



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

REGULACION DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO N POR PROTEINAS G EN NEURONAS DEL GANGLIO SIMPATICO CERVICAL SUPERIOR.

T E S I S

Que para obtener el Titulo de

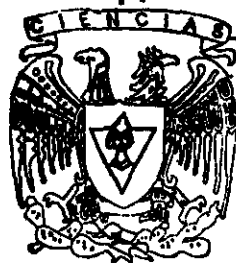
B I O L O G O

P r e s e n t a

Juan Manuel Hernández Castellanos

Director de Tesis:

DR. DAVID ERASMO GARCIA DIAZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Realizada en: Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina, UNAM

286639

Año 2000

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



GOBIERNO NACIONAL
AGENCIA LE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**REGULACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO N
POR PROTEINAS G EN NEURONAS DEL
GANGLIO SIMPÁTICO CERVICAL SUPERIOR**

realizado por **JUAN MANUEL HERNÁNDEZ CASTELLANOS**

con número de cuenta **0-7516760-6** , pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. DAVID ERASMO GARCÍA DIAZ

Propietario

Dr. JOSÉ MARIA FARIAS SANCHEZ

Propietario

Dr. JULIO PRIETO SAGREDO

Suplente

Dra. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GOMEZ

Suplente

Dr. JAIME GARCÍA RUIZ

FACULTAD DE ~~BIOLOGIA~~
U.N.A.M.

Consejo Departamental de **BIOLOGIA**

Edna Maria Suarez Diaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE | p.1 |
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| DEDICATORIA | 4 |
| ABREVIATURAS | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1. ANTECEDENTES GENERALES | 9 |
| 1.1. El ión calcio (Ca^{2+}) | 9 |
| 1.2. Propiedades de Ca^{2+} | 10 |
| 1.3. Funciones de Ca^{2+} en el interior celular | 14 |
| 2. CANALES DE CALCIO | 16 |
| 2.1. Vías de paso al interior celular de Ca^{2+} | 16 |
| 2.2. Tipos de canales de Ca^{2+} | 17 |
| 2.2.1. Canales operados por receptor | 17 |
| 2.2.2. Canales operados por almacenamiento | 17 |
| 2.2.3. Canales de Ca^{2+} intracelulares | 17 |
| 2.2.4. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje | 17 |
| 2.2.4.1. Canales tipo L | 19 |
| 2.2.4.2. Canales tipo N | 20 |
| 2.2.4.3. Canales tipo T | 20 |
| 2.2.4.4. Canales tipo P/Q | 20 |
| 2.2.4.5. Canales tipo R | 20 |
| 3. LA PROTEÍNA G, UN HETEROTRÍMERO | 21 |
| 3.1. Familias de proteínas G | 24 |
| 3.1.1. Proteínas G_s | 24 |
| 3.1.2. Proteínas $G_{i/o}$ | 25 |
| 3.1.3. Proteínas G_q | 26 |
| 3.1.4. Proteínas G_{12} | 27 |
| 4. ANTECEDENTES INMEDIATOS | 29 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 31 |
| 6. HIPOTESIS DE TRABAJO | 32 |
| 7. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO | 32 |
| 7.1. Objetivo general | 32 |
| 7.2. Objetivos particulares | 32 |

| | |
|---|--------------|
| 8. MATERIALES Y METODOS | p. 33 |
| 8.1. Cultivo primario de neuronas del SCGs | 33 |
| 8.2. Plásmidos utilizados | 34 |
| 8.2.1. Las subunidades G β | 36 |
| 8.3. El GFP y el método de fluorescencia | 37 |
| 8.3.1. Inyección intranuclear | 43 |
| 8.4. El registro electrofisiológico | 46 |
| 9. RESULTADOS | 50 |
| 9.1. Identificación por fluorescencia | 50 |
| 9.2. Resultados electrofisiológicos | 52 |
| 9.2.1. Registro de neuronas SCGs control | 55 |
| 9.2.2. Registro de neuronas SCGs inyectadas que mostraron expresión | 57 |
| 9.2.3. Validación de la expresión | 60 |
| 9.2.4. Regulación de las corrientes de Ca ²⁺ por los distintos subtipos G β | 62 |
| 9.2.5. Efecto de sobreexpresar G β 5 | 66 |
| DISCUSIÓN | 69 |
| CONCLUSIONES | 78 |
| PERSPECTIVAS | 78 |
| REFERENCIAS | 79 |

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DEGAPA-UNAM) por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Sinceramente

Juan Manuel Hernández Castellanos

Al profesor impecable
al perfecto mago de la electrofisiología
a mí muy querido amigo y muy venerado
maestro y amigo
David E. García
con los sentimientos de la más profunda
humanidad, dedico
éste humilde trabajo.

ABREVIATURAS

Abrev. de una sola letra para residuos aminoácidos: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr.

α 1 AR: receptores α 1-adrenérgicos

α 2 AR: receptores α 2-adrenérgicos

β AR: receptores β -adrenérgicos

Ca²⁺: ión calcio

CTX: Toxina del cólera

[D]: coeficiente de difusión

DMEM: Medio Aguila Modificado Dulbecco's

FBS: Suero Fetal Bovino

GABA: neurotransmisor ácido γ -amino-n-butírico

GFP: proteína fluorescente verde

G α : subunidad alfa de proteína G

G β : subunidad beta de proteína G

G $\beta\gamma$: dímero $\beta\gamma$ de proteína G

G γ : subunidad gamma de proteína G

HEPES: Amortiguador biológico N-[2-Hidroxietil]piperizina-N-[2-acido-2-etanosulfónico]

I_{Ca}: corrientes de Ca²⁺

IP₃: Inositol(1,4,5)-trifosfato

M1 Cho: Receptor M1 – muscarina-colinérgicos

M2 Cho: Receptor M2 – muscarina-colinérgicos

Met-Enk: met – encefalina

Mg²⁺: ión magnesio

mseg: milisegundos

mV: milivolts

MΩ: Megaohms

NE: norepinefrina

P/S: Penicilina / estreptomicina

Pa: en honor de Blais Pascal (1623-1662), unidad de presión que equivale a la presión uniforme ejercida por una fuerza total de un Newton y que actúa perpendicularmente a una superficie plana de un metro cuadrado.

PG: proteínas G

Pi: Fósforo inorgánico

PIP₂: fosfatidilinositol(4,5)difosfato

PLC: fosfolipasa C

PLCβ: fosfolipasa Cβ

pS: picoSiemens

PTX: Toxina pertusis

RE: retículo endoplásmico

SCGs: ganglio simpático cervical superior

UV: Radiación ultravioleta se extiende desde aproximadamente 1 nm hasta 380 nm del espectro electromagnético.

VDCCs: canales de calcio dependientes de voltaje

7TMSRs: receptor heptaheicoidal

"Las neuronas simpáticas son iguales de interesantes que otros tipos de células nerviosas, pero a causa de la relativa facilidad para aislarlas en estado adulto, representan una forma reproducible y robusta de trabajar con la técnica de fijación de voltaje, sus corrientes son sencillas y fácilmente identificables, han sido muy estudiadas y ahora una clara imagen va surgiendo. El desarrollo de esta historia proporciona un cimiento para estudiar de la misma forma otras neuronas menos accesibles, aunque los detalles de cada tipo neuronal pueden ser ciertamente diferentes".

Bertill Hille, 1994

INTRODUCCION

Todas las células poseen la capacidad de recibir y procesar información de su entorno. Las señales externas estimulan sitios específicos en las células nerviosas. La liberación de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento funcionan como mensajeros químicos entre células vecinas o distantes. La interacción de estos mensajeros con sus receptores específicos en la superficie de la membrana celular, representa el primer paso en una sucesión de eventos moleculares y fisiológicos que sustentan la señalización a través de la membrana plasmática. En algunos casos la estimulación de los receptores da como resultado la activación de proteínas de membrana que constituyen a los canales iónicos.

En los organismos eucariontes la familia de las proteínas G representa un papel fundamental en el enlace entre los receptores de la membrana celular y las proteínas sobre las cuales ejercen su acción.

En el presente trabajo analizaremos la inhibición de las corrientes de calcio neuronales por proteínas G acopladas a receptores, evento que muy probablemente ocurre en todos los tipos neuronales. De tal forma que éste es un modo ampliamente distribuido de modulación de la actividad eléctrica y la función sináptica.

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. El ión calcio

El ión calcio (Ca^{2+}) es el elemento de transducción de señales más común en la célula, abarcando un amplio rango filogenético, desde bacterias hasta las neuronas.

A diferencia de muchos otros segundos mensajeros, el Ca^{2+} es requerido para la vida, aunque el aumento prolongado de los niveles intracelulares lleva a la muerte celular. El Ca^{2+} no puede ser metabolizado como otros segundos mensajeros, su nivel intracelular debe ser regulado estrechamente a través de numerosas proteínas enlazantes y proteínas de extrusión. Durante la excitación, los niveles normales de Ca^{2+} de ~ 100 nM se multiplican hasta ~ 2 mM adquirido del medio extracelular (Clapham, 1995).

¿Por qué es importante el Ca^{2+} ? En el agua de mar el ión magnesio (Mg^{2+}) se encuentra en mayor concentración que el ión calcio, pero a diferencia del Mg^{2+} no es expulsado del citoplasma. Un argumento probable para la singularidad del Ca^{2+} es que se puede mantener a bajas concentraciones, puesto que precipita con fosfato, la moneda energética de la célula. El Ca^{2+} es menos afín por la molécula del agua que el ión Mg^{2+} . Las células desarrollaron estrategias para ligar Ca^{2+} , evolutivamente tal vez primero para reducir el nivel citoplásmico, pero más tarde como transducción de señales (Clapham, 1995).

1.2. Propiedades del ión calcio

El ión calcio es capaz de acomodar de 4 a 12 átomos de oxígeno en su capa más externa, pero su número de coordinación 6-8 es el más común (Mc Phalen et al., 1991). El quelante artificial EDTA se enlaza divalentemente al Ca^{2+} a través de una concentración alta local de grupos combinados, dos grupos nitrógeno y cuatro grupos oxígeno, que forman un arreglo aproximado de octaedro alrededor del ión Ca^{2+} (Pauling, 1947).

Las proteínas por regla general se enlazan al Ca^{2+} a través de 6 átomos de oxígeno, los cuales son proveídos por residuos aminoácidos de glutamato y aspartato que se encuentran normalmente cargados a un pH fisiológico (Fasman et al., 1989).

Mucho sitios de unión de Ca^{2+} se encuentran contenidos en una capa interna de átomos de oxígeno cercano en 2.1-2.7 Angström del centro de Ca^{2+} , una segunda capa se encuentra muy poblada por átomos de carbono que sustentan a los átomos de oxígeno coordinados de la capa interna y una tercera capa alejada 4-5 Angström del centro del ión Ca^{2+} contiene átomos de nitrógeno (Nayal et al., 1994).

Con el conocimiento actual de la estructura de las proteínas no siempre podemos predecir los sitios de unión de Ca^{2+} , únicamente sobre la base de la secuencia de los residuos de aminoácidos. No obstante se conoce un sitio importante en la unión glutamato-fenilalanina, llamado por convención región E y F de parvalbúmina. Este sitio de enlace "hélice-lazo-hélice" es característico de un sitio de unión para el Ca^{2+} .

El sitio de unión de Ca^{2+} está compuesto por residuos que contienen grupos oxígeno en sus cadenas laterales, por lo que son

necesarios los residuos de aspartato, glutamato y glicina para la estructura molecular de "lazo" (Kretsinger et al., 1980). El enlace cooperativo de múltiples iones calcio es usual y más de un sitio de unión con Ca^{2+} puede presentarse en la misma proteína (Clapham, 1995).

Es común clasificar a las proteínas que se unen al Ca^{2+} como: activadoras o amortiguadoras. Las proteínas activadoras cambian su conformación después de unirse al Ca^{2+} y modulan moléculas como son las enzimas y los canales iónicos. Las proteínas de unión amortiguadoras de Ca^{2+} , pueden simplemente unir iones calcio si su concentración se incrementa dentro de la célula o del organelo (Clapham, 1995).

El Ca^{2+} difunde mucho más lentamente que lo predicho simplemente por las propiedades de sus iones [$\sim 1\text{\AA}$, coeficiente de difusión $[D] = 1000 \mu\text{m}^2 / \text{sec}$] (Clapham, 1995). Se ha calculado que los átomos de calcio no migran más allá de 0.1 a 0.5 μm durante lapsos tan cortos como $\sim 50 \mu\text{sec}$ antes de encontrarse con una proteína de unión (suponiendo $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} K_{on}$ y 300 μM concentración de proteína enlazante). El ión calcio se difunde también dependiendo de la saturación de las proteínas amortiguadoras y puede variar entre 15 y 65 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ (Allbriton et al., 1992). Sin embargo, la imagen ideal de una célula con un volumen uniforme para los procesos de difusión es una simplificación muy gruesa. Los amortiguadores celulares son, indudablemente, distribuidos de forma funcional y no uniformemente. Además, los amortiguadores para el Ca^{2+} pueden ser móviles o fijos (Clapham, 1995).

El Ca^{2+} puede ser un segundo mensajero extremadamente difundido, como sería de esperarse por su número, afinidad, y especificidad de enlace con las proteínas.

Existen diversos mecanismos para introducir pequeños "pulsos" de ión calcio en el citoplasma y generar la transducción de señales. Los iones calcio se obtienen de dos grandes depósitos, el espacio extracelular y el retículo endoplásmico (RE), de donde es inyectado en el citoplasma a través de la membrana o desde el RE a través de canales iónicos (Clapham, 1995).

En las células no excitables como son las células sanguíneas, hepatocitos y el endotelio, la molécula de Inositol(1,4,5)-trifosfato (IP_3) regula las vías de paso predominantes. Dos clases de receptores, receptores transmembranales acoplados a la proteína G y los receptores tirosin-cinasa (RTKs) liberan IP_3 . Los receptores transmembranales son activados por fosfolipasa $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$), en tanto que los RTKs estimulan fosfolipasa $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) para convertir fosfatidilinositol(4,5)difosfato (PIP_2) en IP_3 y diacilglicerol (Berridge et al., 1989). El IP_3 actúa como un segundo mensajero intracelular, que se enlaza al receptor tetramérico especializado para IP_3 incluido en la membrana del retículo endoplásmico y activa la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares.

El balance electroquímico para el ión calcio es igual $\sim +150$ mV, por lo que el Ca^{2+} fluye al interior celular a todos los potenciales de membrana fisiológicos (-90 a +60 mV). Además, su entrada es facilitada por una hiperpolarización transitoria. La apertura de los canales de K^+ impulsa el potencial de membrana a potenciales más negativos, permitiendo el paso de iones calcio más rápidamente a través de canales especializados selectivos a Ca^{2+} independientes del voltaje (Clapham, 1995). La selectividad a Ca^{2+}

es asegurada por la estructura del poro del canal y es inadecuada para otros iones.

Como complemento al sistema descrito para las células no excitables, las células excitables poseen canales dependientes del voltaje, que habilitan a estas células para aumentar dramáticamente los niveles citoplásmicos de Ca^{2+} .

Proteínas activadoras especializadas para el Ca^{2+} cercanas a la membrana plasmática en la superficie interna, promueven funciones diversas, como son exocitosis en neuronas y contracción en músculo. En las células excitables, la despolarización desde el potencial de reposo de la membrana (aprox. -70 mV) inicia cambios conformacionales en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, mediante zonas especializadas sensoras de voltaje (S4), éstas moléculas catalizan el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana (Clapham, 1995).

1.3. Funciones del Ca^{2+} en el interior celular

El catión divalente calcio es utilizado por las células como un segundo mensajero para controlar diversos procesos a saber: contracción muscular, secreción, metabolismo, excitabilidad neuronal, proliferación y muerte celular.

La concentración intracelular del ión calcio en células excitables en reposo se mantiene baja (10–100 nM), pero la estimulación da como resultado un incremento en la concentración en el orden de 500 a 1000 nM, niveles que son necesarios para activar sensores como la calmodulina y la troponina C (Berridge, 1998). La célula tiene acceso a dos fuentes de señal de Ca^{2+} , la entrada desde el medio extracelular y la liberación desde almacenes intracelulares. Estos mecanismos de entrada del Ca^{2+} están balanceados por la bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que constituye el mecanismo de salida responsable de la eliminación de la señal de Ca^{2+} (Carafoli, 1994). Este sistema de entrada-salida, comúnmente produce picos breves y fluctuaciones del nivel de calcio. La célula puede evitar el efecto citotóxico del Ca^{2+} empleando esta forma oscilatoria de la señal (Barridge, 1998).

Es bien conocido que el Ca^{2+} funciona como un segundo mensajero que regula una gran variedad de procesos celulares:

Contracción. El fenómeno de acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético y músculo cardiaco depende de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico.

Secreción. Durante el fenómeno de acoplamiento estimulación-secreción, el Ca^{2+} actúa liberando por exocitosis productos del metabolismo celular (por ejemplo: liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas) o

estimulando los mecanismos iónicos responsables de la secreción de fluidos en las glándulas exocrinas.

Metabolismo. La fragmentación del glucógeno en las células del hígado es controlada por una activación del calcio dependiente de fosforilasa.

Excitabilidad neuronal. La excitabilidad de las neuronas puede ser regulada a través de un efecto dependiente del calcio en los canales iónicos y receptores ionotrópicos. Algunos de estos efectos del calcio son de larga duración, como es la potenciación de largo plazo o la depresión de largo plazo, procesos que se encuentran relacionados con el aprendizaje y la memoria.

Proliferación celular. El Ca^{2+} juega un importante papel en la fertilización y controlando la proliferación celular.

Muerte celular. Elevados niveles de calcio, especialmente al mantenerse por períodos largos, pueden ser citotóxicos. El Ca^{2+} se encuentra implicado en ambos procesos, necrosis y apoptosis.

2. CANALES DE CALCIO

2.1. Vías de Paso al Interior Celular del Ca²⁺

Se reconocen al menos siete sistemas de transporte del Ca²⁺ en células eucariontes: tres se encuentran en la membrana plasmática (una Ca²⁺-ATPasa, intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y canales de Ca²⁺), dos en la membrana interna de la mitocondria (un uniportador electroforético y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺) y dos en el retículo sarcoplásmico (una Ca²⁺-ATPasa y un canal de Ca²⁺). Otros sistemas de transporte adicionales se sugiere que se presentan en otras membranas como son los lisosomas y el aparato de Golgi, pero no se han caracterizado completamente para que garanticen su inclusión dentro de los sistemas transportadores del Ca²⁺. Todos estos sistemas pueden ser agrupados en cuatro formas básicas de transporte: ATPasas, intercambiadores, canales y uniportadores electroforéticos (Tabla 1).

Sistemas de transporte de Ca²⁺ en membranas celulares

| Modo de transporte | Membrana | Afinidad por Ca ²⁺ |
|--|---|-------------------------------|
| ATPasa | Membrana Plasmática Retículo Sarcoplásmico | Alta |
| Intercambiadores (Na ⁺ /Ca ²⁺) | Membrana Plasmática Membrana Interna | Baja |
| Canales | Membrana Plasmática Retículo Sarcoplásmico | Baja |
| Uniportadores Electroforéticos | Membrana interna Mitocondrial | Baja |

Tabla 1. Vías de paso del ión Ca²⁺

2.2. Tipos de canales de Ca²⁺

Los canales de Ca²⁺ permiten el paso de los iones calcio al interior celular. Aunque los canales se encuentran en todos los tipos celulares estos se estudian normalmente en membranas de células excitables, donde las corrientes eléctricas dependientes de Ca²⁺ pueden ser medidas (Carafoli, 1994). En células excitables, la apertura del canal es activada por la despolarización de la membrana plasmática, la cual presenta una variedad de canales para la entrada del Ca²⁺.

2.2.1. Canales operados por receptor.

Son canales de Ca²⁺ que se abren al unirse agonistas específicos al receptor, usualmente neurotransmisores como son el glutamato (receptor NMDA) o el ATP.

2.2.2. Canales operados por almacenamiento.

Muchas células tienen este tipo de canales en su membrana plasmática que se abren por el vaciado de sus almacenes internos.

2.2.3. Canales de Ca²⁺ intracelulares.

El retículo endoplásmico y el retículo sarcoplásmico son dos organelos que poseen canales intracelulares responsables de liberar Ca²⁺ de sus almacenamientos internos (Berridge, 1998).

2.2.4. Canales de Ca²⁺ operados por voltaje.

Es una familia de canales que operan en respuesta a la despolarización de la membrana y que permite la entrada selectiva del Ca²⁺. Dependiendo de la magnitud de la despolarización necesaria para activar a los diferentes tipos de canales de Ca²⁺,

estos pueden ser clasificados como activados por alto umbral de voltaje o activados por bajo umbral de voltaje.

Los diferentes tipos son clasificados de acuerdo a su cinética y propiedades farmacológicas, se han identificado varios tipos de canales de Ca^{2+} nativos: T, N, L, P/Q y R. En muchas neuronas la ω -conotoxina fracción GVIA bloquea el componente sensitivo de corriente de la proteína G, indicando de esta manera que los canales de Ca^{2+} tipo N representan el mayor blanco de inhibición. Adicionalmente los canales tipo P/Q son inhibidos por una variedad de transmisores incluidos opiáceos, GABA y somatostatina (Zamponi et al., 1998).

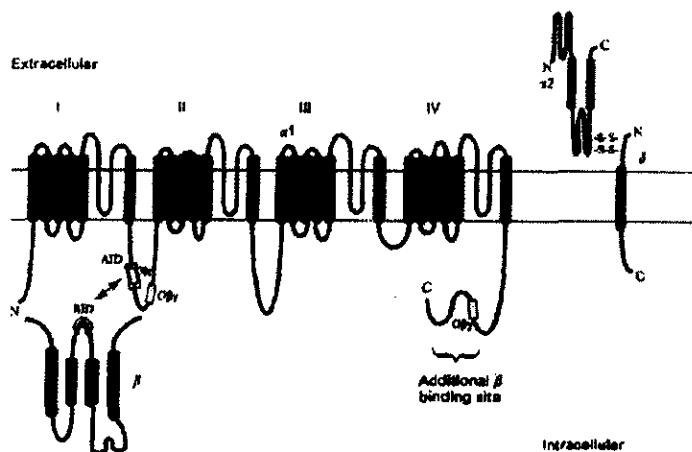


Fig. 1. Representación esquemática de un canal de Ca^{2+} activado por voltaje. Consiste en cuatro dominios repetidos (I-IV). Cada dominio contiene seis regiones α -hélice transmembranales (S1-S6). El dominio I es responsable de la cinética de activación del canal. La región S4 está cargada positivamente y forma parte del sensor de voltaje. El "asa" entre las regiones S5 y S6 forma el poro del canal. (Tomado de Dolphin, 1998)

Estudios bioquímicos muestran que los canales de Ca^{2+} neuronales son proteínas heteroligoméricas, compuestas por las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$ y β con una estequiometría 1:1:1 (Walker et al., 1998). La subunidad $\alpha 1$ forma el poro selectivo a los iones Ca^{2+} , consta de veinticuatro hélices transmembranales agrupadas en

cuatro dominios. Dentro de su secuencia primaria existen dos regiones que son de particular importancia: la región citoplásmica que une a los dominios transmembranales I y II (asa I-II) y la larga región citoplásmica que contiene el extremo carboxilo terminal (región C-terminal). Ambas regiones contienen sitios de interacción con la subunidad citoplásmica β y regiones que han sido demostradas como críticas para la interacción con segundos mensajeros.

Las clonaciones moleculares han identificado nueve genes de subunidad $\alpha 1$ del canal ($\alpha 1A$ - $\alpha 1H$ y $\alpha 1S$), cuatro genes de subunidad β ($\beta 1$ - $\beta 4$) y un gen único codifica para la subunidad $\alpha 2\delta$ (Birnbauer et al., 1994).

El gen $\alpha 1A$ codifica para canales tipo P/Q, $\alpha 1B$ codifica para un canal de Ca^{2+} tipo N, Los genes $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1S$ todos ellos codifican para el canal tipo L y $\alpha 1E$ constituye un nuevo tipo de canal que exhibe algunas semejanzas entre canales de alto umbral y bajo umbral de voltaje. Los más recientemente identificados $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ muestran la codificación de dos distintas isoformas de canal de Ca^{2+} tipo T. La expresión exógena de la clonación de canales de calcio muestra que la proteína G activa, regula selectivamente a $\alpha 1A$ y $\alpha 1B$ de manera idéntica que las corrientes nativas tipo P/Q y tipo N respectivamente. Por el contrario $\alpha 1C$ que corresponde a la corriente tipo L, no muestra sensibilidad a la proteína G (Pérez-Reyes et al., 1998).

2.2.4.1. Canales de Ca^{2+} tipo L (long-lasting)

Son canales de Ca^{2+} activados por alto umbral de voltaje, sensibles a (1,4)-dihidropiridina, se localizan ubicuamente, principalmente en el músculo cardiaco y músculo esquelético, en los

que participa en el fenómeno del acoplamiento excitación-contracción (Walker et al., 1998).

2.2.4.2. Canales de Ca^{2+} tipo N (Neuronal)

Neuronales, transitorios, activados por alto umbral de voltaje, sensibles a ω -conotoxina fracción GVIA, se localizan en las terminales presinápticas y participan en la liberación dependiente de Ca^{2+} de neurotransmisores (Hille, 1992).

2.2.4.3. Canales de Ca^{2+} tipo T

Transitorios, activados por bajo umbral de voltaje, parecen tener importancia en el mantenimiento de la actividad marcapaso de las células del músculo cardíaco y en la actividad oscilatoria de varios tipos neuronales del tálamo (Walker et al., 1998).

2.2.4.4. Canales de Ca^{2+} tipo P/Q

Activados por bajo umbral de voltaje, sensibles a ω -agatoxina y a la toxina FTX de araña, se localizan en las terminales presinápticas, difieren de los canales tipo L en las características propias de modulación por segundos mensajeros. Los canales tipo P/Q son regulados por vías de señalización intracelular activadas por neurotransmisores que se unen a receptores heptahelicoidales acoplados a proteínas G sensibles a la toxina pertusis (Beech et al., 1992).

2.2.4.5. Canales de Ca^{2+} tipo R

Los canales de Ca^{2+} tipo R han sido pobremente caracterizados, debido entre otras razones, a la falta de bloqueadores específicos para este subtipo de canal

3. LA PROTEÍNA G, UN HETEROTRÍMERO

Las proteínas reguladoras de unión al nucleótido guanina son llamadas proteínas G (PG). Actúan de intermediarios de un gran número de diversos receptores de la superficie celular que atraviesan la membrana siete veces (7TMSRs) con una variedad de efectores intracelulares (Graber, 1998).

Esta vía controla transducciones de señales esenciales y numerosas en todos los tejidos y es ubicuo en el reino animal.

Las proteínas G son moléculas heterotriméricas constituidas por una subunidad alfa ($G\alpha$) con una masa entre 36 - 52 kDa, una subunidad beta ($G\beta$) con masa de 35 a 36 kDa y una subunidad gamma ($G\gamma$) con masa entre 8 y 10 kDa. Su estequiometría es 1:1:1 (Freismuth et al., 1998).

Actualmente ha sido posible clonar el cDNA que codifica a los 21 distintos subtipos α de proteína G; éstas pueden ser divididas en cuatro grandes subfamilias de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Adicionalmente se han descrito cinco subtipos β ($\beta 1 - \beta 5$) y doce subtipos γ [$\gamma 1 - \gamma 12$] (Birnbauer et al., 1994).

Las subunidades β y γ se ensamblan en un dímero $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) que actúa como una unidad funcional, la cual únicamente se separa bajo fuertes condiciones de desnaturalización.

La subunidad $G\alpha$ tiene un sitio de alta afinidad de enlace para los nucleótidos de guanina, es activa cuando se enlaza a GTP e inactiva cuando lo está a GDP. Todas las subunidades $G\alpha$ son por sí mismas enzimas. Esto es, poseen actividad GTPasa y pueden en diversas proporciones hidrolizar el radical fosfato del enlace GTP hacia GDP y Pi (Freismuth et al., 1998).

En algunos casos las subunidades $G\alpha$ poseen residuos específicos que pueden modificar covalentemente a las toxinas bacterianas que catalizan la incorporación de un ADP ribosilado en el polipéptido a un residuo aminoácido específico.

En cultivos celulares el dímero $G\beta\gamma$ juega un papel directo en la señalización, regulando la actividad de algunos canales de calcio, canales de potasio, la adenilato ciclasa y fosfolipasas, en células de mamífero.

El mecanismo comúnmente aceptado de la transducción de señales por proteínas G se resume a continuación: El agonista se une al receptor heptahelicoidal (7TMSRs), alterando la configuración del receptor y permitiendo que se catalice el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G acoplada al receptor. El enlace con la molécula de GTP produce un cambio conformacional en la subunidad α de la proteína G dando como resultado la disociación del receptor con el complejo de la proteína G y liberando a las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ que interactúan con el efector "blanco". La actividad intrínseca como GTPasa termina la interacción de la subunidad $G\alpha$ con sus efectores. El GDP ligado a la subunidad $G\alpha$ interactúa fuertemente con el dímero $G\beta\gamma$ y de esta manera el GTP también finaliza la intermediación del dímero $G\beta\gamma$ de la señalización promoviendo la asociación del enlace GDP y la subunidad $G\alpha$ con el dímero $G\beta\gamma$ (Graber, 1998).

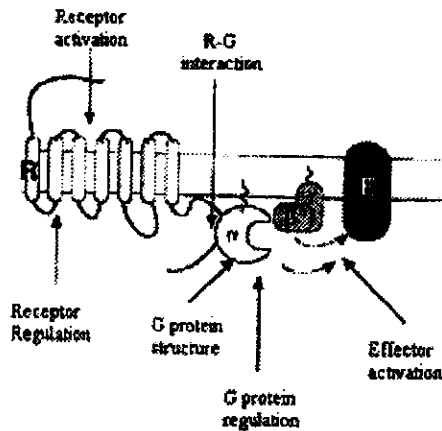


Fig. 2 Representación esquemática del mecanismo de transducción de señales mediado por proteínas G acopladas a receptores heptahelicoidales. (Tomado de Strosberg, 2000)

En resumen, la señalización es controlada por tres ciclos interdependientes de asociación-disociación: interacción entre el receptor y la proteína G; entre los nucleótidos de guanina y la subunidad $G\alpha$; finalmente entre las subunidades $G\beta\gamma$ y el complejo que forma el canal. Así, la primera amplificación de la señal ocurre porque un agonista que ocupa al receptor es capaz de activar múltiples proteínas G y la duración de la señal es en parte determinada por el tiempo de vida del enlace entre el GTP con la subunidad $G\alpha$ (Graber, 1998).

3.1. Familias de proteínas G

Las familias de los subtipos α de las proteínas G pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura y función, existe una congruencia razonable entre ambos esquemas. Las proteínas G primeramente fueron agrupadas de acuerdo a su función; sus nombres se les asignaron subrayando sus papeles funcionales (Hepler et al., 1992).

Actualmente ha sido posible clonar el cDNA que codifica a los 21 distintos subtipos de subunidad $G\alpha$; éstos pueden ser divididos en cuatro grandes subfamilias de acuerdo con la secuencia de aminoácidos. Están representados por G_s , $G_{i/o}$, G_q y G_{12} .

3.1.1. Proteínas G_s

Las hormonas y los receptores olfativos interactúan con miembros de la familia G_s (G_s y G_{oif}) para estimular la adenilato ciclasa y de este modo mejorar la proporción de síntesis de AMPc.

Se han descrito cinco isoformas distintas de adenilato ciclasa y todas ellas son activadas por G_s . La subunidad G_{oif} se expresa exclusivamente en el neuroepitelio olfativo y presuntamente sirve de enlace a los receptores de aromas con una forma específica olfativa de Adenilato Ciclase (Tabla 2).

| Familia/subtipo | Masa kDa (10^{-3}) | Toxina | Distribución | Receptor | Efector |
|-----------------------|------------------------------|--------|---------------------------|------------|---------------------------------|
| G_s $\alpha_{s(s)}$ | 42.2 | CTX | Ubicuo | β AR | Adenilato ciclase |
| $\alpha_{s(i)}$ | 45.7 | CTX | Ubicuo | TSH | Canal Ca^{2+} Canal Na^+ |
| α_{oif} | 44.7 | CTX | Epitelio neuroolfativo | Aromático | Adenilato ciclase |

*Tabla 2. Familia de proteínas G_s

3.1.2. Proteínas G_{i/o}

En los bastones fotoactivos de la retina, la rodopsina activa a la molécula de transducina (G_{ti}) que estimula una fosfodiesterasa específica de GMPc. Aunque G_{ti} se expresa únicamente en los bastones retinianos, una segunda forma de transducina (G_{t2}) se expresa en los conos. Otra forma de transducina se expresa en las papilas gustativas y se le llama G_g o gusducina. La toxina pertusis bloquea una variedad de vías de paso señalizadas por ésta subunidad. La más ampliamente estudiada es la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación o inhibición de varios canales iónicos (Tabla 3).

| Familia/subtipo | Masa kDa (10 ⁻³) | Toxina | Distribución | Receptor | Efector |
|------------------|------------------------------------|--------|-------------------------|--|--|
| G _{i/o} | | | | | |
| α _{ti1} | 40.3 | PTX | Casi ubicuo Bastones | M ₂ Cho, α ₂ AR | |
| α _{ti2} | 40.5 | PTX | Ubicuo, Conos | | Canal K ⁺ |
| α _{i3} | 40.5 | PTX | Ubicuo | Otros | Canal Ca ²⁺ Adenilato ciclasa |
| α _{oA} | 40.0 | PTX | Cerebro, otros | Met.Enk, α ₂ AR | Canal Ca ²⁺ Fosfolipasa |

| | | | | | |
|---------------|------|-----|------------------------------------|--------------------|----------------------|
| α_{OB} | 40.1 | PTX | Cerebro, otros | Otros | Fosfolipasa |
| α_G | 40.5 | CTX | Papilas gustativas | Gusto | Fosfolipasa |
| α_Z | 40.9 | --- | Cerebro, Adrenal, Plateletas | M ₂ Cho | Adenilato ciclase |

*Tabla 3. Familia de proteínas G_{vo}

3.1.3. Proteínas G_q

Las acciones fisiológicas de una amplia variedad de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, pueden ser explicados por su capacidad de activar específicamente a la molécula de fosfolipasa C (PLC) y una enzima efectora que cataliza la hidrólisis de un pequeño lípido, el fosfatidilinositol (4,5)-difosfato para formar dos segundos mensajeros, al (1,4,5)-trifosfato y al diacilglicerol.

Las proteínas G_q no son sensibles a las toxinas pertusis y toxina del cólera. Se han identificado miembros de la familia G_q como reguladores de estas vías de paso. Una combinación de proteínas G_q y G₁₁ se obtiene a partir de cerebro bovino e hígado de rata. Una proteína estrechamente relacionada con ellas se obtiene de eritrocitos de pavo. La reconstitución de estas proteínas con PLC β purificado, da como resultado una estimulación específica y marcada de la enzima.

G_q, G₁₁, y G₁₄ están presentes en muchos tejidos. Los otros dos miembros de la familia G_q, G₁₅ y G₁₆ se expresan únicamente en células de linaje hematopoyético (Tabla 4).

| Familia/subtipo | Masa kDa (10 ⁻³) | Toxina | Distribución | Receptor | Efactor |
|-----------------|------------------------------------|--------|-------------------------------------|--|--|
| G _q | | | | | |
| α _q | 42.0 | --- | Casi ubicuo | M ₁ Cho, α ₁ AR | |
| α ₁₁ | 42.0 | --- | Casi ubicuo | otros | Fosfolipasa C -β ₁ |
| α ₁₄ | 41.5 | --- | Pulmón, riñón, hígado | No conocido | β ₂ - β ₃ , otros |
| α ₁₅ | 43.0 | --- | Células β, células mielínicas | No conocido | |
| α ₁₆ | 43.5 | --- | Células T, células mielínicas | No conocido | Fosfolipasa C -β ₁ ,β ₂ ,β ₃ |

*Tabla 4. Familia de proteínas G_q

3.1.4. Proteínas G₁₂

Estas proteínas no son sustrato de la toxina pertusis y son posibles candidatos de las vías de señalización que no pueden ser interrumpidas por esta toxina. En muchas células, la activación dependiente de GDP de la fosfolipasa C no es bloqueada por la toxina pertusis (Tabla 5).

| Familia/subunidad | Masa kDa (10 ⁻³) | Toxina | Distribución | Receptor | Efactor |
|-------------------|------------------------------------|--------|--------------|----------------|----------------|
| G ₁₂ | | | | | |
| α ₁₂ | 44.0 | --- | Ubicuo | No conocido | No conocido |
| α ₁₃ | 44.0 | --- | Ubicuo | No conocido | No conocido |

*Tabla 5. Familia de proteínas G₁₂

Notas:

Toxina del cólera (CTX) cataliza la ADP ribosilación de un residuo de arginina.

Toxina pertusis (PTX) cataliza la ADP ribosilación de un residuo de cisteína.

*Modificado de Hepler y Gilman, TIBS 17.

4. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) tienen un papel fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso y en general del organismo entero, ya que de ellos dependen procesos esenciales tales como la liberación de neurotransmisores y la secreción de hormonas.

La inhibición de las corrientes de calcio neuronales por proteínas G acopladas a receptores, probablemente ocurre en todos los tipos neuronales, de tal forma que este es un modo ampliamente distribuido de modulación de la actividad eléctrica y la función sináptica. Una forma común de modulación utiliza una vía de señalización cuyos componentes están restringidos a la membrana celular (delimitados a la membrana, Fig. 2), se desarrolla en menos de un segundo y es dependiente del voltaje, i.e., la inhibición puede ser parcialmente liberada por fuertes pulsos despolarizantes (Hille, 1994).

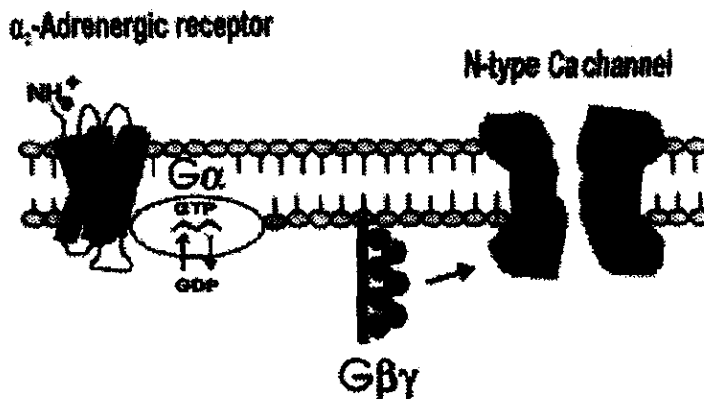


Fig. 3. Una forma común de modulación utiliza una vía de señalización cuyos componentes están delimitados a la membrana. (Tomado de García DE, 1998)

Un ejemplo bien estudiado de esta modulación es la inhibición de los canales de calcio tipo N por norepinefrina (NE) actuando sobre receptores α -2 adrenérgicos (Fig. 2), en neuronas del ganglio simpático cervical superior (SCGs). Este tipo de inhibición es mediado por subunidades beta gamma de las proteínas G que actúan directamente sobre el canal (Ikeda, 1996; Herlitze et al., 1996). Sin embargo, la especificidad de las PG no ha sido investigada y, el sitio blanco de interacción entre la estructura molecular de las subunidades de las PG y la de la subunidad α 1 del canal de calcio es sujeto de controversia en la actualidad.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Trabajos previos del laboratorio (García, et al., 1998) indican que son las subunidades $G\beta$ las que pueden estar mediando la inhibición rápida, delimitada a la membrana, y dependiente del voltaje, de los canales de calcio tipo N, y que son ellas las que identifican una región blanco, en algún dominio del canal, el cual tiene un sitio de reconocimiento apropiado para el ligando.

Investigaciones recientes por otros autores sustentan la posibilidad de que las bases moleculares pueden ser la clave para explicar las interacciones entre las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G con sus efectores (Ford et al., 1998).

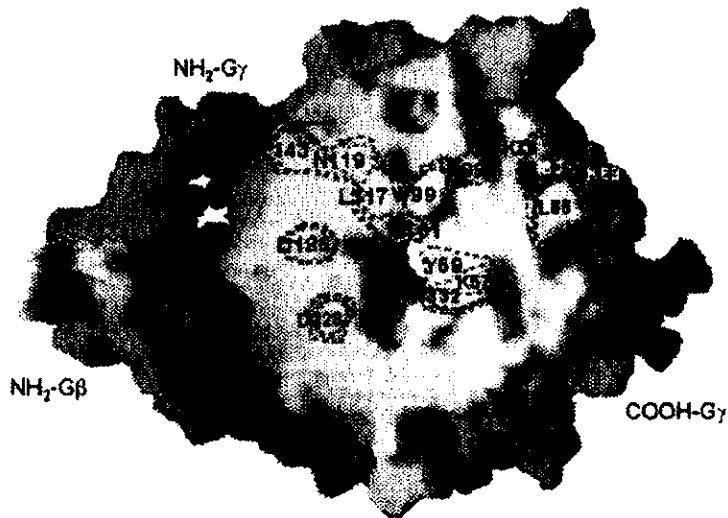


Fig. 4. Representación esquemática de las subunidades $G\beta\gamma$ mostrando las regiones de $G\beta$ involucradas en interacciones con la subunidad $G\alpha$ y con sus efectores. Note particularmente los residuos aa T143, N119, L117, D186, M101, W332, K78 y L55 que son los sitios de unión con el canal de Ca^{2+} (Tomado de Ford et al., 1998).

6. HIPOTESIS DE TRABAJO

La sobreexpresión de las distintas subunidades $G\beta$ en neuronas SCGs dará lugar a una inhibición tónica dependiente del voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo N. La magnitud del efecto regulador de cada subunidad $G\beta$ dependerá de las similitudes o diferencias moleculares entre cada una de ellas.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

1. Sobreexpresar las diferentes subunidades $G\beta$ en neuronas SCGs y determinar electrofisiológicamente sus efectos reguladores sobre la corriente de Ca^{2+} tipo N.

7.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar electrofisiológicamente las propiedades regulatorias de los distintos subtipos $G\beta$.

2. Determinar mediante procedimientos electrofisiológicos la tasa de facilitación, el mimetismo del efecto de norepinefrina y el aumento de la inhibición basal de la corriente de Ca^{2+} tipo N.

6. HIPOTESIS DE TRABAJO

La sobreexpresión de las distintas subunidades $G\beta$ en neuronas SCGs dará lugar a una inhibición tónica dependiente del voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo N. La magnitud del efecto regulador de cada subunidad $G\beta$ dependerá de las similitudes o diferencias moleculares entre cada una de ellas.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

1. Sobreexpresar las diferentes subunidades $G\beta$ en neuronas SCGs y determinar electrofisiológicamente sus efectos reguladores sobre la corriente de Ca^{2+} tipo N.

7.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar electrofisiológicamente las propiedades regulatorias de los distintos subtipos $G\beta$.

2. Determinar mediante procedimientos electrofisiológicos la tasa de facilitación, el mimetismo del efecto de norepinefrina y el aumento de la inhibición basal de la corriente de Ca^{2+} tipo N.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Cultivo primario de neuronas del SCG

Todos los experimentos se realizaron en neuronas SCGs cultivadas por métodos convencionales (Banker y Goslin, 1991; Beech, 1992), obtenidas de ratas. Existen diferentes razones para utilizar este modelo de estudio. En primer lugar, estas neuronas son relativamente fáciles de aislar ya que el ganglio simpático cervical superior es prominente y es una entidad anatómica discreta. Segundo, esta preparación proporciona una de las preparaciones celulares más homogéneas en vertebrados. El ganglio cervical superior de rata contiene una gran proporción de neuronas SCGs (>20'000; Davis, 1978), con un diámetro que varía entre 25-40 μm y una pequeña población de interneuronas (~300; Paivarinta y Eranko, 1982), que no sobreviven en cultivos de células disociadas. De esta forma el ganglio cervical superior proporciona una población particularmente uniforme de neuronas y se encuentra esencialmente libre de otros tipos celulares. Tercero, las neuronas simpáticas son completamente adaptables y pueden crecer rápidamente en una variedad de medios, sobre diferentes substratos y en ausencia o presencia de otros tipos celulares. Además, si las condiciones in vitro son las adecuadas, los cultivos de neuronas simpáticas expresan la mayoría de las propiedades de estas neuronas en estado maduro in situ, incluyendo síntesis y respuesta adecuada a los neurotransmisores, las propiedades electrofisiológicas normales y la morfología de sus dendritas se aproxima a la observada en el tejido.

El método de cultivo de detalla a continuación: Se utilizaron únicamente ratas macho de la cepa Wistar de 5 semanas de edad, 4 cajas petri de 35 mm con 4 ml de solución Hank's cada una (en hielo y bajo oxigenación constante), se agregan 400 μl de solución

de cisteína (4 mg/ml) a una de las cajas. Se decapita al ejemplar, y se disecan los ganglios cervicales superiores, que son transferidos a la solución de Hank's en hielo. Se Limpia y separa el tejido del ganglio, haciendo de 2 a 4 cortes en cada ganglio (sin atravesarlo). El tejido se incuba en 20 U/ml de papaina a 37⁰ C por un tiempo de 18 min. (esta enzima se agrega a 3 ml de la caja que contiene sol. de Hank's + cisteína). Reemplazamos la solución de papaína por una nueva solución de colagenasa (2 mg/ml) y dispasa (30 mg/ml). El tejido se incuba por 18 min., se dispersa ; se reincuba por otros 15 min. y de nuevo se dispersa. El punto final de la dispersión será cuando se encuentren en suspensión células aisladas. El tiempo de dispersión es empírico dependiendo de qué tan rápido las células del ganglio se separan. Se lava dos veces con solución apagadora de enzimas centrifugando a velocidad mínima, aprox. 300 G por un lapso de 8 minutos. Se lava por tercera ocasión en DMEM (glucosa alta) + 1:100 P/S + 10% HI FBS (GIBCO), se resuspende en un volumen adecuado al mismo. Se deposita gota a gota sobre una caja cubierta con poli-l-lisina (1 mg/ml) dentro de un anillo de clonación, la superficie de estas cajas se lava previamente con FBS o agua desionizada estéril. Se incuba una noche en un ambiente con 5% de CO₂ a una temperatura constante de 37° C y al día siguiente realimentamos con medio DMEM.

8.2. Plásmidos utilizados

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA que se multiplican independientemente en las células que los alojan y se heredan con regularidad al dividirse éstas. Tienen una organización molecular muy sencilla, carecen de cápside proteica y no poseen ninguna fase extracelular.

En las células que los poseen constituyen sólo una pequeña parte del genoma celular, en general entre el 1 al 3 por ciento. Aún así esa pequeña fracción de la información hereditaria determina rasgos genéticos accesorios, pero importantes no codificados usualmente por el genoma celular. Sólo los plásmidos portan información para la conjugación entre bacterias, tienen toda la responsabilidad de varias enfermedades en vegetales y animales, permiten que sus hospederos se nutran de muchas sustancias complejas y les confieren resistencia a muchos antibióticos y toxinas (Novick, 1981)

En los últimos años, se ha investigado intensamente con los plásmidos. Se descubrió que son los vehículos ideales para introducir en las células "genes extraños" mediante técnicas de biología molecular, permitiendo la multiplicación de estos genes y su expresión subsecuente.

La organización de los genes de los plásmidos hace compatible la estabilidad hereditaria con una gran flexibilidad estructural. Los plásmidos pueden adquirir nuevos genes y reorganizar extensamente los antiguos para mantener una información genética apropiada a las necesidades de su hospedero, sin comprometer la eficiencia de su propia replicación.

Los plásmidos representan el límite de la simbiosis, porque dependen del hospedero para todas las funciones vitales, salvo las "funciones autonómicas". Unas cuantas funciones genéticas bastan para asegurar la autonomía de éste (Novick, 1981).

Un segmento no mayor de 2000 pares de bases alberga todo el bloque promotor, capaz de replicar plásmidos más de 50 veces mayores que él. Se han definido experimentalmente cuatro elementos de un bloque replicador: el origen o lugar de iniciación de

la replicación; el iniciador; las funciones genéticas que determinan el número de copias y las que aseguran el reparto de las copias a las células hijas. El elemento central del sistema autónomo es el origen, que se define funcionalmente como la menor secuencia de ADN que puede servir de punto de partida de un ciclo de replicación.

El procedimiento de clonación molecular puede dividirse en tres partes: encontrar la secuencia estructural correcta, insertarla en la célula de forma que se conserve cuando la célula se desarrolle y manipular la información, modificando las órdenes reguladoras de manera que la secuencia estructural se exprese en proteína (Gilbert et al., 1980).

En un primer paso se obtiene DNA circular de un plásmido, utilizando endonucleasas de restricción se reconoce un punto y corta la molécula por él. Ahora podemos insertar un fragmento seleccionado de ADN en la abertura mediante técnicas enzimáticas capaces de conectar sus extremos con los del plásmido. Cualquier región de ADN presente en un plásmido puede aislarse y secuenciarse, la dificultad no estriba en determinar la secuencia sino en obtener el fragmento específico de DNA. La técnica de recombinación de DNA sirve a manera de un microscopio para aislar y aumentar una región de DNA del gen estructural deseado, y además, hacer muchas copias.

8.2.1. Las Subunidades G β

La molécula de DNA que codifica para la subunidad G β 1 fue clonada en el plásmido pCDM8, G β 3 en pCIS y las subunidades G β 2, G β 4 se clonaron en el plásmido pcDNA1.

La subunidad Gy3 fue clonada en pCI. La molécula que codifica GFP esta clonada en pEGFP-N1. Por otro lado las subunidades Gβ4, Gy4 cedidas por el Dr. Ikeda están clonadas ambas en el plásmido pCI. El stock de plásmidos con el que recientemente hemos estado realizando experimentos contiene la información que codifica a la vez a la subunidad Gβ1 y a la proteína fluorescente verde mejorada GFP y se encuentran clonadas en el plásmido pEYFPGβ

8.3. El GFP y el método de Fluorescencia

La fluorescencia es el fenómeno en el cual, una sustancia absorbe luz (generalmente de corta longitud de onda) y casi instantáneamente irradia luz en otra longitud de onda más larga. Muchas sustancias se hacen fluorescentes bajo la excitación de la luz ultravioleta (UV). Su fluorescencia no guarda relación alguna, ni en intensidad ni en color con su apariencia visual. Esto nos indica que por el método de fluorescencia obtendremos una imagen completamente diferente, revelando a menudo caracteres de otra forma inobservables.

En la medusa bioluminiscente Aequorea victoria, la luz se produce cuando la energía es transferida de la fotoproteína aequarina activada por Ca^{2+} , a la proteína fluorescente verde (GFP).

El cromóforo GFP consiste en un tripéptido cíclico derivado de los aa S, Y, G en la secuencia primaria de la proteína y únicamente es fluorescente cuando se encuentra incluida dentro de la molécula de proteína GFP entera. Del polipéptido completo de 238 aa son necesarios para la fluorescencia los aa números 7-229. La estructura cristalina de la molécula del GFP muestra un apretado

empaquetamiento de una hoja β -plegada incluida dentro de una estructura formada por α -hélices (Yang, et al 1998).

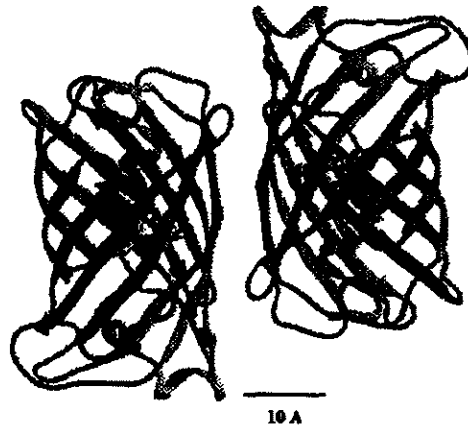


Fig. 5. Modelo molecular de la proteína fluorescente verde GFP, obtenido a partir de cristalografía de rayos X. El cromóforo se encuentra protegido dentro de un cilindro formado por 11 segmentos cortos de α -hélice. (Tomado de Reichman 1998).

La clonación del gen silvestre de GFP y su expresión subsiguiente en sistemas heterólogos ha establecido a la GFP como un valioso sistema de reportero genético. Cuando es expresado en cualquier célula procarionte o eucarionte e iluminado con luz azul o UV, el GFP nos devuelve una brillante fluorescencia verde, ésta es independiente de la especie y no requiere de ningún cofactor, sustrato, o de la formación de productos genéticos adicionales de A. victoria.

La molécula de GFP es bien expresada cuando se fusiona con muchas proteínas diferentes. En muchos casos, las quimeras génicas codifican en las terminales NH_2 o COOH del GFP manteniendo la actividad biológica normal de su compañero heterólogo, así como también, manteniendo las propiedades fluorescentes similares a las del GFP nativo. El uso de esta capacidad nos permite disponer de una "etiqueta fluorescente" para

proteínas, lo que nos posibilita la localización de proteínas fusionadas in vivo. Esta fusión con el GFP puede proporcionar mejor sensibilidad y resolución en comparación con las técnicas usuales de anticuerpos.

La variante mejorada amarillo fluorescente EYFP, contiene la doble substitución de aminoácidos F-64 por L y S-65 por T que cambian la emisión de verde (509 nm), a verde-amarillo (527 nm). Aunque la máxima excitación fluorescente del EYFP está en los 513 nm, puede ser excitada eficientemente a 488 nm (Clontech lab 1999).

Un vector apropiado puede ser inoculado en células de mamífero por una variedad de técnicas, incluyendo dentro de estas: el uso de calcio fosfato (Chen y Okayama, 1988); DEAE-dextrán (Rosenthal, 1987); varios agentes de transfección por liposomas (Sambrook, et al., 1987); la electroporación (Ausubel, et al., 1994); y en nuestro caso mediante la fina técnica de microinyección intranuclear (García, 1996; Ikeda, 1996).

La eficiencia del procedimiento de inoculación en células de mamífero depende en primer término de la línea celular hospedera y del procedimiento utilizado. La expresión del GFP se detecta por microscopía de fluorescencia.

El sistema de formación de una imagen fluorescente es análogo al de la luz visible. Se debe disponer de una fuente de iluminación UV eficiente.

En los haces de iluminación y de la imagen se emplean filtros excitadores y filtros de barrera. Es sumamente importante que ambos filtros, combinados, se anulen entre sí pues de no ser éste el

caso la imagen fluorescente queda degradada debido a la iluminación directa.

Es de utilidad el empleo de un cono de iluminación grande para aumentar el de la imagen que normalmente es poco intensa.

Manantiales de radiación UV. El espectro ultravioleta se extiende desde aproximadamente 1 nm hasta 380 nm. Es posible distinguir tres subdivisiones en esta región (Tabla7).

| |
|--|
| UV A (320 – 400 nm) Zona de transmisión del vidrio |
| UV B (280 – 320 nm) Región eritémica (quemaduras de sol) |
| UV C (185 – 280 nm) Región bactericida o germicida. |

Tabla 7. Subdivisiones de la región UV

Todas las fuentes de iluminación UV de uso corriente utilizan lámparas de vapor de mercurio (alta tensión para radiación de 365 nm y de baja tensión para radiaciones de 254 nm). Las lámparas de UV disponibles en la actualidad, suelen cumplir los requisitos para focos y reflectores. Se emplean mas a menudo los primeros con fines fotográficos, ya que lo que se pretende corrientemente es irradiar el sujeto uniformemente con luz ultravioleta. En trabajos sobre fluorescencia, cualquier desigualdad en el haz UV debe ser evitada, pues de no ser así habría variaciones en la fluorescencia que podrían prestarse a interpretaciones falsas.

Si es necesario un haz estrecho e intenso de UV, el mejor método es probablemente el empleo de un equipo de iluminación compacto de mercurio (con un condensador de cuarzo). Los tubos fluorescentes UV alcanzan su plena intensidad casi

inmediatamente, pero las lámparas de descarga de mercurio, requieren de 5 a 10 minutos para llegar a su rendimiento completo.

Filtros transmisores de UV. La mayoría de los manantiales luminosos de UV emiten algo de luz visible, por lo que es conveniente usar un filtro de transmisión UV (p.ej. Chroma HQ470/40x). Para la excitación UV de ejemplares fluorescentes, el filtro debe situarse en el mismo alojamiento de la fuente de iluminación.

Filtros absorbentes del UV (barrera). Para observar imágenes fluorescentes, el filtro barrera debe absorber por completo la radiación existente (p.ej. Chroma HQ500LP).

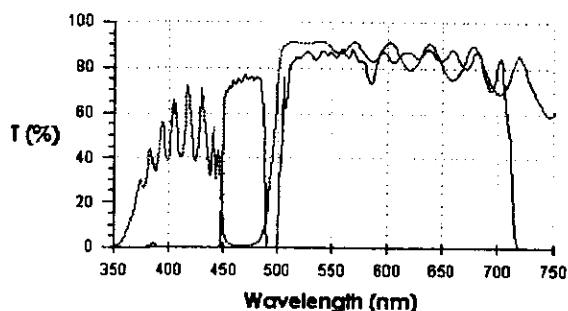


Fig. 6. Gráfica longitud de onda (nm) / transmitancia (%) del espectro electromagnético para el intervalo 350-750nm. Note particularmente la zona de anulación de los filtros excitadores, filtros barrera del UV en los 480 nm-500 nm, que corresponde al color azul-verde. (Tomado de Reichman 1998).

Registro de la fluorescencia. La mayoría de los trabajos sobre fluorescencia se limita a materiales excitados por la banda de emisión de 480 nm del mercurio; ésta produce normalmente una emisión azul o verde. Las condiciones para estos trabajos pueden resumirse así:

Es esencial un área de trabajo oscurecida, para evitar reflejos visibles incontrolados procedentes del sujeto.

Normalmente se emplean lámparas de descarga de mercurio. La lámpara debe ser filtrada, para que produzca solo la banda de excitación requerida. Puede ser necesaria una exposición suplementaria con luz visible, para mostrar la localización de las áreas fluorescentes.

Cuando se emplea fluorescencia, siempre es necesario utilizar un filtro de absorción UV. Es esencial el que las bandas de transmisión del excitador y los filtros de barrera no se superpongan entre sí.

Equipo de la cámara. La fijación de una cámara al microscopio para la realización de foto micrografías puede ser ópticamente muy sencilla; sólo es necesario un adaptador cerrado por completo al paso de la luz. No es necesario objetivo en la cámara, aunque es útil que se disponga de un obturador. Los sistemas de medición de la exposición pueden ser a través del objetivo (TTL) en las cámaras miniatura (SRL, 35 mm), con resultados razonablemente satisfactorios, tratándose de foto-microscopia (Arnold, 1974). No existen problemas especiales de enfoque, éste se realiza directamente a través del objetivo del microscopio; la banda fluorescente de emisión está incluida en la corrección cromática de la mayoría de los objetivos.

Debido a la débil fluorescencia de algunos materiales orgánicos, puede ser necesario el empleo de película de gran rapidez. A menudo es valioso el registro de color para identificar fluorescencias características.

8.3.1. Inyección Intranuclear

La célula viva es una compleja maquinaria biológica, su función es fabricar proteínas. Sintetiza enzimas y otras proteínas que mantienen su propia integridad y sus procesos fisiológicos. Distintas clases de células producen proteínas diferentes, siguiendo instrucciones codificadas en la molécula de ADN de sus genes. Los recientes avances en biología molecular hacen posible alterar estas instrucciones y de esta manera diseccionar y modificar células que pueden sintetizar o sobreexpresar diversas moléculas de proteína.

En nuestro protocolo experimental, es necesario "persuadir" a una célula para que produzca una proteína exógena. Lo que requiere introducir en ella una molécula de ADN que contenga la secuencia de bases que codifiquen los aminoácidos de la proteína, así como las instrucciones para la transcripción y la traducción.

La técnica de microinyección intranuclear es el mejor procedimiento para aplicar "agentes" directamente en el núcleo de células vivas sin ninguna restricción. Pero existen dos problemas principales que hacen dificultoso el procedimiento en comparación con la aplicación de otras técnicas.

El primer problema es la medición del volumen inyectado, resuelto en nuestro caso por el propio diseño del equipo neumático de alta precisión Eppendorf Transjector 5246, directamente podemos regular y al mismo tiempo, leer en la pantalla de este aparato los parámetros de la microinyección. Para nuestro protocolo experimental utilizamos: una presión de inyección de 10 Kpa aplicado por un lapso de 0.3 segundos, valores que no producen cambios significativos en el volumen celular.

El segundo problema es la baja supervivencia de las células inyectadas. Esto es resultado de lesiones celulares durante la microinyección, que pueden ser fatales. Describimos a continuación el protocolo utilizado, que nos dio como resultado una microinyección adecuada y un buen porcentaje de supervivencia.

Protocolo. Después de un lapso de 4 horas, tiempo que las neuronas necesitan para adherirse con la ayuda del sustrato de poli-l-lisina al fondo de la caja, las neuronas son inyectadas intranuclearmente. El procedimiento utilizado es el descrito por García, et al; Ikeda, et al., 1996. Preparación de la solución que se inyecta. Se deposita en un tubo eppendorf 2 μ l de solución GFP [1 μ g/ μ l], concentración en peso. Se agrega 2 μ l de solución de plásmido G $\beta_{(1-5)}$ [1 μ g/ μ l]. Adicionamos 0.1 % = 2 μ l de solución de molécula dextran fluoresceína, que es el indicador fluorescente utilizado para monitorear a las células inyectadas. Aforamos a 20 μ l con agua desionizada estéril. La solución resultante se centrifugó a una velocidad de 10'000 RPM por un lapso de 20 minutos. Del volumen total de esta solución se recuperó únicamente sobrenadante hasta un volumen de 10 μ l y el residuo lo desechamos pues es solución con madejas muy densas de DNA no adecuada para la microinyección. Fabricación de la pipeta de microinyección. La punta de microinyección la forjamos en términos generales siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para estirar los microelectrodos que son usados en la técnica de fijación de voltaje pero con un retardo en el enfriamiento, con lo que obtenemos una microaguja de cuello corto con la boca del conducto de diámetro más largo y estrecho. De esta manera obtuvimos puntas rígidas y estrechas que permiten aplicar la presión de microinyección de forma precisa.

Carga de la microaguja. Fueron utilizados únicamente capilares "frescos" (recién estirados), con la micropipeta eppendorf rango 0.5-10 μ l y puntas eppendorf cat. 930-00-100-7 se carga 1 μ l de solución de inyección en la microaguja teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire. Ajuste de la pipeta. Una vez cargada la pipeta se fija firmemente al cabezal y la punta se dirige hacia la célula. Para obtener una mayor proporción de supervivencia es recomendable que la "punta" se dirija perpendicularmente a la superficie celular ($\sim 45^\circ$ de la vertical), esto evitó daño celular. Ubicación del plano "z". Se localizó ópticamente una célula, se sumergió la microaguja en el medio y la situamos visualmente. Se desciende hasta llegar a un nivel sobre el borde superior de la célula seleccionada, continuamos descendiendo muy lentamente y se presiona suavemente sobre la célula, hasta $\sim 50\%$ del volumen celular. A este nivel le llamamos z-limit y es la zona del plano "z" a la que fue aplicada la microinyección. Fijamos el valor en la memoria del equipo inyector Transjector 5246. Prueba de permeabilidad. Retiramos la micro aguja unas cuantas micras sobre la célula a un nivel donde aun sea posible apreciarla sin necesidad de enfocar la imagen y probamos permeabilidad. Se observo fluorescencia característica del colorante dextran fluoresceína en el campo óptico, a causa del disparo de prueba. Microinyección. Apuntamos a un plano medio de la célula y se pulso el botón de disparo. El procedimiento de microinyección y el retirado de la microaguja es automático y muy rápido (tiempo programado: 0.3 seg.) Para cubrir el área de cultivo utilizamos una técnica de barrido en forma de zig-zag, moviendo la platina y no el micromanipulador. Entre catorce a dieciséis horas posteriores a la microinyección intranuclear se identifico a las células que expresaron positivamente la información genética contenida en el plásmido. Esto se logro

gracias a la observación de fluorescencia característica de la molécula de GFP presente en ellas.

8.4. El Registro Electrofisiológico

Los efectos producidos sobre las corrientes de Ca^{2+} fueron determinados realizando los registros electrofisiológicos mediante el método de fijación del voltaje (Voltage-Clamp, Hamill, 1981) en configuración de célula completa. Este método en esencia consiste en lo siguiente: una delgada pipeta de vidrio con cualidades particulares es estrechamente sellada contra la membrana celular, permitiendo aislar una pequeña porción de membrana, donde se encuentran contenidos canales iónicos. Estos canales son manipulados química y eléctricamente, y de esta forma son deducidas sus características. En la configuración de célula completa es posible retirar una diminuta sección de membrana y abrir delicadamente una ventana al interior de la célula viva sin alterar los constituyentes citoplásmicos. Dentro de las diversas aplicaciones de la técnica de fijación de voltaje se encuentran el estudio de cómo las corrientes iónicas afectan el voltaje de membrana, además nos permite analizar procesos celulares como son la liberación de neurotransmisores, secreción de hormonas o investigar el mecanismo de contracción, entre otros. El método de fijación de voltaje igualmente nos permite caracterizar electrofisiológicamente a cada una de las subunidades β de la proteína G.

El planteamiento y la realización de los experimentos electrofisiológicos fueron destinados a probar cada uno de los subtipos $G\beta$ y, por lo tanto, a determinar cual o cuales de estos son capaces de reproducir los siguientes efectos:

Aumento de la tasa de facilitación

Las corrientes entrantes de Ca^{2+} (I_{Ca}) son producidas cada 10 segundos con un par de pulsos de prueba de 20 mseg a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, una vez antes (pulso de prueba 1) y una vez después (pulso de prueba 2) de un prepulso de 25 mseg a +125 mV. El fuerte prepulso despolarizante libera transitoriamente la mayoría de la inhibición inducida por NE y la facilitación resultante puede definirse como la corriente producida durante el pulso de prueba 2 dividida entre la corriente producida durante el pulso de prueba 1. Para acentuar los cambios en la activación dependiente del voltaje de las I_{Ca} , estas fueron medidas como el promedio de las corrientes producidas en el intervalo 5-6 mseg después del comienzo de la despolarización, espacio de tiempo anterior a cuando se alcanza el valor máximo de la corriente de Ca^{2+} .

Porcentaje de inhibición por NE

La perfusión intracelular directa de subunidades $\text{G}\beta\gamma$ purificadas, en células de las raíces dorsales de pollo (Ikeda SR, 1996), y en células del ganglio simpático cervical superior de rata (Herlitze et al., 1996), simulan el efecto de los neurotransmisores naturales al disminuir y enlentecer la cinética de la activación de las corrientes de Ca^{2+} . Para subrayar los efectos del enlentecimiento cinético de la activación de la I_{Ca} la amplitud de la corriente fue tomada como el valor promedio de los puntos registrados entre 5 a 6 mseg después del inicio del pulso de prueba 1. Debido a que la magnitud de I_{Ca} depende del tamaño celular los datos son presentados como densidad de corriente normalizada por la capacitancia celular (pA/pF).

Inhibición basal de la corriente de Ca^{2+} tipo N

Inhibición es la disminución de la corriente de Ca^{2+} que fluye al interior celular después del tratamiento con NE. La tasa de facilitación, un parámetro calculado dividiendo la amplitud de la corriente producida durante el pulso de prueba 1 entre la amplitud de la corriente producida durante el pulso de prueba 2, aumenta dramáticamente durante la aplicación de NE y de esta forma nos proporciona una medición conveniente y confiable de la inhibición dependiente del voltaje.

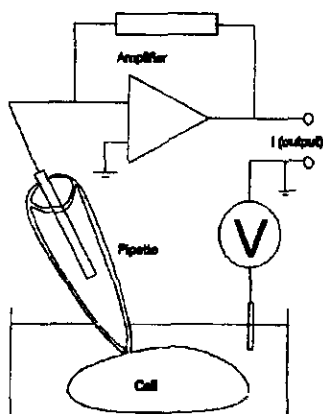


Fig. 7. La técnica de fijación de voltaje nos permite registrar la corriente que fluye a través de los canales iónicos de la célula.

Las corrientes de Ca^{2+} fueron registradas utilizando la técnica de fijación de voltaje mediante un amplificador EPC7 (List Electronics), a temperatura ambiente. Las pipetas se estiraron a partir de capilares de vidrio para microhematocrito (Kimax-51, 34502) y pulidas en una microforja Narishige, presentaron resistencias entre 1 y 2 Megaohms ($\text{M}\Omega$). Durante el registro la célula fue perfundida localmente con goteo continuo (1 a 2 ml/min) de solución externa. El flujo de las soluciones se seleccionó mediante un sistema de válvulas solenoides, el cambio entre una solución y otra fue casi instantáneo. Los protocolos de voltaje se

generaron y los datos fueron digitalizados, registrados y analizados utilizando el sistema de adquisición Basic Fastlab (Indec Systems, Capitola CA).

Las mediciones de la corriente de Ca^{2+} utilizaron la siguiente serie de soluciones: solución de pipeta o solución interna (concentraciones milimolares), Ac. Metanosulfónico 125, TEA Cl 20, HEPES 10, BAPTA Tetracesio 0.1, MgCl_2 4, Na_2ATP 5, Na_2GTP 0.3, Leupeptina 0.1, ajustamos a pH 7.2 con CsOH.

Solución externa o solución de registro TEA Cl 162.5, HEPES 10, Glucosa 8, CaCl_2 2, MgCl_2 1, TTX 0.0002, Nifedipina 0.002, ajustamos el pH a 7.3 con TEA-OH.

El análisis de los registros eléctricos obtenidos se realizó por métodos electrofisiológicos y estadísticos substrayendo los componentes lineales de membrana y normalizando por la capacidad de la misma. La amplitud de las corrientes de Ca^{2+} fue medida como corrientes a los 5-6 ms y calculada en términos de densidad de corriente (en pA/pF). Los resultados finales los expresamos como promedios, \pm el error estándar del mismo (SEM) Las comparaciones estadísticas se realizaron como variables independientes, utilizando la prueba t de Student. Se consideraron diferencias estadísticas significativas cuando $p < 0.05$.

Actualmente es bien aceptado que el modelo de facilitación de I_{Ca} por la aplicación de prepulsos despolarizantes establece una manera precisa, inequívoca y generalmente utilizada en el estudio de la regulación por proteínas G de las I_{Ca} (Bean, 1989; Elmslie, 1990).

9. RESULTADOS

9.1 Identificación por fluorescencia

Para monitorear nuestras células experimentales, fueron utilizados los plásmidos reporteros: S65T que codifica para la molécula de GFP y el plásmido pEYFP que codifica para la proteína "GFP mejorada" los cuales expresaron de manera adecuada a la proteína fluorescente verde, las células con expresión positiva se identificaron claramente a través de la observación directa después de un periodo de incubación de 12 a 16 horas. Para la identificación de estas células se usó el sistema de microscopía de epifluorescencia y los filtros de fluoresceínas y GFP. Este sistema se encuentra instalado en el microscopio utilizado durante las sesiones de registro electrofisiológico, de tal forma que no existe incertidumbre al identificar a las células que muestran expresión de GFP pues brillan con una acentuada fluorescencia característica.

Por otra parte y como complemento de esta técnica se realizó un archivo de las imágenes observadas, un ejemplo se presenta en la figura 9. En primer término la información se encuentra en forma de radiaciones electromagnéticas reflejadas, como es el caso de las imágenes obtenidas en la fotografía convencional; o imágenes de cuerpos que fluorescen por radiaciones emitidas por el sujeto.

Las imágenes fotográficas se obtuvieron aplicando el siguiente protocolo: entre doce y dieciséis horas posteriores a la técnica de microinyección intranuclear y respetando los tiempos de expresión, se procedió al registro electrofisiológico. Momentos antes de realizar los "sellos" para la fijación de voltaje ejecutamos los disparos del obturador a través de un chasis fotográfico SRL, de 35 mm Canon T60, acoplado al cuerpo del microscopio Axiovert 135



Fig. 8. Neuronas del ganglio simpático cervical superior (SCGs) de rata obtenidas a partir de un cultivo primario, para realizar la imagen se utilizó película sensibilidad ASA 125, tiempo de exposición 2 segundos, amplificación 400 X.

9.2 Resultados electrofisiológicos

Plummer y colaboradores (1989), realizaron diversos experimentos para conocer las propiedades y sensibilidad farmacológica de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} presentes en neuronas del ganglio simpático cervical superior de rata. Estas investigaciones demuestran que en estas células las corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) son acarreadas principalmente por canales tipo N y en una menor proporción por canales tipo L, ambos tipos de canales son activados por alto umbral de voltaje y presentan una conductancia similar (11pS), se inactivan lenta e incompletamente, pero se diferencian por su sensibilidad a antagonistas específicos. Los canales tipo L son sensibles a 1,4-dihidropiridina y se les denomina DHP-sensibles, en tanto que los canales tipo N lo son a la toxina de serpiente ω -conotoxina fracción GVIA. Esta propiedad de los canales permitió conocer la proporción de la I_{Ca} que fluye a través de cada uno de los distintos tipos de canales mencionados. Después de bloquear con ω -conotoxina fracción GVIA, fue aplicada una prolongada despolarización y se apreció una respuesta máxima típica de una población de canales tipo L. A partir de los resultados obtenidos en estos experimentos, se estimó la fracción de I_{Ca} que es acarreada por estos canales y se encontró que no es mayor del 10-15% de la I_{Ca} total en neuronas SCGs. La sensibilidad de la mayor parte de la I_{Ca} en SCGs a la ω -conotoxina fracción GVIA, indica que en estas células los canales de Ca^{2+} tipo N acarrean 85-90% de la corriente de Ca^{2+} y el resto es acarreada por canales tipo L y otros (Plummer MR, et al, 1989). Para la realización de nuestros experimentos y con fines experimentales la fracción de la I_{Ca} que es conducida por canales tipo L se bloquea selectivamente por 2 μM de nifedipina.

Las corrientes de Ca^{2+} dependen estrechamente del voltaje y son mayores cuando se examinan inmediatamente después del inicio de la aplicación de un pulso despolarizante.

Los registros de la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) tipo N se obtuvieron mediante el método de prepulso despolarizante, el cual se sabe interrumpe transitoriamente la acción reguladora de las proteínas G sobre el canal de Ca^{2+} (Elmslie et al., 1990).

La presencia de agonistas adrenérgicos produce inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje provocando que una fracción de los canales se abra mucho mas lentamente y sean necesarias despolarizaciones mayores para abrirse, lo que se registra como una corriente de Ca^{2+} menor a potenciales equivalentes respecto del control. Son necesarias despolarizaciones mayores para obtener corrientes de magnitudes semejantes a aquellas producidas por una despolarización en condiciones de ausencia de neurotransmisores adrenérgicos.

En un trabajo ya clásico (Bean, 1989) se postula un modelo donde los canales de Ca^{2+} pueden presentarse bajo dos estados distintos denominados respectivamente: "willing" (dispuesto) y "reluctant" (renuente), en equilibrio dinámico en condiciones basales. En el estado willing, en ausencia de neurotransmisores, los canales pueden ser abiertos por despolarizaciones moderadas; en tanto que en el modo reluctant los canales solamente pueden ser abiertos por despolarizaciones considerablemente mayores. En el mismo artículo el autor propone que los canales pueden interconvertirse entre los dos estados en un periodo de tiempo muy corto y que los agonistas adrenérgicos desplazan el equilibrio hacia el modo reluctant.

Se ha propuesto que la regulación por proteínas G de la I_{Ca} involucra un enlace directo entre las subunidades de ésta proteína y la molécula del canal de Ca^{2+} . La unión de las subunidades de la proteína G al canal puede implicar un cambio conformacional haciendo necesarias despolarizaciones mayores para permitir la apertura del canal (Bean, 1989).

Si es aplicada una despolarización lo suficientemente fuerte como para abrir los canales en el modo willing, eventualmente los canales que se encontraban inicialmente en el modo reluctant también se abrirán (Bean, 1989).

9.2.1. Registro de neuronas SCG's control

El presente trabajo presenta experimentos de fijación de voltaje en neuronas SCGs de rata sometidas al procedimiento de microinyección intranuclear y que mostraron la sobreexpresión de las distintas subunidades β y de la proteína G, con el fin de estudiar la facilitación de la corriente de Ca^{2+} tipo N.

Fueron realizadas diversas pruebas con el propósito de descartar la inespecificidad de los efectos observados. En la fig 9 se muestra un control obligado en nuestro protocolo experimental. En la figura 9A se muestra el registro de una célula control sin inyectar, La figura 9B muestra el registro de una célula control de inyección a la cual le fue inoculada una solución que contiene el cDNA que codifica para las subunidades $G\beta$ pero no produjo cambios en ninguno de los parámetros estudiados. La falta de efecto corresponde muy probablemente a que el disparo de microinyección no acertó en el núcleo de la célula.

Al comparar ambas series de registros es evidente la semejanza de los resultados obtenidos para las dos poblaciones de células experimentales presentadas aquí y nos permite afirmar que nuestro paradigma experimental por sí mismo no altera la respuesta celular al protocolo de pruebas.

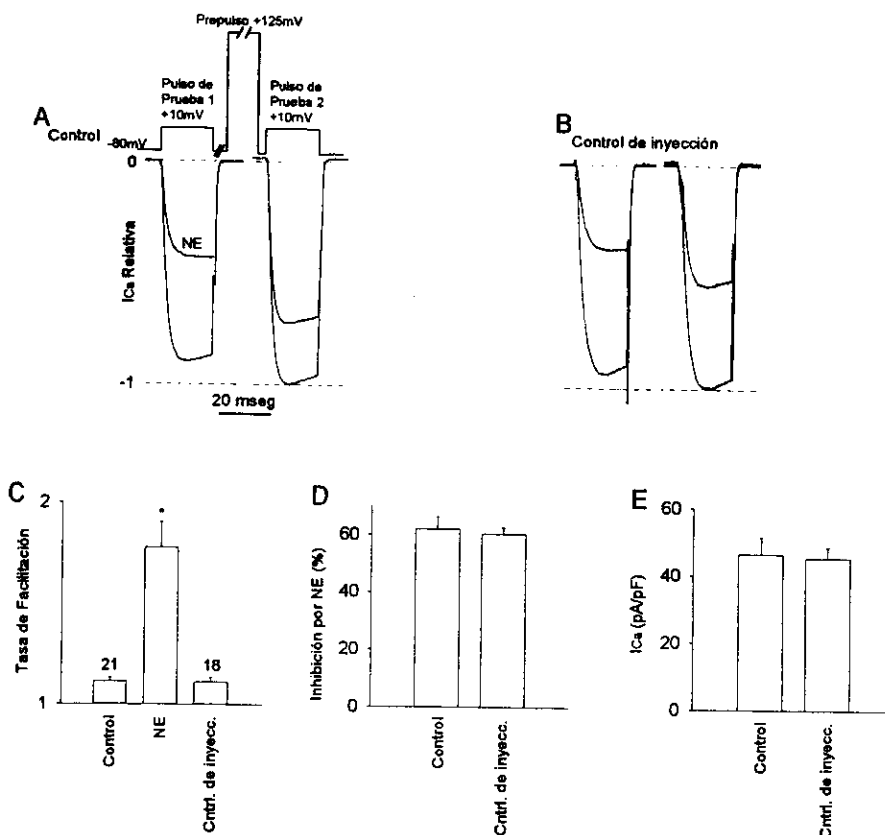


Fig 9. El procedimiento de microinyección no altera la respuesta de la célula al protocolo experimental de doble pulso despolarizante. Los trazos de la fig 1A-B ilustran dos registros de células obtenidas a partir de un cultivo primario de neuronas SCGs. Los registros muestran la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) tipo N realizados mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa. Los trazos se presentan superpuestos, los inferiores corresponden al registro de I_{Ca} en ausencia de agonista y los trazos superiores representan una I_{Ca} en presencia del agonista adrenérgico norepinefrina (NE) a una concentración $10 \mu M$. Para ambos incisos, los trazos del lado izquierdo corresponden a una situación previa y los trazos del lado derecho a una situación posterior a la aplicación de un fuerte prepulso despolarizante, como referencia véase el protocolo de pruebas en la parte superior del inciso A. La comparación entre ambos trazos permite establecer claramente las características fundamentales de la inhibición inducida por agonistas que se unen a receptores α -2adrenérgicos. Se observa que, la aplicación del prepulso provoca pocos cambios en la corriente en ausencia de agonista y revierte parcialmente los cambios producidos por la presencia de NE, como son el enlentecimiento de la cinética de activación y reducción de la magnitud de la corriente. Incisos C-E, resumen de datos. C, tasa de facilitación para las dos poblaciones experimentales de células, en el caso de células control la tasa de facilitación se aproxima a 1.1. D, porcentaje de la I_{Ca} inhibida por NE durante el pulso de prueba 1 en células control, este valor es cercano al 60%. E, densidad de la I_{Ca} durante el pulso de prueba 1 en ausencia de NE. Los números sobre las barras indican el total de células registradas en cada situación experimental.

9.2.2. Registros de neuronas SCG's inyectadas que mostraron expresión

En dos artículos publicados en 1996 (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996), los autores han demostrado que la inoculación de subunidades purificadas $\beta\gamma$ de proteína G en neuronas SCGs; o al aplicarles la microinyección del mRNA para estas mismas subunidades, la sobreconcentración de estas moléculas reproduce los efectos observados por la aplicación de norepinefrina y la regulación dependiente del voltaje originada por la activación del receptor α_2 -adrenérgico. La corriente de Ca^{2+} tipo N muestra un aumento en la inhibición, aumenta el índice de facilitación y se enlentece la cinética de activación.

De los trabajos que han sido llevados a cabo en este campo se deduce que la administración de distintas combinaciones de subunidades $\text{G}\beta\gamma$ purificadas, o la transfección en cultivos primarios de SCGs con el mRNA para estas subunidades, origina un estado de inhibición tónica de las I_{Ca} que se revierte al aplicar pocos milisegundos antes del pulso de prueba un fuerte prepulso despolarizante, lo que constituye un principio fundamental en el estudio de la inhibición dependiente de voltaje de estos canales.

De igual forma, en un trabajo previo del laboratorio (García et al., 1998) se reportó que la microinyección intranuclear del cDNA que codifica para los diferentes subtipos de las subunidades $\text{G}\beta\gamma$ o $\text{G}\beta$ solas, reproducen los efectos del aumento en la inhibición, aumenta el índice de facilitación y muestra un enlentecimiento de la cinética de activación sobre la corriente de Ca^{2+} tipo N. Se han tomado como base los resultados obtenidos por estos autores, y adoptado similares paradigmas experimentales, los cuales nos han permitido obtener células con sobreexpresión de subunidades $\text{G}\beta\gamma$.

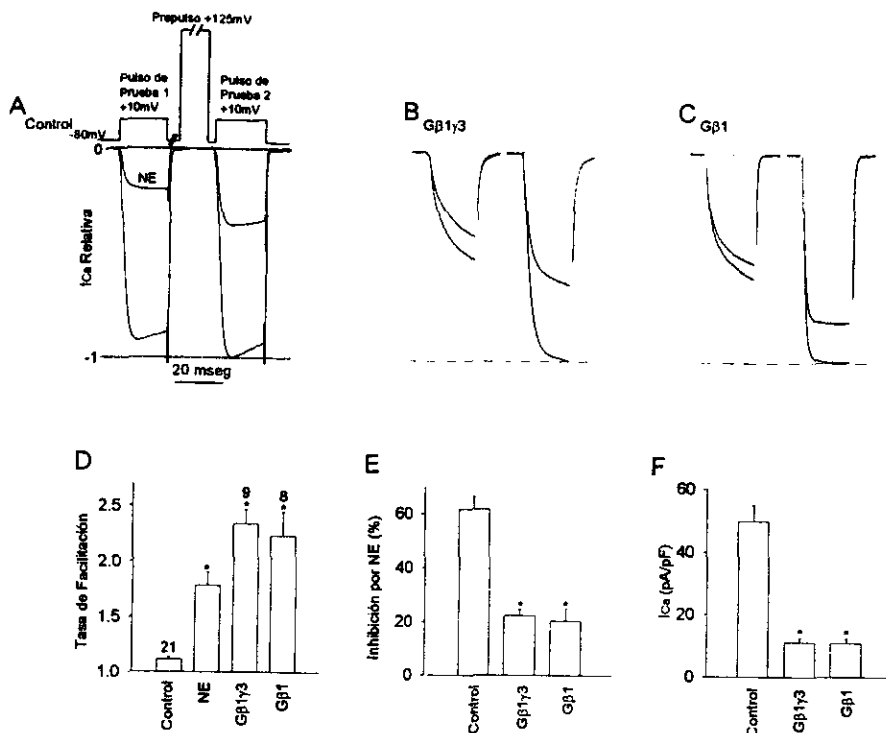


Fig 10. La inyección intranuclear del cDNA que codifica para Gβ1 combinada con Gγ3 o sola, aumenta la facilitación de I_{Ca}. Trazos superpuestos de I_{Ca} producida por un protocolo de doble pulso, en ausencia o presencia de 10 μM NE. A, Protocolo de pruebas y registro electrofisiológico de una neurona control. B-C, Una concentración del cDNA 100 ng/μl en la solución de microinyección generó la sobreexpresión de las subunidades Gβ1γ3 y Gβ1 sola respectivamente. D-F, Resumen gráfico para la tasa de facilitación. Los números sobre las columnas corresponden al total de células registradas bajo las condiciones experimentales indicadas. E, Porcentaje de I_{Ca} inhibida por NE durante el pulso de prueba 1. F, Densidad de I_{Ca} durante el pulso de prueba 1 en ausencia de NE. Los datos son el promedio ± SEM *p < 0.05 vs el control.

Las subunidades βγ de la proteína G se encuentran estrechamente asociadas en condiciones naturales y sus efectos reguladores se atribuyen al dímero intacto. Sorprendentemente se ha probado que la inoculación del plásmido que codifica para la subunidad Gβ1 sola es efectiva al regular los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo N, se proponen dos posibles explicaciones para este fenómeno: en la primera se plantea que al sobreexpresar subunidades Gβ solas, éstas van a asociarse con subunidades Gγ endógenas para formar el dímero Gβγ; otra

posibilidad es que la subunidad $G\beta$ por si sola sea capaz de regular el canal. Estos resultados se presentan en la Fig 10, el inciso B ilustra el registro de una célula con sobreexpresión de las subunidades $G\beta 1\gamma 3$ y produjo los siguientes efectos en la I_{Ca} , la tasa de facilitación se amplificó 1.2 veces (de 1.1 en células control a 2.3403 ± 0.1253), la inhibición por NE se ve reducida (de 60 a solamente 22.2538 ± 2.5089), la densidad de la I_{Ca} también se redujo (11.1244 ± 1.5648). De la misma forma el inciso C, muestra los trazos de una célula sobreexpresada con la subunidad $G\beta 1$ sola. Los resultados de la sobreexpresión de esta subunidad, son muy parecidos a los obtenidos en la célula del inciso anterior y nos sugieren fuertemente que la sobreexpresión de la subunidad $G\beta 1$ sola es suficiente para regular la corriente de Ca^{2+} tipo N. Al analizar estos resultados se aprecia que, tomando como referencia las células control sin inyectar, en las células tratadas aumenta la inhibición tónica de la corriente de Ca^{2+} (Fig 10F). Los resultados aquí presentados proporcionan evidencia de que la sobreexpresión de las subunidades $G\beta\gamma$ o $G\beta$ solas, pueden imitar la regulación de los canales de Ca^{2+} por su agonista natural.

9.2.3. Validación de la expresión

Una prueba muy importante realizada durante el desarrollo de este trabajo, fue la de validación de la expresión. Las células sometidas al procedimiento de microinyección, en la primera serie de experimentos fueron inoculadas con una solución que contenía tres tipos de plásmidos. Estos son: pCDM8, pCIS o pcDNA1, cada uno de ellos contienen clonada la secuencia que codifica para alguna de las distintas subunidades $G\beta$; pCI con el clon para la subunidad $G\gamma 3$; y finalmente pEGFP-N1 que contiene la secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP).

La primera serie de experimentos se realizó utilizando el protocolo ya descrito y a esta serie grande de experimentos corresponde la primera parte de los registros de la Fig 11. El inciso B nos muestra los trazos superpuestos obtenidos de una célula con sobreexpresión de las subunidades $G\beta 1\gamma 3$.

El inciso C de esta misma figura presenta el registro de una célula en la que se ha ensayado una solución que contiene como vector de microinyección a la molécula dextran fluoresceína y un nuevo plásmido pEYFP $G\beta 1$, que aprovecha las características de este gen reportero. En este plásmido han sido clonadas dentro de un mismo promotor, una a continuación de la otra, las secuencias que codifican para GFP y la subunidad $G\beta 1$. Para su expresión no se requiere de ningún cofactor, sustrato, o de la formación de productos genéticos adicionales y mantiene la actividad biológica normal de la subunidad $G\beta$, al ser iluminado por luz UV muestra la característica que lo distingue como gen reportero, devuelve una fluorescencia verde brillante.

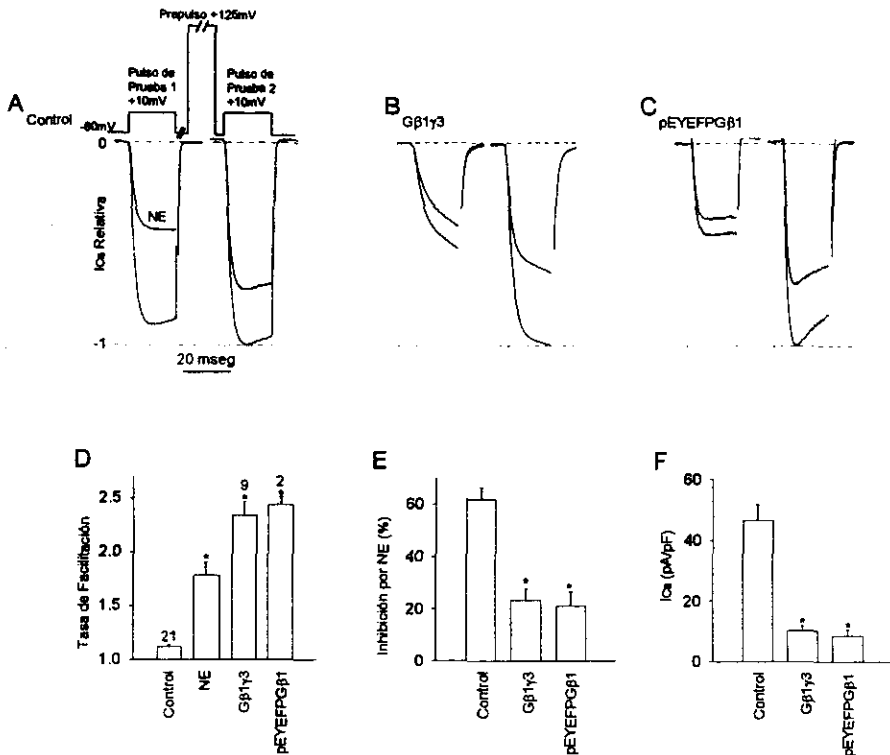


Fig 11. Validación de la expresión. A, Protocolo de voltaje y registro de una célula control no inyectada. B, Registro de una célula que mostró sobreexpresión de las subunidades Gβ1γ3. C, Registro de célula microinyectada con el plásmido pEYEFPGβ1. Observe la vigorosa inhibición de I_{Ca}. F, Resumen de tasa de facilitación, porcentaje de inhibición por NE y densidad de I_{Ca}. Los datos son el promedio ± SEM *p < 0.05 vs el control. Los números sobre las columnas indican el total de células examinadas.

En los resúmenes gráficos se observa la similitud en proporción con respecto a los resultados obtenidos en las células sobreexpresadas utilizando el procedimiento "clásico" y los adquiridos mediante la inoculación del nuevo pEYEFPGβ1. Actualmente disponemos de esta poderosa herramienta, que además nos proporciona una demostración visual por fluorescencia de la sobreexpresión de las subunidades Gβ en nuestro protocolo experimental.

9.2.4. Regulación de la Corriente de Ca^{2+} por distintos subtipos $G\beta$

Dentro del presente apartado son presentados los efectos de la sobreexpresión de diferentes subunidades $G\beta\gamma$ sobre las corrientes de Ca^{2+} tipo N.

Como ha sido reportado previamente (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996), la sobreexpresión de distintos subtipos $G\beta\gamma$ producen: reducción en la magnitud de la I_{Ca} máxima, retardo cinético y facilitación al prepulso indicando una marcada inhibición tónica dependiente del voltaje (Miller, 1990). Utilizando el paradigma experimental básico fueron probadas sistemáticamente las aptitudes de los subtipos $G\beta_2$ - $G\beta_4$, combinadas con $G\gamma_3$ o solas para producir inhibición tónica dependiente del voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo N. Las figuras 12 y 13 recopilan los datos obtenidos de facilitación basal y la inhibición de la corriente de Ca^{2+} mediada por NE en neuronas SCGs inyectadas con el cDNA que codifica para las subunidades $G\beta_2$, $G\beta_3$, $G\beta_4$ asociadas con $G\gamma_3$ o solas. La sobreexpresión de todas estas subunidades regulan las corrientes de Ca^{2+} tipo N y sus efectos son más evidentes cuando se comparan respecto a los producidos por la aplicación de NE en neuronas no inyectadas, obtenidas del mismo cultivo primario. Consistente con esta idea vemos en la figura 12 inciso B, el registro de una célula que mostró sobreexpresión de las subunidades $G\beta_2\gamma_3$ y en el inciso C el registro de una célula que mostró la sobreexpresión de la subunidad $G\beta_2$ sola. Se aprecia que la aplicación de NE falla en producir efectos significativos, lo que revela una regulación cercana al máximo ocasionada por la sobreexpresión de las subunidades $G\beta_2\gamma_3$ o la sobreexpresión de la subunidad $G\beta_2$ sola.

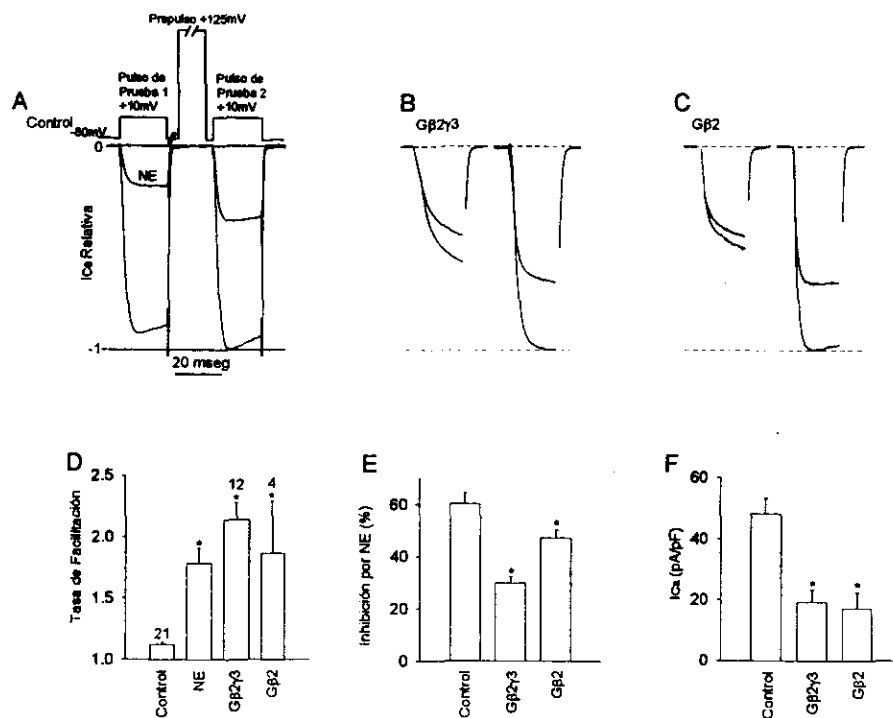


Fig 12. Efecto de la sobreexpresión de las subunidades Gβ2γ3 y la subunidad Gβ2 sola. A-C, Trazos superpuestos de I_{Ca} producidos por el protocolo de voltaje mostrado en A, en ausencia o presencia de 10 μM NE. B-C, Registro de células que mostraron sobreexpresión de las subunidades Gβ2γ3 y Gβ2 sola respectivamente. D-F, Resumen de datos para la tasa de facilitación, porcentaje de inhibición por NE y densidad de I_{Ca} *p < 0.05. los números sobre las columnas indican el total de células analizadas.

La sobreexpresión de las subunidades Gβ2γ3 o la subunidad Gβ2 sola, muestran un incremento significativo en la tasa de facilitación (2.204 ± 0.1297), disminuye la inhibición por NE (19.2100 ± 6.8804), la densidad de I_{Ca} disminuye (19.2030 ± 4.0252) y se aprecia un enlentecimiento cinético en ausencia de agonista.

Se realizaron una serie de ensayos para probar la eficacia de varios subtipos G β en la inhibición de los canales de Ca²⁺ tipo N. Los efectos de sobreexpresar G β 3 γ 3 o G β 4 sola o coexpresada con G γ 3 o G γ 4 se presentan en la figura 13. De acuerdo con las pruebas de otros subtipos G $\beta\gamma$ la sobreexpresión de estas subunidades produce una alteración significativa en la facilitación de la I_{Ca}. La sobreexpresión de estas subunidades incrementa la tasa de facilitación, produce el característico enlentecimiento cinético de las I_{Ca} y la disminución de la inhibición por NE de las I_{Ca}.

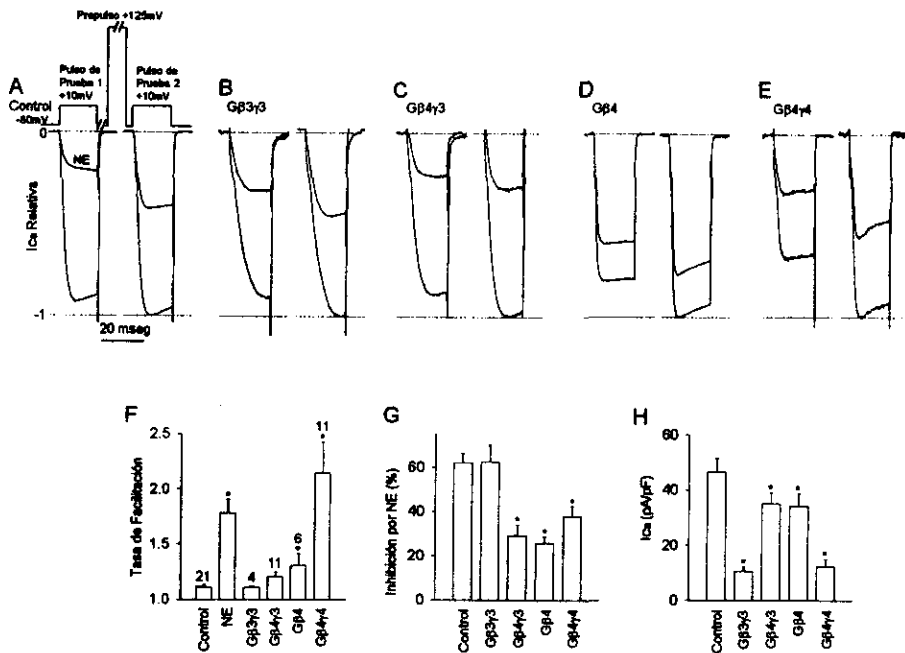


Fig 13. Efecto de la sobreexpresión de las subunidades G β 3 γ 3, G β 4 γ 3, G β 4 sola y G β 4 γ 4. A, Parte superior protocolo de pruebas, registro de corriente en célula control no inyectada. B-E, Registro de neuronas inyectadas con el cDNA para los subtipos indicados. F-H, Resumen de datos para la tasa de facilitación, porcentaje de inhibición por NE y densidad de I_{Ca} *p < 0.05. Los números sobre las barras corresponden al total de células examinadas.

La sobreexpresión de las subunidades $G\beta_{3\gamma 3}$, $G\beta_{4\gamma 3}$, $G\beta_{4\gamma 4}$ sola y $G\beta_{4\gamma 4}$, ocasionan regulación de las I_{Ca} produciendo alteraciones significativas en la facilitación basal y en la inhibición por NE, además de originar el característico entretencimiento cinético de la I_{Ca} .

9.2.5. Efecto de sobreexpresar G β 5

La subunidad G β 5 solamente es un 53% semejante al resto de las subunidades β de la proteína G, posee además 13 residuos aminoácidos adicionales, en contraste con las subunidades G β 1 a G β 4, que son semejantes entre ellas un 90%, pero es capaz de asociarse funcionalmente con diversas subunidades G γ . En tejidos de rata el análisis Northern blot revela que la subunidad G β 5 se expresa predominantemente en el cerebro (Watson et al., 1994). Dentro del cerebro se ha detectado alta expresión de esta subunidad en cerebelo, corteza cerebral, polo occipital, lóbulo frontal y baja expresión en el cuerpo calloso y el cordón espinal (Jones et al., 1998). De la misma manera que para las otras subunidades β de la proteína G, la literatura no contiene suficiente información sobre la especificidad de esta subunidad. En particular se han investigado algunos pocos sistemas. En un trabajo sobre un sistema dihíbrido de adenilato-ciclase II en el cual todas las subunidades interactúan en alguna proporción, el autor se plantea interesantemente que la subunidad G β 1 estimula, mientras que la subunidad G β 5 inhibe al adenilato-ciclase II (Bayewich et al., 1998), otro sistema en el que se han examinado distintos subtipos G β específicamente incluyen la adenilato-ciclase I, la activación de MAP-quinasa (Zang et al., 1996), la activación de fosfolipasa β 2. De esta forma en el caso de los efectores clásicos de proteínas G como son el adenilato-ciclase, fosfolipasa y canales iónicos; la especificidad de interacción de las subunidades G β se realiza siempre comparando β 5 versus β 1.

Al igual que para las demás células presentadas en este trabajo empleamos el mismo protocolo de pruebas para obtener los registros de la corriente de Ca²⁺ en neuronas que mostraron

sobreexpresión de las subunidades G β 5 γ 3 y G β 5 sola. Se ha utilizado la misma concentración en la solución de inyección (100 ng/ml), la sobreexpresión de estas subunidades dieron lugar a los efectos que se muestran en la figura 14 para los parámetros de aumento de la tasa de facilitación, porcentaje de inhibición por NE, inhibición de la I_{Ca}.

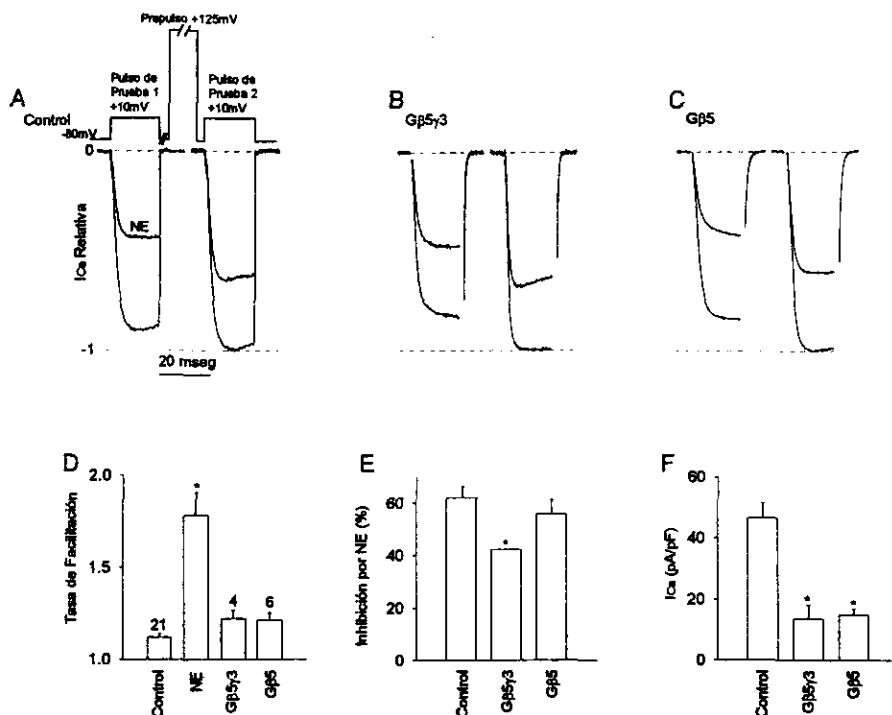


Fig 14. Efecto de sobreexpresar G β 5. A, Parte superior protocolo de voltaje, registro de una célula control sin inyectar. B-C, Registro de células que mostraron sobreexpresión de los subtipos G β 5 γ 3 y G β 5 sola. D-E, Resumen de los datos \pm SEM * p < 0.05 versus control para la tasa de facilitación, porcentaje de inhibición por NE y densidad de I_{Ca}. Los números sobre las columnas indican el total de experimentos.

Como se mencionó antes, la subunidad G β 5 por sus características particulares se sitúa separada de las otras subunidades G β , (Watson et al., 1994). En nuestros experimentos, la inyección del vector que codifica para la subunidad G β 5 produjo

un ligero incremento en la tasa de facilitación (1.2133 ± 0.0454), oclusión parcial de la inhibición inducida por NE y una pequeña pero significativa ($p < 0.05$) inhibición dependiente del voltaje de las corrientes de Ca^{2+} .

DISCUSION

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso y en general del organismo entero (García et al., 1998). De ellos dependen muchas funciones importantes que incluyen entre otras la exocitosis y la contractilidad, sin embargo se considera como la más importante de estas funciones a la liberación de neurotransmisores que se produce en respuesta a una despolarización de una terminal nerviosa (Plummer, 1989).

En 1986 Holz y colaboradores reportaron por primera vez que la regulación de los canales de calcio dependientes del voltaje, por hormonas y neurotransmisores es controlada por proteínas G que se encuentran acopladas a receptores de neurotransmisores. Los resultados presentados por estos investigadores proporcionan la primera demostración directa de la inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje por neurotransmisores mediada por proteínas G (Holz et al., 1986).

Debido a sus ventajosas características, las neuronas SCGs son el modelo de estudio donde se han investigado de manera mas detallada estas vías de señalización. Está demostrado que la regulación de los canales de Ca^{2+} tipo N se lleva a cabo a través de un sistema delimitado a la membrana celular, e involucra proteínas G de la familia $G_{1/o}$, sensibles a la toxina pertusis (Hille, 1994).

El objetivo general del presente trabajo fue sobreexpresar a los diferentes subtipos $G\beta$ en neuronas SCGs, para demostrar electrofisiológicamente las propiedades reguladoras de estas subunidades. Mediante procedimientos electrofisiológicos se determinó la tasa de facilitación, mimetismo del efecto de

norepinefrina y el aumento de la inhibición basal de la corriente de Ca^{2+} tipo N.

Los resultados presentados muestran la capacidad de los diferentes subtipos $G\beta$ solas o asociados con $G\gamma 3$ para regular la I_{Ca} tipo N en neuronas SCGs, confirmando resultados y observaciones previas realizados por otros autores (Herlitz et al., 1996; Ikeda, 1996; García et al., 1998), que apoyan nuestras observaciones acerca del papel regulador de las subunidades $G\beta$ en células excitables.

La sobreexpresión de las diferentes subunidades $G\beta$ producen efectos característicos sobre la I_{Ca}

La técnica de microinyección intranuclear es el mejor método para transfectar directamente en el núcleo de células vivas moléculas exógenas sin ninguna restricción (Hahnel, 1992). Se realizaron diversos ensayos con el fin de probar que nuestros resultados experimentales no son producto de artefactos inespecíficos en el protocolo experimental. Los resultados mostrados en la figura 10 corresponden a un control obligado de nuestros experimentos. Fueron comparados los registros de una célula control sin inyectar versus una célula sometida al procedimiento de microinyección que no mostró expresión, al analizar los parámetros estudiados: aumento de la tasa de facilitación, porcentaje de inhibición por norepinefrina e inhibición basal de la corriente de Ca^{2+} tipo N, es evidente que en ambos los resultados son semejantes y en las células inyectadas a pesar de haber sido sometidas al trauma de la microinyección las propiedades reguladoras de la corriente de Ca^{2+} por el sistema delimitado a la membrana celular no se ven alteradas. Al efectuar el análisis estadístico se observa que la semejanza entre los resultados no se reduce a una célula individual sino que estos son

compartidos en general por las dos poblaciones experimentales, confirmando de esta manera que nuestras observaciones no están referidas a respuestas aisladas.

Las neuronas inyectadas previamente con las subunidades G β 1 γ 3 y G β 1 sola (Figura 10), muestran enlentecimiento cinético y facilitación al prepulso lo que indica un aumento en la inhibición tónica dependiente del voltaje de acuerdo con lo reportado por otros autores (Ikeda, 1996). La aplicación de norepinefrina falla en producir efectos significativos, indicando una regulación de los canales de Ca²⁺ tipo N por la sobreexpresión de las subunidades β 1 de proteína G cercana al máximo.

Fueron ensayados sistemáticamente los subtipos G β 1 a G β 5 solos o en combinación con G γ 3 para probar la hipótesis de la sobreexpresión de estas subunidades produce inhibición tónica de los canales de Ca²⁺ tipo N. En la figura 13 se aprecia que la sobreexpresión de la subunidad G β 2 produce una inhibición evidente de la corriente de Ca²⁺ mediada por norepinefrina y un enlentecimiento cinético en ausencia del agonista. En la figura 14 se muestran los efectos de sobreexpresar las subunidades G β 3 γ 3, causó modificaciones significativas en la tasa de facilitación y en la inhibición basal de la corriente de Ca²⁺. Por otra parte la sobreexpresión de la subunidad G β 5 sola o asociada con la subunidad G γ 3 (Fig 14), produjo un efecto disminuido sobre la regulación de la corriente de Ca²⁺ tipo N. Estos resultados no son del todo inesperados pues se debe considerar que esta subunidad es solamente 53% semejante al resto de las subunidades G β (Yan et al., 1996; Clapham et al., 1997), en condiciones naturales la subunidad G β 5 únicamente se asocia con miembros de la familia de proteínas G_{q/11} (Fletcher et al., 1998), y es expresada primariamente en el cerebro (Watson et al., 1994). Estos resultados

sugieren de acuerdo con resultados de trabajos previos del laboratorio (García et al, 1998), que las diferentes subunidades G β 1-G β 5 solas son capaces de producir regulación dependiente del voltaje de los canales de Ca $^{2+}$ tipo N.

En contraste con nuestros resultados, un estudio reciente (Ruiz-Velasco et al., 2000) reporta que únicamente la sobreexpresión de la subunidad G β 4 sola es capaz de producir un efecto significativo en la regulación de la corriente de Ca $^{2+}$ tipo N y la sobreexpresión de las demás subunidades G β necesitan de la asociación de la subunidad G γ para producir efectos similares. Nosotros proponemos dos posibles explicaciones para este fenómeno: A pesar de realizar sus ensayos en un modelo de estudio semejante (SCGs), es posible que existan diferencias en los procedimientos y como segunda posibilidad planteamos que, el cDNA utilizado por este grupo presente diferencias respecto del utilizado por nosotros en la secuencia que codifica para la subunidad.

Regulación voltaje-dependiente de los canales de Ca $^{2+}$ por subunidades G β .

Los registros de la corriente de Ca $^{2+}$ fueron realizados mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa (Hamill et al., 1981), los trazos obtenidos reflejan el flujo de los iones Ca $^{2+}$ a través de los canales en estado abierto, la amplitud de la corriente depende del número de canales abiertos y de la corriente que pasa por un solo canal.

Para conocer la capacidad de producir regulación en la corriente de Ca $^{2+}$ entre las diferentes subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G, las neuronas SCGs fueron transfectadas con plásmidos que codifican para los diferentes subtipos, la solución de inyección

incluía diferentes combinaciones de ellos. En general se procedió inyectando una combinación $G\beta\gamma$ y en ensayos sucesivos a la subunidad $G\beta$ sola para los diferentes subtipos. La sobreexpresión de las subunidades $G\beta 1$, $G\beta 2$ (figs 10 y 12), produjo los siguientes efectos: La tasa de facilitación de la corriente de Ca^{2+} aumentó, la inhibición por norepinefrina y la densidad de la corriente de Ca^{2+} se redujeron. La transfección de estos subtipos $G\beta$ cambia la activación dependiente de voltaje a potenciales más positivos y reduce la pendiente de la activación de los canales de Ca^{2+} tipo N (Herlitze S, et al, 1996). Está bien estudiado (Herlitze et al., 1996) que la inoculación de las subunidades $\beta\gamma$ purificadas de proteínas G, imitan la regulación de los canales de Ca^{2+} tipo N producida por la activación de los receptores α_2 -adrenérgicos, cuando es aplicado el neurotransmisor norepinefrina. La inoculación de las subunidades $G\beta 2\gamma 3$ purificadas de proteínas G, produjo los siguientes efectos: aumento de la inhibición de la corriente de Ca^{2+} , aumento del índice de facilitación al aplicar prepulsos despolarizantes y enlentecimiento en la cinética de activación de la corriente de Ca^{2+} . El efecto fue más claro al inyectar el mRNA que codifica para la subunidad $G\beta 2$ sola (Herlitze et al., 1996). Consistentemente se ha observado (Herlitze et al., 1996; García et al., 1998) que la subunidad $G\beta 2$ o el complejo $G\beta 2\gamma 3$, ocluyen el efecto de la norepinefrina mientras que estos resultados no se reproducen al inyectar subunidades α ó γ de proteínas G solas. De la misma forma, no se reproducen al inyectar mRNA ó cDNA irrelevante (García, 1998).

Los resultados presentados (Figs 9 y siguientes), proporcionan evidencia directa de que las subunidades $G\beta$ reproducen la regulación de los canales de Ca^{2+} tipo N por proteínas G acopladas a receptores. Un punto que es interesante

analizar es que las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G se encuentran estrechamente asociadas en condiciones naturales y sus efectos reguladores sobre los canales de calcio dependientes de voltaje son atribuidos al dímero intacto (Hepler et al., 1992; Clapham et al., 1993). Notablemente se ha probado que la transfección de subunidades $G\beta$ solas son capaces de cambiar a voltajes más positivos la activación de los canales de Ca^{2+} tipo N. Se han formulado dos posibles explicaciones para este fenómeno: se plantea que al sobreexpresar subunidades $G\beta$ solas, éstas van a asociarse con subunidades $G\gamma$ endógenas para formar el dímero $G\beta\gamma$; En contraste con esta hipótesis, nuestros resultados reforzados por trabajos de otros autores (De Waard et al., 1997; Herlitze et al., 1996; García et al., 1998) sugieren fuertemente otra posibilidad, la subunidad $G\beta$ por si sola es capaz de regular directamente a los canales de Ca^{2+} .

Efecto diferencial de los subtipos $G\beta$ para regular los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N

En la actualidad se sabe que la inhibición de los canales de Ca^{2+} ocurre a través de una interacción directa entre el complejo que forma la estructura del canal de Ca^{2+} y las subunidades $G\beta\gamma$ (Zamponi et al., 1998). En un trabajo previo del laboratorio se ha mostrado evidencia que sustenta esta hipótesis y además se propuso que tal modulación podría realizarse particularmente a través de las subunidades $G\beta$, (García et al., 1998). Los resultados expuestos en el presente trabajo muestran que las subunidades con un efecto más evidente sobre la regulación de los canales de Ca^{2+} tipo N son $G\beta 1$ y $G\beta 2$ solas o asociadas con la subunidad $G\gamma 3$ (Figs 10 y 12), las subunidades $G\beta 3$ y $G\beta 4$ solas o unidas con la subunidad $G\gamma 3$ (Fig 13) presentaron el mismo efecto en forma atenuada, siendo la subunidad $G\beta 5$ sola o ligada con la subunidad

G γ 3 (Fig 14) la que presenta un menor efecto regulador. Aún cuando existen diferencias en la proporción de la regulación de los canales de Ca²⁺ tipo N por las distintos subtipos G β , se aprecia claramente que todas ellas asociadas o no con la subunidad Gy poseen esta capacidad. Estos resultados son comparables con los presentados por otros autores (García et al., 1998; Ruiz-Velasco et al., 2000).

Las subunidades G β promueven el estado "reluctant" de los canales de Ca²⁺

Bean (1989) propone que, la inhibición de las corrientes de Ca²⁺ es debida a un cambio inducido por el neurotransmisor en la dependencia del voltaje al cual los canales se abren. Los neurotransmisores alteran profundamente la activación dependiente del voltaje de los canales de Ca²⁺. En el modelo propuesto por Bean los canales se presentan en dos modos operativos: un estado "willing" principalmente en ausencia del neurotransmisor, donde los canales pueden ser abiertos por despolarizaciones moderadas; y un estado "reluctant" donde los canales no se pueden abrir por despolarizaciones pequeñas o moderadas, pero sí pueden serlo por despolarizaciones mayores. Él también postula que los canales se interconvierten entre los dos estados y que la acción reguladora del neurotransmisor sitúa a una gran proporción de ellos en el modo "reluctant". Los efectos inhibitorios por neurotransmisores sobre los canales de Ca²⁺ tipo N han sido estudiados a nivel de canal unitario (Lipscombe et al., 1989), en este nivel de resolución se observa que los agonistas producen varios tipos de fenómenos incluyendo una reducción en la probabilidad de apertura del canal, aumento en la latencia a la primera apertura y un incremento en el tiempo promedio del estado cerrado de los canales. Todas estas evidencias indican que los neurotransmisores modifican el comportamiento del

canal (Miller, 1990), de esta manera la secuencia de eventos describe un tipo de inhibición presináptica que parece encontrarse ampliamente distribuida en el sistema nervioso. Los canales de Ca^{2+} tipo N, inhibidos por subunidades de proteínas G se consideran en estado "reluctant", reflejando con este termino la disminución de la respuesta del canal a cambios en el potencial de membrana (Wanke et al., 1987; Bean, 1989; Ikeda, 1991; Patil et al., 1996). En contraste, los canales que no son inhibidos por las subunidades de proteínas G son llamados "willing" termino que indica una rápida respuesta a cambios en el potencial de membrana (Bean, 1989). Los canales tipo N pueden ser inhibidos por receptores presinápticos operando directamente a través de la activación de las proteínas G las cuales alteran la dependencia de voltaje de los canales (Miller, 1990). Los resultados de la sobreexpresión del subtipo $\text{G}\beta 2$ y sus efectos reguladores sobre la corriente de Ca^{2+} tipo N se asemejan marcadamente a los efectos producidos por el neurotransmisor norepinefrina sobre este canal (Fig 13) y nos sugieren la unión directa de estas subunidades de las proteínas G al canal de Ca^{2+} . Se propone que, una estrecha unión entre las subunidades β de proteínas G y la estructura del canal de Ca^{2+} puede interferir en el cambio conformacional que abre el canal de manera que son necesarias fuertes despolarizaciones para promover la apertura (Hille, 1995; Wickman, et al., 1995; Diverse-Pierluissi et al., 1995).

Relevancia funcional de la variedad de subunidades $\text{G}\beta$.

La regulación de la corriente de Ca^{2+} por las diferentes subunidades $\text{G}\beta$ es dependiente del voltaje porque la corriente presenta facilitación al aplicar un pulso despolarizante de duración y magnitud adecuadas (Elmslie et al., 1990), este cambio coincide

con el modelo en el cual los canales de Ca^{2+} se interconvierten entre los estados "willing" y "reluctant".

Los resultados del presente estudio indican que las subunidades $\text{G}\beta$ son capaces de producir regulación dependiente del voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo N. En general la sobreexpresión de las diferentes subunidades $\text{G}\beta 1$ - $\text{G}\beta 4$ produce efectos cualitativos similares, la inhibición de los canales de Ca^{2+} mediada por la norepinefrina es ocluida. Las homologías de la secuencia aminoácida de las diferentes subunidades $\text{G}\beta$ muestran que las subunidades $\text{G}\beta 1$, $\text{G}\beta 2$ y $\text{G}\beta 4$ son 90% similares entre sí, mientras que con respecto a $\text{G}\beta 3$ son semejantes un 80%, en tanto que en relación con $\text{G}\beta 5$ solamente son semejantes en 53% (Yan et al., 1996), las diferencias de proporción homóloga entre las diferentes subunidades β de proteínas G sugieren que las diferencias funcionales deben ser entonces debidas a diferencias estructurales. En un trabajo anterior (Ford et al., 1998), los autores proponen que las bases moleculares pueden ser la clave para explicar las interacciones de las subunidades $\text{G}\beta$ con sus efectores.

Los resultados del presente trabajo permiten proponer que la variedad de subunidades $\text{G}\beta$ podrían tener un papel clave en la especificidad de la señalización intracelular, desde el receptor de membrana hasta el canal iónico efector, a través de la activación de subunidades específicas o de patrones de ellas para cada neurotransmisor. De esta manera, manteniendo la especificidad de la señalización en el sistema nervioso y por lo tanto dando la respuesta adecuada a cada condición, como parte de los mecanismos homeostáticos fundamentales que regulan la liberación de neurotransmisores y la transmisión sináptica.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión en neuronas SCGs de las diferentes subunidades $G\beta$ asociadas o no con $G\gamma 3$ produce regulación dependiente del voltaje de los canales de calcio tipo N.
2. Las subunidades $G\beta$ regulan el canal de calcio tipo N a través del aumento de la inhibición de la corriente, enlentecimiento cinético de la activación de la corriente y mimetismo del efecto de la norepinefrina.
3. La magnitud del efecto regulador que ejerce cada subunidad $G\beta$ sobre el canal de calcio tipo N está relacionada con la similitud estructural que guardan las distintas subunidades $G\beta$ entre sí.

PERSPECTIVAS

La sobreexpresión de los diferentes subtipos $G\beta$ produce en la corriente de Ca^{2+} cambios cinéticos que pueden ser utilizados para caracterizar la especificidad de la señalización. Trabajos previos del laboratorio (García et al., 1998) y un trabajo reciente por otros autores (Arnot et al., 2000), han probado la eficacia de las diferentes subunidades $G\beta$ en la regulación de canales de Ca^{2+} tipo N, encontrando que dependiendo de la subunidad expresada en este sistema existen diferencias cinéticas. Proponemos que los cambios cinéticos derivados de sobreexpresar a las diferentes subunidades $G\beta$ en neuronas SCGs, corresponden al efecto producido por neurotransmisores característicos para cada una de ellas, de esta forma las células nerviosas poseen un mecanismo de ajuste fino de la cantidad de Ca^{2+} que fluye al interior celular.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

- Access Excellence, (1998) "About Biotech".
www.accessexcellence.org/AB/GG/insrting.html
- Allbriton NL et al., (1992) "Range of Messenger Action of Calcium Ion and Inositol 1,4,5-triphosphate". *Science* 258, 1812-1815
- Arnold CR et al., (1974) "Fotografía Aplicada". (Fotobiblioteca, Ediciones Omega, Barcelona)
- Arnot MI et al., (2000) "Differential modulation of N-type α_{1B} and P/Q-type α_{1A} calcium channels by different G protein subunit isoforms". *J. Physiol.* 527(2): 203-12
- Ausubel FM et al., (1994) In: *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, NY) Vol. 1, Ch.5 y 9
- Bayewitch ML et al., (1998) "Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G beta subunits". *J Biol Chem.* 273(4):2273-6.
- Bean BP, (1989) "Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence". *Nature* 340, 153-156
- Beech DJ et al., (1992) "Intracellular Ca^{2+} Buffers Disrupt Muscarinic Suppression of Ca^{2+} Current and M-current in Rat Sympatetic Neurons". *PNA Sci USA* 88:652-656
- Berridge MJ et al., (1998) "Inositol Trisphosphate and Calcium Signaling". *Nature* 361, 315-325
- Birnbaauer L et al., (1994) "The Naming of Voltage-Gated Calcium Channels". *Neuron*,13:505-506
- Boyer JL et al., (1994) Selective Activation of Phospholipase C by Recombinant G-protein- α and $\beta\gamma$ Subunits. *J Biol Chem.* 269(4):2814-9.
- Carafoli E, (1994) "The Signaling Function of Calcium and its Regulation". *J Hypertens Suppl.* 12(10):S47-56
- Chen C et al., (1988) "Calcium-phosphate Mediated Gene Transfer: A Highly Efficient Transfection System for stably Transforming Cells With Plasmid DNA". *Biotechniques* 6: 632-638

- Chen C et al., (1997) "A Surface on the G Protein β -subunit Involved in Interactions With Adenylyl Cyclases". PNA Sci USA 94: 2711-2714
- Clapham DE et al., (1993) "New roles for G-protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signaling". Nature 365(6445): 403-6
- Clapham DE, (1995) "Calcium Signalling". Cell: 80; 259-268
- Clontech Laboratories, Inc. (1999) "Living Colors, User Manual". www.clontech.com
- De Waard M et al., (1997) "Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels". Nature 385: 446-450
- Diverse-Pierluissi M et al., (1995) "Transmitter-mediated inhibition of N-type calcium channels in sensory neurons involves multiple GTP-binding proteins and subunits". Neuron 14: 191-200
- Diverse-Pierluissi M et al., (2000) "Selective Coupling of Protein $\beta\gamma$ Complex to inhibition of Ca^{2+} Channels". J Biol Chem 275(37): 28380-28385
- Elmslie KS et al., (1990) "LHRH and $GTP\gamma S$ Modify Calcium Current Activation in Bullfrog Sympathetic Neurons". Neuron 5(1): 75-80
- Fasman GD, (1989) "Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation". (New York: Plenum Press)
- Fletcher JE et al., (1998) "The G protein $\beta 5$ subunit intracts selectively with the $G_q \alpha$ subunit". J Biol Chem 273(1): 636-44
- Ford CE et al., (1998) "Molecular Basis for Interactions of G Protein $\beta\gamma$ Subunits with Effectors". Science 280 (2567): 1271-1274
- Freismuth M et al., (1998) "G Proteins and the Regulation of Second Messenger Systems". in: Harrison's Principles of Internal Medicine (New York: Mc Graw Hill)
- García DE et al., (1998) "G-Protein β -Subunit Specificity in the Fast Membrane-Delimited Inhibition of Ca^{2+} Channels". J Neurosci 18(22): 9163-9170
- Gilbert W et al., (1980) "Proteínas Útiles Obtenidas a Partir de Bacterias Recombinantes" Investigación y ciencia 53:46-56
- Graber SG, (1998), "G-Proteins: An Introduction", in: Calbiochem Sygnal Transduction Catalog & Tecnical Resource

- Hahnel Ch, (1992) "Quantitative Microinjection". in: Practical Electrophysiological Methods (Wiley-liss, Inc. New York, 1993)
- Hamill OP et al., (1981) "Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches". Pflugers Arch. 391:85-100
- Hepler JR et al., (1992), "G Proteins". TIBS 17(10): 383-387
- Herlitze S, Garcia DE et al., (1996) "Modulation of Ca²⁺ Channels by G-protein $\beta\gamma$ Subunits". Nature 380: 258-262
- Herlitze S et al., (1997) "Molecular determinations of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel α_{1A} subunit". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1512-1516
- Hille B, (1992) "Ionic Channels of Excitable Membranes". (Sunderland Mass, Sinauer Associates)
- Hille B, (1994) "Modulation of Ion-channel Function by G-protein-Coupled Receptors." TINS 17 (12): 533-536
- Holz GG et al., (1986) "GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels". Nature 319: 670-672
- Ikeda SR, (1990) "Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones". J. Phys. 439: 181-214
- Ikeda SR, (1996) "Voltage-Dependent Modulation of N-type Calcium Channels by G-protein $\beta\gamma$ Subunits". Nature 380: 255-258
- Jones PG et al., (1998) "Cloning and tissue distribution of the human G protein beta-5 cDNA". Biochim. Biophys. Acta 1402: 288-291
- Klymkowsky M, (1996) "Molecular search tools" in <http://spot.Colorado.EDU/~klym/mtSGP.GIF>
- Kretsinger RH, (1980) "Structure and Evolution of Calcium Modulated Proteins". CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 119-174
- Lipscombe D et al., (1989) " α -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium channel gating". Nature 340: 637-642

- Marchetti C et al., (1986) "Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick". *Pflügers. Arch.* 406: 104-111
- Mc Phalen CA et al., (1991) "Calcium Binding Sites in Proteins: a Structural Perspective". *Adv. Prot. Chem.* 42: 77-144
- Miller RJ, (1990) "Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release". *FASEB J.* 4(15): 3291-9
- Nayal M et al., (1994) "Predicting Ca²⁺ Binding Sites in Proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 817-821
- Novick RP, (1981) "Plásmidos". *Investigación y Ciencia* 53:46-59
- Olivera BM et al., (1985) "Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails". *Science* 230(4732): 1338-43
- Patil PG, (1996) "Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels". *Biophys J.* 71(5): 2509-21
- Pauling L, (1947) "General Chemistry" (New York: Dover Publications)
- Pérez-Reyes E et al., (1998) "Molecular Characterization of a Novel Family of Low Voltage-activated, T-type, Calcium Channels". *J. Bioenerg. Biomembr.* 30(4):313-8.
- Pestronk A, (1999) "Ion Channels, Transmitters, Receptors & Disease. Diagrams".
WWW.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/diagrams/chan.htm
- Plummer MR et al., (1989) "Elementary Properties and Pharmacological Sensitivities of Calcium Channels in Mammalian Peripheral Neurons". *Neuron* 3: 1453-1463
- Plummer MR et al., (1991) "Neurotransmitter Modulation of Calcium Channels in Rat Sympathetic Neurons". *J Neurosci* 11(8): 2339-48
- Reichman J, (1998) "Chroma Handbook of Optical Filters for Fluorescence Microscopy". www.chroma.com/data/spectra.cfm
- Rosenthal N, (1987) "Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays". *Methods Enzymol.* 159: 704-709
- Ruiz-Velasco V et al., (2000) "Multiple G-protein $\beta\gamma$ combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons". *J. Neurosci.* 29(6): 2183-91

Sambrook J et al., (1987) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)

Vourgourakis Y et al., (1996) "Molecular Search Tools". spot.Colorado.EDU/~klym/mtSGP.GIF

Walker D et al., (1998) "Subunit Interaction Sites in Voltage-dependent Ca^{2+} Channels: Role in Channel Function". Trends Neurosci. 21(4):148-54.

Wanke E et al., (1987) "Activation of muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons". Proc Natl Acad Sci USA 84(12): 4313-7

Watson AJ et al., (1994) "A fifth member of the mammalian G-protein β -subunit family: expression in brain and activation of the β -2 isotype of phospholipase C". J. Biol. Chem. 269: 22150-22156.

Wickman K et al., (1995) "Ion channel regulation by G proteins". Physiol. Rev. 75: 865-885.

Yan K et al., (1996) "Differential ability to form the G protein $\beta\gamma$ complex among members of the β and γ subunit families". J Biol Chem 271(12): 7141-6

Yang F et al., (1998) "The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein". www.nsls.bnl.gov/BeamRD/LiteBites/Yang1.html

Zafiroula-Iro G, (1998) "Signal transduction mechanisms mediated by G protein coupled receptors". www.demokritos.gr/ib/group1.html

Zamponi GW et al., (1998) "Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single $G\beta\gamma$ subunit". Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 4035-9

Zhang S et al., (1996) "Selective activation of effector pathways by brain-specific G protein $\beta 5$ ". J Biol Chem. 271(52): 33575-9