la *exocitosis*, proceso que depende de la entrada de calcio a través de los canales de calcio sensibles a voltaje (Turner y cols. 1992; Sitges y Chiu 1995; 1995b), y la liberación por *reversión de transportadores de neurotransmisores*, proceso mediado por el aumento en la concentración presináptica de Na^+ (Sitges y cols. 1993; Sitges y Chiu 1995b; Santos y cols. 1996; Sitges y cols. 1998).

En la parte inferior de la figura 2 se esquematiza la exocitosis de los neurotransmisores en una terminal nerviosa, que se presenta cuando el aumento transitorio de la concentración intracelular de Ca^{2+} induce la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana de la terminal nerviosa presináptica a nivel de la zona activa. Esta fusión propicia la liberación de los neurotransmisores desde las vesículas hacia la hendidura sináptica.

Después de unirse a sus receptores postsinápticos los neurotransmisores liberados tienen que ser removidos. A la fecha se han descrito tres mecanismos para eliminar a los neurotransmisores de la hendidura sináptica: recaptura del neurotransmisor liberado, difusión del neurotransmisor hacia el espacio extracelular y degradación enzimática del neurotransmisor. A diferencia de las sinapsis de naturaleza colinérgica, las sinapsis centrales carecen de enzimas extracelulares que permitan la degradación de los neurotransmisores; una de las funciones centrales de las células gliales es contribuir con la limpieza rápida de los neurotransmisores de la hendidura sináptica vía los transportadores de transmisores. El proceso

de recaptura se realiza a través de transportadores específicos de membrana. Los transportadores de neurotransmisores son proteínas que expresan alto grado de homología y consisten de 12 dominios transmembranales con una conservación substancial a través de las secuencias del dominio transmembranal. El movimiento de los neurotransmisores para los que son específicos cada uno de estos transportadores está acoplado al co-transporte de iones de Na^+ , Cl^- o K^+ , por lo que han sido divididos en dos grandes familias: los *dependientes de Na^+/Cl^-* , que incluyen a los transportadores de GABA, noradrenalina, dopamina y serotonina, y los dependientes de Na^+/K^+ donde se agrupan todos los transportadores de glutamato (Kanner 1994; Nelson y Lill 1994; Palacin y cols. 1998).

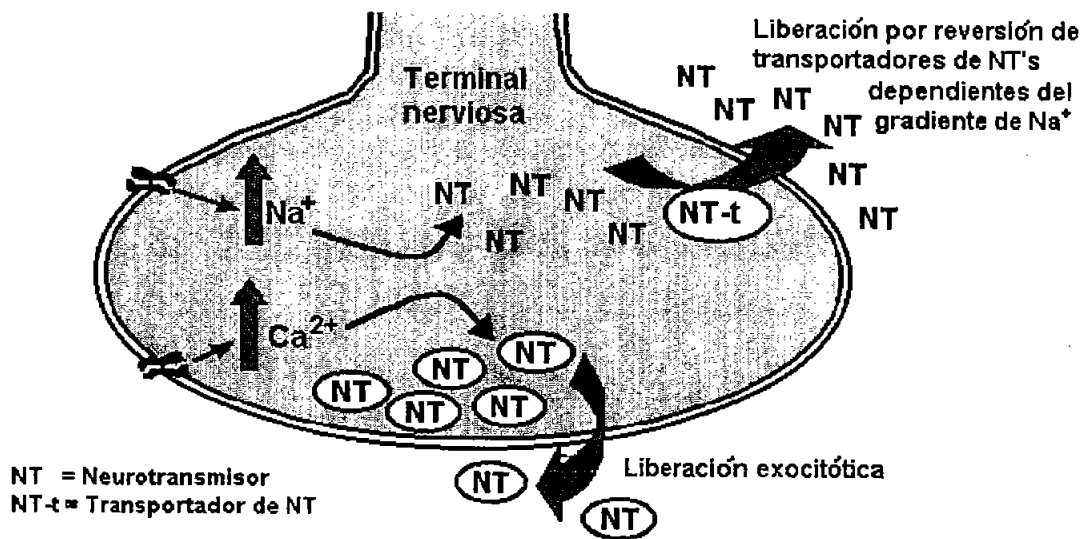


Fig. 2. Principales mecanismos de liberación de neurotransmisores. En la parte inferior de la figura se esquematiza el proceso de exocitosis tras la entrada de Ca^{2+} por los canales de calcio, y en la parte superior la liberación dependiente del aumento del sodio a través de la activación de los canales presinápticos de sodio y mediada por reversión de los transportadores de neurotransmisores.

Dado que la recaptura de los neurotransmisores por sus transportadores está acoplada al gradiente electroquímico de Na^+ , cuando se incrementa la concentración presináptica de Na^+ al interior de las terminales

nerviosas, los transportadores de neurotransmisores pueden actuar de forma reversa, transportando a los neurotransmisores hacia el exterior de la terminal, propiciando así su liberación por un mecanismo que no depende de la entrada del calcio extracelular. En la parte superior de la figura 2 se esquematiza la liberación de los neurotransmisores mediada por reversión de sus transportadores.

Además, se ha propuesto un tercer mecanismo de liberación de neurotransmisores, denominado "*kiss and run*" (Cousin y Robinson 2000; Stevens y Williams 2000). Este tercer mecanismo postula que cuando el poro de fusión se abre transitoriamente se produce una liberación exocitótica parcial, que difiere de la fusión total de la vesícula sináptica como sucede durante la exocitosis clásica. Este tipo de liberación ha sido reportado en neuronas cultivadas de hipocampo (Stevens y Williams 2000) y en sinaptosomas de corteza de rata (Cousin y Robinson 2000).

1.2. Generalidades sobre los tres iones que controlan la fisiología de las terminales nerviosas aisladas.

Las terminales nerviosas contienen en sus membranas diversos tipos de canales sensibles a voltaje entre los que destacan los de sodio, potasio y calcio. Los canales sensibles a voltaje están conformados por subunidades principales y auxiliares. En la subunidad principal α se encuentran los elementos necesarios para su funcionamiento básico: poro, compuerta, sensor de voltaje y sitios de modulación farmacológica. Las subunidades adicionales β y δ actúan como subunidades de modulación o de modificación de la función misma del canal.

1.2.1. Canales de sodio sensibles a voltaje

Los canales de sodio (Na_v) son proteínas heterotriméricas que consisten de una subunidad principal α , una $\beta 1$ y una $\beta 2$ (Catterall 1992). Las subunidades α han sido divididas en los subtipos I, II, IIA y III (Taylor y Narasimhan 1997), de estos, el IIA es el predominante en el cerebro de mamífero. Los canales de sodio IIA se distribuyen principalmente en axones y dendritas proximales y se encuentran con baja densidad en los somas neuronales. Los canales tipo I se encuentran principalmente en los somas celulares y en las dendritas y presentan baja densidad en los axones. Los canales tipo III se encuentran en cantidades significativas solo en cerebros inmaduros (Westenbroek y cols. 1989; Taylor y Narasimhan 1997). En las terminales nerviosas, hay una alta densidad de canales de sodio tipo IIA (Krueger y Blaustein 1980; Tamkun y Catterall 1981; Catterall 1992).

Sitios de modulación los canales de sodio sensibles a voltaje. A la fecha, se han descrito 6 sitios de unión a diversos agentes farmacológicos, como se ilustra en la figura 3. El sitio 1 se localiza en la boca del poro del canal: Es el sitio de unión de la tetrodotoxina (TTX) y las saxitoxina (α y β -STX). Estas toxinas se unen en el lado extracelular del canal. La tetrodotoxina se une con alta afinidad (K_d 1 – 10 nM para bloquear el paso del sodio) y es una de las herramientas más útiles para el estudio de los canales de sodio sensibles a voltaje (Hille, 1992; Cestéle y Catterall 2000). En el sitio 2 se unen con alta afinidad alcaloides como la veratridina o la batracotoxina. Estas toxinas causan una activación permanente del canal cuando éste se encuentra en un potencial de membrana en reposo mediante el bloqueo de la inactivación del canal, cambiando la dependencia de voltaje de activación a un potencial de membrana más negativo (Catterall 1992). En el poro del canal, se localiza el sitio de los anestésicos locales. Los anestésicos locales eliminan la propagación de los potenciales de acción bloqueando a los canales de sodio. Las toxinas peptídicas de escorpión (toxinas β de escorpión) y anémonas actúan específicamente sobre la

inactivación del canal uniéndose en el sitio 4. En el sitio 5 se unen brevetoxinas y ciguatoxinas, que aumentan la permeabilidad del ion sodio y modifican su inactivación. La figura 3 muestra los principales sitios de modulación farmacológica del canal de sodio.

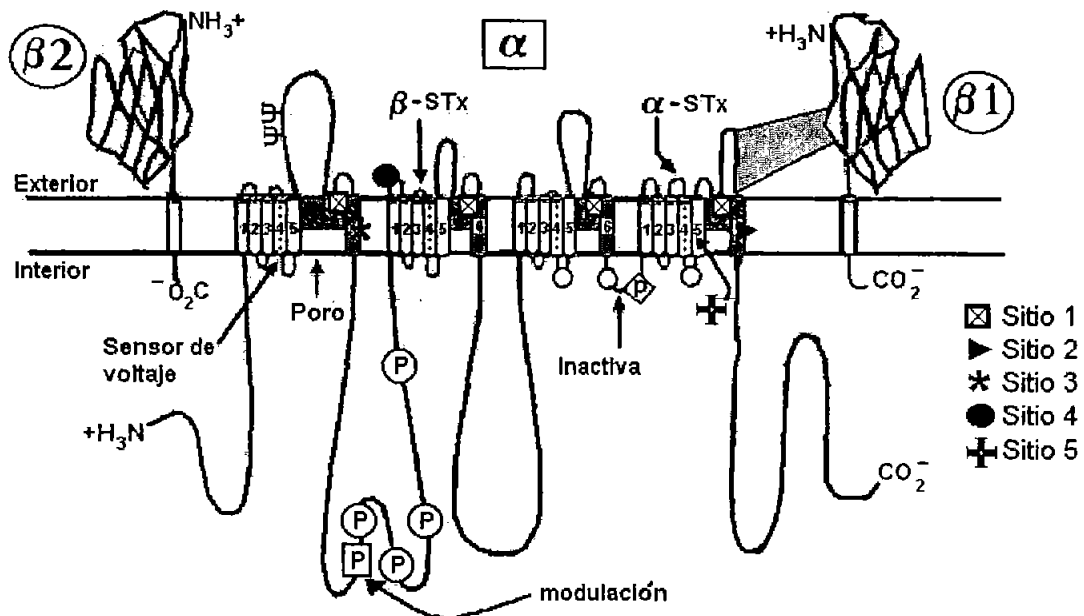


Fig. 3. Sitios de modulación farmacológica de los canal de sodio sensible a voltaje. En el sitio 1 se une la tetrodotoxina (TTX), y las saxitoxina (α y β -STX); en el sitio 2 se unen con alta afinidad la batracotoxina y la veratridina. Las toxinas de anémonas marinas se unen al sitio 3. En el poro del canal, se encuentra el sitio de unión de anestésicos locales. Las toxinas peptídicas de escorpión tipo β se unen al sitio 4 y en el sitio 5, la brevetoxina y la ciguatoxina se unen al canal (Modificado de Catterall, 1992)

1.2.2. Canales de potasio sensibles a voltaje

Desde los trabajos pioneros de Hodgkin y Huxley, el ion potasio, junto con el sodio, han sido reconocidos como los dos iones más importantes en la fisiología de las células excitables debido a que ambos están involucrados directamente en la generación de las respuestas eléctricas del SNC (Rudy 1980; Hille 1992).

Al igual que los canales de Na^+ y de Ca^{2+} sensibles a voltaje, los canales de K^+ se constituyen por subunidades α ; sin embargo, se requieren 4 subunidades α para formar un canal funcional de potasio que puede ser homomultímero o heteromultímero y cada una de estas subunidades puede tener asociadas varias subunidades β (Mathie y cols. 1998).

Los canales de K^+ son los encargados de estabilizar el potencial de membrana, pues su apertura mantiene a las células en un potencial negativo (hiperpolarizado) cercano al potencial de equilibrio de K^+ ($E_M \approx E_K$) y alejado del umbral de disparo. La apertura o cierre de los canales de potasio controla la forma y duración de los potenciales de acción, los intervalos inter-espigas y los patrones de disparo neuronal; además modulan los periodos de intensa actividad eléctrica, y en general disminuyen la efectividad de las entradas excitatorias en las células excitables (Hille 1992; Yi y cols. 2001).

La clonación de los canales de K^+ ha permitido la identificación de dos grandes familias dependiendo de sus propiedades biofísicas: los activados por voltaje (K_V) y los de rectificación entrante (K_{IR}). La familia de los canales de potasio activados por voltaje, se constituye por subunidades α con seis dominios transmembranales, mientras que sus subunidades β carecen de estos dominios. Los canales de rectificación entrante parecen estar lejanamente relacionados con los K_V y solo contienen dos posibles segmentos transmembranales en cada subunidad α (Jan y Jan, 1997). Adicionalmente a estos canales, también se ha descrito canales de "fuga" (leak) y canales de potasio activados por Na^+ .

Canales de potasio tipo K_v . La característica principal de estos canales es la presencia de un sensor de voltaje, lo que les permite ser controlados por el potencial de membrana. Un canal K_v tiene un poro grande en el que acomoda múltiples iones de potasio en una sola fila, lo que facilita su disociación de los sitios de unión del canal por repulsión electrostática, permitiendo así su permeación. Además, existe una serie de elementos estructurales que han sido involucrados en la permeación del potasio: el segmento S4-S5 que interactúa con los iones permeables, al igual que la partícula de inactivación que se localiza en el lado citoplásmico de la membrana y permite la oclusión del poro del canal interrumpiendo la permeación de iones. El segmento S6 contribuye también en la permeación desde la porción interna del poro y el segmento H5 o P, interactúa con las toxinas peptídicas del lado extracelular de la membrana (Jan y Jan; 1997).

Una vez que el canal de K^+ está activado por despolarización membranar, se echan a andar los mecanismos de inactivación. A la fecha se han descrito dos: inactivación tipo-N y tipo-C. Ambos mecanismos involucran elementos estructurales de las regiones N- y C-terminal de la subunidad α de los canales K_v . La inactivación tipo-N involucra al mecanismo de la "bola y cadena", en el cual el sitio N-terminal de cada una de las cuatro subunidades α sirve como una partícula de inactivación independiente y bloquea al lado citoplásmico del poro del canal posterior a su apertura, causando de esta manera su inactivación. El otro mecanismo, el tipo-C puede presentarse en ausencia de la inactivación tipo-N y parece estar involucrado en la boca exterior del poro del canal y se ha propuesto que esta inactivación genera cambios conformacionales en la estructura del canal.

Subtipos fisiológicos de corrientes de canales K_v . Los canales K_v generan dos tipos de corrientes: las de tipo A de inactivación rápida (I_A o I_{KA}) y las corrientes de inactivación lenta o de rectificación retardada (I_{KDR}). Tanto la I_A como la I_{KDR} han sido definidas ampliamente en función de frecuencia y grado de inactivación durante los pulsos de despolarización membranar. La I_A muestra una inactivación rápida, mientras que la I_{KDR} muestra muy poca

inactivación durante un pulso despolarizante de 100-200 ms. La inactivación de las dos corrientes también difiere considerablemente, ya que la I_A se encuentra completamente inactiva a potenciales de membrana despolarizados cercanos a -50 mV, mientras que la I_{KDR} no muestra una inactivación pronunciada al estado estacionario.

Herramientas para el estudio de canales de potasio. Existe una serie de fármacos bloqueadores de canales de K^+ como el tetraetilamonio (TEA) o la 4-Aminopiridina (4-AP); además de ciertas toxinas como la Carabidotoxina, la Apamina y las α -dendrotoxinas. Sin embargo estas toxinas no siempre tienen la selectividad deseada entre las diferentes corrientes de los canales nativos o las corrientes de los canales clonados (Hille, 1992., Mathie y cols., 1998).

El Tetraetilamonio. El TEA ha sido tradicionalmente visto como un agente bloqueador de la corriente tipo I_{KDR} y menos efectivo en el bloqueo de la I_A . El TEA puede bloquear a la I_{KDR} actuando en dos sitios: en el lado externo y en la cara interna del canal de K^+ . La acción del TEA en el lado externo del canal tiene diferentes efectos sobre la corriente I_{KDR} en diferentes tejidos; además el TEA no es selectivo entre las corrientes generadas por canales heteromultímeros que generan corrientes de rectificación retardada y requiere de concentraciones milimolares para bloquear canales de K^+ .

La 4-Aminopiridina (4-AP). La 4-AP es un bloqueador más potente de los canales tipo K_V y más específicamente, de los canales que generan la I_A . En contraste con los extensos estudios en el bloqueo de canales de K^+ con TEA, el mecanismo por el cual la aplicación externa de 4-AP bloquea estos canales, no es del todo claro. Se ha propuesto que la 4-AP puede actuar cruzando la membrana plasmática en su forma no modificada y actuar en la cara interna del canal. Una serie de estudios de mutagénesis de las subunidades α de los K_V apoyan esta hipótesis (Yi y cols. 2001; Stephens y cols. 1994).

En neuronas, la 4-AP puede bloquear la corriente I_A con una IC_{50} de ~2mM, mientras que ciertas corrientes tipo I_{KDR} son bloqueadas con una menor concentración (1-30 μ M). En adición, la selectividad de la 4-AP por las

corrientes I_A sobre las I_{KDR} no siempre es evidente como se ha visto en diversos experimentos; además, existen variaciones en la selectividad de la 4-AP dependiendo de la especie animal que se trate: la 4-AP bloquea al canal KV 1.3 de rata con una IC_{50} de 150-200 μ M, pero bloquea al canal KV 1.3 de ratón con una IC_{50} de 21 μ M. Otra complicación adicional es que la 4-AP bloquea por ejemplo, canales homoméricos KV1.4 con una IC_{50} de 1 mM y a los KV1.5 con una IC_{50} ~200 μ M; sin embargo cuando se quiere inhibir al canal heteromultímero KV1.4/KV1.5 tiene una IC_{50} \approx 7-8 mM resultando mucho menos potente (Mathie y cols., 1998, Yi y cols., 2001)

Toxinas peptídicas. Estas han sido de mucha utilidad debido a su unión de alta afinidad a las subunidades principales de canales de K^+ . Entre las toxinas bien caracterizadas se encuentran la carabidotoxina, la noxiustoxina y las α -dendrotoxinas (α -DTX), esta última utilizada por vez primera para el aislamiento y la purificación de las subunidades α de los canales de K^+ y en el descubrimiento de las subunidades auxiliares β . Estas toxinas tienen alta potencia, con una IC_{50} que oscila en el rango nanomolar. Sin embargo, las toxinas peptídicas no están consideradas dentro de las herramientas farmacológicas ideales en el estudio de los canales de K^+ , debido a que algunas son altamente selectivas para ciertas corrientes de K^+ , sin embargo otras apenas tienen capacidad discriminativa entre una y otra.

1.2.3. Canales de calcio sensibles a voltaje

El ion calcio juega un papel fundamental en la regulación de diversos procesos fisiológicos. Uno de los elementos centrales en la regulación de la entrada de calcio al interior de las terminales nerviosas es la presencia de canales de calcio sensibles a voltaje. La apertura y cierre de estos canales, mediada por estímulos despolarizantes, permite al Ca^{2+} pasar al interior de la célula siguiendo su gradiente electroquímico lo que genera una señal transitoria (Berridge 1998; Meir y cols. 1999).

Con base en su voltaje de activación, los canales de calcio han sido divididos en dos grandes grupos (Zhang y cols. 1993): los de bajo umbral o LVA, de "Low Voltage Activated" por sus siglas en ingles, y los de alto umbral o HVA de "High Voltage Activated". El primer grupo se activa con un voltaje cercano al potencial de reposo de las neuronas (≈ -70 mV), mientras que el segundo grupo tiene su umbral de activación muy por encima del potencial de reposo (≈ -30 y -10 mV). Farmacológicamente, los canales de calcio han sido agrupados de la siguiente manera:

Canales tipo L, N y T. El primer grupo de canales de calcio reconocidos usando agentes farmacológicos, fueron los que presentaban sensibilidad a las dihidropiridinas. Los canales HVA sensibles a dihidropiridinas se denominaron canales de calcio *tipo L*. Posteriormente, se determinó otro grupo de canales HVA no sensibles a dihidropiridinas mediante la toxina ω -conotoxina GVIA del caracol marino, *Conus geographus*; estos canales se denominaron *tipo N*. Un tercer grupo de canales de calcio, insensible a estos agentes farmacológicos y del tipo LVA, fueron nombrados canales *tipo T* por su activación transitoria (Meir y cols.1999). *Canales tipo P y Q.* Los canales *tipo P* fueron descritos por vez primera en las células de Purkinje del cerebelo. Se inhiben con la toxina ω -Agatoxina IVA. Curiosamente, al expresarse en ovocitos de la rana *Xenopus* presentan baja sensibilidad a la ω -Agatoxina IVA, lo que llevó a la propuesta de que existía otro tipo de canal sensible a voltaje del tipo HVA: los canales *tipo Q*. No es sencillo hacer una distinción farmacológica entre los canales tipo P y Q, por tal razón han sido agrupados como canales de calcio tipo *P/Q* (Meir y cols. 1999).

Canales tipo R. El bloqueo de los canales tipo L, T, N y P/Q no elimina completamente las corrientes de calcio, razón por la cual se propuso la existencia de otro grupo de canales de calcio: los canales *tipo R* (Zhang y cols. 1993). La actividad de estos canales se elimina en presencia de níquel (Meir y cols. 1999).

Los canales de calcio están distribuidos de manera específica en diversas regiones de las neuronas y juegan papeles específicos en el

proceso de liberación de neurotransmisores y en la propagación de la despolarización neuronal. Los canales tipo N y P/Q se colocan en casi todas las terminales nerviosas cerebrales y en diferente medida juegan un papel fundamental en la liberación de neurotransmisores (Sitges y Chiu 1995, 199b; Reuter 1996).

1.3. Papel de la ATPasa de Na^+/K^+ en las terminales nerviosas

Tras la generación y/o propagación de los potenciales de acción y la subsecuente liberación de neurotransmisores, se activan mecanismos para restaurar los gradientes iónicos y el potencial de membrana que ha sido modificado por la excitación neuronal. Un elemento central en este proceso regulativo, es la activación de la ATPasa de Na^+/K^+ (Fig. 4). De hecho, más de la mitad de la energía total del sistema nervioso central es usado por la ATPasa de Na^+/K^+ para mantener los gradientes de Na^+ y K^+ a través de la membrana celular (Erecinska y Dagain, 1990; Erecinska y cols. 1996; Takahashi y cols. 1999).

El proceso de transporte de la ATPasa implica el paso de 3 Na^+ hacia el exterior de la célula y de 2 K^+ hacia el interior acompañado de la hidrólisis de una molécula de ATP. En la parte orientada hacia el medio extracelular hay dos sitios de unión para el K^+ mientras que en la parte interna de la ATPasa hay tres sitios de unión al Na^+ y uno más para el ATP. Al unirse el ATP a la ATPasa ésta experimenta un cambio conformacional que impulsa los iones Na^+ y K^+ en contra de su gradiente de concentración, lo que permite la salida del sodio, acompañado de la entrada de potasio, avanzando en contra de su gradiente electroquímico. La ouabaina, que es un glicósido cardiaco, inhibe la función de la ATPasa de Na^+/K^+ cuando se une externamente a la proteína, donde usualmente se fija el K^+ (Fig. 4).

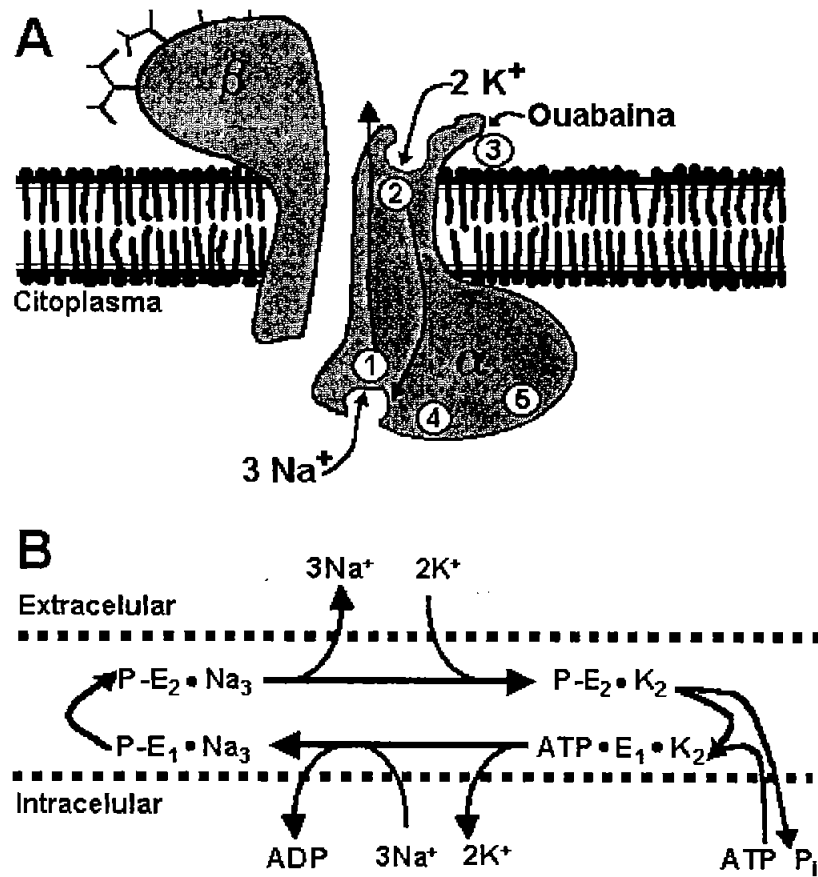


Fig. 4. La ATPasa de Na⁺/K⁺ El modelo de la ATPasa de Na⁺/K⁺ en (A) representa la formación de un heterodímero αβ con los sitios de unión para el Na⁺ (1), K⁺ (2), ouabaina (3), fosforilación (4) y el sitio de unión del ATP (5). El cuerpo de la subunidad β se encuentra principalmente en el espacio extracelular, mientras que el cuerpo de la subunidad α está localizado al interior de la membrana plasmática. (B) Esquema simplificado del ciclo de la ATPasa Na⁺/K⁺. E₁ y E₂ son las conformaciones de la enzima con sus sitios de unión a cationes (Na⁺ y K⁺) del lado citoplásmico o extracelular, respectivamente. P-E₁-Na₃ representa la translocación de carga que ocurre entre ese estado y la salida de iones de Na⁺ al lado extracelular. Los glicósidos cardíacos como la ouabaina solo se unen durante el estado E₂.

1.4. La sobreactivación de los canales de sodio y el daño neuronal

Los canales de sodio sensibles a voltaje juegan un papel fundamental en las terminales nerviosas, pues son los responsables de iniciar y conducir los potenciales de acción. La activación de estos canales está acompañada de un incremento en la concentración interna de Na^+ , que en turno, induce despolarización de las terminales nerviosas y un aumento en las descargas repetitivas de potenciales de acción. La despolarización de las terminales nerviosas permite la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje, elevando rápidamente la Ca_i que induce finalmente, liberación por exocitosis de los neurotransmisores desde las vesículas hacia la hendidura sináptica.

Durante la activación sostenida de los canales de sodio sensibles a voltaje se presenta una *sobrecarga* en la concentración interna de Na^+ y de Ca^{2+} (mediada por la activación de sus respectivos canales) que estimula la liberación de neurotransmisores, incluyendo a los neurotransmisores excitadores como el glutamato, que se encuentra especialmente concentrado en las terminales nerviosas (Sitges y cols. 2000). La liberación excesiva de neurotransmisores en respuesta a la despolarización por aumento en la permeabilidad a estos iones genera una cascada de eventos dañinos entre los que se incluyen, por ejemplo, el aumento *per se* del calcio intracelular, la despolarización membranar sostenida, cambios en la actividad enzimática de las proteasas, de las fosfolipasas y de las endonucleasas; además el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que bajo condiciones fisiológicas normales regularmente contribuye con el mantenimiento de una baja concentración interna de calcio sacando 1 Ca^{2+} por cada 3 Na^+ (proceso electrogénico que se realiza siguiendo al gradiente externo de Na^+), se altera completamente. Debido al aumento en la Na_i mediado por la despolarización membranar y a la sobreactivación de los canales de sodio sensibles a voltaje, el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ puede operar en su forma reversa, sacando al

Na⁺ y metiendo Ca²⁺. El aumento en el calcio intracelular por reversión del intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ está bien documentado (Haigney y cols. 1994; Stys y cols. 1992). En conjunto, estos eventos conducen al daño isquémico y a la muerte celular, como se esquematiza en la figura 5.

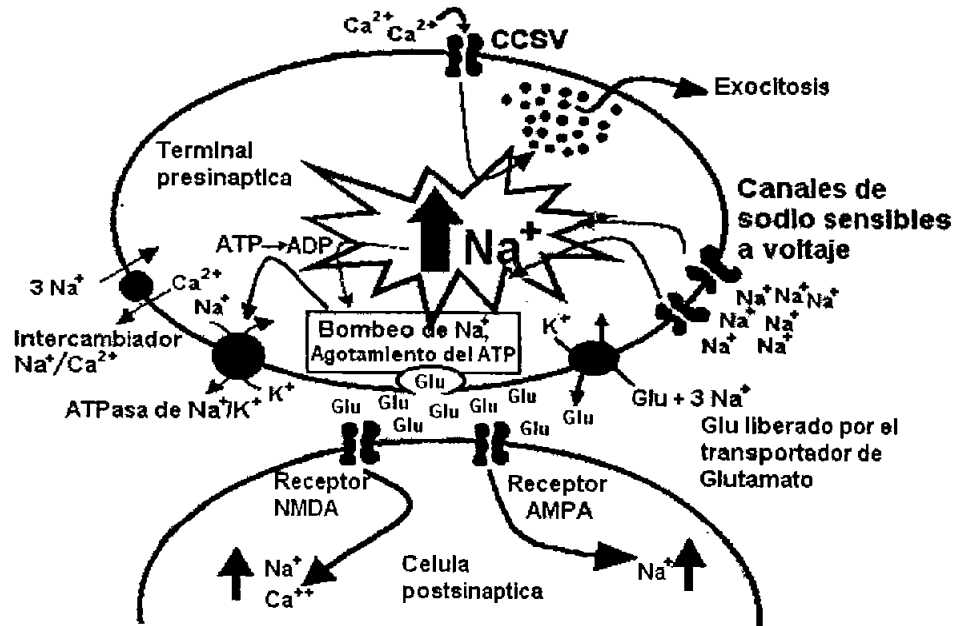


Fig. 5. La activación sostenida de los canales presinápticos de sodio. La sobreactivación de los canales de sodio, acompañado de la entrada masiva de Na⁺ al interior de las terminales nerviosas glutamatérgicas, es un evento que desencadena una serie de respuestas dañinas que van desde la despolarización membranar postsináptica, activación sostenida de los receptores de glutamato, aumento en liberación de neurotransmisores excitatorios, actividad desordenada de diversas enzimas, y una agotamiento en las reservas de ATP.

Los efectos dañinos que induce la sobreactivación de los canales de sodio ha permitido postular que la *modulación farmacológica negativa* de estos canales representa un estrategia terapéutica razonable contra el daño del tejido cerebral en situaciones patológicas como la isquemia cerebral, donde la demanda energética (producción de ATP) sobrepasa al suministro energético (Urenjak y Obrenovitch 1996). Los agentes que bloquean a los receptores de glutamato, a los canales de calcio o a los canales de sodio sensibles a voltaje, representan un importante grupo de fármacos con potencial neuroprotector. Consistentemente con este planteamiento, el

mecanismo de acción de muchos de los fármacos antiepilépticos utilizados comúnmente en la clínica están asociados con la *modulación negativa* o inhibición de los canales presinápticos cerebrales de sodio (Lingamaneni y Hemmings 1999).

En nuestro laboratorio ha estado en investigación un fármaco anticonvulsivante y bloqueador de canales de sodio como alternativa en estos efectos dañinos, que es la vinpocetina.

1.5. Vinpocetina

La vinpocetina cuya fórmula se muestra en la figura 6, es un fármaco nootrópico (del griego *nous*, mente y *tropos*, movimiento; refiere a drogas que actúan estimulando las capacidades cognitivas) con capacidades neuroprotectoras (Stolc, 1990; Santos y cols. 2000; Bönöczk y cols; 2000) que inhibe selectivamente el aumento en la concentración interna de Na^+ y la liberación de glutamato, aspartato y dopamina inducida por activación de los canales de sodio sensibles a voltaje con veratridina, mientras que no modifica ni el aumento en el Ca^{2+} interno ni la liberación de neurotransmisores inducida por un medio rico en K^+ externo (K^+ alto = 30 mM) (Sitges y Nekrassov 1999; Trejo y col. 2001).

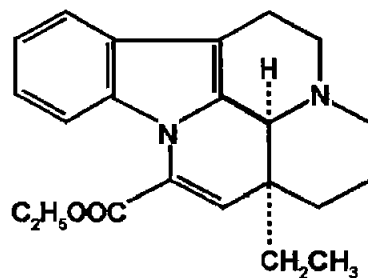


Fig. 6. Estructura de la vinpocetina, un derivado sintético de la flor de *Vinca minor* Linnae.

En la figura 7, tomada de Sitges y Nekrassov (1999), se muestra la inhibición que causa la vinpocetina sobre el aumento en el Na^+ y en la liberación de los

neurotransmisores excitadores glutamato y aspartato inducidos por veratridina. Además un trabajo del laboratorio demostró en el cobayo *in vivo* que la inyección previa intraperitoneal de vinpocetina (2 mg/kg) protege a los animales de las convulsiones inducidas por 4-AP (2 mg/kg). En este estudio se demostró que la administración previa de vinpocetina inhibe los cambios que induce la 4-AP en el electroencefalograma durante los periodos ictal y post-ictal de la actividad epiléptica cortical y también inhibe las alteraciones en amplitud y latencia de los potenciales auditivos evocados en presencia de 4-AP (Sitges y Nekrassov 2004).

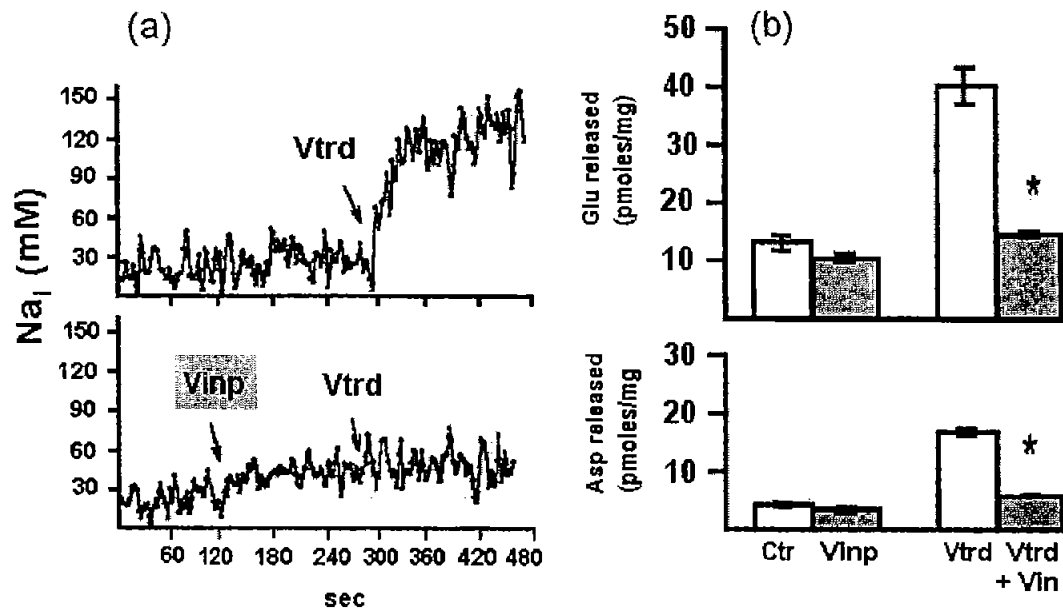


Fig. 7. La vinpocetina inhibe selectivamente las respuestas inducidas por la activación de los canales de sodio presinápticos. Sinaptosomas de estriado cargados con SBF1, (a) la vinpocetina es capaz de eliminar el aumento en la Na_i que induce el activador de canales de sodio, veratridina, y (b) elimina la liberación de neurotransmisores excitadores Glu y GABA que estimula la veratridina. (Sitges y Nekrassov 1999)

La actividad epileptiforme inducida por la 4-AP está ampliamente documentada tanto *in vitro* como en modelos de epilepsia experimental *in vivo* (Ives y Jefferys 1990; Frago-Veloz y Tapia, 1992; Psarropoulou y Avoli 1996; Morales-Villagran y cols. 1999; Armand y col. 1999; Peña y Tapia, 1999; Sitges y Nekrassov 2004). Por tal razón, en el presente proyecto se

exploró *in vitro* el mecanismo mediante el cual la vinpocetina previene la actividad epiléptica cortical inducida por 4-AP que ha sido observada *in vivo*. Para esto, se estudiaron los efectos de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i y el aumento en la Ca_i inducido por 4-AP en sinaptosomas de estriado.

Previo a este estudio, se decidió además, re-evaluar el mecanismo de acción presináptico del agente convulsivante 4-AP. Ambos estudios que constituyen el cuerpo de resultados de este trabajo se realizaron siguiendo la misma metodología, la cual se describe en la siguiente sección.

2. Métodos

2.1. La preparación sinaptosomal

Las terminales nerviosas son las estructuras especializadas de la neurona para la liberación de neurotransmisores. Las terminales nerviosas de cerebro completo o de alguna región cerebral del mamífero (conocidas como sinaptosomas), pueden ser aisladas por métodos bien establecidos. La obtención de esta preparación es equivalente a 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 trabajo experimental del presente proyecto se realizó en sinaptosomas aislados del cuerpo estriado perteneciente a los ganglios basales de la rata para también poder detectar la liberación del neurotransmisor dopamina, ya que esta estructura cerebral contiene el 90% de las terminales dopaminérgicas del cerebro. Además en los sinaptosomas de estriado están contenidas tanto las terminales nerviosas dopaminérgicas provenientes de la *substancia nigra*, cómo las terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza así como las terminales de las interneuronas GABAérgicas.

2.2. Obtención de los sinaptosomas

Se disecan los estriados de cuatro ratas macho Wistar de ≈ 250 g; se homogeneizan en sacarosa 0.32 M (1:9 peso:volumen) a 2,000 r.p.m. El resultante se centrifuga a 1,500 x g durante 10 min. Este primer

sobrenadante vuelve a ser centrifugado, ahora a 9,000 x g durante 20 minutos para obtener la fracción sinaptosomal cruda P2. Esta fracción sinaptosomal (P2), además de incluir a las terminales nerviosas propiamente, contiene también mitocondrias. Como no existe una diferencia significativa en los resultados que se obtienen con sinaptosomas de la fracción P2 vs. sinaptosomas purificados de la fracción P4 (Sitges y Chiu, 1995; Rodríguez y Sitges, 1996; Sitges y Galindo, 2005), se decidió utilizar esta primer fracción sinaptosomal P2 para realizar los experimentos.

El procedimiento de obtención de sinaptosomas se realiza a una temperatura de 4°C. A continuación, la fracción sinaptosomal P2 se resuspende en un Ringer Krebs HEPES con la siguiente constitución milimolar: 147 NaCl, 1.2 KH₂PO₄, 3.37 KCl, 1 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 20 HEPES, y 5.6 de dextrosa, a un pH de 7.4 burbujeados con una mezcla de O₂/CO₂.

2.3. Estrategias para despolarizar a los sinaptosomas

El tamaño de los sinaptosomas varía de 0.1 μM hasta 1 μM, lo que impide emplear métodos electrofisiológicos para despolarizarlos. Esta imposibilidad ha llevado a los neuroquímicos a idear estrategias alternativas. Por la ecuación de Goldman sabemos que se puede llevar al potencial de membrana en el sentido de la despolarización, que culmina en la liberación de los neurotransmisores, cuando por ejemplo se sustituye la baja concentración externa de K⁺ ([K⁺]_o) en reposo por una [K⁺]_o elevada, o al aumentar la permeabilidad al Na⁺ (P_{Na}) (Sitges 1993). Así, 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), el uso de toxinas como la veratridina, que incrementan la permeabilidad al Na⁺, o el uso de bloqueadores de canales de K⁺ como la 4-aminopiridina (4-AP). La liberación de

neurotransmisores inducida por cada una de esas 3 estrategias de despolarización, sin embargo, presenta distintas características. La liberación inducida con K^+ alto por ejemplo, requiere de la disponibilidad de los canales de Ca^{2+} pero no involucra a los canales de Na^+ . La liberación de neurotransmisores inducida por veratridina es por el contrario, completamente dependiente de la disponibilidad de los canales de Na^+ (Sitges y cols. 1993; Sitges y Chiu 1995b), y la inducida por 4-AP requiere de la disponibilidad de los canales de Ca^{2+} y posiblemente también involucra a los canales de Na^+ (Tibbs y col. 1989), Aunque desde hace 14 años Sitges y cols. (1986) demostraron que el mecanismo primario que desencadena la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro completo de ratón inducida por la 4-AP y la noxiustoxina, es el bloqueo de los canales de K^+ .

2.4. Determinación de la concentración interna de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en los sinaptosomas

La cuantificación de los iones internos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} se realizó mediante los indicadores fluorescentes específicos para los diferentes iones usando el método estandarizado en el laboratorio (Sitges y Chiu, 1995; Sitges y cols. 1998). Brevemente, la fracción sinaptosomal P2 se incubó con SBFI-AM (Sodium-Binding benzofuran isophthalate por sus siglas en inglés), (10 μM) o fura-2-AM (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl) - 6 - aminobenzofuran-5-oxy] - 2 - (2'-amino-5'-methylphenoxy)- ethane-N,N,N',N' - tetraacetic acid) (5 μM) (para Na^+ y Ca^{2+} , respectivamente) por 45 min. Para la estimación de la K^+ , mediante la fluorescencia del PBFI (Potassium-Binding benzofuran isophthalate) (10 μM), los sinaptosomas se incubaron durante 50 minutos; a una temperatura de 37°C. Posterior a la incubación, se eliminó el indicador no incorporado mediante una dilución y una segunda centrifugación. El *pellet* resultante se resuspendió en 1.5 ml de KRH. Esta suspensión sinaptosomal

fue mantenida a 4°C en la oscuridad y los experimentos se realizaron en un periodo no mayor a 2 horas después de obtenida la preparación. La fluorescencia del Na⁺, K⁺ o Ca²⁺ en las alícuotas de sinaptosomas (350 µg / ml de proteína sinaptosomal) fue medida en un espectrofluorómetro conectado *on-line* a una PC-IBM compatible. Las longitudes de excitación asignadas fueron de 340 y 380 nm, y la longitud de emisión fue de 505 nm; los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 – 25°C).

La recolección de datos se tomó en intervalos de 1.8 segundos. Después de medir la relación 340/380 nm en condiciones control por 3-4 minutos, los sinaptosomas fueron tratados con 4-AP o los fármacos a probar y se realizó la recolección de datos por otros 3-5 minutos. El método para la estimación de la concentración interna milimolar de sodio ha sido reportado previamente (Rodríguez y Sitges, 1996) y la concentración interna de calcio fue estimada mediante la fluorescencia del fura-2 siguiendo el método estandarizado por Grynkiewicz y cols. (1985).

La eficacia del PBFI para monitorear el potasio intracelular. El PBFI consta de un fluoróforo de benzofuranil unido a un éter quelador de corona. La cavidad en la corona le confiere selectividad al K⁺ sobre el Na⁺. Cuando los iones de K⁺ se unen al PBFI, el rendimiento cuántico de la fluorescencia del indicador aumenta; su pico de excitación se reduce y su excitación máxima cambia a una longitud de onda mas corta, causando un cambio significativo en la intensidad de la fluorescencia 340/380 nm. Esta señal es ligeramente sensible a cambios en el pH entre 6.5-7.5, además, de que la fluorescencia del PBFI varía dependiendo de la concentración presente de K⁺. Aunque la selectividad del PBFI es considerablemente menor que la selectividad del fura-2 por el calcio o el SBFI por el sodio, esta es suficiente para la detección de K⁺ en presencia de otros iones monovalentes como el Na⁺ y el H⁺ mientras estos se encuentren en rangos fisiológicos (Kazner y cols. 1992; Minta y Tsien, 1989).

2.5. Experimentos de liberación de neurotransmisores endógenos

En nuestro 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). Los aminoácidos endógenos, Glu y GABA se determinan posteriormente a su derivatización con OPA (ortho-ftalaldehído) por medio de un detector de fluorescencia. La concentración de dopamina se determinó mediante un detector electroquímico. A continuación se detalla este método.

Los sinaptosomas ($300 \pm 23 \mu\text{g}$) se suspendieron en 500 μl de KRH y se preincubaron durante 5 minutos a una temperatura de 37°C antes de la exposición a las drogas que se probaron (KRH con 30 mM K^+ , 10 μM de veratridina, 1 mM de 4-AP, o 100 μM de ouabaina en ausencia o presencia de 1 μM de tetrodotoxina) y se volvieron a incubar durante otros 10 minutos. Esta incubación se detuvo mediante una centrifugación. A los sobrenadantes de esta centrifugación (donde están contenidos los neurotransmisores liberados) se les agrega 5 μl de ácido perclórico (PCA/EDTA 0.1 M y 0.1 mM respectivamente) y se almacenan a -40°C para su posterior análisis. El PCA acidifica el KRH donde están contenidos los neurotransmisores y les confiere mayor estabilidad. La acidificación evita la degradación de aminoácidos y especialmente, catecolaminas (Murai y cols. 1988). Para estandarizar la liberación de los neurotransmisores por mg de proteína sinaptosomal, los *pellets* resultantes fueron utilizados para determinación de proteína. Las muestras con los neurotransmisores liberados se inyectaron en el sistema de HPLC en los días subsecuentes al experimento.

2.6. Determinación de la concentración de DA

Se tomaron 20 μ l de la muestra suspendida en PCA/EDTA (0.1M/0.1mM) y se inyectó directamente en el sistema Waters de HPLC para su análisis. En este caso, el sistema de HPLC consistió de una bomba (modelo 600), un inyector de reodina, una columna analítica (C18, 150 x 3.9 mm de diámetro interno, con una partícula de 5 μ M de tamaño) con control de temperatura a 30°C, y un detector electroquímico (modelo DECADE) con un electrodo de carbón vidriado mantenido a un voltaje de +0.8 V vs un electrodo de referencia de KCl (3M) con un rango de 1 nA. La fase móvil consistió de 50 mM de ácido orto-fosfórico con un buffer de 50 mM de ácido cítrico, pH 3.1 ajustado con KOH, con metanol al 5% (vol/vol), 100 mg/L de ácido octanesulfónico y 20 mg/L de EDTA, con un flujo de 1ml/min para la separación de la DA. La concentración del neurotransmisor en las muestras de los experimentos se calculó con curvas de calibración obtenidas de muestras con concentraciones crecientes de DA, Glu y GABA que fueron inyectadas en el sistema de HPLC.

2.7. Determinación de la concentración de Glu y GABA

Para cuantificar a los neurotransmisores aminoácidos, se toman muestras de 10 μ l suspendidas en PCA/EDTA (0.1 M/0.1 mM) y se mezclaron con 20 μ l de OPA. Tras 120 segundos una alícuota de 10 μ l se inyectó en el sistema de HPLC. La columna analítica de este sistema de HPLC fue una Nova-Pack C18, con un diámetro de 75 x 3.9 mm, con una partícula de 10 μ M de tamaño, mantenida a una temperatura de 25°C y acoplada a un detector de fluorescencia con una excitación a 360 nm (λ) y una emisión a 450 nM. Para la separación de los aminoácidos se aplicó un programa de gradiente lineal

durante 30 minutos con la composición siguiente: la fase móvil A (30 mM de buffer de acetato de sodio con pH de 6.8) con un gradiente de 100% a 50% y la fase móvil B (metanol) de 0% a 50% a un flujo de 1 ml/min. Las concentraciones de Glu y GABA en las muestras experimentales se calcularon con curvas obtenidas de estándares con concentraciones crecientes de los transmisores tras una derivatización con OPA e inyectadas al sistema de HPLC.

2.8. Estadística

Se aplicó la prueba de *t de Student* para las evaluaciones estadísticas. Con una $P < 0.05$, los resultados se tomaron como estadísticamente significativos.

3. Estudio I: Caracterización de la participación de los canales de sodio sobre el aumento en el Na⁺ inducido por 4-aminopiridina en sinaptosomas

3.1. Generalidades del mecanismo de acción de la 4-AP

La 4-AP, cuya estructura se ilustra en la figura 8, es un agente convulsivante que induce liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central. La capacidad de la 4-AP para producir actividad epileptiforme en preparaciones in vitro o inducir convulsiones en el modelo animal está ampliamente documentada (Ives y Jefferys 1990; Psarropoulou y Avoli 1996; Armand y cols. 1999). Las propiedades convulsivantes de la 4-AP también han sido descritas en humanos (Spyker y cols. 1980).

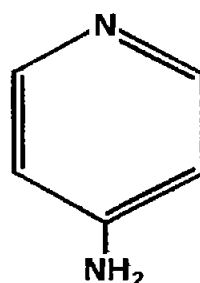


Fig. 8. Estructura de la 4-Aminopiridina (4-AP)

A nivel presináptico la acción de la 4-AP está ampliamente documentada. Hace más de 20 años, Tapia y Sitges (1982) describieron que en sinaptosomas de cerebro completo de ratón precargados con glutamato radioactivo ([¹⁴C]Glu), GABA radioactivo ([³H]GABA) o con colina radioactiva ([³H-Ch), la 4-AP aumentaba la liberación basal de los neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores. La acción estimuladora de la liberación

de neurotransmisores inducida por 4-AP fue confirmada posteriormente para glutamato endógeno (Glu), mediante experimentos de fluorimetría continua en sinaptosomas cerebrocorticales de cobayo (Tibbs y cols. 1989) y para dopamina radioactiva ($[^3\text{H}]\text{DA}$) cargada previamente en sinaptosomas de estriado de rata (Scheer y Lavoie; 1991; Carvalho y cols. 1995), como se ilustra en las figuras 9 y 10, respectivamente.

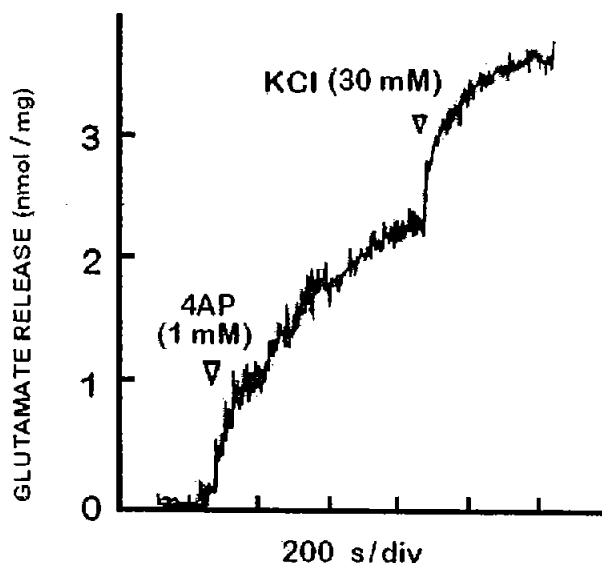


Fig. 9. La 4-AP estimula la liberación de glutamato endógeno. Tibbs y cols. (1989) demostraron a través de un ensayo de fluorimetría continua en sinaptosomas cerebrocorticales de cobayo que la 4-AP 1 mM induce liberación de glutamato (Modificado de Tibbs y cols. 1989)

La dependencia de calcio externo para la estimulación de la liberación de neurotransmisores que induce la 4-AP parece depender directamente de la concentración de 4-AP. Por ejemplo, Tapia y Sitges (1982) demostraron que, en sinaptosomas de cerebro completo de ratón precargados con $[^{14}\text{C}]\text{Glu}$ y $[^3\text{H}]\text{GABA}$, la liberación de ambos neurotransmisores inducida con 50 μM de 4-AP depende totalmente de la presencia de calcio externo, mientras que la liberación de estos mismos neurotransmisores inducida por 4-AP a una concentración de 2 mM no requiere de la presencia de dicho catión divalente. Posteriormente, en sinaptosomas de estriado de rata precargados con $[^3\text{H}]\text{DA}$, Carvalho y cols (1995) encontraron que la

liberación de este neurotransmisor inducida por 0.1 mM de 4-AP, dependía totalmente de la presencia de calcio externo, mientras que la liberación de la [³H]DA inducida por la 4-AP a una concentración más elevada (1 mM) no dependía en absoluto de la presencia de calcio externo. En la figura 10, tomada del trabajo de Carvalho y colaboradores se ilustra este punto.

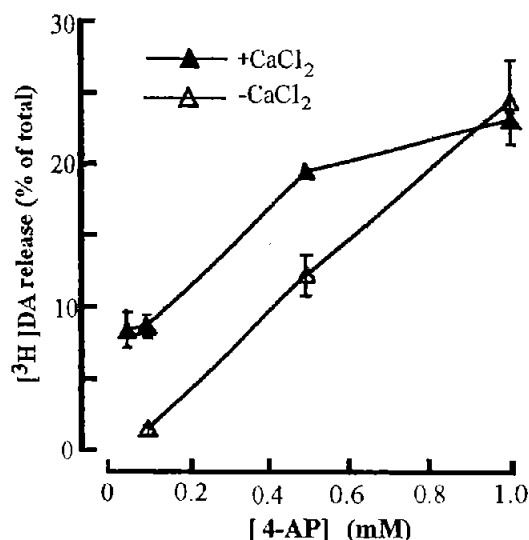


Fig. 10. La 4-AP induce liberación de [³H]DA. La dependencia de calcio para la liberación de [³H]DA que induce la 4-AP en sinaptosomas de estriado de rata, depende de la concentración de 4-AP. La liberación de [³H]DA con 0.1 mM de 4-AP depende totalmente de la presencia de calcio extracelular, sin embargo, la liberación del mismo neurotransmisor con 1 mM de 4-AP no requiere calcio externo (Tomado de Carvalho y cols. 1992).

Como se mencionó anteriormente (sección 1.1) para que los neurotransmisores sean liberados por exocitosis, se requiere de la entrada de calcio externo. Sin embargo, cuando la concentración interna de Na⁺ se eleva substancialmente, los neurotransmisores pueden ser liberados por la reversión de los transportadores de neurotransmisores aún en ausencia del calcio externo (Tapia y cols. 1985; Sihra y Nicholls 1987; Nicholls 1989; Sitges 1989; Adam-Vizi 1992; Sitges y cols. 1993; Sitges y cols. 1994; Raiteri y cols. 2002, 2002b). En consecuencia, la liberación de neurotransmisores que induce una dosis alta de 4-AP (1 – 2 mM) en ausencia de calcio externo, puede indicar que la 4-AP es capaz de elevar la concentración interna de

sodio en las terminales nerviosas cerebrales. Además, el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP en sinaptosomas es sensible al bloqueador de los canales de sodio, tetrodotoxina (Tibbs y cols. 1989; Heemskerk y cols. 1991), lo que sugiere una posible participación de los canales de sodio en el mecanismo de acción de la 4-AP. Sin embargo, la posible participación de estos canales en el mecanismo de acción de la 4-AP no ha sido investigada hasta la fecha.

Por otra parte, los cambios en el movimiento de $^{86}Rb^+$ que induce la 4-AP en sinaptosomas indican la participación de los canales de K^+ en el modo de acción de la 4-AP en las terminales nerviosas (Sitges y cols. 1986; Tibbs y cols. 1996).

Con el propósito de comprender el aparentemente complejo modo de acción presináptico de la 4-AP, se investigó su efecto sobre la concentración interna de los tres iones que controlan la fisiología de las terminales nerviosas en sinaptosomas de estriado precargados con los indicadores fluorescentes: SBF1, PBF1 y fura-2, que cambian su emisión en respuesta a cambios en la concentración interna de Na^+ , K^+ o Ca^{2+} , respectivamente.

En esta primera parte del proyecto de investigación se presenta una caracterización de la participación de los canales de sodio sensibles a voltaje en los cambios de las concentraciones internas de los iones Na_i , K_i , Ca_i a diferentes concentraciones y revela nuevos aspectos del modo de acción de la 4-AP en las terminales nerviosas.

3.2. Resultados

3.2.1. Efectos de la 4-AP sobre la Na_i

Se cargaron las terminales nerviosas de estriado de rata con el indicador sensible a sodio, SBFI. Se probaron diferentes concentraciones de 4-AP y se examinaron los cambios en la Na_i .

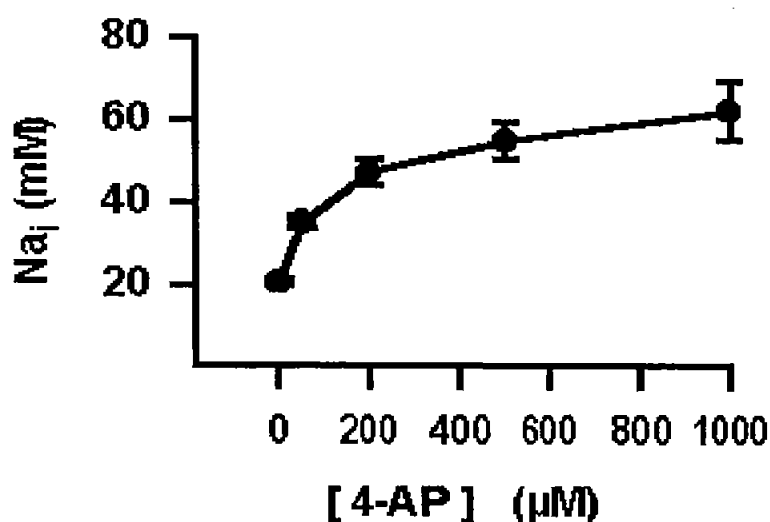


Fig. 11. Efectos de concentraciones crecientes de 4-AP sobre la Na_i . Sinaptosomas de estriado precargados con SBFI. La concentración interna de sodio se calculó como se indica en la sección de métodos. Después de medir la Na_i durante 5 minutos los sinaptosomas se expusieron a las concentraciones finales de 4-AP que se indican en el eje de las abscisas de la gráfica. Después de cada adición de 4-AP, la Na_i se midió durante 5 minutos más. La gráfica es el promedio de la Na_i \pm error estándar de 7 experimentos en preparaciones independientes y en paralelo.

En condiciones basales, la Na_i calculada en los sinaptosomas fue de 20.6 ± 0.8 mM. La adición de 0.05 mM de 4-AP aumenta la Na_i hasta 35.1 ± 1 mM y la exposición subsecuente a concentraciones crecientes (0.2 mM, 0.5 mM y 1 mM) de 4-AP aumenta la Na_i a 47.3 ± 3 , 55 ± 4 y 62.3 ± 7 mM

respectivamente. La figura 11 ilustra los efectos de las concentraciones crecientes de 4-AP sobre la Na_i .

3.2.2. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i inducida por 4-AP

Para examinar la posible participación de los canales de sodio sensibles a voltaje sobre el aumento en la Na_i que induce la 4-AP, se probó el efecto del bloqueador selectivo de canales de sodio, tetrodotoxina. Las concentraciones de 4-AP que se probaron fueron 0.1 mM y 1 mM. La figura 12a muestra que el aumento en la Na_i que induce 0.1 mM de 4-AP es eliminado completamente en presencia de 1 μ M de tetrodotoxina; mientras que el aumento en la Na_i que induce 1 mM de 4-AP solo se reduce en 34% con tetrodotoxina (Fig. 12b). Las respuestas desarrolladas a 0.1 mM y 1 mM en ausencia y presencia de tetrodotoxina se ilustran en la parte inferior de la figura 12.

A continuación, se comparó el efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce el activador de los canales de sodio, veratridina, así como el inhibidor de la ATPasa de Na^+/K^+ , ouabaina.

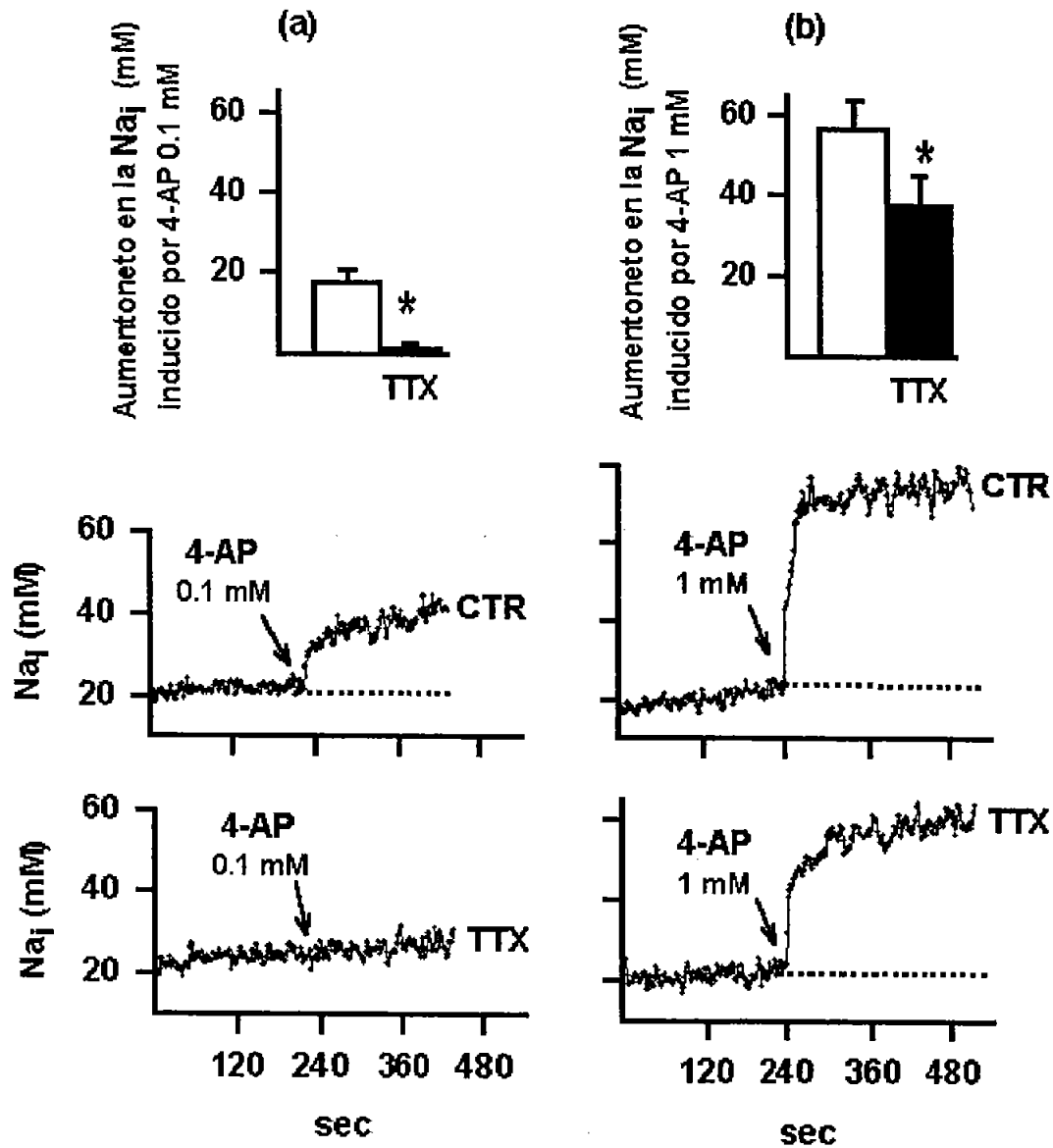


Fig. 12. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la 4-AP Sinaptosomas de estriado precargados con SBFi. Después de medirse la Na_i en ausencia o presencia de $1 \mu M$ de tetrodotoxina durante 4 minutos, los sinaptosomas fueron expuestos a 0.1 mM de 4-AP (a) o 1 mM de 4-AP (b) y se midió la Na_i 4 minutos más. Gráficas superiores: El aumento neto del sodio interno se refiere a la respuesta de la Na_i a la 4-AP (promedio de la respuesta tras la aplicación de la 4-AP) menos el valor basal de la Na_i en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de tetrodotoxina. Las barras representan el promedio \pm SEM de 4 (a) o 7 (b) experimentos independientes. $*P < 0.05$ entre la respuesta de la Na_i con 4-AP, en presencia o ausencia de tetrodotoxina. Gráficas inferiores: experimentos representativos que muestran la cinética de la Na_i en respuesta a 4-AP a las concentraciones indicadas, en ausencia (CTRL) o presencia de $1 \mu M$ de tetrodotoxina.

3.2.3. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i inducida con veratridina y ouabaina

En concordancia con estudios previos que demostraron (Sitges y Nekrassov 1999; Gutser y Gleitz 1998) el efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la veratridina y la ouabaina, bajo las presentes condiciones experimentales, la tetrodotoxina también eliminó el aumento en la Na_i inducido tras la activación persistente de los canales de sodio con veratridina (Fig. 13a), y solo produjo una inhibición parcial del aumento en la Na_i inducido por el bloqueo de la ATPasa de Na^+/K^+ , con ouabaina (Fig. 13b).

Por ejemplo, 1 μM de tetrodotoxina elimina alrededor de 96% de la respuesta inducida con 10 μM de veratridina y 22 y 27% de la respuesta inducida por 20 y 50 μM de ouabaina, respectivamente. Los experimentos representativos de sodio en respuesta a veratridina y a ouabaina en ausencia y presencia de tetrodotoxina se ilustran en las gráficas inferiores de la figura 13.

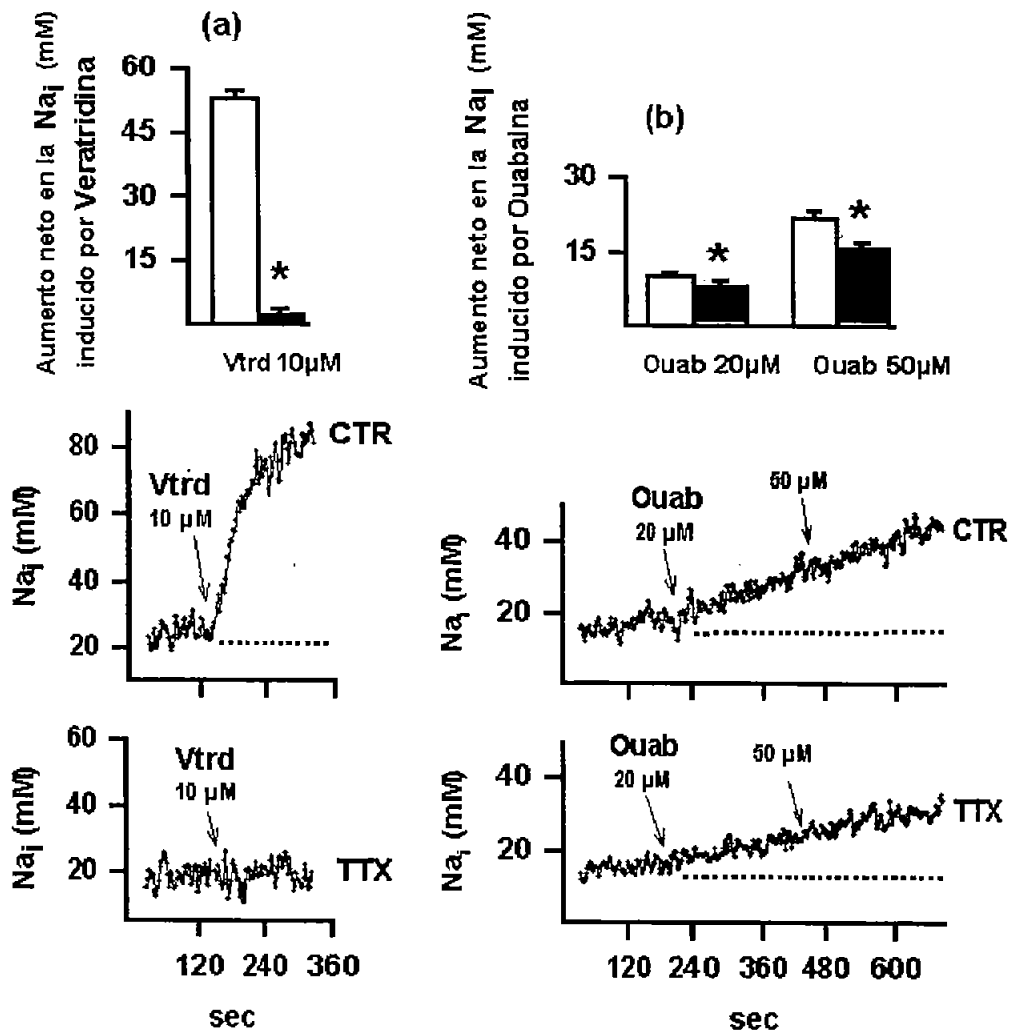


Fig. 13. Efecto de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la veratridina y la ouabaina. Sinaptosomas precargados con SBF1. Después de medir la Na_i durante 4 minutos, los sinaptosomas se expusieron a 10 μ M de veratridina (a) o 20 y 50 μ M de ouabaina (b) y se midió la Na_i durante el tiempo señalado. Gráficas superiores: aumento neto de la Na_i en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de 1 μ M de tetrodotoxina. Las barras son el promedio de 4 (a) o 6 (b) experimentos independientes. * $P < 0.05$ entre la respuesta de la Na_i a veratridina o ouabaina en ausencia o presencia de tetrodotoxina. Gráficas inferiores: experimentos representativos que muestran la cinética del aumento en la Na_i inducido por veratridina o ouabaina en ausencia (CTR) o presencia de tetrodotoxina (TTX).

3.2.4. Efectos de ouabaina, 4-AP y veratridina sobre la K_i

Considerando que, cuando la ATPasa de Na^+/K^+ se detiene, el K^+ externo no puede ser bombeado hacia el interior y el Na^+ no puede ser sacado, probamos los efectos de la ouabaina sobre la proporción de fluorescencia de 340/380 nM del PBFI para examinar si la ATPasa de Na^+/K^+ podría estar involucrada en el mecanismo por el cual, la ouabaina a la concentración de 100 μM aumenta la Na_i dos terceras partes de manera insensible a tetrodotoxina. La figura 14 muestra que la exposición de los sinaptosomas a la ouabaina disminuye la fluorescencia del PBFI. Los efectos sobre la K_i (determinados por la proporción de fluorescencia del PBFI) de 4-AP 1 mM, 10 μM de veratridina y 4-AP 0.1 mM también se muestran en la figura 14. La concentración alta de 4-AP (que al igual que la ouabaina aumenta una fracción de la Na_i de una manera insensible a tetrodotoxina) induce una pronunciada reducción de la K_i (Fig. 14b). En contraste, 10 μM de veratridina y la 4-AP a la concentración de 0.1 mM (ambos fármacos incapaces de aumentar la Na_i en presencia de tetrodotoxina), también fallan en modificar la K_i (Figs. 14c y 14d, respectivamente).

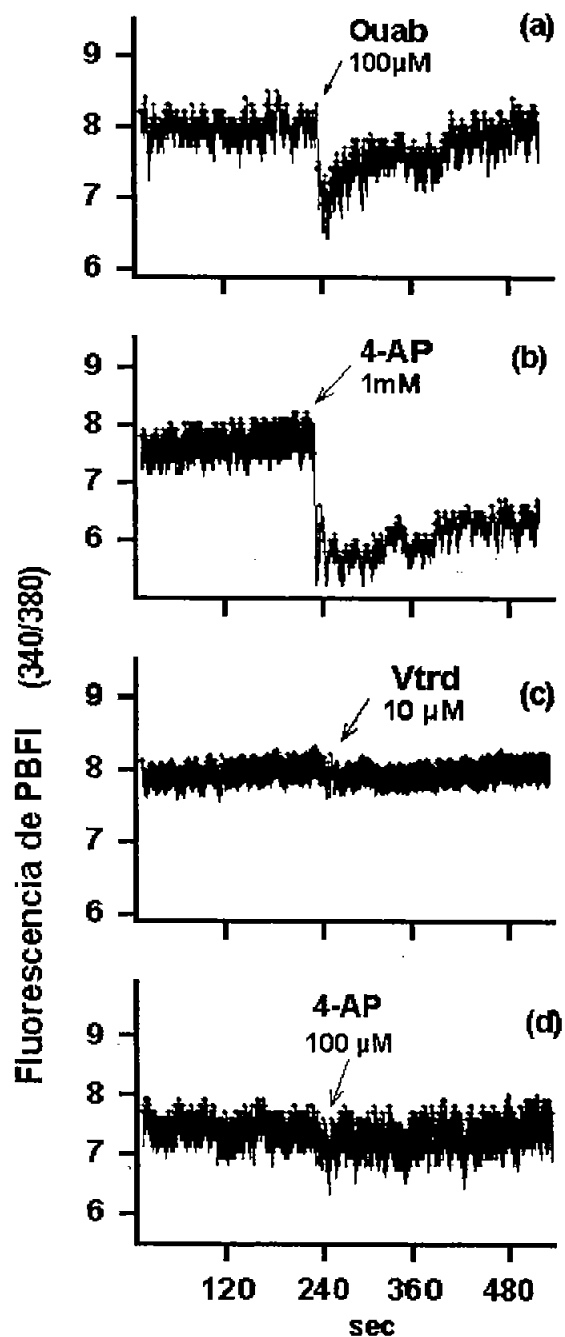


Fig. 14. Efecto de la ouabaina, veratridina y 4-AP sobre la K_i . Sinaptosomas precargados con PBF1, como se describe en la sección de método. Los datos fueron recolectados en intervalos de 1.8 seg. Después de medir la fluorescencia de 340/380 del PBF1 4 minutos, los sinaptosomas fueron expuestos a 100 μ M de ouabaina (a), 1 mM de 4-AP (b), 10 μ M de veratridina (c), o 0.1 mM de 4-AP (d). Tras cada adición se midió la fluorescencia del PBF1 5 minutos más. Las gráficas se construyeron a partir del promedio de 5 (a), 7 (b), 6 (c) y 5 (d) experimentos independientes.

3.2.5. Efecto de los bloqueadores de canales de sodio y de calcio sobre el aumento en la Ca_i inducida por 4-AP

En contraste con la eficacia de 1 mM de 4-AP en comparación con 0.1 mM de 4-AP para elevar la Na_i , el efecto de la 4-AP sobre el aumento en la Ca_i no dependió de la concentración de la 4-AP, como se ilustra en la figura 15a y 15b. Por tal razón, se probaron los efectos de la tetrodotoxina, al igual que las toxinas bloqueadoras de los canales de calcio en sinaptosomas expuestos subsecuentemente a las dos concentraciones de 4-AP.

En concordancia con estudios previos que demostraron que en sinaptosomas precargados con fura-2, 1 μ M de tetrodotoxina ejerce una pronunciada inhibición del aumento en la Ca_i que induce 0.1 mM de 4-AP (Heemskerk y cols. 1991), así como también con 1 mM de 4-AP (Tibbs y cols. 1989) en el presente estudio se encontró que la respuesta en la Ca_i inducida por la 4-AP a ambas dosis, se inhibe substancialmente con tetrodotoxina (Fig. 15c); notablemente, el bloqueo de los canales de calcio con ω -AGA IVA en combinación de ω -CnTx GVIA, bloqueadores de los canales de calcio tipo P/Q y N, inhiben el aumento en la Ca_i inducido por la adición secuencial de 0.1 y 1 mM de 4-AP (Fig. 15d).

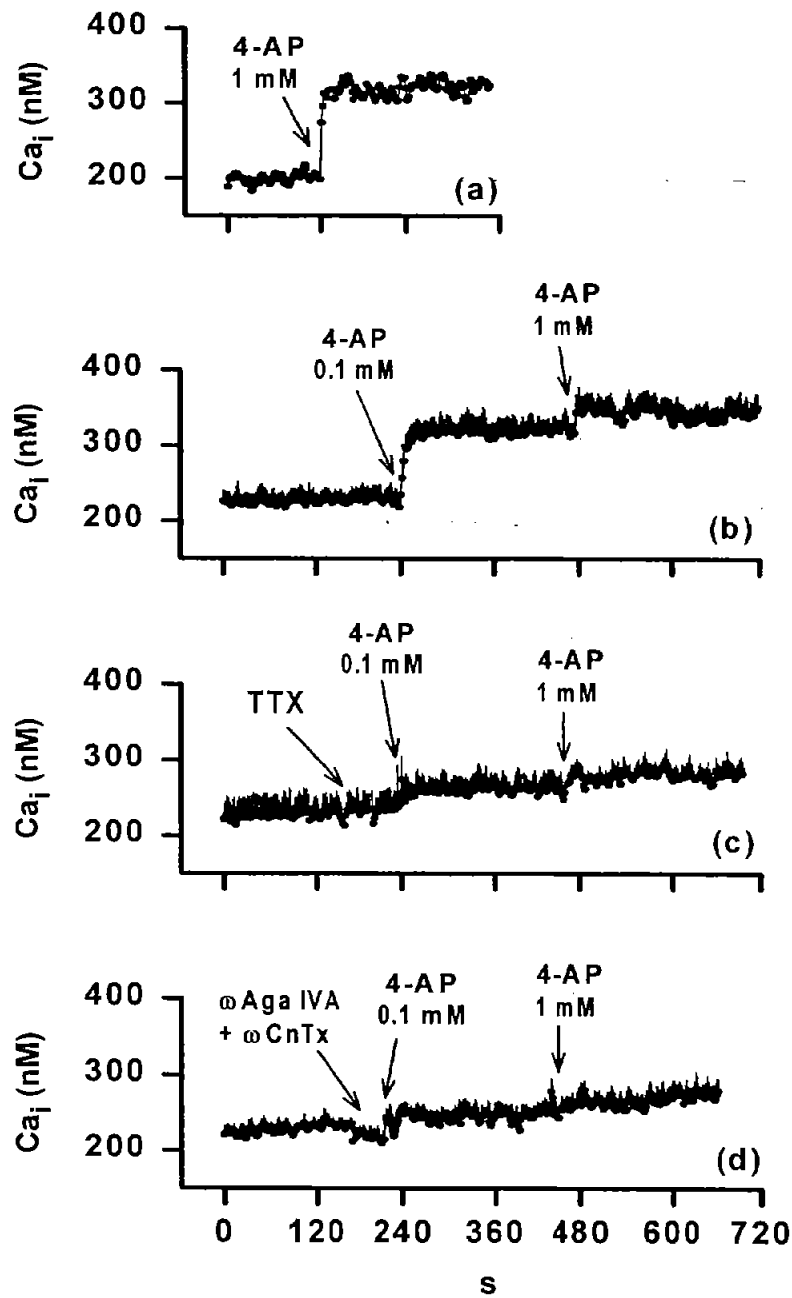


Fig. 15. Efectos de la tetrodotoxina y de la ω -AGA IVA en combinaci3n con ω -CnTx GVIA sobre el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP. Sinaptosomas de estriado precargados con fura-2, y la estimaci3n de la Ca_i se describe en el m3todo. Los puntos se recolectaron en intervalos de 1.8 segundos. Despu3s de medir la b3sica de calcio en ausencia (a y b), o en presencia de tetrodotoxina (c) o ω -AGA IVA en combinaci3n con ω -CnTx GVIA (d), los sinaptosomas fueron expuestos a 1 mM de 4-AP (a) o 0.1 mM y subsecuentemente a 1 mM de 4-AP y la Ca_i se midi3o por 4 minutos m3s tras cada adici3n. Los resultados son el promedio \pm error est3ndar de 4 experimentos independientes y en paralelo.

3.2.6. Efecto de la tetrodotoxina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por diferentes agentes

Los efectos de la tetrodotoxina sobre la liberación simultánea de los neurotransmisores endógenos, DA, Glu y GABA inducidos con 1 mM de 4-AP se probaron y compararon con los efectos de la tetrodotoxina sobre la liberación de neurotransmisores inducida con K^+ alto, veratridina y ouabaina. La tabla I muestra que la liberación de todos los neurotransmisores inducida con K^+ alto no se modifica en presencia de tetrodotoxina, la cual inhibe completamente la liberación de los neurotransmisores estimulada con veratridina, y parcialmente inhibe la liberación inducida con 4-AP 1 mM o con ouabaina.

La comparación de la efectividad de estos cuatro agentes revela que la veratridina es el más efectivo, probablemente porque la reversión de los transportadores de neurotransmisores inhibe la recaptura de los transmisores liberados. La efectividad para inducir liberación de neurotransmisores del alto potasio, la 4-AP y la ouabaina varía dependiendo del neurotransmisor. Por ejemplo, bajo las presentes condiciones experimentales, la 4-AP 1 mM y la ouabaina son más efectivas para inducir liberación de DA, mientras que el K^+ alto y la ouabaina son más eficaces que la 4-AP para inducir liberación de los neurotransmisores aminoácidos Glu y GABA.

Tabla 1. Comparación de los efectos de la tetrodotoxina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por alto potasio, veratridina y 4-AP en sinaptosomas estriatales.

	DA	Glu	GABA	(n)
Control	11.1 ± 2.3	13.2 ± 2.3	3.6 ± 0.8	(6)
High K	42.4 ± 4.9*	27.7 ± 3.5*	9.3 ± 0.7*	(6)
High K + TTX	41.3 ± 4.8	29.5 ± 3.8	9.8 ± 1.2	(6)
Control	11.1 ± 2.2	13.4 ± 1	3.3 ± 0.5	(7)
Vtrd	127.5 ± 102	42.4 ± 3.7*	15.8 ± 1.2*	(7)
Vtrd + TTX	10.8 ± 2*	13.0 ± 0.7 [†]	3.6 ± 0.6 [†]	(7)
Control	10.5 ± 2.2	13.1 ± 0.7	2.3 ± 0.3	(8)
4-AP 1 mM	94.4 ± 8.3*	16.7 ± 1.3*	5.2 ± 0.2*	(8)
4-AP 1mM + TTX	77.7 ± 6.3 [†]	14.6 ± 1.4 [†]	3.2 ± 0.2 [†]	(8)
Control	8.3 ± 1.0	13.8 ± 0.6	2.7 ± 0.1	(5)
Ouabain	140.1 ± 3.8*	28.8 ± 1.1*	9.2 ± 0.3*	(5)
Ouabain + TTX	77.2 ± 8.5 [†]	21.3 ± 1.3 [†]	6.1 ± 0.4 [†]	(5)

La concentración de DA está en pmoles/mg de proteína sinaptosomal.

La concentración de aminoácidos está en nmoles/mg de proteína sinaptosomal.

Las concentraciones finales de K⁺ alto, veratridina, 4-AP, ouabaina y tetrodotoxina son: 30 mM, 10 μM, 1 mM, 1 mM y 1 μM, respectivamente.

Los resultados son el promedio ± SEM con el (n) número de repeticiones de experimentos independientes y en paralelo.

* P < 0.05 entre el control y los sinaptosomas despolarizados.

[†] P < 0.05 entre los sinaptosomas tratados con el agente despolarizante solo o en combinación con tetrodotoxina.

4. Estudio II: Efectos de la vinpocetina sobre las respuestas inducidas por 4-AP en sinaptosomas de estriado de rata.

En este segundo estudio se probaron los efectos de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i que induce 0.1, 0.2 y 1 mM de 4-AP en sinaptosomas estriatales. La concentración de vinpocetina que se usó a lo largo de este estudio fue 15 μ M, porque en un trabajo previo del laboratorio se demostró que esta concentración de vinpocetina elimina completamente el aumento en la Na_i y en la Ca_i que induce la veratridina. Parte de los resultados de este trabajo están en la figura 7 (Sitges y Nekrassov, 1999). Este segundo estudio nos presenta un panorama más comprensible del mecanismo subyacente a la acción anticonvulsivante de la vinpocetina que ha sido previamente demostrada *in vivo* (Sitges y Nekrassov, 2004). La pregunta de cómo la vinpocetina afecta la excitabilidad neuronal se estudió determinando los efectos de la vinpocetina sobre los cambios en las concentraciones internas de sodio y calcio inducidas por diferentes concentraciones del agente convulsivante 4-AP en la misma preparación de terminales nerviosas cerebrales aisladas del estriado.

4.1.1. Acción de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i inducido por varias concentraciones de 4-AP.

Al probar el efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i inducido por concentraciones crecientes de 4-AP (0.1, 0.2 y 1 mM) encontramos que con la 4-AP a la concentración baja este efecto es bloqueado. Sin embargo, el aumento en la Na_i que induce la 4-AP a concentraciones mayores (0.2 mM o 1 mM) solo se inhibe parcialmente como se ilustra en la figura 16a. La figura 16b muestra que la tetrodotoxina también elimina el aumento en la Na_i que

induce la 4-AP a la concentración de 0.1 mM y solo bloquea parcialmente el aumento en la Na_i inducido por la 4-AP a las concentraciones mayores.

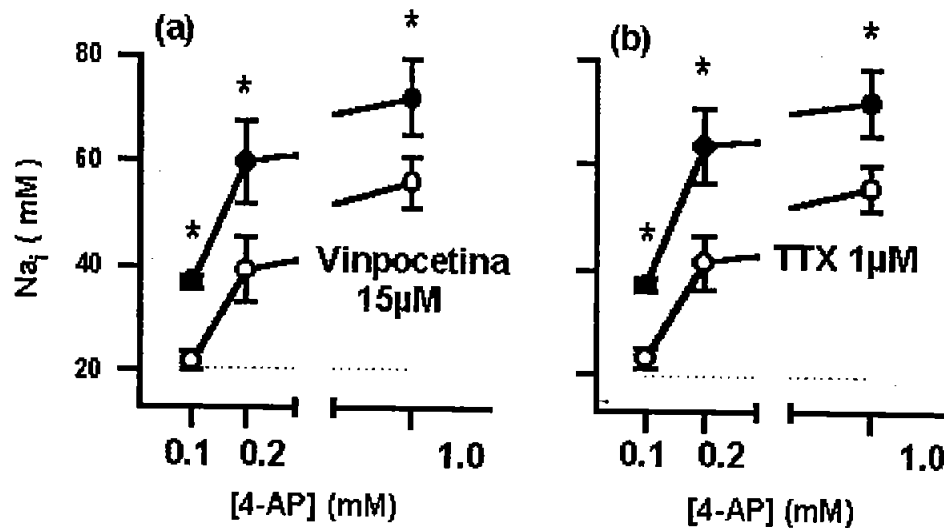


Fig. 16. Efectos de la vinpocetina y la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la 4-AP. Sinaptosomas precargados con SBF1. La Na_i se calculó como se indica en el método. Los círculos negros (a y b), son el promedio con su respectivo error estándar del aumento en la Na_i que induce la 4-AP a la concentración indicada en la parte inferior del eje. El efecto de 15 μ M vinpocetina (a) o 1 μ M de tetrodotoxina (b) se muestran con los círculos blancos. * P = < 0.05 entre la respuesta de la Na_i con 4-AP en ausencia o presencia de vinpocetina (a) o tetrodotoxina (b). La gráfica es el promedio de los siguientes experimentos. Para 4-AP 0.1; 0.2 y 1 mM + Vinpocetina n =7, 8 y 6 experimentos; y 4-AP 0.1; 0.2 y 1 mM + tetrodotoxina n = 7, 9 y 7 experimentos independientes y en paralelo. La línea punteada de ambas gráficas es la concentración basal de sodio interno: (a)=20.3 mM (n = 21) y (b)=19.9 mM (n = 23).

La figura 17 muestra la cinética de los cambios en la Na_i inducida por 4-AP 1 mM así como la reducción que causan la vinpocetina y la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la 4-AP (Fig. 18 b y c).

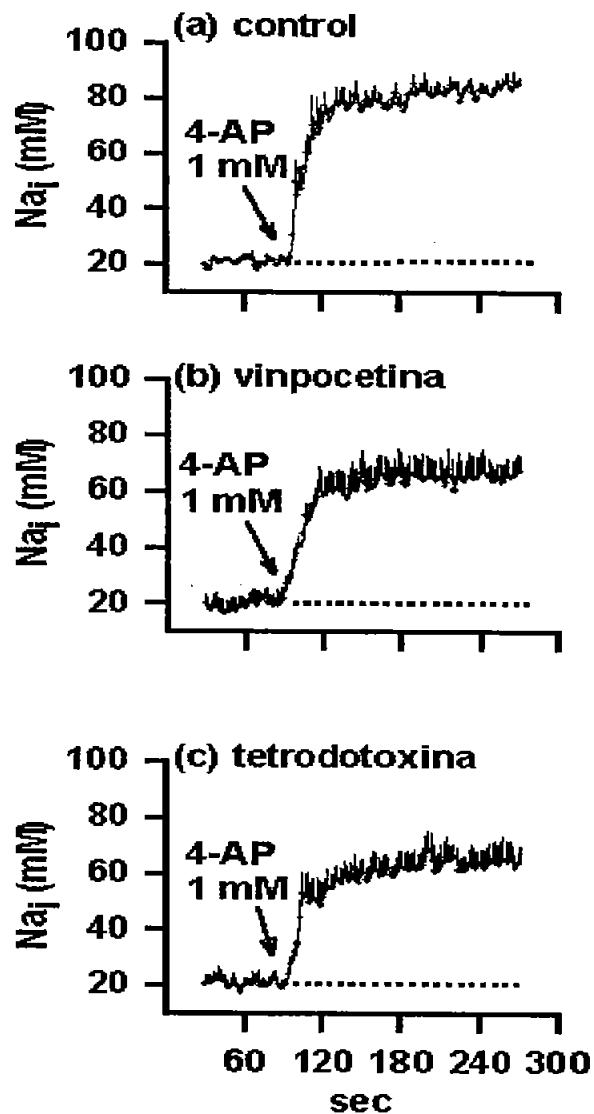


Fig. 17. Efecto de la vinpocetina y la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce 1 mM de 4-AP. Sinaptosomas precargados con SBF1 como se indica en el método. Después de medirse la Na_i durante 3 minutos en ausencia (a), presencia de 15 μ M de vinpocetina (b) o 1 μ M de tetrodotoxina (c), los sinaptosomas se expusieron a 1 mM de 4-AP y se midió la Na_i durante 5 minutos más. Los resultados son el promedio \pm error estándar de 6 experimentos independientes y en paralelo.

4.1.2. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i inducida por 0.1 mM de 4-AP y por veratridina en ausencia de calcio externo.

La figura 18a muestra que el aumento en la Na_i que induce la 4-AP 0.1 mM es independiente de la presencia de calcio externo. La figura 18a también muestra que tras el aumento en la Na_i inducido con 4-AP 0.1 mM la aplicación secuencial de veratridina causa un aumento adicional en la Na_i .

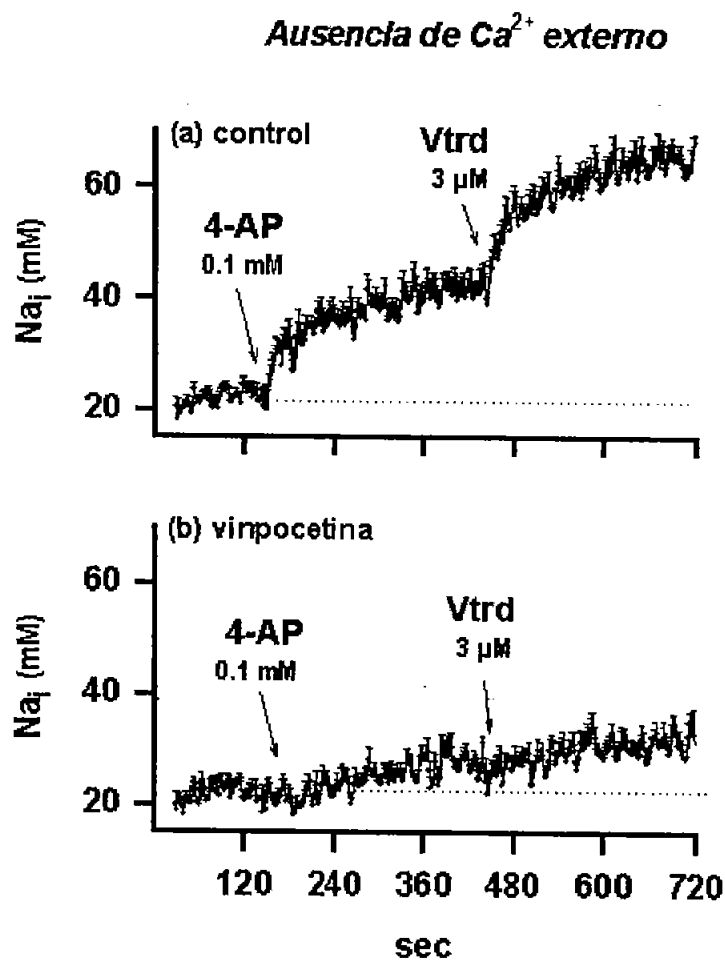


Fig. 18. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i por 4-AP y VTRD. Sinaptosomas precargados con SBFI en un KRH sin calcio externo, con 10 mM de EGTA. La Na_i se calculó como se indica en el método. Tras medir la Na_i basal durante 4 minutos, se aplicó 0.1 mM de 4-AP y se midió la Na_i 5 minutos, tras los cuales, se aplicó 3 μ M de veratridina y se midió la Na_i 5 minutos más (a). La preincubación de los sinaptosomas con 15 μ M de vinpocetina, no altera la Na_i (\approx 20 mM) y elimina el aumento en la Na_i que induce tanto la 4-AP como la veratridina (b). Los resultados son el promedio \pm error estándar de 4 experimentos independientes y en paralelo.

La vinpocetina elimina tanto el aumento en la Na_i que induce la 4-AP como la veratridina (Fig. 18b).

Es importante destacar que en condiciones de reposo, la Na_i basal en los sinaptosomas resuspendidos en un medio sin calcio externo es similar (≈ 20 mM) a la Na_i basal en los sinaptosomas resuspendidos en un medio con calcio externo y que el aumento en la Na_i inducido por una concentración mayor de veratridina ($10 \mu\text{M}$) también es independiente de la presencia de calcio externo (Sitges y cols. 1998).

4.1.3. Efecto de la vinpocetina en sinaptosomas predespolarizados.

La acción de la vinpocetina sobre la Na_i también fue probada en sinaptosomas que fueron previamente despolarizados. Para esto, se aplicó vinpocetina después de haber estimulado a los sinaptosomas con 4-AP 0.1 mM o $3 \mu\text{M}$ de veratridina.

La estimulación de los sinaptosomas con (a) 0.1 mM de 4-AP o (b) $3 \mu\text{M}$ de veratridina induce un aumento en la Na_i como se ilustra en la figura 19. La posterior aplicación de una alícuota de $15 \mu\text{M}$ de vinpocetina disminuye el aumento en la Na_i inducido tanto por 4-AP como por veratridina. Sin embargo, pese a la reversión con vinpocetina del aumento en la Na_i , inducido por ambas drogas, no se alcanza una recuperación total de la Na_i similar a la basal obtenida antes de la aplicación de ambas drogas. Esta serie de experimentos también fue realizada en ausencia de calcio externo.

Ausencia de Ca^{2+} externo

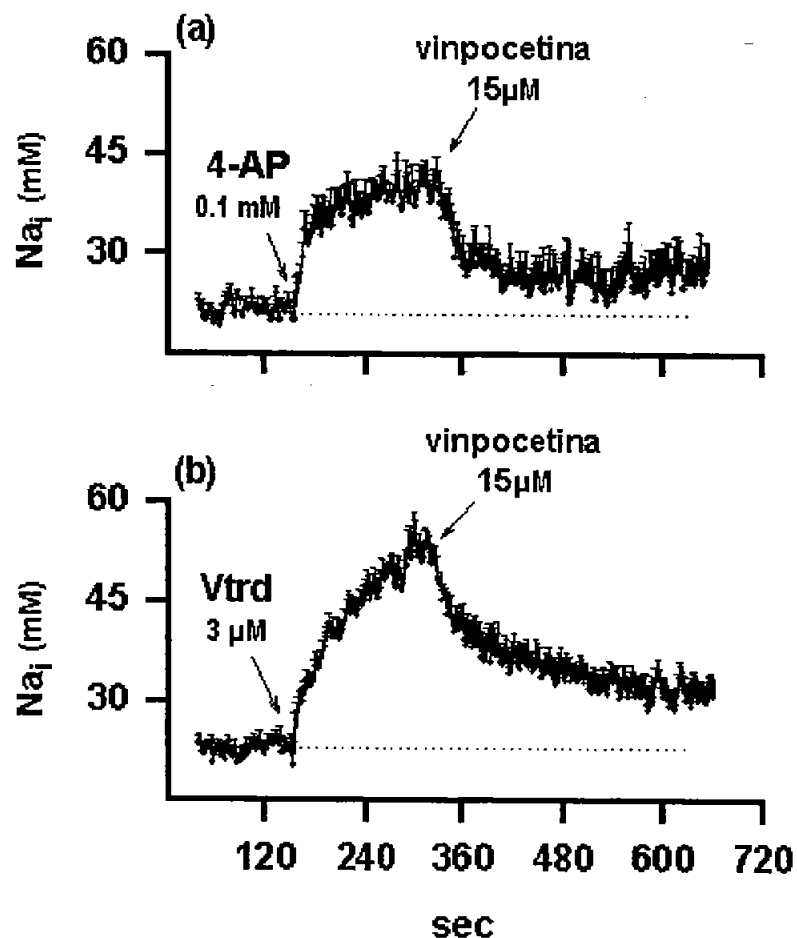


Fig. 19. Efecto de la vinpocetina sobre la Na_i y la despolarización inducida con veratridina o 4-AP. Sinaptosomas de estriado precargados con SBF1 y resuspendidos en un KRH sin calcio externo y 10 mM de EGTA. Tras medir la Na_i basal durante 4 minutos, se aplicó 0.1 mM de 4-AP (a), o 3 μ M de veratridina (b) y se midió la Na_i 4 minutos más, tras los cuales se aplicó una alícuota de 15 μ M de vinpocetina y se midió su efecto durante 6 minutos más. Las gráficas son el promedio de 6 experimentos independientes y en paralelo \pm su respectivo error estándar.

4.1.4. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i inducida con 4-AP.

Como se demostró previamente (Fig. 15 del estudio I), el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP a las concentraciones de 0.1 y 1 mM, es similar e igualmente sensible a tetrodotoxina.

A continuación se probó si la vinpocetina es capaz o no de eliminar el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP (0.1 y 1 mM). La figura 20a muestra que el aumento neto en la Ca_i que induce la 4-AP a las dos concentraciones se inhibe marcadamente con vinpocetina (barras grises) así como con tetrodotoxina (barras blancas).

Estos mismos experimentos también se muestran desarrollados en la figura 20. El curso temporal de los aumentos en la Ca_i que induce la 4-AP 0.1 y la 4-AP 1 mM se muestran en las figuras 20b y 20d respectivamente. Estos aumentos en la Ca_i se inhiben cuando los sinaptosomas son preincubados con vinpocetina (Figs. 20c y 20e), así como cuando los sinaptosomas son preincubados con tetrodotoxina (Figs. 20f).

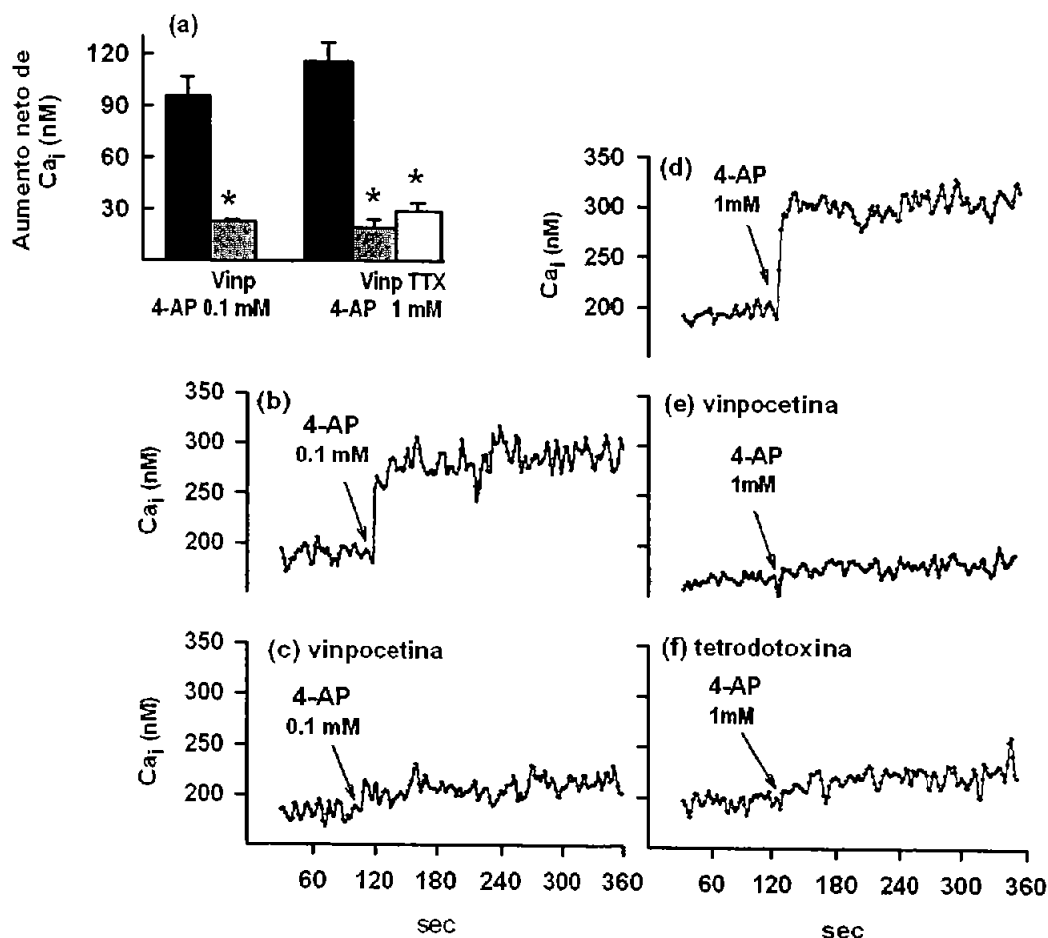


Fig. 20. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP. Sinaptosomas precargados con fura-2. La Ca_i se calculó como se indica en el método. El aumento neto en la Ca_i se refiere a la respuesta de la Ca_i en presencia de 4-AP (promedio del aumento en la Ca_i) menos su respectiva basal (promedio de la Ca_i antes de la adición de la 4-AP) en ausencia (barras negras), presencia de vinpocetina (barras grises) o tetrodotoxina (barras blancas). * $P < 0.05$ entre el valor máximo de la Ca_i con 4-AP, 4-AP + vinpocetina o 4-AP + TTX. Gráficas inferiores: Tras medir la Ca_i 3 minutos, se aplicó 4-AP y se midió la Ca_i 5 minutos más. El aumento en la Ca_i inducido por 0.1 mM (b), o 1 mM de 4-AP (d) es eliminado por 15 μ M de vinpocetina (c y e respectivamente) o por 1 μ M de tetrodotoxina (f). Las gráficas son experimentos representativos que muestran los cambios en el curso temporal de la Ca_i en respuesta a la 4-AP a la concentración indicada en ausencia (b y d), presencia de vinpocetina (c y e) o tetrodotoxina (f), de un total de 7 (b y c) ó 8 (d, e y f) experimentos independientes y en paralelo.

4.1.5. Efecto de la vinpocetina sobre la Ca_i en sinaptosomas predespolarizados.

La acción de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i también se probó en sinaptosomas previamente despolarizados. La figura 21 muestra que la adición de (a) 0.1 o (b) 1 mM de 4-AP, (c) 3 o (d) 10 μ M de veratridina estimula un aumento en la Ca_i . La posterior aplicación de 15 μ M de vinpocetina resulta en una disminución de la Ca_i . Para la 4-AP, la reversión del aumento en la Ca_i alcanza un nivel similar a la Ca_i basal. Sin embargo, la reversión por vinpocetina del aumento en la Ca_i estimulado con veratridina no alcanza una recuperación de la Ca_i similar a la obtenida antes de aplicar veratridina.

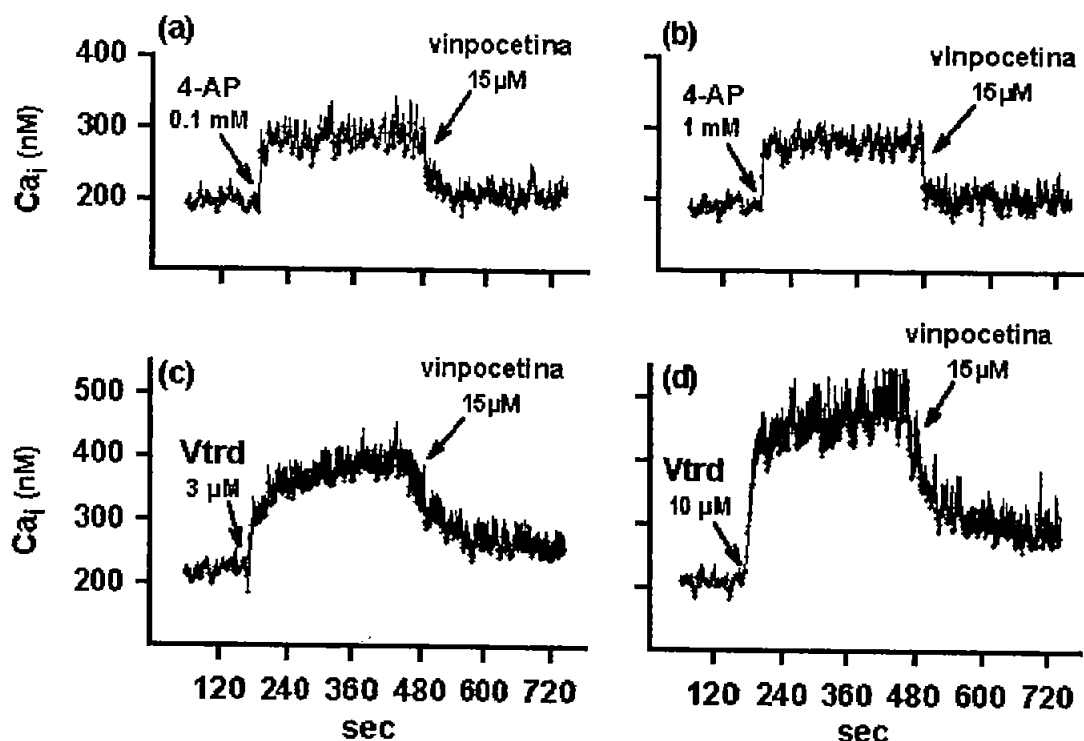


Fig. 21. Efecto de la vinpocetina sobre el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP o la veratridina. Sinaptosomas precargados con fura-2 y la Ca_i se calculó como se indica en el método. Después de medir la Ca_i 4 minutos, se aplicó 0.1 mM de 4-AP (a), 1 mM de 4-AP (b), 3 μ M de veratridina (c) o 10 μ M de veratridina (d) y se midió la Ca_i 5 minutos más, tras los cuales se aplicó una alícuota de 15 μ M de vinpocetina y se midió la Ca_i 5 minutos más. Los resultados son el promedio \pm error estándar de 5 experimentos independientes y en paralelo.

4.1.6. Acción de la vinpocetina sobre el aumento de la Ca_i inducida por la adición secuencial de 4-AP y K^+ alto.

La figura 22a muestra el aumento en la Ca_i que induce la adición secuencial de 4-AP 0.1 mM seguido de K^+ alto (30 mM). La figura 22b muestra que la vinpocetina inhibe el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP pero no inhibe el aumento en la Ca_i que induce la adición de K^+ alto. De manera similar, en presencia de tetrodotoxina, el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP 0.1 mM, es eliminado totalmente, mientras que no se modifica el aumento en la Ca_i que induce el K^+ alto (Fig. 22c).

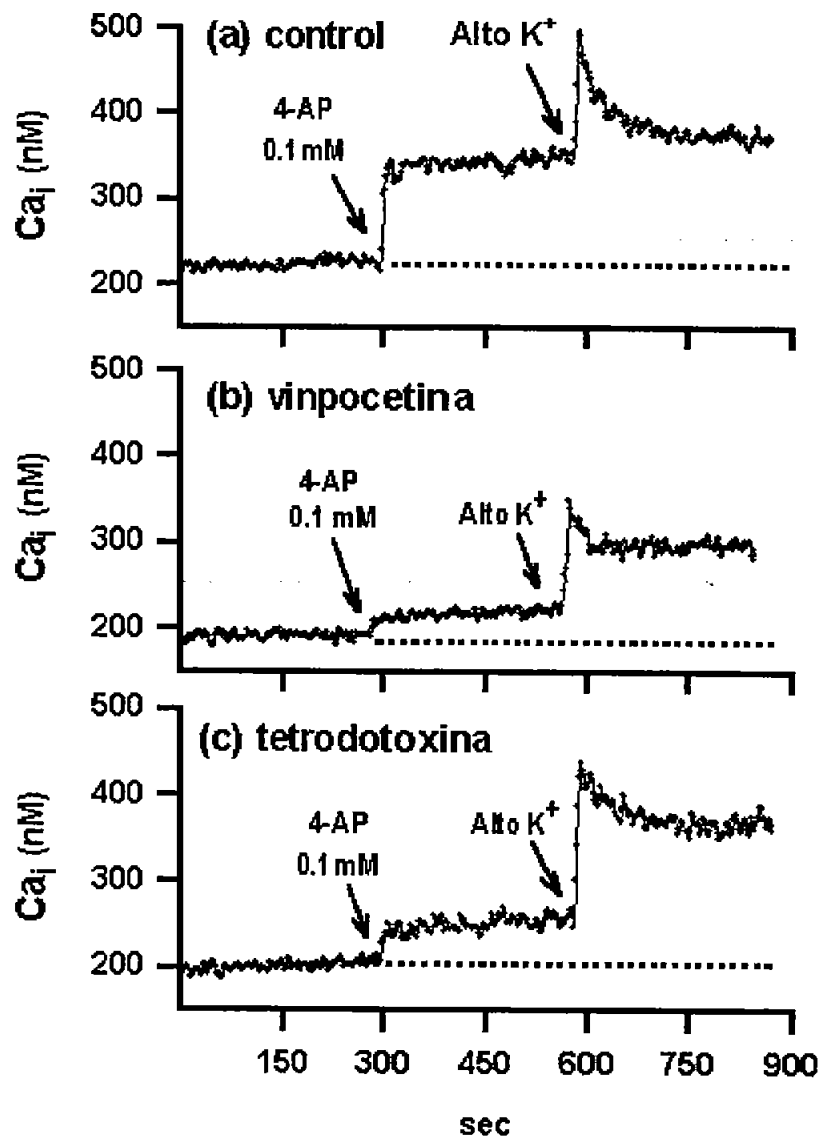


Fig. 22. La vinpocetina elimina el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP pero no modifica el aumento en la Ca_i que induce el alto potasio. Sinaptosomas precargados con fura-2. Los puntos fueron recolectados en intervalos de 1.8 segundos. Después de medir la basal de calcio durante el tiempo indicado, (a) los sinaptosomas se expusieron a 0.1 mM de 4-AP durante 5 minutos, tras los cuales, se aplicó una alícuota de K^+ alto (concentración final 30 mM) y se midió la Ca_i 5 minutos más. La vinpocetina al igual que la tetrodotoxina, elimina el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP 0.1 mM pero no elimina el aumento en la Ca_i que induce el K^+ alto (b y c, respectivamente). La gráfica muestra un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes y paralelos.

5. Discusión

Los efectos de la 4-AP sobre la Na_i , K_i y Ca_i se investigaron en sinaptosomas de estriado de rata precargados con SBFI, PBFI y fura-2, respectivamente. Aunque estos indicadores selectivos no resuelven los eventos sinápticos rápidos que ocurren en milisegundos, pueden detectar los cambios en la Na_i , K_i y Ca_i y resolver satisfactoriamente eventos cinéticos que perduran durante segundos. Por ejemplo, el SBFI y el fura-2 han sido utilizados exitosamente para revelar cambios en la Na_i y Ca_i que persisten por minutos tras la aplicación de fármacos como la veratridina, la ouabaina y algunos ionóforos en sinaptosomas de cobayo, rata, ratón e incluso humano (Tibbs y cols. 1989; Deri y Adam-Vizi 1993; Rodríguez y Sitges 1996; Sitges y cols. 1998; Meder y cols. 1999). El PBFI no ha sido utilizado previamente en sinaptosomas y solo existen unos cuantos estudios en los que este indicador selectivo de potasio se ha empleado en preparaciones biológicas. El PBFI ha probado ser adecuado para cuantificar cambios en la K_i dentro de las células (Kasner y Ganz 1992; Muyderman y cols. 1997).

5.1.1. Efectos de la 4-AP sobre la Na_i y la K_i

Los presentes resultados muestran que la 4-AP como la veratridina y la ouabaina aumentan la Na_i en segundos. La sensibilidad a tetrodotoxina del aumento en la Na_i inducida por estos agentes indica la participación directa de los canales de sodio sensibles a voltaje en los tres casos. Sin embargo, existen diferencias en el grado de inhibición por tetrodotoxina. Por ejemplo, el aumento en la Na_i que induce la veratridina, al unirse al sitio 2 del canal de sodio, es eliminado completamente por el bloqueo del poro del canal de sodio en el sitio 1 con tetrodotoxina, como se ha demostrado previamente en sinaptosomas de diversas regiones cerebrales precargados con SBFI (Deri y Adam Vizi 1993; Sitges y cols. 1998; Sitges y cols. 2000). En contraste, el

aumento en la Na_i que induce la ouabaina, en el que también se ha propuesto participan los canales de sodio (Gleitz y cols. 1995; Gutzer y Gleitz 1998), solo es parcialmente sensible a tetrodotoxina (Fig. 11b).

Esta es la primera vez que se estudian los efectos de la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la 4-AP. Es muy interesante notar que el grado de sensibilidad a la tetrodotoxina del aumento en la Na_i que induce la 4-AP depende de la concentración de 4-AP. Mientras que el aumento en la Na_i que induce 0.1 mM de 4-AP es totalmente eliminado con tetrodotoxina, el aumento en la Na_i que induce 1 mM de 4-AP solo se reduce en una tercera parte con tetrodotoxina.

La acción específica de la tetrodotoxina sobre los canales presinápticos de sodio se demuestra por la total inhibición del aumento en la Na_i que induce la veratridina, como se indica en la figura 13a. Por consiguiente, la eliminación del aumento en la Na_i que induce la 4-AP a la concentración baja indica que el aumento en la Na_i que induce la 4-AP 0.1 mM está exclusivamente mediado por la activación de los canales de sodio sensibles a voltaje. En concordancia con este planteamiento, estudios electrofisiológicos realizados en rebanadas de hipocampo han demostrado que la respuesta excitatoria sincronizada que induce la 4-AP a la concentración de 0.1 mM es eliminada completamente con 1 μ M de tetrodotoxina (Perreault y Avoli 1991). La inhibición parcial que ejerce la tetrodotoxina sobre el aumento en la Na_i que induce la 4-AP a la concentración de 1 mM nos indica la presencia de un fenómeno adicional capaz de aumentar la Na_i , que se sobrepone al primero y que es inducido por la 4-AP a concentraciones mayores.

A través de la membrana de los sinaptosomas, existe una marcada diferencia en el gradiente electroquímico de potasio ($[K^+]_{ext} \lll [K^+]_{in}$) (Blaustein y Goldring 1975; Bartschat y Blaustein 1985). El principal papel de la ATPasa de Na^+/K^+ es mantener elevada la concentración de potasio en contra de su gradiente electroquímico. La disminución en la K_i inducida con ouabaina observada en la figura 14b, indica que en condiciones basales la

ATPasa de Na^+/K^+ está trabajando para mantener elevada la concentración interna de potasio. La disminución en la K_i que ocurre espontáneamente cuando se inhibe a la ATPasa de Na^+/K^+ con ouabaina (Fig. 14b) se ve acompañada por un aumento en la Na_i que es insensible a tetrodotoxina (Fig. 13b), lo que indica que en condiciones basales o de reposo, el potasio externo se bombea hacia el interior de las terminales nerviosas, y el sodio interno se bombea hacia el exterior mediante la ATPasa.

Como sucede con los sinaptosomas expuestos a ouabaina, la 4-AP a la concentración de 1 mM también disminuye la K_i (Fig. 14b) e induce un aumento considerable en la Na_i que es insensible a tetrodotoxina (Fig. 12b). Por lo tanto, una posible explicación del aumento en la Na_i insensible a tetrodotoxina que produce la 4-AP 1 mM es que a dosis elevadas, la 4-AP inhiba a la ATPasa de Na^+/K^+ . El bloqueo extenso de los canales de potasio causado por 4-AP 1 mM debe reducir la pérdida interna de K^+ hasta un umbral suficiente para detener a la bomba de Na^+/K^+ . En contraste, la incapacidad de la 4-AP a la concentración baja para modificar la K_i (Fig. 14d), indica que el bloqueo de los canales de potasio producido por la 4-AP 0.1 mM no es suficiente para inhibir a la ATPasa de Na^+/K^+ . Consistentemente, el aumento en la Na_i inducido por la 4-AP 0.1 mM es completamente inhibido por tetrodotoxina. Esto también indica que la ATPasa de Na^+/K^+ no juega un papel en el aumento en la Na_i inducido por 0.1 mM de 4-AP. Más aún, la veratridina que aumenta considerablemente la Na_i , de manera sensible a tetrodotoxina (Fig. 13a), también fue incapaz de modificar la K_i (Fig. 14c).

En conjunto, los efectos de la 4-AP, la ouabaina y la veratridina sobre las concentraciones internas de sodio y potasio indican que los fármacos que son incapaces de reducir la K_i y elevan la Na_i mediante la activación de los canales presinápticos de sodio no inhiben a la ATPasa de Na^+/K^+ . En resumen, cuando menos bajo las presentes condiciones experimentales, la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ parece estar determinada por la pérdida de la K_i , en vez de el aumento en la Na_i .

A través de la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ , la ouabaina y la 4-AP a la concentración de 1 mM, reducen la K_i (Figs. 14a y 14b) y aumentan una fracción considerable de la Na_i ($\approx 70\%$) de manera insensible a tetrodotoxina (Fig. 13b y 12b, respectivamente). Además de esta fracción, tanto la ouabaina como la 4-AP 1 mM, también aumentan una fracción de la Na_i ($\approx 30\%$) que es sensible a tetrodotoxina, lo que indica que los dos mecanismos descritos (inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ y activación de los canales de sodio sensibles a voltaje) actúan conjuntamente.

Para el caso de la ouabaina, el aumento en la Na_i que acompaña a la disminución en la K_i , parece aumentar la probabilidad de apertura de los canales presinápticos de sodio, dando cuenta de la pequeña fracción del aumento en la Na_i que induce la ouabaina y es inhibida por tetrodotoxina. Mientras que para el caso de la 4-AP, la completa eliminación por tetrodotoxina del aumento en la Na_i que induce la 4-AP 0.1 mM y la inhibición parcial del aumento en la Na_i que induce la 4-AP 1 mM, sugiere que la 4-AP aumenta la Na_i a través de la activación de los canales de sodio a ambas concentraciones, y solo cuando el bloqueo de los canales de K^+ alcanza cierto umbral, como el que se presenta con 1 mM de 4-AP, la ATPasa de Na^+/K^+ se detiene con el concomitante aumento en la Na_i insensible a tetrodotoxina.

Aún así, no puede descartarse la posibilidad de que el aumento en la Na_i insensible a tetrodotoxina observado en el presente estudio pueda deberse a un mecanismo distinto al que postulamos. Por ejemplo, la acumulación de sodio al interior de los sinaptosomas que es insensible a tetrodotoxina, puede deberse a la actividad de canales catiónicos no selectivos. Estos canales permiten la entrada de sodio y calcio al interior de las células de manera insensible a tetrodotoxina, sin embargo, a la fecha no existe evidencia directa de la presencia de estos canales en los sinaptosomas. Otra posibilidad es que el aumento en la Na_i que induce la

4-AP 1 mM e insensible a tetrodotoxina se deba a que el sodio entre a las terminales nerviosas a través de canales de sodio insensibles a tetrodotoxina. En 1995 Chao y Alzheimer postularon la existencia de una corriente de sodio insensible a tetrodotoxina en las neuronas del estriado de la rata. Sin embargo los autores fueron incapaces de demostrar de manera fidedigna la presencia de esta corriente.

Además diversos autores como Krueger y Blaustein (1980) y posteriormente Tamkun y Catterall (1981), postularon que en las terminales nerviosas el tipo predominante de canales de sodio es el IIA, que es totalmente sensible a tetrodotoxina.

Finalmente, se requieren experimentos adicionales para demostrar de manera directa que el bloqueo extensivo de los canales de potasio con 4-AP 1 mM es suficiente para bloquear a la ATPasa de Na^+/K^+ . Por ejemplo, un experimento que permita monitorear la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ a través de la cuantificación del ATP intrasinaptosomal en ausencia y presencia de 4-AP, esclarecería este punto. Usando el sustrato luciferin y la enzima luciferasa en presencia y ausencia de 4-AP, se obtendrían resultados directos de la concentración interna de ATP, mismos que nos permitirían confirmar o descartar la interpretación propuesta en este estudio.

Esta es el primer estudio en el que se utiliza el PBF1 para seguir el movimiento del potasio al interior de las terminales nerviosas del cerebro de mamífero. A la fecha, existen pocos trabajos donde se haya utilizado este indicador para monitorear la actividad de este ión. Previamente, el PBF1 se ha utilizado para monitorear de una manera no invasiva las concentraciones intracelulares de K^+ en células mesengliales glomerulares del riñón, (Kazner y cols; 1992), en astrocitos y en cultivos primarios de corteza (Muyderman y cols; 1997, 2001), sin que hasta la fecha exista un solo trabajo reportado donde se haya cargado terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) con PBF1. Un punto a favor de este indicador es que las respuestas obtenidas

con PBFI han sido corroboradas con experimentos de *voltage-clamp* (Muyderman y cols; 2001).

En el presente estudio la K_i de los sinaptosomas se presenta únicamente como fluorescencia del PBFI (340/380), a diferencia de los resultados obtenidos con SBFI para calcular la Na_i (expresada en mM) o fura-2 para la Ca_i (expresada en nM), respectivamente. En los trabajos previos realizados en astrocitos y en cultivos primarios de corteza donde se reporta la K_i en mM se utilizaron calibraciones indirectas para expresar la K_i (Muyderman y cols; 1997, 2001) o mediante manipulaciones experimentales poco confiables (Kasner y Ganz. 1992). Además, en estos estudios se presenta también la K_i como proporción de fluorescencia 340/380 del PBFI debido a la dificultad para calibrar la señal de este indicador.

Una posible solución para calibrar la señal del PBFI y convertir sus valores de fluorescencia al rango milimolar, sea utilizando la sal de PBFI sin el grupo acetometilester (AM) unido. Usando esta sal de PBFI y variando las concentraciones externas de potasio, se podría realizar una calibración con los valores de fluorescencia obtenidos. Estas variaciones de fluorescencia vs concentración externa de potasio, nos permitirían generar una curva de calibración donde se puedan sustituir los valores experimentales para poder expresarlos en milimoles de potasio. Desafortunadamente, durante la realización de los experimentos de potasio en los sinaptosomas no se contó con un PBFI sin el grupo -AM razón por la cual no fue posible lograr una calibración de la señal; además, las manipulaciones experimentales propuestas por Kasner y cols. (1992) no pudieron ser reproducidas en los sinaptosomas durante la realización de la presente investigación.

5.1.3. Efectos de la 4-AP sobre la Ca_i

En concordancia con estudios previos en sinaptosomas cerebrocorticales de cobayo y rata (Tibbs y cols. 1989; Heemskerk y cols. 1991), que demuestran que la tetrodotoxina inhibe el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP a

diferentes concentraciones, en el presente proyecto de investigación se demuestra que en sinaptosomas estriatales de rata la tetrodotoxina inhibe completamente el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP a las dos concentraciones probadas (Fig. 13c). Sin embargo, la marcada diferencia que produce la 4-AP a las dos concentraciones probadas sobre la Na_i y la K_i , contrasta con la similitud de los efectos de las dos concentraciones de 4-AP sobre la Ca_i , misma que es altamente sensible tanto al bloqueo de los canales de sodio con tetrodotoxina, como al bloqueo de los canales de calcio con las toxinas bloqueadoras de canales de calcio, ω -AGA IVA y ω -CnTx GVIA (Fig. 13d). En conjunto, estos resultados sugieren que la 4-AP a cualquier concentración, activa una cantidad constante de canales de sodio sensibles a voltaje, pero que solamente la fracción del aumento en la Na_i inducido por 4-AP que es sensible a tetrodotoxina está relacionado con el aumento en la Ca_i inducido por 4-AP. La inhibición del aumento en la Ca_i inducido por 4-AP por la ω -AGA IVA en combinación con ω -CnTx GVIA también indica que la activación de los canales presinápticos de sodio es necesaria para que se activen los canales de calcio que participan en el aumento en la Ca_i inducido por 4-AP a cualquier concentración. Se descarto la posibilidad de que el aumento en la Na_i que induce la 4-AP a la concentración alta (1 mM) aumente la Ca_i por reversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} debido a la marcada inhibición que ejercen los bloqueadores de los canales de calcio tipo N y P/Q sobre el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP a la concentración de 1 mM.

5.1.4. Efectos de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores.

La 4-AP, junto con el K^+ alto y la veratridina, son las estrategias más comúnmente utilizadas para inducir liberación de neurotransmisores en los sinaptosomas. Es generalmente aceptado, que la liberación inducida por K^+ alto es de naturaleza excitotóxica y que la liberación de neurotransmisores

inducida por veratridina involucra la reversión de los transportadores de neurotransmisores. Consistentemente, el K^+ alto no aumenta la Na_i (Deri y Adam-Vizi 1993) y aumenta la Ca_i (mediante la activación de los canales de calcio) y la liberación de neurotransmisores de manera insensible a tetrodotoxina y sensible a ω -Aga IVA (Turner y cols. 1992; Sitges y Chiu 1995; 1995b; Meder y cols. 1997). En contraste, el aumento en la Na_i , en la Ca_i y en la liberación de los neurotransmisores inducidos por veratridina, se inhiben con tetrodotoxina y son insensibles a ω -Aga IVA (Sitges y Chiu, 1995b, Sitges y cols. 1998). Consistentemente, la tabla 1 muestra que la liberación de DA, Glu y GABA inducida por K^+ alto no se inhibe en presencia de tetrodotoxina, mientras que la liberación de dichos neurotransmisores inducida por veratridina se inhibe completamente por tetrodotoxina. La inhibición parcial que ejerce la tetrodotoxina sobre la liberación de neurotransmisores que induce la 4-AP 1 mM indica una combinación de exocitosis y liberación por reversión de los transportadores de neurotransmisores. Es importante subrayar que en el caso de la 4-AP la fracción de la liberación sensible a tetrodotoxina corresponde a la fracción liberada por exocitosis. Con base en los resultados presentados aquí, concluimos que el aumento en la Na_i sensible a tetrodotoxina que induce la 4-AP está ligado al aumento en la Ca_i que induce la 4-AP. Por consiguiente, la marcada inhibición ejercida por tetrodotoxina sobre la liberación de Glu y GABA que induce la 4-AP 1 mM indica que un importante porcentaje de la liberación de estos neurotransmisores aminoácidos es de naturaleza excitotónica. En contraste para el caso de la DA, es probable que la acumulación de sodio en el interior de las terminales nerviosas causado por la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ con 4-AP 1 mM, contribuya considerablemente con la liberación de DA mediada por la reversión del transportador de DA. La inhibición parcial con tetrodotoxina de la liberación estimulada con ouabaina es consistente con la inhibición parcial que ejerce la tetrodotoxina en el aumento en la Na_i que induce la misma ouabaina. Es probable que la fracción de la liberación de neurotransmisores sensible a

tetrodotoxina que induce la ouabaina, también corresponda, como en el caso de la 4-AP 1 mM, a la fracción excitotóxica.

5.2.1. Efectos de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i y la Ca_i que induce la 4-AP

Nuestro hallazgo de que la vinpocetina inhibe completamente la fracción del aumento en la Na_i y la Ca_i sensible a tetrodotoxina que induce la 4-AP confirma que la vinpocetina inhibe selectivamente las respuestas inducidas por la activación de los canales de sodio sensibles a voltaje. El paralelismo entre los efectos que ejerce la vinpocetina y el bloqueador específico de canales presinápticos de sodio, tetrodotoxina, sobre el aumento en la Na_i inducido por 4-AP a las tres concentraciones probadas (Fig. 16), indica el involucramiento de los canales de sodio sensibles a voltaje en el mecanismo de acción de la vinpocetina.

Como se mencionó previamente, el aumento en la Na_i que induce la 4-AP está mediado por dos mecanismos que dependen de la concentración de 4-AP. El aumento en la Na_i que induce la 4-AP a la dosis baja (0.1 mM) está mediado exclusivamente por la entrada de sodio a través de los canales de sodio sensibles a voltaje, y es completamente inhibido por vinpocetina como se muestra en el primer punto de la figura 16a y en la figura 18b, mientras que el aumento en la Na_i inducido por la dosis alta de 4-AP (1 mM), que también involucra la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ , solo es parcialmente sensible a vinpocetina, como se evidencia en la figura 17b.

Un trabajo del laboratorio (Sitges y cols. 1998) demostró que el aumento en la Na_i que induce la veratridina es independiente de la presencia de calcio externo. Como para el caso de la veratridina, el aumento en la Na_i inducido por 4-AP no requiere de la presencia de calcio externo (Figs. 18 y 19). Una evidencia más de la modulación negativa de los canales de sodio sensibles a voltaje por vinpocetina, es que en sinaptosomas resuspendidos

en un medio sin calcio externo, la vinpocetina también inhibe el aumento en la Na_i inducido por la aplicación secuencial de 0.1 mM de 4-AP y veratridina (Fig. 18b), además de que detiene el aumento en la Na_i en sinaptosomas predespolarizados con 0.1 mM de 4-AP o veratridina, como lo muestran las figuras 19a y 19b. La reversión del aumento en la Na_i que se observa en presencia de vinpocetina debe estar mediada, como ha sido propuesto previamente, por la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ , el único mecanismo responsable de la salida del sodio del interior de las terminales nerviosas cuando estas funcionan bajo condiciones fisiológicas estables (Gleitz y cols. 1995; Gutzer y Gleitz, 1998).

Estudios previos del laboratorio demostraron que a diferencia del aumento en la Ca_i inducido por K^+ alto, que se inhibe por el bloqueo de los canales de calcio con las ω -agatoxinas, IVA y TK, y es insensible a tetrodotoxina y a vinpocetina, el aumento en la Ca_i inducido por veratridina es insensible al bloqueo de los canales de calcio tipo P/Q con ω -agatoxina y es inhibido completamente por el bloqueo de los canales de sodio con tetrodotoxina o vinpocetina (Sitges y Nekrassov 1999; Galindo y Sitges 2004). El aumento en la Ca_i inducido por 4-AP muestra un tercer tipo de sensibilidad farmacológica, ya que es inhibido tanto por las toxinas bloqueadoras de canales de calcio, como por tetrodotoxina (Fig. 15c y 20f) y por vinpocetina (Figs. 20c y 20e).

Es probable que la inhibición por vinpocetina del aumento en la Ca_i sea secundario al bloqueo de los canales de sodio sensibles a voltaje, ya que mientras que el aumento en la Ca_i inducido por 4-AP es sensible a los bloqueadores de canales de sodio y calcio (Fig. 15), el aumento en la Na_i inducido por 0.1 mM de 4-AP, es completamente inhibido por vinpocetina y tetrodotoxina (Figs. 18 y 18b) y no requiere de la presencia de calcio externo.

Nuestro hallazgo de que el aumento en la Ca_i en los sinaptosomas predespolarizados con veratridina (3 y 10 μ M) también se reduce marcadamente con vinpocetina (Fig. 21) confirma resultados previos que muestran que la vinpocetina inhibe el aumento en la Ca_i que induce la

veratridina en células piramidales de CA1 de hipocampo de rata (Zelles y cols. 2001) y en sinaptosomas (Tretter y Adam-Vizi 1998; Sitges y Nekrassov 1998; Sitges y Nekrassov 1999).

Nuestros hallazgos de que la vinpocetina, que solamente inhibe el aumento en la Na_i inducido por 4-AP a la concentración baja (0.1 mM), inhiba completamente el aumento en la Ca_i que induce la 4-AP a las dos concentraciones probadas, no contradice la interpretación de que la vinpocetina inhibe selectivamente a los canales presinápticos de sodio, pues el aumento en la Na_i mediado por los canales presinápticos de sodio que induce la 4-AP está ligado a la activación de los canales presinápticos de calcio (Fig. 15).

Consistentemente con la conclusión de que la inhibición de los canales presinápticos de sodio por vinpocetina subyace a otros efectos concomitantes de la vinpocetina, tales como la inhibición del aumento en la Ca_i que induce la 4-AP y que se muestra en este estudio, están los resultados previos de que la vinpocetina también inhibe la liberación de glutamato, aspartato y dopamina inducidos por veratridina pero es incapaz de inhibir la liberación de dichos neurotransmisores inducidos por K^+ alto (Sitges y Nekrassov 1998; Sitges y Nekrassov 1999). Es interesante que en sinaptosomas de hipocampo de rata, la droga antiepiléptica carbamazepina y otros derivados de la carbamazepina inhiban la liberación de glutamato inducida por la activación de los canales de sodio sensibles a voltaje con veratridina, pero no modifiquen la liberación de glutamato inducida por K^+ alto (Ambrosio y cols. 2001).

De acuerdo con la interpretación de que todos los efectos inhibitorios de la vinpocetina sobre el aumento en la Na_i y la Ca_i que induce la 4-AP se deben al bloqueo de los canales presinápticos de sodio, están nuestros hallazgos de que, aunque la 4-AP aumenta la Na_i a través de los canales presinápticos de sodio en ausencia de calcio externo, la 4-AP es incapaz de aumentar la Ca_i en presencia de vinpocetina o tetrodotoxina (Fig. 22). La incapacidad de la vinpocetina para eliminar el aumento en la Ca_i que induce

el K^+ alto aplicado secuencialmente después de 0.1 mM de 4-AP (Fig. 22) confirma resultados previos (Sitges y Nekrassov 1999) y es consistente con la incapacidad de la tetrodotoxina de inhibir el aumento en la Ca_i que induce el K^+ alto en sinaptosomas (Tibbs y cols. 1989; Heemskerk y cols. 1991).

Finalmente, aunque la vinpocetina a la concentración de 15 μ M y la tetrodotoxina a la concentración de 1 μ M inhiben el aumento en la Na_i inducido por veratridina y por 4-AP de manera similar, es poco probable que ambas drogas se unan al mismo sitio en el canal de sodio, ya que, mientras la tetrodotoxina se une al poro del canal del lado extracelular de la membrana plasmática, es probable que la vinpocetina sea internalizada, a juzgar por sus efectos sobre la formación de DOPAC (Trejo y cols. 2001).

6. Conclusión

En este proyecto de investigación se demuestra que los efectos tanto de la tetrodotoxina como de la vinpocetina sobre los cambios iónicos y la liberación de neurotransmisores que induce la 4-AP se deben a la disminución de la permeabilidad de los canales presinápticos de sodio.

7. Bibliografia

Adam-Vizi V. 1992. External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J Neurochem.* 58(2):395-405.

Ambrosio AF, Silva AP, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM. 2001. Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. *Biochem Pharmacol.* 15;61(10):1271-5.

Armand V, Hoffmann P, Vergnes M, Heinemann U. 1999. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in entorhinal cortex hippocampal slices of rats with a genetically determined absence epilepsy (GAERS). *Brain Res.* 11;841(1-2):62-9.

Bartschat DK, Blaustein MP. 1985. Potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J Physiol.* 361:419-40.

Berridge MJ. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 21(1):13-26.

Blaustein MP, Goldring JM. 1975. Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J Physiol.* 247(3):589-615.

Bonoczk P, Gulyas B, Adam-Vizi V, Nemes A, Karpati E, Kiss B, Kapas M, Szantay C, Koncz I, Zelles T, Vas A. 2000. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: effect of vinpocetine. *Brain Res Bull.* 53(3):245-54.

Carvalho CM, Ferreira IL, Duarte CB, Malva JO, Tretter L, Adam-Vizi V, Carvalho AP. 1995. Relation of $[Ca^{2+}]_i$ to dopamine release in striatal synaptosomes: role of Ca^{2+} channels. *Brain Res.* 669(2):234-44.

Catterall WA. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev.* 72(4 Suppl):S15-48.

Cestele S, Catterall WA. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.* 82(9-10):883-92.

Chao TI, Alzheimer C. Do neurons from rat neostriatum express both a TTX-sensitive and a TTX-insensitive slow Na^+ current? 1995. *J Neurophysiol.* 74(3):934-41.

Cousin MA, Robinson PJ. 2000. Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals. *J Neurochem.* 75(4):1645-53.

Deri Z, Adam-Vizi V. 1993. Detection of intracellular free Na^+ concentration of synaptosomes by a fluorescent indicator, Na^+ -binding benzofuran isophthalate: the effect of veratridine, ouabain, and alpha-latrotoxin. *J Neurochem.* 61(3):818-25.

Erecinska M, Dagani F. 1990. Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. Effects of K^+ , Na^+ , and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. *J Gen Physiol.* 95(4):591-616.

Erecinska M, Nelson D, Silver IA. Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes). *Biochim Biophys Acta.* 1996 Nov 12;1277(1-2):13-34.

Fragoso-Veloz J, Tapia R. 1992. NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol.* 221(2-3):275-80.

Galindo CA, Sitges M. 2004. Dihydropyridines mechanism of action in striatal isolated nerve endings: comparison with omega-agatoxin IVA. *Neurochem Res.* 29(4):659-69.

Gleitz J, Beile A, Peters T. 1995. (+/-)-Kavain inhibits veratridine-activated voltage-dependent Na(+)-channels in synaptosomes prepared from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology.* 34(9):1133-8.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6):3440-50.

Gutser UT, Gleitz J. 1998. The alkaloid 6-benzoylheteratisine inhibits voltage-gated Na⁺ channels in rat brain synaptosomes. *Neuropharmacology.* 37(9):1139-46.

Jan LY, Jan YN. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci.* 20:91-123.

Haigney MC, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. 1994. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation.* 90(1):391-9.

Heemskerk FM, Schrama LH, Ghijsen WE, De Graan PN, Lopes da Silva FH, Gispen WH. 1991. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca²⁺ concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J Neurochem.* 56(6):1827-35.

Hille B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd edn. Sinauer Press. Sunderland, MA.

Ives AE, Jefferys JG. 1990. Synchronization of epileptiform bursts induced by 4-aminopyridine in the in vitro hippocampal slice preparation. *Neurosci Lett.* 112(2-3):239-45.

Kanner BI. 1994. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J Exp Biol.* 196:237-49.

Kasner SE, Ganz MB. 1992. Regulation of intracellular potassium in mesangial cells: a fluorescence analysis using the dye, PBFI. *Am J Physiol.* 262(3 Pt 2):F462-7.

Krueger BK, Blaustein MP, Ratzlaff RW. 1980. Sodium channels in presynaptic nerve terminals. Regulation by neurotoxins. *J Gen Physiol.* 76(3):287-313.

Lingamaneni R, Hemmings HC. 1999. Effects of anticonvulsants on veratridine- and KCl-evoked glutamate release from rat cortical synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 276(2):127-30.

Mathie A, Wooltorton JR, Watkins CS. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol.* 30(1):13-24.

Meder W, Fink K, 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(6):797-805.

Meder W, Fink K, Zentner J, 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(3):1126-31.

Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S, Rahamimoff R. 1999. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev.* 79(3):1019-88.

Minta A, Tsien RY. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem.* 264(32):19449-57.

Morales-Villagran A, Lopez-Perez S, Medina-Ceja L, Tapia R. 1999. Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neurosci Lett.* 275(2):133-6.

Murai S, Saito H, Masuda Y, Itoh T. 1988. Rapid determination of norepinephrine, dopamine, serotonin, their precursor amino acids, and related metabolites in discrete brain areas of mice within ten minutes by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem.* 50(2):473-9.

Muyderman H, Hansson E, Nilsson M. 1997. Adrenoceptor-induced changes of intracellular K⁺ and Ca²⁺ in astrocytes and neurons in rat cortical primary cultures. *Neurosci Lett.* 238(1-2):33-6.

Muyderman H, Sinclair J, Jardemark K, Hansson E, Nilsson M. 2001. Activation of beta-adrenoceptors opens calcium-activated potassium channels in astroglial cells. *Neurochem Int.* 38(3):269-76.

Nekrassov V, Sitges M. 2004. Vinpocetine inhibits the epileptic cortical activity and auditory alterations induced by pentylentetrazole in the guinea pig in vivo. *Epilepsy Res.* 60(1):63-71.

Nelson N, Lill H. 1994. Porters and neurotransmitter transporters. *J Exp Biol.* 196:213-28.

Nicholls DG. 1989. Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem.* 52(2):331-41.

Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 78(4):969-1054.

Peña F, Tapia R. 1999. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem.* 72(5):2006-14.

Perreault P, Avoli M. 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 65(4):771-85.

Psarropoulou C, Avoli M. 1996. Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis. *Brain Res Dev Brain Res.* 94(1):52-9.

Raiteri L, Raiteri M, Bonanno G. 2002. Coexistence and function of different neurotransmitter transporters in the plasma membrane of CNS neurons. *Prog Neurobiol.* 68(4):287-309.

Raiteri L, Stigliani S, Zedda L, Raiteri M, Bonanno G. 2002b. Multiple mechanisms of transmitter release evoked by "pathologically" elevated extracellular [K⁺]: involvement of transporter reversal and mitochondrial calcium. *J Neurochem.* 80(4):706-14.

Reuter H. 1996. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 6(3):331-7.

Rodriguez R, Sitges M. 1996. Nigericin-induced Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ exchange in synaptosomes: effect on [3H]GABA release. *Neurochem Res.* 21(8):889-95.

Rudy B. 1988. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.* 25(3):729-49.

Santos MS, Moreno AJ, Carvalho AP. 1996. Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke.* 27(5):941-50.

Santos MS, Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. 2000. Synaptosomal response to oxidative stress: effect of vinpocetine. *Free Radic Res.* 32(1):57-66.

Scheer HW, Lavoie PA. 1991. Mechanism of aminopyridine-induced release of [3H]dopamine from rat brain synaptosomes. *Gen Pharmacol.* 22(1):169-72.

Sihra TS, Nicholls DG. 1987. 4-Aminobutyrate can be released exocytotically from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem.* 49(1):261-7.

Sitges M, Possani LD, Bayon A. 1986. Noxiustoxin, a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K⁺ permeability. *J Neurosci.* 6(6):1570-4.

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(2):436-41.

Sitges M, 1993. Comunicación entre las células nerviosas: Sinapsis. (Eds: Clapp C y Martínez de la Escalera G.) Comunicación neuroendócrina: Bases Celulares y Moleculares. Primera Edición, pp 71-85. México, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

Sitges M, Chiu LM, Gonzalez L. 1993. Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [3H]GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem Res.* 18(10):1081-7.

Sitges M, Reyes A, Chiu LM. 1994. Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride. *J Neurosci Res.* 39(1):11-22.

Sitges M, Chiu LM. 1995. Characterization of the type of calcium channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve endings. *Neurochem Res.* 20(9):1073-80.

Sitges M, Chiu LM. 1995b. omega-Aga IVA selectively inhibits the calcium-dependent fraction of the evoked release of [3H]GABA from synaptosomes. *Neurochem Res.* 20(9):1065-71.

Sitges M, Pena F, Chiu LM, 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(2):177-90.

Sitges M, Rodriguez RM. 1998. Effects of external pH variations on brain presynaptic sodium and calcium channels; repercussion on the evoked release of amino acid neurotransmitters. *Neurochem Res.* 23(4):477-85.

Sitges M, Nekrassov V. 1999. Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochem Res.* 24(12):1585-91.

Sitges M, Nekrassov V, Guarneros A. 2000. Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res.* 854(1-2):48-56.

Sitges M, Nekrassov V. 2004. Vinpocetine prevents 4-aminopyridine-induced changes in the EEG, the auditory brainstem responses and hearing. *Clin Neurophysiol.* 115(12):2711-7.

Sitges M, Galindo CA. omega-Agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca(2+) channel-mediated changes in internal Ca(2+) and glutamate release in depolarised brain nerve terminals. *Neurochem Int.* 2005 Jan;46(1):53-60.

Spyker DA, Lynch C, Shabanowitz J, Sinn JA. 1980. Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin Toxicol.* 16(4):487-97.

Stevens CF, Williams JH. 2000. "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23):12828-33.

Stephens GJ, Garratt JC, Robertson B, Owen DG. 1994. On the mechanism of 4-aminopyridine action on the cloned mouse brain potassium channel mKv1.1. *J. Physiol.* 477 (Pt 2):187-96.

Stolc S. 1999. Indole derivatives as neuroprotectants. *Life Sci.* 65(18-19):1943-50.

Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. 1992. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci.* 12(2):430-9.

Takahashi S, Shibata M, Fukuuchi Y. 1999. Role of sodium ion influx in depolarization-induced neuronal cell death by high KCl or veratridine. *Eur J Pharmacol.* 372(3):297-304.

Tamkun MM, Catterall WA. 1981. Ion flux studies of voltage-sensitive sodium channels in synaptic nerve-ending particles. *Mol Pharmacol.* 19(1):78-86.

Tapia R, Sitges M. 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250(2):291-9.

Tapia R, Sitges M, Morales E. 1985. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361(1-2):373-82.

Taylor CP, Narasimhan LS. 1997. Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. *Adv Pharmacol.* 39:47-98.

Tibbs GR, Barrie AP, Van Mieghem FJ, McMahon HT, Nicholls DG. 1989. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release. *J Neurochem.* 53(6):1693-9.

Tibbs GR, Dolly JO, Nicholls DG. 1996. Evidence for the induction of repetitive action potentials in synaptosomes by K⁺channel inhibitors: an analysis of plasma membrane ion fluxes. *J Neurochem.* 67(1):389-97.

Trejo F, Nekrassov V, Sitges M. 2001. Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings. *Brain Res.* 909(1-2):59-67.

Tretter L, Adam-Vizi V. 1998. The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i rise in synaptosomes. *Neuroreport.* 9(8):1849-53.

Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. 1992. Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science.* 258(5080):310-3.

Urenjak J, Obrenovitch TP. 1996. Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol Rev.* 48(1):21-67.

Westenbroek RE, Merrick DK, Catterall WA. 1989. Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron.* 3(6):695-704.

Yi BA, Minor DL Jr, Lin YF, Jan YN, Jan LY. 2001. Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11016-23.

Zelles T, Franklin L, Koncz I, Lendvai B, Zsilla G. 2001. The nootropic drug vinpocetine inhibits veratridine-induced [Ca²⁺]_i increase in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neurochem Res.* 26(8-9):1095-100.

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. 1993. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*. 32(11):1075-88.

8. Artículo Publicado

El artículo que compila los resultados de la primera parte de la presente tesis se anexa a continuación, y el manuscrito que compila los resultados de la segunda parte de la tesis fue recientemente sometido a la revista Neurochem. Int. (se anexa carta de recepción)

Characterization of the Participation of Sodium Channels on the Rise in Na^+ Induced by 4-Aminopyridine (4-AP) in Synaptosomes

Emilio Galván¹ and María Sitges^{1,2}

(Accepted July 16, 2003)

The participation of voltage-sensitive Na^+ channels (VSSC) on the changes on internal (i) Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and on DA, Glu, and GABA release caused by different concentrations of 4-AP was investigated in striatum synaptosomes. TTX, which abolished the increase in Na_i (as determined with SBFI), induced by 0.1 mM 4-AP only inhibited by 30% the rise in Na_i induced by 1 mM 4-AP. One millimolar 4-AP markedly decreased the fluorescence of the K^+ indicator dye PBFI but 0.1 mM 4-AP did not. Like 1 mM 4-AP, ouabain decreased PBFI fluorescence and increased a considerable fraction of Na_i in a TTX-insensitive manner. In contrast with the different TTX sensitivity of the rise in Na_i induced by 0.1 and 1 mM 4-AP, the rise in Ca_i (as determined with fura-2) induced by the two concentrations of 4-AP was markedly inhibited by TTX, as well as by ω -agatoxin in combination with ω -conotoxin GVIA, indicating that only the TTX-sensitive fraction of the rise in Na_i induced by 4-AP is linked with the activation of presynaptic Ca^{2+} channels. It is concluded that the TTX-sensitive fraction of neurotransmitter release evoked by 4-AP is released by exocytosis, and the TTX-insensitive fraction involves reversal of the neurotransmitters transporters. This contrasts with the exocytosis evoked by high K^+ that is unchanged by TTX and with the neurotransmitter-transporter-mediated release evoked by veratridine, which is highly TTX sensitive and does not require activation of Ca^{2+} channels.

KEY WORDS: Tetrodotoxin; neurotransmitter release; sodium channels; calcium channels; potassium channels; Na^+ , K^+ -ATPase; synaptosomes.

INTRODUCTION

4-AP is a well-known convulsant that increases neurotransmitter release in the CNS (1). The action of 4-AP at the presynaptic brain level is amply documented. It was demonstrated 20 years ago, when Tapia and Sitges (2) found that in mice brain isolated nerve endings (synaptosomes) preloaded with radioactive glutamate (Glu), GABA,

or the acetylcholine precursor choline, 4-AP increased the baseline release of the excitatory and inhibitory neurotransmitters. This releasing action of 4-AP was latter confirmed for endogenous Glu determined by continuous fluorimetry in guinea pig cerebrocortical synaptosomes (3) and for [³H]DA release in rat striatal synaptosomes (4,5).

The requirement of external Ca^{2+} for the neurotransmitter releasing action of 4-AP is likely to depend on the concentration of 4-AP. For example, in whole mice brain synaptosomes preloaded with [³C]Glu and [³H]GABA, the release of both amino acid neurotransmitters induced by 50 μM 4-AP is highly dependent on the presence of external Ca^{2+} and the release induced by 4-AP at a high concentration (2 mM) is less dependent on external Ca^{2+} (2). Similarly, in rat striatum synaptosomes preloaded with

¹ Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

² Address reprint requests to: María Sitges, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F. Tel: 622-38-66; Fax: 525-622-38-97; E-mail: sitges@servidor.unam.mx

[³H]DA, the release of this transmitter induced by 0.1 mM 4-AP is highly dependent on external Ca²⁺, whereas the release of [³H]DA induced by 1 mM 4-AP does not depend on external Ca²⁺ at all (5).

Neurotransmitter exocytosis depends on the entrance of external Ca²⁺. However, when the internal concentration of Na⁺ (Na_i) is substantially elevated the neurotransmitters are released by reversal of the neurotransmitter transporters in the absence of external Ca²⁺ (6–13). Therefore the neurotransmitter release evoked by the high (1–2 mM) concentrations of 4-AP in the absence of external Ca²⁺ may indicate that 4-AP is capable of elevating Na_i in cerebral nerve endings.

In addition, the rise in the internal concentration of Ca²⁺ (Ca_i) induced by 4-AP, which was not resolved using ⁴⁵Ca²⁺ (14) but became evident when the more sensitive fura-2 technique was used in synaptosomes, is inhibited by the Na⁺ channel blocker TTX (3,15), indicating the role of VSSC in the mode of action of 4-AP at the brain presynaptic level. The involvement of K⁺ channels in the mode of action of 4-AP at the presynaptic brain level is indicated by the changes on ⁸⁶Rb⁺ fluxes caused by 4-AP in synaptosomes (16,17).

In an attempt to further understand the apparently complex mode of action of 4-AP, its effect on the internal concentrations of the three main ions controlling the physiology of cerebral nerve endings was investigated in striatum synaptosomes preloaded with SBFI, PBFI, or fura-2 that change their emission fluorescence in response to the internal concentrations of Na⁺, K⁺, or Ca²⁺, respectively. This is the first time that PBFI is used to monitor K_i changes in synaptosomes. This systematic study, which attempted to elucidate the participation of VSSC on the changes on Na_i, K, Ca_i, and neurotransmitter release induced by 4-AP at different concentrations, reveals new aspects of the mode of action of 4-AP at the presynaptic brain level.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of Striatum 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 1500 × *g* for 10 min, and supernatants obtained from this centrifugation were centrifuged for another 20 min at 9000 × *g*. The resulting pellets containing striatal synaptosomes were resuspended in standard Krebs' Ringer HEPES (KRH, in mM: 147 NaCl, 1.2 KH₂PO₄, 3.37 KCl, 1 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 20 HEPES, and 5.6 mM dextrose [pH 7.4], bubbled with a O₂/CO₂ mixture).

Estimation of Na_i, K_i and Ca_i Concentrations in Striatum Synaptosomes. The methods used to load synaptosomes with fura-2 or with

SBFI and to monitor their fluorescence were previously reported (12, 18,19). Briefly, striatal synaptosomes were incubated with SBFI-AM (10 μM) or with fura-2-AM (5 μM) for 45 min at 37°C. For estimation of PBFI fluorescence, striatum synaptosomes were incubated with PBFI-AM (10 μM) for 50 min at 37°C. Incubation was stopped by dilution and centrifugation. After washing out the unincorporated fluorescent dyes, the final synaptosomal pellets were resuspended in 1.5 ml of KRH. The synaptosomal suspensions were kept at 4°C in the dark and used within 2 h. Aliquots (300 μg/ml) of these suspensions were transferred to the cuvettes, diluted 10-fold with KRH and stirred continuously. Fluorescence of SBFI, PBFI, and fura-2 was monitored on-line 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°C). Data points were collected at 1.8-s intervals. After monitoring the 340/380-nm baseline ratio for 3 to 4 min, an aliquot of concentrated solution of the drug to be tested (4-AP, veratridine, or ouabain) was directly added to the cuvette for obtaining the desired final concentration and data points were collected for another 4 to 5 min.

The method used for estimation of Na_i in mM from SBFI fluorescence was previously reported (20). Ca_i was estimated from fura-2 fluorescence following the ratio method of Grynkiewicz et al. (21).

Release Experiments. Rat striatal synaptosomes (300 ± 23 μg) suspended in 500 μl of KRH were preincubated at 37°C for 5 min before exposure to the experimental conditions to be studied (KRH, 30 mM K⁺, 20 μM veratridine, 1 mM 4-AP, or 100 μM ouabain in the absence or presence of 1 μM TTX) and then incubated at 37°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°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 neurotransmitters released were injected into the HPLC system within the 2 weeks after the experiment.

Determination of the Concentration of DA. Twenty microliters of sample suspended in 0.1 M PCA/0.1 mM EDTA were injected directly into the Waters HPLC system for analysis. The HPLC system consists of a delivery pump (model 600), a Rheodyne injector, an analytical column (resolve, C18, 150 × 3.9-mm internal diameter, particle size 5 μm) controlled at 30°C, and an electrochemical detector (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% (vol/vol) methanol, 100 mg/L octanesulfonic acid, and 20 mg/L EDTA, at a flow rate of 1 ml/min, was applied for DA elution. The concentration of DA in the experimental samples was calculated with calibration curves obtained from the injection of increasing concentrations of the external standard mixture (containing DA, Glu, and GABA) into the HPLC system.

Determination of the Concentrations of Glu and GABA. Ten microliters of sample suspended in 0.1 M PCA/0.1 mM EDTA were mixed with 20 μl of *O*-phthalaldehyde reagent. After 120 s (strict time), a 10-μl aliquot was injected into the HPLC system. An analytical column (Nova-pak C-18, 75 × 3.9-mm internal diameter, particle size 10 μm) set at 25°C and a fluorescence detector set at 360 nm (excitation wavelength) and 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 and GABA in the experimental samples were calculated with calibration curves obtained from the injection of increasing concentrations of the external standard mixture after *O*-phthalaldehyde derivatization into the HPLC system.

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

Source of Materials. SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate), PBFI (K^+ -binding benzofuran isophthalate), and fura-2 (1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) in their cell-permeant acetoxymethyl ester (AM) forms and pluronic acid F-127 were from Molecular Probes Inc (Eugene, OR). 4-Aminopyridine (4-AP), veratridine, tetrodotoxin (TTX), gramicidin D, digitonin, and probenecid were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). ω -Agatoxin IVA (ω -Aga IVA) and ω -conotoxin GVIA (ω -CnTx GVIA) were from Calbiochem (La Jolla, CA). All other reagents were of analytical grade.

RESULTS

Effect of TTX on the Elevation of Na_i Induced by 4-AP

The effect of the Na^+ channel blocker TTX was tested to examine whether VSSCs are involved in the mechanism by which 4-AP rises Na_i . The rise in Na_i induced by 4-AP at a concentration of 100 μ M is practically abolished by TTX (Fig. 1a). However, the rise in Na_i induced by 4-AP at the higher concentration (1 mM) is only reduced 34% by TTX (Fig. 1b). Also, the rise in Na_i induced by 200 μ M 4-AP is only partially inhibited (35%) by TTX (data not shown). Examples of the developed responses to 0.1 and 1 mM 4-AP, in the absence and in the presence of TTX, are illustrated in the bottom plots of Figure 1.

Effect of TTX on the Elevation of Na_i Induced by Veratridine and by Ouabain

In agreement with previous studies (22,23) under the experimental conditions used in this study, TTX completely prevented the rise in Na_i induced by the persistent activation of VSSC with veratridine (Fig. 2a) and only produced a partial inhibition of the rise in Na_i induced by the blockade of the Na^+,K^+ -ATPase with ouabain (Fig. 2b). For example, 1 μ M TTX reduced by 96% the Na_i response to 10 μ M veratridine and by 22% and 27% the Na_i response to 20 and 50 μ M ouabain, respectively. The net rise in Na_i induced by 100 μ M ouabain (24.4 ± 0.6 mM, over the respective baseline) (not shown in Fig. 2b) is reduced $32 \pm 5\%$ by TTX. Representative experiments of the developed Na_i responses to veratridine and ouabain in the absence and presence of TTX are illustrated in the graphs below Figure 2a and 2b, respectively.

Effects of Ouabain, 4-AP, and Veratridine on K_i

Considering that when the Na^+,K^+ -ATPase is stopped external K^+ cannot be pumped in and internal Na^+ cannot be pumped out, we tested the effect of ouabain on the PBFI 340/380 fluorescence ratio to examine whether the pump could be involved in the mechanism by which 100 μ M ouabain increases two thirds of the Na_i in a TTX-insensitive manner. Figure 3a shows that exposure of synaptosomes to ouabain decreases the PBFI fluorescence. The effects on K_i (as determined by the PBFI fluorescence ratio) of 1 mM 4-AP, 10 μ M veratridine, and 0.1 mM 4-AP also are shown in Figure 3. At the high concentration (1 mM) 4-AP (that like ouabain rises a fraction of Na_i in a TTX-insensitive manner) induces a pronounced reduction in K_i (Fig. 3b). In contrast, 10 μ M veratridine and 4-AP at the concentration of 0.1 mM (that are both unable to raise Na_i in the presence of TTX) are also unable to change K_i (Fig. 3c and 3d, respectively).

Effects of Voltage-Sensitive Na^+ and Ca^{2+} Channel Blockers on the Elevation of Ca_i Induced by 4-AP

In contrast to the higher efficacy of 1 mM than 0.1 mM 4-AP to raise Na_i , 1 mM 4-AP does not elevate Ca_i much further than 0.1 mM 4-AP (Fig. 4a and 4b).

The degree of the rise in Ca_i induced by 1 mM 4-AP (final) in synaptosomes directly exposed to 1 mM 4-AP (Fig. 4a) or preexposed to 0.1 mM 4-AP (Fig. 4b) is similar; thus the effects of TTX or of the toxins that block Ca^{2+} channels on the rise in Ca_i induced by 0.1 and 1 mM 4-AP were tested in synaptosomes exposed subsequently to the two concentrations.

In agreement with previous studies showing that in fura-2 preloaded synaptosomes, 1 μ M TTX exerts a pronounced inhibition of the elevation of Ca_i induced by 0.1 mM 4-AP (15) as well as by 1 mM 4-AP (3), we found that the Ca_i response induced by 4-AP at the above concentrations is markedly inhibited by TTX (Fig. 4c). Notably, the blockage of Ca^{2+} channels with ω -Aga IVA in combination with ω -CnTx GVIA markedly inhibited the rise in Ca_i induced by the subsequent addition of 0.1 and 1 mM 4-AP (Fig. 4d).

Effect of TTX on Neurotransmitter Release Induced by Various Releasing Agents

The effect of TTX on the simultaneous release of three endogenous neurotransmitters, namely DA, Glu, and GABA, induced by 1 mM 4-AP was tested and compared with the effect of TTX on neurotransmitter release induced by high K^+ , veratridine, and ouabain. Table I shows that

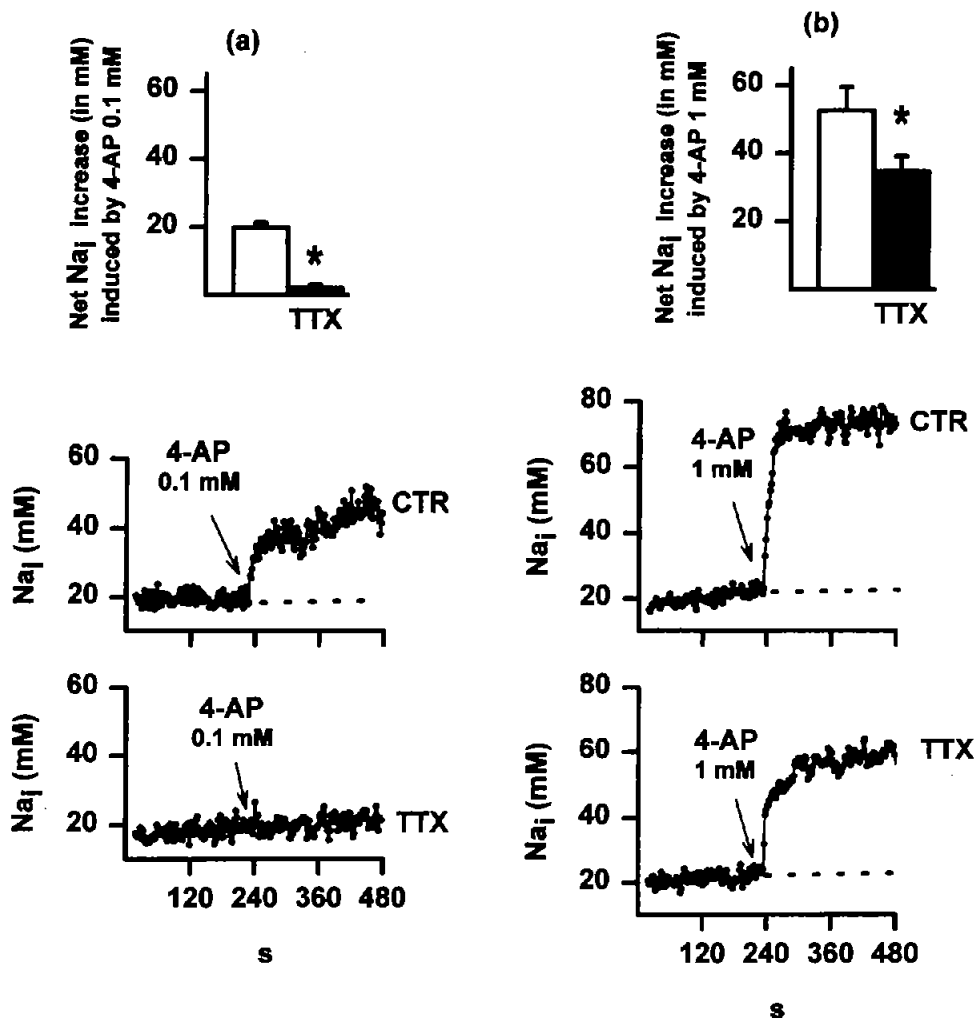


Fig. 1. Effect of TTX on the increase in Na_i induced by 4-AP at two concentrations. Striatal synaptosomes were preloaded with SBFI. After measuring the basal level of Na_i in the absence or in the presence of TTX for 4 min, synaptosomes were exposed to 0.1 mM 4-AP (a) or to 1 mM 4-AP (b) and the Na_i level was measured for another 4 min. Top graphs: Net Na_i increase refers to the Na_i response to 4-AP (i.e., average of data points after 4-AP minus the respective baseline (i.e., average of data points before 4-AP) in the absence (empty bars) or in the presence (dark bars) of 1 μ M TTX. Bars results are the mean \pm SEM values from four (a) or seven (b) independent preparations. * $P < .05$ between the Na_i response to 4-AP in the absence and in the presence of TTX. Bottom graphs: Representative experiments showing the kinetics of the Na_i response to 4-AP at the indicated concentration in the absence (CTR) or in the presence of 1 μ M TTX (TTX).

the release of all the neurotransmitters tested evoked by high K^+ is unchanged by TTX, which completely inhibits the release evoked by veratridine and partially inhibits the release evoked by 1 mM 4-AP or by ouabain.

Comparison of the releasing effectiveness of these four agents reveals that veratridine is the most effective, probably because the reversal of the neurotransmitter transporters inhibits the reuptake of the released transmitters. The releasing effectiveness of high K^+ , 4-AP, and ouabain varies depending on the neurotransmitter. For example, under the present experimental conditions 1 mM 4-AP and ouabain are more effective DA releasers

than high K^+ , whereas high K^+ and ouabain were more effective releasers of the amino acid neurotransmitters Glu and GABA than 1 mM 4-AP.

DISCUSSION

In the present study the effect of 4-AP on Na_i , K_i , and Ca_i was investigated in striatal synaptosomes preloaded with SBFI, PBFI, and fura-2, respectively. Although these selective indicator dyes do not resolve the very rapid synaptic events that occur in milliseconds, they can detect Na_i , K_i ,

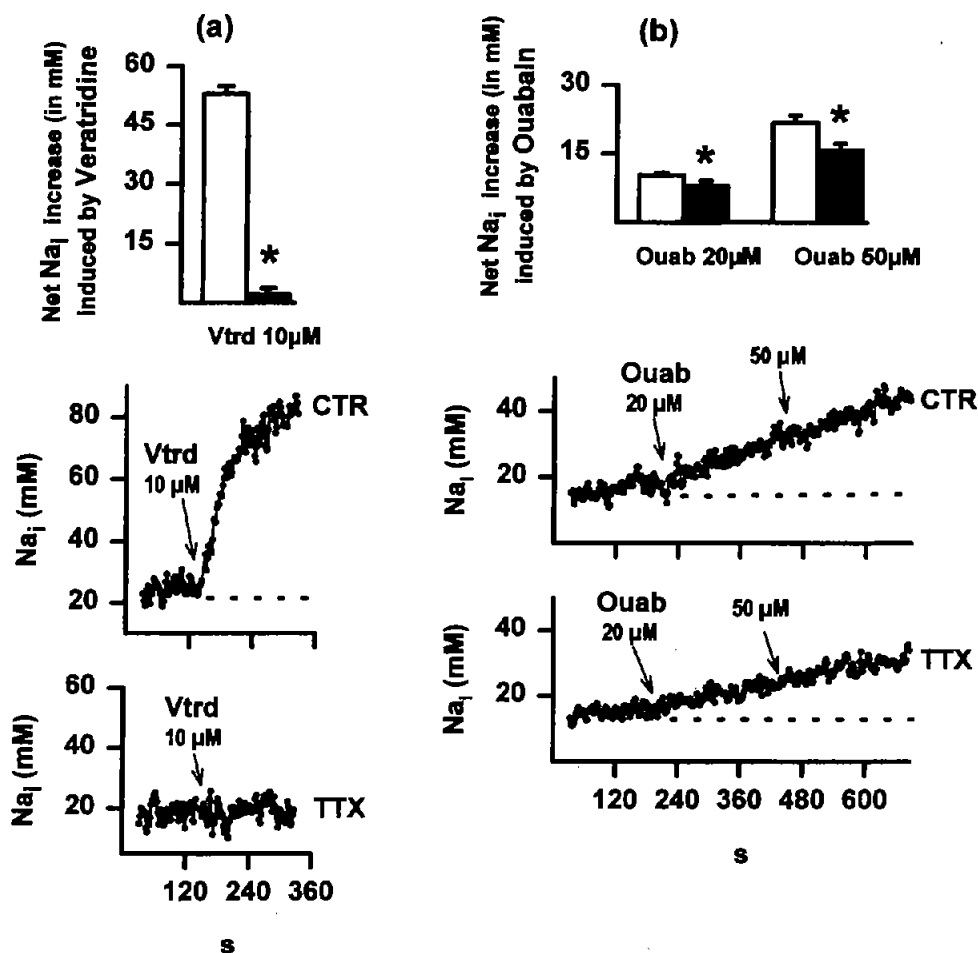


Fig. 2. Effect of TTX on the increase in Na_i induced by veratridine or by ouabain. Striatal synaptosomes were preloaded with SBFI. After measuring the basal level of Na_i in the absence or in the presence of TTX for 4 min, synaptosomes were exposed to 10 μM veratridine (a) or to 20 μM and then 50 μM final ouabain (b) and the Na_i level measured for the indicated times. Top graphs: Net Na_i increase refers to the Na_i response to 10 μM veratridine or to ouabain (at the indicated concentration) minus the respective baseline in the absence (empty bars) or in the presence (dark bars) of 1 μM TTX. Bars results are the mean \pm SEM values from four (a) or six (b) independent preparations. * $P < .05$ between the Na_i response to veratridine or to ouabain in the absence or in the presence of TTX. Bottom graphs: Representative experiments showing the kinetics of the Na_i responses to veratridine or ouabain at the indicated concentrations in the absence (CTR) or in the presence of 1 μM TTX (TTX).

and Ca_i changes and resolve fairly rapid kinetic events. For example, SBFI and fura-2 have been successfully used for revealing Na_i and Ca_i changes that persist for seconds and minutes after the application of drugs like veratridine, ouabain, or ionophores in guinea pig, rat, mice, and human synaptosomes (3,18,20,23–25). The PBFI technique has not been used in synaptosomes previously, and although there are only a couple of studies using PBFI in biological preparations, PBFI also has proven suitable to monitor K^+ changes inside cells (26,27).

Effects of 4-AP on Na_i and K_i

The present results show that 4-AP, like veratridine and ouabain, increases Na_i within seconds. The TTX sen-

sitivity of the rise in Na_i induced by the above agents indicates the involvement of VSSC in all cases. However, clear differences in the degree of inhibition by TTX are observed. For example, the rise in Na_i induced by veratridine binding to the Na^+ channel (site 2) is completely inhibited by the blockade of the channel pore (site 1) by TTX, as expected from previous reports on SBFI preloaded synaptosomes prepared from mice brain (18) or rat cerebral regions (23,24,28). In contrast, the rise in Na_i induced by ouabain, which has been claimed to involve VSSC (22,29), is only partly sensitive to TTX. This is the first time that the effect of TTX on the rise in Na_i induced by 4-AP has been measured. Interestingly, the present results show that the degree of TTX sensitivity of the Na_i response to 4-AP varies depending on the concentration

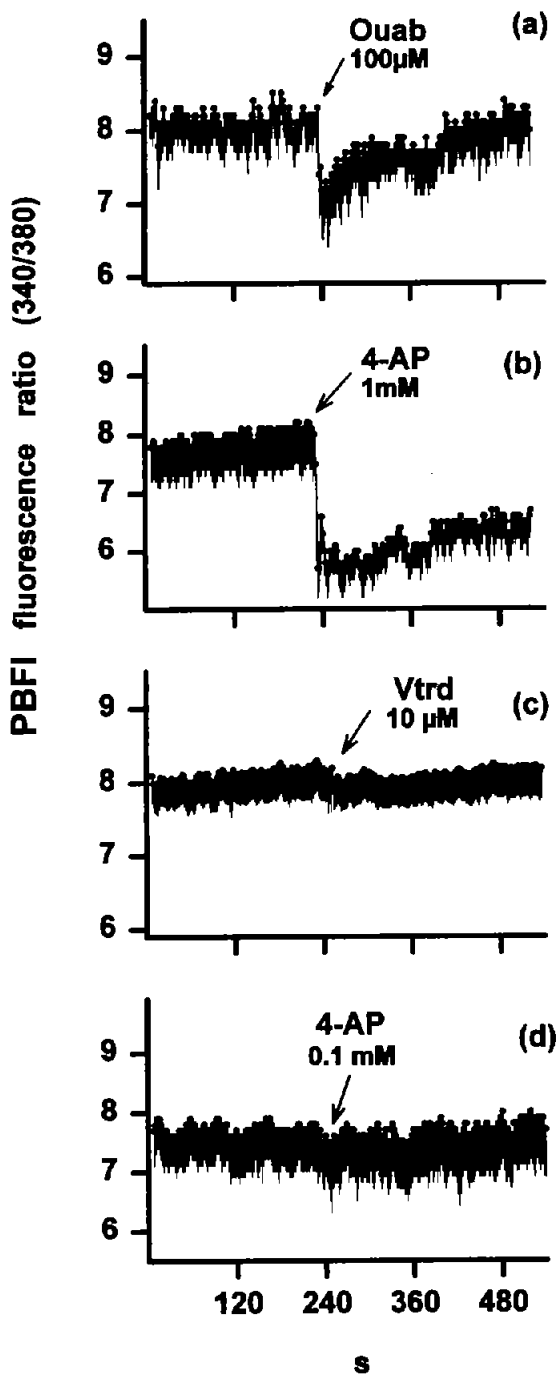


Fig. 3. Effect of ouabain, veratridine, and 4-AP at two concentrations on K_{ij} . Striatal synaptosomes were loaded with PBFi as described in the Experimental Procedure Section. Data points were taken at 1.8-s intervals. After measuring the PBFi fluorescence ratio (340/380) for 4 min, synaptosomes were exposed to ouabain (a), to 1 mM 4-AP (b), to 10 μM veratridine (c) or to 0.1 mM 4-AP (d), and the PBFi fluorescence ratio was measured for another 5 min after each addition. Results are the mean \pm SEM values from five (a), seven (b), six (c), or five (d) independent preparations.

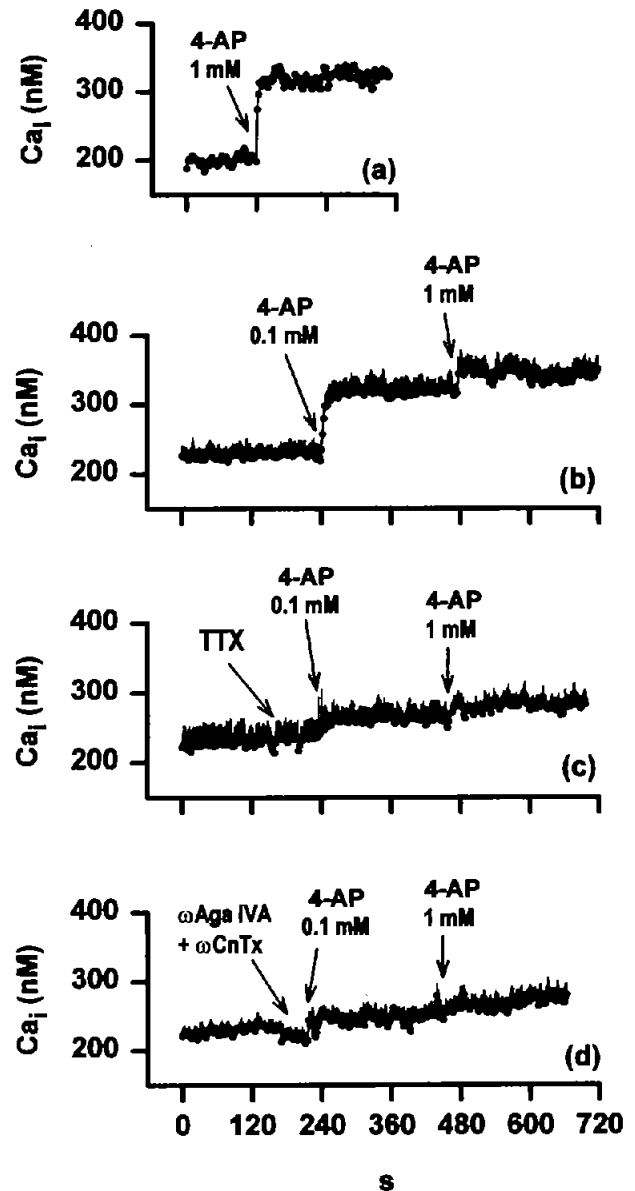


Fig. 4. Effect of TTX and of ω -Aga IVA in combination with ω -CnTx-GVIA on the increase in Ca_i induced by 4-AP. Synaptosomes purified from rat striatum were loaded with fura-2. Ca_i was estimated by the ratio technique described in the Experimental Procedure section. Data points were taken at 1.8-s intervals. After measuring the basal level of Ca_i in the absence (a and b) or in the presence of 1 μM TTX (c) or ω -Aga IVA in combination with 1 μM ω -CnTx-GVIA (d), synaptosomes were exposed to 1 mM 4-AP (a) or to 0.1 mM and subsequently to 1 mM 4-AP, and the Ca_i level was measured for another 4 min after each addition. Results are the mean \pm SEM values of four independent preparations.

of 4-AP tested, as the rise in Na_i induced by 0.1 mM 4-AP is completely inhibited by TTX, whereas the rise in Na_i induced by 4-AP at a high (1 mM) concentration is only reduced in one third by TTX.

Table I. Comparison of the Effect of TTX on Neurotransmitter Release Induced by high K^+ , Veratridine, Ouabain and 4-AP in Striatal Synaptosomes

	DA	Glu	GABA	N
Control	11.1 ± 2.3	13.2 ± 2.3	3.6 ± 0.8	6
High K^+	42.4 ± 4.9*	27.7 ± 3.5*	9.3 ± 0.7*	6
High K^+ + TTX	41.3 ± 4.8	29.5 ± 3.8	9.8 ± 1.2	6
Control	11.1 ± 2.2	13.4 ± 1.0	3.3 ± 0.5	7
Vtrd	127.5 ± 10.2*	42.4 ± 3.7*	15.8 ± 1.2*	7
Vtrd + TTX	10.8 ± 2 [†]	13.0 ± 0.7 [†]	3.6 ± 0.6 [†]	7
Control	10.5 ± 2.2	13.1 ± 0.7	2.3 ± 0.3	8
4-AP	94.4 ± 8.3*	16.7 ± 1.3*	5.2 ± 0.2*	8
4-AP + TTX	77.7 ± 6.3 [†]	14.6 ± 1.4 [†]	3.2 ± 0.2 [†]	8
Control	8.3 ± 1.0	13.8 ± 0.6	2.7 ± 0.1	5
Ouabain	140.1 ± 3.8*	28.8 ± 1.1*	9.2 ± 0.3*	5
Ouabain + TTX	77.2 ± 8.5 [†]	21.3 ± 1.3 [†]	6.1 ± 0.4 [†]	5

Note: DA concentrations are in pmoles/mg of synaptosomal protein. Amino acids concentrations are in nmoles/mg of synaptosomal protein. High K^+ , veratridine (Vtrd), 4-AP, ouabain, and TTX final concentrations are 30 mM, 20 μ M, 100 μ M, 1 mM, and 1 μ M, respectively. Results are the mean \pm SEM values of the indicated number (N) of independent experiments. * $P < .05$ between control and depolarized synaptosomes. [†] $P < .05$ between synaptosomes treated with the releasing agent in the absence and presence of TTX.

Under the present experimental conditions the specific action of TTX on VSSC is supported by the complete inhibition of the Na_i response elicited by veratridine. Thus the complete inhibition exerted by TTX on the rise in Na_i induced by 0.1 mM 4-AP indicates that at this concentration the 4-AP-induced rise in Na_i is exclusively mediated by the entrance of Na^+ via VSSC. In agreement, electrophysiological results in hippocampal slices show that the synchronous excitatory responses evoked by 0.1 mM 4-AP are completely blocked by 1 μ M TTX (1). However, the partial inhibition exerted by TTX on the Na_i response to 1 mM 4-AP indicates that an additional phenomenon capable of elevating Na^+ that is superimposed upon the first is caused by 4-AP at higher concentrations.

Across the synaptosome surface membrane there is normally a large K^+ gradient [$(K^+)_{out} \lll (K^+)_{in}$] (30). The main role of the plasma membrane Na^+,K^+ -ATPase is to maintain the high level of internal K^+ against its chemical gradient. The decrease in K_i induced by ouabain shown here indicates that under baseline conditions Na^+,K^+ -ATPase is working for maintaining the high K_i concentration. The decrease in K_i that occurs spontaneously when Na^+,K^+ -ATPase is inhibited by ouabain is accompanied by a TTX-insensitive rise in Na_i , indicating that under baseline conditions external K^+ is being pumped in and internal Na^+ is being pumped out by Na^+,K^+ -ATPase. Considering that, like for the case of ouabain, exposure of striatal synaptosomes to 1 mM 4-AP decreases K_i and increases a considerable fraction of Na_i in a TTX-insensitive manner, one reasonable

explanation for the TTX-insensitive rise in Na_i induced by 4-AP at the high (1 mM) concentration is the indirect inhibition of the Na^+,K^+ -ATPase. The extensive blockade of K^+ channels caused by 1 mM 4-AP may reduce the loss of internal K^+ to a threshold sufficient to stop the pump. In contrast, the failure of 4-AP at the lower (0.1 mM) concentration in modifying K_i , indicates that the blockage of K^+ channels produced by 0.1 mM 4-AP is not enough to cause inhibition of the Na^+,K^+ -ATPase. Consistently, the rise in Na_i induced by 0.1 mM 4-AP is completely inhibited by TTX, indicating that the Na^+,K^+ -ATPase does not play a role in this rise in Na_i . Veratridine, although largely increasing Na_i , but in a completely TTX-sensitive manner, failed in modifying K_i . Taking together these Na_i and K_i results, it can be concluded that a drug that does not reduce K_i , and only elevates Na_i via activation of VSSC does not cause an inhibition of the Na^+,K^+ -ATPase. Therefore the activity of the Na^+,K^+ -ATPase (at least under the present experimental conditions) is likely to be determined by the loss of internal K^+ rather than by the increase in internal Na^+ .

Ouabain and 1 mM 4-AP reduce K_i and elevate a considerable fraction of Na_i (~70%) in a TTX-insensitive manner through the inhibition of Na^+,K^+ -ATPase but also rise a fraction of Na_i (~30%) that is inhibited by TTX, indicating that the two mechanisms (i.e., inhibition of the Na^+,K^+ -ATPase and activation of VSSC) act in concert. Even so, the participation of these two mechanisms is particular for each case. For the case of ouabain, the increase in Na_i and the decrease in K_i that result from the inhibition of Na^+,K^+ -ATPase may increase the probability of VSSC opening. For the case of 4-AP, the complete inhibition of the Na_i response to the low concentration of 4-AP by TTX suggests that 4-AP is able to increase Na_i by activation of VSSC at any concentration, and only when the blockage of K^+ channels reaches a certain threshold, like that achieved with 1 mM 4-AP, is Na^+,K^+ -ATPase stopped with the concomitant TTX-insensitive rise in Na_i .

Effect of 4-AP on Ca_i

In agreement with the previously reported inhibition of the rise in Ca_i induced by 4-AP at various concentrations by TTX in rat and guinea pig cerebrocortical synaptosomes (3,15), we have found that TTX inhibits the rise in Ca_i induced by 4-AP in striatal synaptosomes at both concentrations. However, the marked differences between the Na_i and K_i responses induced by the low and at the high concentrations of 4-AP contrast with the similar rise in Ca_i induced by 0.1 and 1 mM 4-AP that is markedly

inhibited by both the blockade of VSSC with TTX and the blockade of Ca^{2+} channels with the Ca^{2+} toxins. Taken together, these findings suggest that 4-AP at the two concentrations (0.1 and 1 mM) activates a constant amount of VSSC and that only the TTX-sensitive fraction of the rise in Na_i induced by 4-AP is linked to the increase in Ca_i induced by 4-AP. The inhibition of the Ca_i response to 4-AP by the Ca^{2+} toxins (ω -Aga IVA and ω -CnTx GVIA) also indicates that the activation of VSSC is a necessary step for the activation of the Ca^{2+} channels that account for the rise in Ca_i induced by 4-AP.

The possibility that the large increase in Na_i induced by 1 mM 4-AP is increasing Ca_i by reversal of the Na^+/Ca^+ exchanger is discarded on the basis of the marked inhibition exerted by the P/Q and N-type Ca^{2+} channel blockers on the rise in Ca_i induced by 4-AP at the high (1 mM) concentration. Whether or not this peculiar simultaneous activation of voltage-sensitive Na^+ and Ca^{2+} channels is underlying the previously proposed "kiss and run" neurotransmitter release mechanism induced by 4-AP (31) is a matter of future investigations.

Effect of 4-AP on Neurotransmitter Release

4-AP, along with high K^+ and veratridine, is among the strategies most commonly used for evoking neurotransmitter release in synaptosomes. It is generally accepted that the high K^+ -evoked release is primarily exocytotic and that veratridine-induced neurotransmitter release is primarily due to reversal of the neurotransmitter transporters. Consistently, high K^+ does not raise Na_i significantly (24) and increases Ca_i and neurotransmitter release in a TTX-insensitive and ω -Aga IVA-sensitive manner (12,32,33). In contrast, the veratridine-induced increase in Na_i , Ca_i , and neurotransmitter release is inhibited by TTX and is ω -Aga IVA insensitive (12,18). Consistently, TTX, which failed to inhibit the release of DA, Glu, and GABA evoked by high K^+ , completely inhibited the release of those neurotransmitters evoked by veratridine (Table I). The partial inhibition exerted by TTX on neurotransmitter release evoked by 1 mM 4-AP indicates a combination of exocytosis and reversal of the neurotransmitter transporters. However, it is interesting that in the case of 4-AP the TTX-sensitive fraction of neurotransmitter release is the fraction released by exocytosis. Because the findings obtained here indicate that only the TTX-sensitive rise in Na_i induced by 4-AP is linked to the increase in Ca_i induced by 4-AP. Therefore the larger inhibition exerted by TTX on the release of Glu and GABA than on the release of DA induced by 4-AP (1 mM) indicates that an important percentage of the release of those amino acid neurotransmitters evoked by 1 mM 4-AP is exocytotic. In contrast, in the case of DA

it is likely that the accumulation of Na^+ caused by the inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase by 4-AP accounts for an important percentage of the DA-transporter-mediated release of DA. The partial inhibition of the ouabain-evoked neurotransmitter release by TTX is consistent with the partial inhibition caused by TTX on the rise in Na_i induced by ouabain. Whether or not the TTX-sensitive fraction of neurotransmitter release induced by ouabain also corresponds, like for the case of 1 mM 4-AP, to the exocytotic fraction is a matter of future investigations.

ACKNOWLEDGMENT

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

REFERENCES

1. Perreault, P. and Avoli, M. 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65:771–785.
2. Tapia, R. and Sitges, M. 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250:291–299.
3. Tibbs, G. R., Barrie, A. P., Van Miegheem, F. J. E., 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^{2+} and glutamate release. *J. Neurochem.* 53:1693–1699.
4. Scheer, H. W. and Lavoie, P. A. 1991. Mechanism of aminopyridine-induced release of [^3H]dopamine from rat brain synaptosomes. *Gen. Pharmacol.* 22:169–172.
5. 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.
6. Sihra, T. S. and Nicholls, D. G. 1987. 4-Aminobutyrate can be released exocytotically from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49:261–267.
7. Nicholls, D. G. 1989. Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52:331–341.
8. Sitges, M. 1989. Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on s-amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J. Neurochem.* 53:436–441.
9. Adam-Vizi, V. 1992. External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J. Neurochem.* 58:395–405.
10. Sitges, M., Chiu, L. M., and González, L. 1993. Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [^3H]GABA: Inhibition by verapamil and amiloride. *Neurochem. Res.* 18:1081–1087.
11. Sitges, M., Reyes, A., and Chiu, L. M. 1994. Dopamine transporter mediated release of dopamine: Role of chloride. *J. Neurosci. Res.* 39:11–22.
12. Sitges, M. and Chiu, L. M. 1995. ω -Aga IVA selectively inhibits the calcium dependent fraction of the evoked release of [^3H]GABA from synaptosomes. *Neurochem. Res.* 20:1065–1071.
13. Raiteri, L., Stigliani, S., Zedda, L., Raiteri, M., and Bonnano, G. 2002. Multiple mechanisms of transmitter release evoked by pathologically elevated extracellular [K^+]: Involvement of transporter reversal and mitochondrial calcium. *J. Neurochem.* 80:706–711.

14. Tapia, R., Sitges, M., and Morales, E. 1985. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361:373–382.
15. Heemskerk, F. M., Schrama, L. H., Ghijsen, W. E., De Graan, P. N. E., Lopes da Silva, F. H., and Gispen, W. H. 1991. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: Changes in intracellular free Ca^{2+} concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J. Neurochem.* 56:1827–1835.
16. Sitges, M., Possani, L. D., and Bayón, A. 1986. Noxiustoxin, a short-chain toxin from the mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K^+ permeability. *J. Neurosci.* 6: 1570–1574.
17. Tibbs, G. R., Dolly, O., and Nicholls, D. G. 1996. Evidence for the induction of repetitive action potentials in synaptosomes by K^+ -channel inhibitors: An analysis of plasma membrane ion fluxes. *J. Neurochem.* 67:389–397.
18. 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.
19. Sitges, M. and Rodriguez, R. 1998. Effects of external pH variations on brain presynaptic sodium and calcium channels: Repercussion on the evoked release of amino acid neurotransmitters. *Neurochem. Res.* 23:477–485.
20. Rodriguez, 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.
21. Grynkiewicz, 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.
22. Gutser, U. T. and Gleitz, J. 1998. The alkaloid 6-benzoylhetatisine inhibits voltage-gated Na^+ channels in rat brain synaptosomes. *Neuropharmacology* 37:1139–1146.
23. Sitges, M. and Nekrassov, V. 1999. Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochem. Res.* 24:1585–1591.
24. Deri, Z. and Adam-Vizi, V. 1993. Detection of intracellular free Na^+ concentration of synaptosomes by a fluorescent indicator, Na^+ -binding benzofuran isophthalate: The effect of veratridine, ouabain and alpha-latrotoxin. *J. Neurochem.* 61:818–825.
25. 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.
26. Kasner, S. E. and Ganz, M. B. 1992. Regulation of intracellular potassium in mesengial cells: A fluorescence analysis using the dye. PBFI. *Am. J. Physiol.* 262:F462–F467.
27. Muyderman, H., Hansson, E., and Nilsson, M. 1997. Adrenoceptor-induced changes of intracellular K^+ and Ca^{2+} in astrocytes and neurons in rat cortical primary cultures. *Neurosci. Lett.* 238:33–36.
28. 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.
29. Gleitz, J., Beile, A., and Peters, T. 1995. (\pm)-Kavain inhibits veratridine-activated voltage-dependent Na^+ -channels in synaptosomes prepared from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology* 34: 1133–1138.
30. Blaustein, M. P. and Goldring, J. M. 1975. Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: Evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J. Physiol.* 247:589–615.
31. Cousin, M. A. and Robinson, P. J. 2000. Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals. *J. Neurochem.* 75: 1645–1653.
32. Turner, T. J., Adams, M. E., and Dunlap, K. 1992. Calcium channels coupled to glutamate release identified by ω -Aga IVA. *Science* 258: 310–313.
33. 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 Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356:797–805.

NEUROCHEMISTRY International

From the Editor-in-Chief: Professor E. Sylvester Vizi
Institute of Experimental Medicine
Hungarian Academy of Sciences
PO Box 67
H-1450 Budapest
Hungary

Tel: +36 1 332 7176
Fax: +36 1 332 8943
Email: neurochem@koki.hu

Neurochemistry International
Hungarian Academy of Sciences
Roosevelt tér 9.
1051 Budapest
Hungary

4 November, 2004

Dr. María Sitges
Departamento de Biología Celular y
Fisiología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Apartado Postal 70228
Ciudad Universitaria 04510
Mexico

Manuscript reference: NCISV/2004/91

Dear Dr. Sitges,

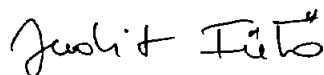
Thank you for submitting your manuscript entitled "**Vinpocetine blockade of sodium channels inhibits the rise in sodium and calcium induced by 4-aminopyridine in synaptosomes**" to Neurochemistry International.

It will be sent to reviewers for their comments. When these have been received I will write to you again.

If you have any queries regarding your manuscript during the review process, please contact us at the address above, and be ready to quote your manuscript's reference number **NCISV/2004/91**.

Yours sincerely,

ES Vizi
editor in chief



signed in his absence by editorial assistant

