

Neurotoxinas:

SIGNIFICADO BIOLÓGICO y mecanismos de acción

Emilio **Salceda** y
Aída **Ortega**

Existe una gran variedad de organismos terrestres y marinos productores de toxinas. Numerosos procariotes, animales y plantas producen sustancias que ejercen actividad tóxica, en ocasiones letal, sobre otros seres vivos. En cierto sentido, las toxinas pueden ser consideradas una defensa biológica que ayuda a las especies que las producen en su lucha por la vida incrementando sus probabilidades de sobrevivencia, proliferación y diseminación. Así, las toxinas naturales son el resultado de una prolongada coevolución de especies que comparten un mismo nicho ecológico. En este proceso, cada toxina ha sido modelada para acertar específicamente en un blanco molecular clave del animal presa. En otras palabras, de alguna manera, en el curso de la evolución, las toxinas han “aprendido” cuáles son los más esenciales de los procesos vitales de los organismos vivos, y “saben” cómo afectar selectivamente la molécula clave de un proceso dado.¹ Desde un punto de vista biológico, esta característica de las toxinas puede parecer paradójica si se piensa en el provecho que un animal venenoso podría obtener de sustancias con un espectro de especificidad más extenso: ello lo haría un depredador más flexible en cuanto que ampliaría el rango de sus presas potenciales. Sin embargo no es así. Para el depredador venenoso un espectro de especificidad reducido puede ser una ventaja, particularmente si la velocidad del proceso



© Anamaría Ashwell, de la serie *Imágenes*, 2007.

de parálisis de la presa es un factor a considerar. Una especificidad limitada permite un uso más rápido y más eficiente de un menor número de moléculas de toxina. Restringir la unión de una toxina al subtipo de receptor más relevante para determinado mecanismo fisiológico evita el desperdicio del ligando, dispendio que ocurriría si la sustancia se uniera a subtipos relacionados, pero no relevantes, que pudieran estar presentes en mayor número que el subtipo que interesa desde el punto de vista del proceso fisiológico que se pretende afectar. Cualquier unión gratuita demandaría, consecuentemente, una mayor producción de la toxina para solventar el gasto realizado en receptores “inútiles”, de forma que la acción sobre el subtipo relevante no pierda eficacia.² Este hecho no excluye, desde luego, la posibilidad de que dos o más toxinas, actuando sobre diferentes blancos moleculares, ejerzan su efecto de manera colaborativa con el fin de inmovilizar a la presa. Un ejemplo de ello lo ofrecen ciertos componentes del veneno del cono púrpura *Conus purpurascens*. La notable eficiencia y la gran velocidad con que estos organismos capturan a sus presas se debe, en buena medida, a la concurrencia de múltiples neurotoxinas

que utilizan dos mecanismos fisiológicos paralelos, a saber: bloqueo neuromuscular y choque excitotóxico.

Cuando un cono púrpura ataca a un pez, de manera casi instantánea ocurre en éste una parálisis rígida que se acompaña de tétanos en las aletas. De forma eventual alguna presa puede llegar a recuperarse de este primer estado; sin embargo, invariablemente, entrará en una segunda condición caracterizada por parálisis flácida. Al conjunto de signos que ocurren en un pez que ha sido atacado por un cono púrpura se le ha llamado síndrome de tétanos súbito de la presa (STOP, por su sigla en inglés). Es evidente que esta secuencia obedece a que el veneno pone en marcha dos estrategias de inmovilización. Se sabe que el veneno de *Conus purpurascens* contiene, al menos, tres toxinas paralizantes que actúan bloqueando la transmisión neuromuscular; dos de ellas, la α A conotoxina PIVA –cuyo blanco molecular es el receptor nicotínico a la acetilcolina– y la μ -conotoxina PIIIA –que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje del músculo esquelético– no producen la parálisis rígida característica del STOP. De hecho, ningún componente individual del veneno evoca un STOP completo. Terlau y colaboradores,³ inyectando a peces con pares de componentes del veneno fraccionado por métodos cromatográficos, encontraron dos fracciones que, en combinación, producen el síndrome con todas sus características: un péptido de 29 aminoácidos llamado δ -conotoxina PVIA, y un péptido de 27 aminoácidos, al que denominaron κ -conotoxina PVIIA, que parece no competir por los sitios de unión de las ω -conotoxinas ni por los de las δ -conotoxinas. La inyección de este péptido a un pez produce hiperactividad inicial, seguida por contracción y extensión continuas de las aletas mayores, sin parálisis ni muerte. La δ -conotoxina PVIA, en cambio, provoca disminución en la actividad locomotora, extensión mandibular y, posteriormente, nado espasmódico y parálisis rígida generalizada que conduce a la muerte. Experimentos electrofisiológicos realizados por los mismos autores han demostrado que la primera toxina bloquea la conductancia al K^+ en canales tipo *shaker*, en tanto que la segunda suprime la habitualmente rápida inactivación de los canales de Na^+ de cerebro de rata, prolongando la duración de la corriente macroscópica de sodio. Así, incrementando el influjo de Na^+ y decre-

mentando el flujo de K^+ , el veneno surte su efecto de manera muy rápida (1-2 s *in vivo*). La razón por la que algunos animales han desarrollado mecanismos tóxicos paralelos similares a los expuestos aquí, radica probablemente en los hábitos de caza de las diferentes especies. El cono púrpura, por ejemplo, suele aguijonear a su presa en situaciones en las que ésta tiene espacio suficiente para huir. Si para inmovilizar a un pez el depredador dependiese únicamente del bloqueo neuromuscular que, comparativamente, es un proceso muy lento, se vería expuesto a perder la presa en un gran número de ocasiones. El choque excitotóxico es, en cambio, una solución biológica altamente eficaz que rinde a la presa prácticamente en el sitio en donde fue atacada. El caso de las anémonas es similar: el contacto inicial que estos organismos hacen con sus presas se realiza por medio de un sólo tentáculo; ello hace necesaria una acción fulminante que es efectuada por toxinas funcionalmente análogas a las de *Conus purpurascens*. Especies con estrategias de caza diferentes carecen de este mecanismo: el *Conus geographus*, por ejemplo, aguijonea a sus presas únicamente cuando éstas no tienen manera de escapar, por lo que el depredador puede prescindir de excitotoxinas y depender sólo de toxinas que bloquean la transmisión neuromuscular.⁴

Las toxinas de origen natural exhiben un amplio rango de complejidad química que va desde el simple ácido fórmico de las hormigas hasta las proteínas bacterianas conformadas por varios miles de aminoácidos. Sus formas de acción son diversas y dependen en gran medida de las necesidades del organismo que las sintetiza. Así, por ejemplo, las toxinas de origen animal suelen dirigirse hacia proteínas de la superficie celular que median funciones esenciales para la célula; casi todas son ligandos de canales iónicos. Ello se debe al hecho de que los animales productores de toxinas usan su veneno para atacar o inmovilizar a sus presas o depredadores potenciales. En tal caso la prioridad es que el veneno surta su efecto con rapidez y la estrategia más eficaz consiste en que sus componentes actúen sobre la superficie celular. No es entonces sorprendente que las toxinas de origen bacteriano se comporten de manera diferente. La supervivencia de las bacterias no depende de la velocidad con que actúan sus toxinas, sino de su capacidad biológica para modificar la

fisiología de sus hospederos de manera que tal intervención les asegure un medio favorable para su propia multiplicación y diseminación. Con la excepción de algunas toxinas bacterianas cuyo principal mecanismo de acción consiste en alterar la integridad de la membrana plasmática, estas sustancias suelen ejercer sus efectos desde el interior de la célula blanco.

NEUROTOXINAS

De entre la gran variedad de toxinas producidas naturalmente por los seres vivos, aquellas que ejercen su acción tóxica primaria sobre el sistema nervioso —afectando la estructura y/o la función de los elementos neurales— reciben el nombre de neurotoxinas; la mayor parte de estos agentes funcionan como ligandos altamente específicos de proteínas presentes en las células nerviosas. Dada la extrema complejidad estructural, química y homeostática del sistema nervioso (particularmente el de los vertebrados), no es extraño que las sustancias con propiedades neurotóxicas sean tan numerosas. Con el fin de limitar la extensión de este trabajo, nos limitaremos aquí a presentar, a manera de ejemplo, las principales características de las toxinas que afectan a los canales de sodio dependientes de voltaje. Se hará también una descripción de los principales aspectos estructurales y funcionales de los canales mismos.

TOXINAS QUE ACTÚAN SOBRE CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

El término canales iónicos se aplica a ciertos elementos macromoleculares de naturaleza proteica insertos en las membranas de las células excitables; su función es producir y transducir señales eléctricas. Las técnicas modernas de registro electrofisiológico y de clonación molecular han revelado una gran diversidad de canales por lo que, con base en criterios como: a) conductancia, b) selectividad iónica, c) cambios de permeabilidad en respuesta a factores como el voltaje transmembranal, la unión de neurotransmisores, hormonas y otros agentes, así como a la acción de



© Anamaria Ashwell, de la serie *Imágenes*, 2007.

ciertas enzimas y metabolitos intracelulares (todo lo cual configura la propiedad que se ha denominado *gating*) y d) farmacología, se los ha clasificado en familias que tienen propiedades funcionales comunes.

LOS CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los canales de sodio tienen un papel fundamental en la fisiología del sistema nervioso: transmiten impulsos eléctricos a través de células y redes celulares permitiendo la coordinación de un amplio rango de procesos fisiológicos que van desde la locomoción hasta la cognición. En síntesis, son proteínas que funcionan como catalizadores del paso de iones de sodio a través de la membrana plasmática en las direcciones dictadas por el potencial electroquímico.

Los cambios de permeabilidad mediados por los canales de sodio pueden ser caracterizados por dos atributos fisiológicos: *gating* y selectividad. Los modelos cinéticos de *gating* implican cambios en la conformación del canal; el esquema más simple puede ser descrito con base en tres conformaciones o estados:

un estado de reposo, no conductivo o cerrado (C), un estado conductivo, abierto (O) y un estado no conductivo especial llamado inactivado (I). Clásicamente C es favorecido por una membrana hiperpolarizada, en tanto que el estado I lo es por una membrana despolarizada. La conformación O ocurre sólo transitoriamente. Nuestra visión actual de la cinética del canal es mucho más compleja e incluye muchos estados intermedios no conductivos entre las conformaciones C y O, probablemente más de una conformación conductiva, y muchas vías hacia estados inactivados.

En general, la conductancia a través del canal es regulada por dos procesos: 1) activación, el cual controla la tasa y la dependencia del voltaje con las cuales ocurre la apertura de los canales luego de una despolarización, y 2) inactivación, el cual controla las mismas variables para el cierre subsecuente de los canales durante una despolarización sostenida. El término selectividad se refiere a la capacidad que tienen los canales para discriminar entre varios iones. Los canales de sodio son altamente selectivos para cationes metálicos alcalinos: permiten el paso de Li^+ casi tan fácilmente como el de Na^+ ; prefieren el Na^+ al K^+ en una proporción aproximada de 10:1; tienen una baja permeabilidad al Rb^+ y casi ninguna al Cs^+ .

ESTRUCTURA DEL CANAL DE SODIO

Los canales de sodio son grandes glicoproteínas formadas por varias subunidades polipeptídicas denominadas α (con una masa molecular de 240-280 kDa), β_1 , β_2 , β_3 y β_4 , de entre 30 y 40 kDa cada una, en estado glicosilado. Además de la subunidad α , los canales de sodio en el sistema nervioso central están conformados por las subunidades β_1 (o β_3) y β_2 , en tanto que los del músculo esquelético del animal adulto tienen sólo la subunidad β_1 . En el caso de los canales de sodio cerebrales la estequiometría de las subunidades es 1:1:1.⁵ El poro acuoso conductor de iones está contenido en la subunidad α y los elementos esenciales para la función del canal (apertura, selectividad iónica e inactivación rápida) pueden ser demostrados cuando ésta es expresada sola en células heterólogas. Las subunidades β son elementos auxiliares que modifican la cinética y la dependencia de voltaje de la apertura y

cierre del canal, y su coexpresión le confiere a éste las propiedades del canal nativo.

Utilizando secuencias parciales del canal de sodio purificado de la anguila eléctrica, Noda y colaboradores⁶ aislaron el DNAc que codifica la subunidad α de dichos canales. La secuencia deducida, de 1820 aminoácidos, reveló una proteína conformada por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales posee 6 segmentos transmembranales (S1-S6) en configuración helicoidal alfa. La Figura 1 muestra el arreglo generalmente aceptado en la actualidad para la subunidad α del canal de sodio. La proteína constituye un poro cuya vía de permeación está formada en su parte externa por los lazos de unión S5-S6 (denominados segmentos P) de cada dominio.

Las estructuras primarias de los segmentos P difieren notablemente entre los dominios; es decir, existe asimetría en la contribución de cada dominio a la vía de permeación. Dos dominios tienen una participación fundamental en la selectividad del canal al sodio: el dominio III, en el cual una lisina es crítica para la discriminación entre Na^+ y Ca^{++} , y el dominio IV, en el cual ciertas mutaciones de residuos contiguos (1531-1534) hacen que el canal no discrimine entre cationes monovalentes. En cuanto a la sensibilidad al voltaje, el hecho de que los segmentos transmembranales S4 posean residuos de aminoácidos cargados positivamente en cada tercera posición sugiere que son estos segmentos los que constituyen el sensor de voltaje.

Durante la activación, varios residuos cargados en cada segmento cuatro se desplazarían físicamente a través de la membrana utilizando para ello alguna región del canal aún no identificada. Este proceso, llamado inactivación rápida, podría estar mediado al menos parcialmente por el lazo citoplasmático que une a los dominios III y IV el cual contiene una fenilalanina crítica (F1489) dentro de una secuencia IFM (isoleucina-fenilalanina-metionina) que interactuaría con la boca interna del poro bloqueándolo durante la inactivación.

Hasta el momento se han caracterizado nueve subunidades α en células de mamífero, mismas que en la nomenclatura moderna se denominan $\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$. Se conoce también una décima isoforma relacionada (Na_x) que funciona como canal de sodio.

Todos los sitios de unión de toxinas identificados hasta hoy parecen estar localizados en la subunidad α .

Sitio de unión	Neurotoxina	Efecto fisiológico
1	Tetrodotoxina (TTX) Saxitoxina (STX)	Bloqueador del transporte iónico.
2	Veratridina Batracotoxina (BTX) Grayanotoxina (GTX)	Activación persistente.
3	Toxinas α de escorpiones africanos Toxinas de anémona marina	Enlentecimiento de la inactivación; activación persistente del canal.
4	Toxinas β de escorpión americano	Llevar el umbral de activación a potenciales más negativos.
5	Brevetoxinas (PbTX) Ciguatoxinas (CTX)	Activación persistente llevando el umbral de activación a potenciales más negativos.
Otros	Anestésicos locales, DDT, insecticidas piretroides, DPI 201-106	Bloqueo del canal en reposo y dependiente del uso. Enlentecimiento de la inactivación e incremento en la duración del potencial de acción.

TABLA 1. Sitios de unión a toxinas en el canal de sodio dependiente de voltaje. Se muestran también sustancias que se unen a otros sitios del canal. (Modificada a partir de Ogata y Ohishi⁷)

CLASIFICACIÓN DE LAS TOXINAS QUE ACTÚAN SOBRE CANALES DE SODIO

Las toxinas que actúan sobre los canales de sodio sensibles al voltaje han sido clasificadas de acuerdo con sus sitios putativos de acción. Cinco sitios receptores han sido propuestos hasta el momento (Tabla 1):

- **SITIO 1.** Es el receptor para los compuestos heterocíclicos tetrodotoxina (TTX, del pez globo, familia *Tetraodontidae*) y saxitoxina (STX, del dinoflagelado *Gonyaulax catenella*) así como para la toxina polipeptídica μ -conotoxina (del cono marino *Conus geographus*). Las toxinas de este grupo bloquean el poro del canal, impidiendo el paso de iones de sodio.

El sitio de unión a TTX se encuentra en la cara extracelular del canal y está presente en todas la isoformas conocidas del canal de sodio; por lo tanto, la afinidad a la toxina es dependiente de la isoforma. Noda y colaboradores señalaron que el Glu-387 del canal $\text{Na}_v1.2$ del cerebro de rata es responsable de la afinidad del canal de sodio por la TTX y la STX.⁸ En un estudio más extenso, Terlau y colaboradores demostraron que ciertas mutaciones en la región S5-S6 en cualquiera de los cuatro dominios del canal causan una pérdida de afinidad por la TTX.⁹ Congruentemente, uno de los residuos responsables correspondía al Glu-387 del canal $\text{Na}_v1.2$. Este residuo aminoacídico, junto con los residuos Glu-945, Asp-1426 y Asp-1717, fue relacionado con el anillo interno al cual se une la TTX. Un segundo grupo de

residuos conforman un anillo externo que interactúa con la TTX, y está formado por los residuos aminoácidos Asp-384 y Glu-942 en los dominios I y II, respectivamente, Lis-1422 en el dominio III, y un residuo neutral Ala-1714 en el dominio IV.⁹ Además de las interacciones electrostáticas con estos dos anillos, para que la TTX se una al canal se requiere de un anillo aromático del dominio I, en la región del poro.¹⁰ Este residuo no está absolutamente conservado y se presenta en canales de sodio resistentes a tetrodotoxina (TTX-R), incluida la isoforma cardíaca Na_v1.5. El cambio de una cisteína por Tir-385 en la isoforma cardíaca humana es responsable de la baja sensibilidad del canal a TTX, Cd²⁺ y STX.

La μ -conotoxina es un inhibidor competitivo de la unión de STX a los canales de sodio musculares (Na_v1.4), no así a los neuronales; por tanto, esta toxina distingue los canales de sodio nerviosos de los musculares.¹¹ Al igual que la TTX, la μ -conotoxina bloquea el poro del canal.

• **SITIO 2.** Es el receptor de varias toxinas liposolubles que incluyen a los alcaloides grayanotoxina (de *Rhododendron* y otras plantas de la familia *Ericaceae*), veratridina (de las hierbas liliáceas del género *Veratrum*), aconitina (de plantas del género *Aconitum*) y batracotoxina (BTX, de la piel de sapos del género *Phylllobates*). Las toxinas de este grupo producen activación persistente de los canales de sodio que conduce a la

despolarización de la membrana neuronal, bloquean la inactivación del canal, desplazan la dependencia de voltaje de la activación a valores más negativos y, al parecer, reducen la selectividad iónica del canal. Estos efectos han hecho suponer que el sitio 2 se encuentra localizado en alguna región del canal de sodio involucrada en la dependencia de voltaje de la activación. Se ha propuesto que estas toxinas se unen preferencialmente a la conformación activada del canal dejándolo en el estado abierto. BTX puede actuar desde cualquier lado de la membrana, lo cual sugiere que su sitio de unión pudiera estar ubicado en los segmentos del canal que atraviesan la membrana celular. La identificación de los residuos que forman el sitio 2 ha sido complicada debido a que sus ligandos presentan una alta hidrofobicidad. La esterificación de la batracotoxina proporcionó la primera herramienta útil para ser usada en experimentos de análisis de unión (*binding*). Como era de esperarse debido a su hidrofobicidad, se encontraron varios sitios de unión. Algunas porciones del sitio 2 se relacionan con la unión a anestésicos locales, y otras con la unión a insecticidas piretroides. Un estudio de fotomarcage con derivados de la batracotoxina fue el primero en obtener un éxito relativo para localizar el sitio receptor 2;¹² este trabajo sugiere que la región S6 del dominio I de la subunidad α del canal de sodio es un importante componente del sitio receptor; resultados similares se han obtenido utilizando mutagénesis dirigida, indicando, además, que los residuos aminoácidos Ile-433, Asn-434 y Leu-437, localizados en el segmento IS6 de los canales de sodio de las células musculares esqueléticas, forman parte de la región receptora a la batracotoxina, la cual comprende, adicionalmente, algunas regiones de los dominios II y IV.¹³ Un estudio reciente en el que se emplearon mutagénesis dirigida y técnicas computacionales propone un modelo en el cual la toxina interactúa directamente con el asa P del dominio III, lo que a su vez ayudaría a explicar cómo es que BTX altera la selectividad iónica y la conductancia del canal.¹⁴

• **SITIO 3.** Este sitio receptor une toxinas polipeptídicas purificadas a partir de los venenos de escorpiones norafricanos (α -escorpiotoxinas), anémonas marinas, algunas especies de araña y, al menos, de una avispa.



© Anamaría Ashwell, de la serie *Imágenes*, 2007.

Las toxinas de este grupo bloquean o enlentecen la inactivación del canal y, por tanto, prolongan la duración del potencial de acción en el músculo y en las neuronas.^{15, 16} Las toxinas de escorpión y las de anémona típicamente están conformadas por 60-70 y 46-49 residuos aminoácidos, respectivamente, aunque se ha aislado una toxina de anémona con apenas 27 residuos (ATX-III, de *Anemonia sulcata*), así como varias toxinas de escorpión con 30-40 residuos.

Las toxinas de anémona generalmente son más pequeñas que las toxinas α de escorpión y no guardan relación estructural con ellas a pesar de que ambos grupos se unen al mismo sitio, tienen propiedades farmacológicas similares y se desplazan recíprocamente del sitio de unión. Dado que la unión de las toxinas de escorpión al sitio receptor es notoriamente dependiente de voltaje y que esta dependencia se correlaciona con la dependencia de voltaje de la activación del canal de sodio, se ha propuesto que el sitio 3 debe localizarse en alguna parte del canal relacionada con el cambio conformacional que debe ocurrir durante la activación dependiente de voltaje, es decir, con el sensor de voltaje o con alguna estructura de compuerta del canal. Durante la despolarización, los segmentos S4 de la subunidad α del canal de sodio, incluyendo al del dominio IV, se desplazan hacia el espacio extracelular. Las toxinas de este grupo se unen al lazo extracelular ubicado entre los segmentos transmembranales IVS3-S4 (Figura 1), estableciendo una interacción electrostática con los residuos Glu-1613 de los canales de sodio de neuronas de cerebro de rata, Asp-1612 en los canales de células cardíacas, y Asp-1428 en los canales de sodio de músculo esquelético. La unión de estas toxinas al asa extracelular entre los segmentos S3-S4 del dominio IV retardaría el movimiento del segmento S4, el cual es necesario para la inactivación rápida.

• **SITIO 4.** Es el receptor para otra clase de toxinas de escorpión (denominadas β -escorpiotoxinas) que son purificadas a partir del veneno de escorpiones americanos como los pertenecientes al género *Centruroides*. Debido al gran parecido que en su estructura terciaria presentan las toxinas α y β de escorpión, durante algún tiempo se pensó que compartían el mismo sitio de unión; sin embargo, en 1980 se sugirió que la toxi-



© Anamaria Ashwell, de la serie *Imágenes*, 2007.

na β del escorpión *Tityus serrulatus*, llamada TiTx γ , no competía por el sitio de unión de las toxinas α de escorpión en canales desodio neuronales.¹⁷

Estudios posteriores han mostrado claramente que estas toxinas se unen a sitios independientes. Este tipo de sustancias desplaza la dependencia de voltaje de la activación a valores de potencial más negativos, induciendo actividad neuronal espontánea. La unión de las toxinas β de escorpión al sitio receptor es independiente del potencial de membrana. El principal sitio de unión para estas toxinas se encuentra en el dominio II de la subunidad α del canal.¹⁸ Estudios hechos con quimeras del canal de sodio Na $_v$ 1.2 mostraron que el residuo Gli-845 del dominio DII juega un papel crucial en la unión de la toxina; además, algunos residuos extracelulares son requeridos, pues la toxina C α SS-IV necesita que el canal se encuentre activado para unirse, por lo que se ha sugerido que la toxina secuestra el segmento S4 del dominio II uniéndose a ciertos residuos que quedan expuestos durante la activación del canal.^{18, 19} Los residuos de unión aún son desconocidos, pero mutaciones del residuo Glu-779 en el lazo extracelular IIS1-S2, y de los residuos Glu-837 y Leu-840 en el lazo extracelular

IIS3-S4 reducen la afinidad del canal por las toxinas β de escorpión.²⁰

• **SITIO 5.** Es un dominio hidrofóbico del canal, al que se unen las brevetoxinas (PbTx) y las ciguatoxinas (CTX) liposolubles aisladas de los dinoflagelados *Ptychodiscus brevis* (organismo asociado a las mareas rojas) y *Gambierdiscus toxicus* (relacionado con la intoxicación por la ingesta del pez del arrecife, condición conocida como ciguatera), respectivamente.

La identidad de este sitio se dedujo del hecho de que, en ensayos de unión, estas sustancias no son desplazadas por toxinas que se unen a los otros sitios. Las toxinas que se unen al sitio 5 modifican los procesos de activación e inactivación del canal de sodio. Experimentos electrofisiológicos han demostrado que ambas toxinas provocan que el umbral de activación se desplace a potenciales más negativos.

La naturaleza de la acción de esta toxina difiere con respecto a la de las toxinas que se unen a los sitios receptores 2 y 3, ya que éstas actúan cuando el canal está cerrado o modificando la reactivación del canal inactivado, en tanto que la PbTx-3 induce estados de preapertura, haciendo parecer como si el canal tuviera diferentes estados de apertura.

Experimentos de fijación de voltaje han mostrado que las toxinas PbTx 2 y 3 provocan que el umbral de activación se mueva a potenciales hiperpolarizantes, con cinéticas extremadamente lentas.²¹

Es probable que la identidad del sitio 5 esté relacionada con al menos una parte de los segmentos S5-S6 del dominio IV.²²

Desde un punto de vista estructural, estos segmentos se encuentran muy cercanos en los canales de sodio nativos e interactuarían para formar el sitio receptor.

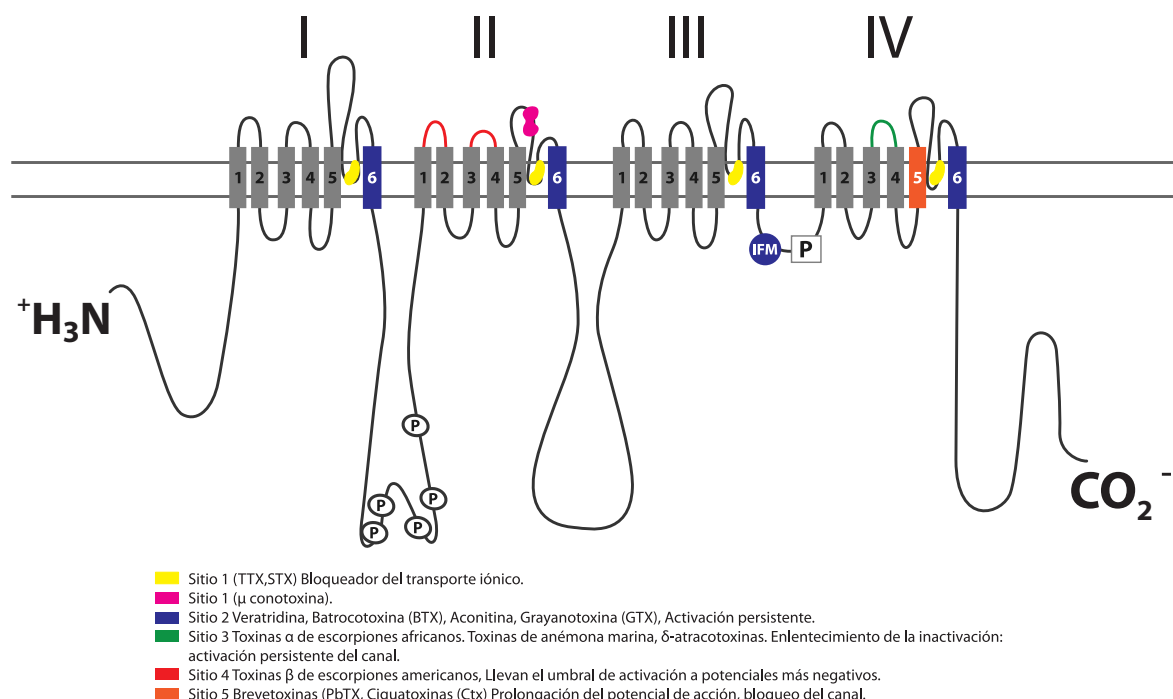
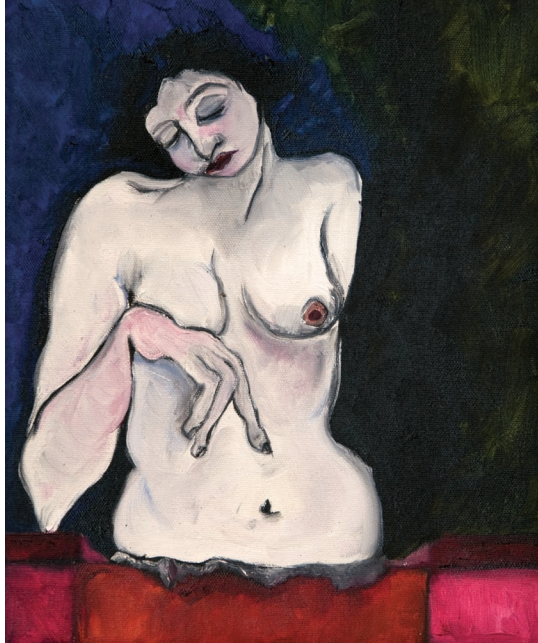


Figura 1. Esquema que muestra la localización de los distintos sitios de unión de neurotoxinas. El sitio receptor 1, al cual se unen la TTX y la STX, está formado por dos anillos de residuos aminoácidos localizados en el asa que forman los segmentos transmembranales S5-S6 en cada uno de los cuatro dominios; el sitio de unión para la μ-conotoxina se encuentra en el asa que forman los segmentos IIS5-S6. Al sitio receptor 2 se unen las grayanotoxinas, los alcaloides de la planta *Aconitium napellus* y la batracotoxina, y se halla en la región S6 de todos los dominios de la subunidad α del canal de sodio. El sitio receptor 3 es ocupado por varios grupos de toxinas polipeptídicas como las toxinas α de escorpión, las toxinas de anémona y algunas de las toxinas de araña y avispa; estas toxinas bloquean o inhiben el proceso de inactivación de los canales uniéndose a la asa extracelular ubicada entre los segmentos transmembranales IIS3-S4. El sitio 4 es ocupado por las toxinas β de escorpión, las cuales interactúan con el segmento extracelular IIS4, segmento que en el estado activado interactúa con la asa formada por los segmentos S3-S4. La brevetoxina y las ciguatoxinas se unen al sitio receptor 5, interactuando con los segmentos transmembranales IS6 y IIS5. A un sitio receptor adicional (no representado en el esquema) se uniría la toxina polipeptídica TxIVA aislada del *Conus textile*, y su localización en el canal aún no ha sido identificada con precisión.



© Anamaria Ashwell, de la serie *Imágenes*, 2007.



B I B L I O G R A F Í A

- ¹ Rappuoli R and Montecucco C (1997) *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*, Oxford University Press, New York.
- ² Adams ME and Olivera BM (1994) Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *Trends Neurosci* 17:151-155.
- ³ Terlau H, Shon KJ, Grille M, Stocker M, Stuhmer W and Olivera BM (1996) Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 381:148-151.
- ⁴ Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de S, V and Cruz LJ (1985) Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230:1338-1343.
- ⁵ Marban E, Yamagishi T and Tomaselli GF (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 508:647-657.
- ⁶ Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127.
- ⁷ Ogata N and Ohishi Y (2002) Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 88:365-377.
- ⁸ Noda M, Suzuki H, Numa S and Stuhmer W (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 259:213-216.
- ⁹ Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K and Numa S (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 293:93-96.
- ¹⁰ Satin J, Kyle JW, Chen M, Bell P, Cribbs LL, Fozzard HA and Rogart RB (1992) A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science* 256:1202-1205.
- ¹¹ Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D and Moczydlowski E (1985) *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260:9280-9288.
- ¹² Trainer VL, Brown GB and Catterall WA (1996) Site of covalent labeling by a photoreactive batrachotoxin derivative near transmembrane segment IS6 of the sodium channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271:11261-11267.
- ¹³ Wang SY and Wang GK (1998) Point mutations in segment I-S6 render voltage-gated Na⁺ channels resistant to batrachotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2653-2658. Catterall WA (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64:493-531.

- ¹⁴ Wang SY, Mitchell J, Tikhonov DB, Zhorov BS and Wang GK (2006) How batrachotoxin modifies the sodium channel permeation pathway: computer modeling and site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* 69:788-795.
- ¹⁵ Salceda E, Garateix A and Soto E (2002) The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1067-1074.
- ¹⁶ Salceda E, Pérez-Castells J, López-Méndez B, Garateix A, Salazar H, López O, Aneiros A, Ständker L, Béress L, Forssmann WG, Soto E, Jiménez-Barbero J and Giménez-Gallego G (2007) CgNa, a type I toxin from the giant Caribbean sea anemone *Condylactis gigantea* shows structural similarities to both type I and II toxins, as well as distinctive structural and functional properties. *Biochem J* 406: 67-76.
- ¹⁷ Jover E, Couraud F and Rochat H (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 95:1607-1614.
- ¹⁸ Cestele S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T and Catterall WA (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21:919-931.
- ¹⁹ Schiavon E, Sacco T, Cassulini RR, Gurrola G, Tempia F, Possani LD and Wanke E (2006) Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J Biol Chem* 281:20326-20337.
- ²⁰ Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T and Catterall WA (2006) Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J Biol Chem* 281:21332-21344.
- ²¹ Purkerson SL, Baden DG and Fieber LA (1999) Brevetoxin modulates neuronal sodium channels in two cell lines derived from rat brain. *Neurotoxicology* 20:909-920.
- ²² Gawley RE, Rein KS, Jeglitsch G, Adams DJ, Theodorakis EA, Tiebes J, Nicolaou KC and Baden DG (1995) The relationship of brevetoxin 'length' and A-ring functionality to binding and activity in neuronal sodium channels. *Chem Biol* 2:533-541.

Emilio Salceda y Aída Ortega, Instituto de Fisiología BUAP, email: esalceda@siu.buap.mx