



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA**

**"CARACTERIZACION BIOFISICA Y
FARMACOLOGICA DE LOS CANALES DE CALCIO
EN NEURONAS DISOCIADAS DEL ESTRIADO
DE LA RATA"**

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 :

P. DE BIOL. HUMBERTO SALGADO BURGOS

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO

LOS EXPERIMENTOS SE REALIZARON EN EL LABORATORIO DEL DR.
JOSE BARGAS DIAZ EN EL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR.

MEXICO, D. F.

2001



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.

Para la realización de este trabajo se contó con facilidades por parte de la **E.N.E.P. Iztacala** dentro del **Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL)**.

Este trabajo fue realizado con recursos aportados por la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** de la **Universidad Nacional Autónoma de México (IN202300)** y **CONACYT (31839-N)**.

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio del Dr. José Bargas Díaz** en el **Instituto de Fisiología Celular**, en la **Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo comprendido desde **Marzo de 1999** a **Diciembre de 2000**.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **M. En C. Jaime Aurelio Barral Caballero**, Proyecto **Neurociencias** de la **U.I.I.C.S.E., E.N.E.P. Iztacala**.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas, sin cuya ayuda no habría sido posible la terminación de esta tesis:

Al Dr. José Bargas Díaz por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por sus valiosas enseñanzas.

Al M. En C. Jaime Aurelio Barral Caballero (por la dirección de este trabajo); así como a los miembros del jurado por su revisión crítica y sus comentarios del trabajo de tesis:

M. en C. Bertha Segura Alegría
Biol. Jorge Gersenowies Rodríguez
M. en C. Ma. Del Carmen Vilchis Quintero
M. en C. Rodolfo Cardenas Reygadas

DEDICO ESTE TRABAJO

A mis padres: Agustín y Silvia.

A mis hermanas: Rossana, Araceli y Zacnic-te.

Por todo el cariño que me han dado y por su apoyo incondicional.

A mis amigas Carmen y Tamara por todo el trabajo que realizamos juntos.

A mis amigos y amigas: Edgar, Jessica, Rodrigo, Gerardo, Ernesto, Paco, Arturo, Cuahutemoc, Christian, Marco, Omar, Cesar, Iris, Tania, Adriana, Sara, Ulises

Así como a mis compañeros del Laboratorio.

Índice

Introducción

1	Ganglios basales.....	1
	Neoestriado.....	2
	Aferencias al neoestriado.....	2
	Eferencias del neoestriado.....	2
	Tipos neuronales del neoestriado.....	4
	Canales de calcio.....	6
	Clasificación de los canales de calcio.....	6
	Canales de calcio tipo T.....	7
	Canales de calcio tipo L.....	9
	Canales de calcio tipo N.....	12
	Canales de calcio tipo P/Q.....	12
	Canales de calcio tipo R.....	14
	Propiedades moleculares de los canales de calcio.....	14
1	Objetivo.....	18
2	Metodología.....	19
	Preparación.....	19
	Registros de fijación de voltaje en célula entera.....	20
	Adquisición de datos.....	23
3	Resultados.....	24
	Propiedades farmacológicas de las corrientes de Ca^{2+} activadas por alto umbral.....	24
	Efecto del bloqueador nitrendipina sobre la corriente de Ca^{2+}	26
	Efecto de la toxina ω -Cgtx GVIA sobre las corrientes de Ca^{2+}	27

Efecto de la toxina ω -AgaTx TK sobre las corrientes de Ca^{2+}	30
Efecto aditivo de la aplicación de ω -AgaTx TK.....	30
Efecto del bloqueo por nitrendipina y la toxina ω -CgTx MIIC	
Juntas sobre las corrientes de Ca^{2+}	33
4 Discusión.....	38
Canal de Ca^{2+} tipo L.....	38
Canal de Ca^{2+} tipo N.....	39
Canal de Ca^{2+} tipo P y Q.....	40
¿P, Q o P/Q?.....	42
Canal de Ca^{2+} tipo R.....	44
Importancia funcional de los canales de calcio.....	45
Conclusiones.....	47
Bibliografía.....	48

RESUMEN

El calcio que entra a través de canales de calcio dependientes del voltaje juega un papel importante en múltiples funciones celulares (Bargas et al. 1993; Nicoll, 1989 y Fossier et al, 1994).

En el presente trabajo se caracterizaron biofísica y farmacológicamente las corrientes de calcio en neuronas neoestriatales de la rata. Para esto, se realizaron registros de fijación de voltaje en la modalidad de célula entera en neuronas neoestriatales.

Con ayuda de bloqueadores específicos para los diferentes tipos de canales de calcio, se determinó que ésta corriente en las neuronas espinosas medianas del neocórtex se debe a la activación de los canales L, N, P/Q y R.

Por otro lado, debido a que existe un alto grado de similitud entre los canales de calcio tipo P y Q, se quiso determinar si existen ambos canales en las neuronas espinosas medianas. Para ello se utilizaron diferentes dosis de la ω -AgaTxTK. Los resultados mostraron un sólo sitio de unión para ésta con un coeficiente de Hill de 1.04, sugiriendo que existe un solo canal ¿ P ó Q ?.

En estas células la presencia de los diferentes canales de calcio es de gran importancia ya que son blanco de modulación por neurotransmisores, participan en la integración sináptica y le confieren distintas propiedades para regular su excitabilidad que pueden manifestarse como: latencias variables para disparar, cambios en la amplitud y duración de los potenciales de acción, dispáro en rafagas, etc.

INTRODUCCION

GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones motoras, en especial la iniciación y ejecución de movimientos (Albin, 1989; Brodal, 1992; Weiner, 1994, 1997; Kawaguchi, 1995; Mink, 1996 Y Chesselet y Delfs, 1996). Estos son núcleos subcorticales interconectados que comprenden los núcleos caudado, putamen (que constituyen el neostriado), accumbens, subtálamo, substancia negra y globo pálido, (figura 1) (Albin, 1989; Brodal, 1992; Calabresi, et al, 1996; Mink, 1996; Chesselet y Delfs 1996; Lovinger, 1996; Bargas, 1998; Smith, 1998; Wilson, 1998 y Kalivas y Nakamura, 1999).

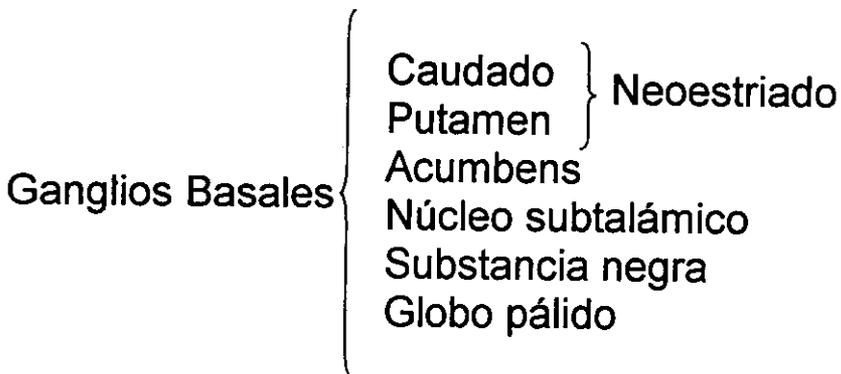


Figura. 1. Núcleos que constituyen los ganglios basales.

Los ganglios basales comprenden núcleos del cerebro anterior y medio, los cuales juegan un papel importante en el control de postura y los movimientos. Se conocen algunas enfermedades asociadas a disfunciones en los ganglios basales (mal de Parkinson y esquizofrenia), las cuales se expresan en posturas del cuerpo anormales, movimientos lentos e involuntarios o una combinación de estas anomalías (Smith et al. 1998 y Mink, 1996).

NEOESTRIADO

Aferencias al neostriado

El neostriado constituye la principal entrada de aferencias a los ganglios basales, ya que recibe entradas sinápticas glutamatérgicas de las distintas regiones de la corteza cerebral, en especial de las áreas motoras, sensoriales y de asociación; además, del tegmento ventral anterior, los núcleos intralaminares del tálamo, así como de las fibras dopaminérgicas que provienen de la sustancia negra compacta y serotoninérgicas de los núcleos del Rafé, situados en la formación reticular del puente (figura.2) (Brodal, 1992; Parent y Hazrati, 1995; Weiner, 1994, 1997; Chesselet y Delfs 1996; Smith et al. 1998 y Wilson, 1998).

Eferencias del neostriado

El neostriado proyecta a los dos segmentos del globo pálido, el segmento externo (Gpe o globo pálido en no primates) y el segmento interno (Gpi o núcleo entopeduncular en no primates) y a la sustancia negra. Las proyecciones estriatales a la sustancia negra van principalmente a la reticulata; siendo pocas

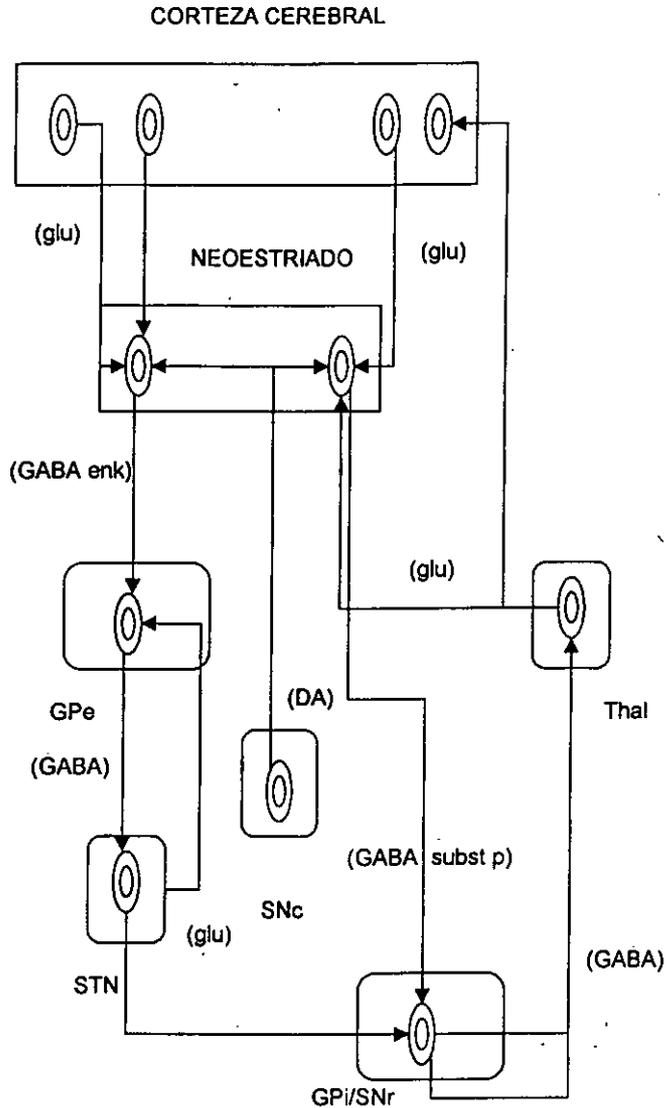


Figura 2. Diagrama de las aferentes y eferentes principales a los ganglios basales. Las células de proyección del neostriado proyectan hacia la sustancia negra compacta (SNc) y reciben aferentes de ella. Las neuronas espinosas medianas proyectan a la sustancia negra reticulata (SNr), al globo pálido interno (Gpi) y al globo pálido externo (Gpe). El Gpi proyecta hacia el tálamo, y este a su vez proyecta hacia la corteza. El Gpe proyecta hacia el núcleo subtálamico (STN) quien a su vez proyecta hacia la SNr. La SNr proyecta hacia el tálamo y este último proyecta hacia la corteza. También se ilustran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías. Glu, glutamato; subst P, substancia P; DA, dopamina; enk, encefalinas y GABA, ácido g aminobutírico (Brodal, 1992 y Lovinger, 1996).

las que inervan a la compacta (figura.2) (Brodal, 1992; Parent y Hazrati, 1995; Weiner, 1994 y 1997; Chesselet y Delfs 1996; Smith, 1998 y Wilson, 1998).

Tipos neuronales del neostriado

Existen varios tipos de neuronas neostriatales: las neuronas de proyección y las interneuronas locales. Las neuronas de proyección del neostriado tienen un cuerpo celular de tamaño mediano (12-20 μm de diámetro). Se denominan "neuronas espinosas medianas" (NEMs), y representan el 95% de la población neuronal de este núcleo (Mink, 1996; Lovinger, 1996; Smith, 1998 y Wilson, 1998). Utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) como su principal neurotransmisor, pero a la vez pueden coexpresar un gran número de péptidos neuroactivos, como la sustancia P, las encefalinas y las dinorfinas. De las interneuronas locales, se encuentra la interneurona colinérgica grande, la cual es identificada por la presencia de colin-acetiltransferasa, con un cuerpo celular elongado de 50 a 60 μm de largo por 15 a 25 μm de ancho y representan el 2% de las células estriatales (Kawaguchi, 1995). El siguiente tipo es inmunoreactivo a parvalbúmina y contiene GABA. Estas neuronas representan el 1 % de toda la población estriatal, se caracterizan por tener el cuerpo celular redondo y un tamaño de 14 a 15 μm de diámetro. Otro tipo de interneurona es inmunoreactiva a somatostatina y al neuropéptido Y. Estas neuronas también contienen la enzima NADPH diaforasa, la cual está involucrada en la síntesis de óxido nítrico, que actúa como segundo mensajero. Estas interneuronas representan aproximadamente el 1% de la

población neuronal de este núcleo y tienen un cuerpo celular esférico con un diámetro de 12 μm ; y el último tipo es la interneurona GABAérgica que contiene calretinina, que representa menos del 1% de la población neuronal (Kawaguchi, 1995; Parent, 1995 y Wilson, 1998).

Estas neuronas establecen sinapsis con las NEMs modulando su actividad a través de GABA y los péptidos que liberan (Kawaguchi, 1995; Parent y Hazrati, 1995 y Wilson, 1998).

En estas células (NEMs) se conoce que los canales de calcio dependientes del voltaje participan en la liberación de los neurotransmisores, los cuales a su vez los pueden modular (Anwyl, 1991; Bourinet, et al, 1996). Además de que estos canales le proporcionan a la célula un repertorio de mecanismos para regular su excitabilidad, entendida ésta como la forma en que la célula responde a un estímulo dado. Esta regulación puede manifestarse como: latencias variables para disparar, cambios en la amplitud y duración de los potenciales de acción, dispáro en ráfagas, integración sináptica, modulación por neurotransmisores, etc. (Nicoll, 1989 y Bargas, 1993).

CANALES DE CALCIO

El calcio entra a las células a través de canales de calcio activados por voltaje y representa una pieza clave en la regulación de una gran variedad de procesos celulares como la liberación del neurotransmisor, metabolismo intracelular y expresión génica (Fossier et al, 1994; Qian y Saggau, 1997; Sinha et al, 1997 y Smith y Cunnane, 1997).

Avances en biología molecular, electrofisiología y farmacología han servido para la identificación de los diferentes tipos o subtipos de canales de calcio (Snutch y Reiner, 1992 y Ertel, et al, 2000; Katz, 1992; Ellinor, et al, 1995; Fox, et al, 1987; Miller, 1992 y Usowicz, et al, 1992; Sather et al, 1994 y Lin y Lin-Shiau, 1997). En adición a sus características distintivas ya sean estructurales y funcionales, muchos de estos subtipos exhiben sensibilidades diferentes hacia los agentes farmacológicos (McBurney et al. 1992; Alvarez, et al, 1995; Bargas, et al, 1994; Chin, 1998; Churchill y MacVicar, 1998; Richard et al, 1998; Uchitel, 1997).

CLASIFICACION DE LOS CANALES DE CALCIO

Diversos estudios en neuronas revelan la existencia de diferentes canales de calcio, los cuales son complejos heteroméricos formados por 5 subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ y δ (figura 3). Estos se han clasificado en dos grupos con base en su dependencia de voltaje para su activación: activados por bajo voltaje (LVA), que

corresponden a los canales de tipo T y los activados por alto voltaje (HVA), que son los canales de los tipos L, N, P/Q y R (figura 4) (Bean, 1989; Bertolino y Llinás, 1992).

Las subunidades α_1 forman el poro de los canales de calcio y las subunidades auxiliares α_2, β, γ y δ modulan las cinéticas de activación e inactivación; así como la densidad de corriente y la unión de los diferentes bloqueadores de canales de calcio, las cuales incrementan considerablemente sus funciones (Varadi, 1995 y Catterall, 1996 y 1998).

Las subunidades α_{1G}, α_{1H} y α_{1I} forman el poro de los canales de calcio del tipo T (LVA), en tanto que las α_{1A} forman el poro de los canales tipo P/Q; α_{1B} del tipo N, $\alpha_{1C}, \alpha_{1D}, \alpha_{1F}$ y α_{1S} para los de tipo L y α_{1E} del tipo R respectivamente (Figura 4).

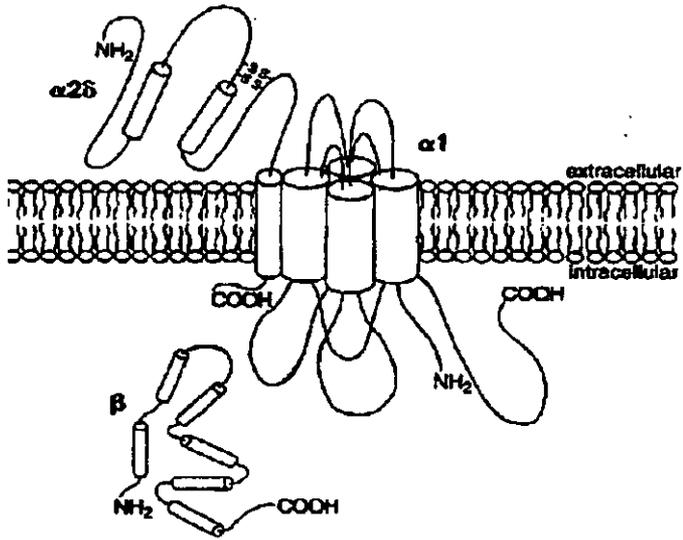
Canales de calcio tipo T

Los canales de calcio tipo T se activan a potenciales negativos y su inactivación es muy rápida (tabla 1). Están involucrados en la generación de la actividad de marcapasos en neuronas y en el músculo cardíaco. Para este canal la toxina selectiva es la Kurtoxina. Además, se ha reportado que son sensibles al octanol, la amilorida y a bajas concentraciones de Ni^{2+} (tabla 1) (Tsien et al., 1991; Dolphin et al., 1991; Randall y Tsien, 1997; Peres-reyes, 1998 y Monteil et al, 2000). Otra propiedad típica de estos canales es su pequeña conductancia que es de 5-9 pS (picosiemens) (tabla1).

Canal	T	L	N	P	Q	R
Corriente	I_T	I_L	I_N	I_P	I_Q	I_R
Conductancia	5-8 pS	25 pS	20 pS	14 pS	19 pS	20 pS
Agonistas	—	BayK8644	—	—	—	—
Antagonistas	Kurtoxina	DHPs	ω -Conotoxina GVIA	ω -Agatoxina Tk	ω -Agatoxina Tk	SNX
Inactivación	Inactivación rápida	Baja inactivación	Moderado rango de inactivación	No inactivante	Moderado rango de inactivación	Moderado rango de inactivación
Información estructural	α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} . Se desconocen subunidades auxiliares.	α_{1S} , $\alpha_{2\delta}$ y β . α_{1C} , $\alpha_{2\delta}$ y β α_{1D} , $\alpha_{2\delta}$ y β	α_{1B} , $\alpha_{2\delta}$ y β .	α_{1A} , $\alpha_{2\delta}$ y β .	α_{1A} , $\alpha_{2\delta}$ y β .	α_{1E} , $\alpha_{2\delta}$ y β .

Tabla 1. Corrientes, conductancias, agonistas, antagonistas, rango de inactivación y composición de subunidades de los canales de calcio (Randall et al. 1995; Varadi et al. 1995 y Catterall, 1998).

A.



B.

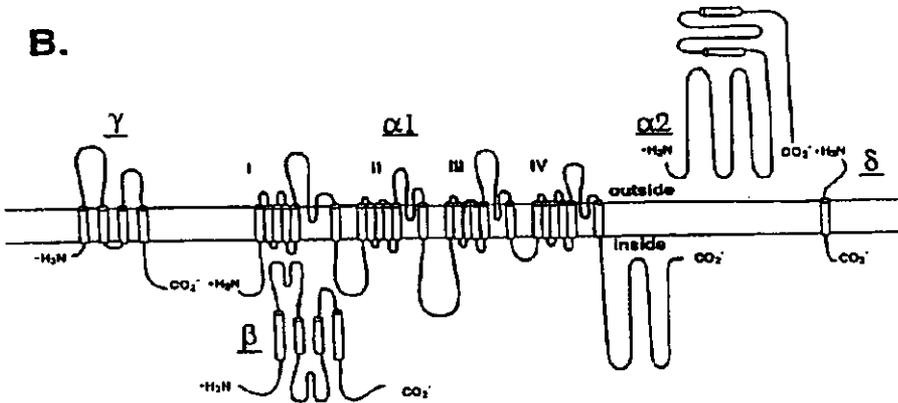


Figura.3. Estructura de los canales de calcio. A y B ilustran un modelo transmembranal de la composición de subunidades y estructura del canal de calcio purificado del músculo esquelético (Catterall, 1998).

Los canales de calcio HVA son originalmente identificados por sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas (McBurney et al, 1992; Mori et al, 1996; Morel y Hugues, 1998; Moreno, 1999). En años recientes la identidad de estos canales ha sido corroborada con estudios comparativos de su estructura molecular. El descubrimiento de antagonistas orgánicos de los canales de calcio dihidropiridinas (DHPs) y toxinas proporcionaron un gran progreso en el conocimiento de los mecanismos moleculares de los canales de calcio dependientes del voltaje. Estos bloqueadores se han usado para purificar los diferentes canales de calcio y en el conocimiento de su estructura primaria del DNA clonado (Tanabe et al., 1987; Hockerman et al, 1997; Striessnig et al, 1998 y Budde, et al, 1998).

Canales de calcio tipo L

Los canales sensibles a las DHPs tienen una conductancia unitaria de 25 pS (tabla 1), fueron los primeros canales de calcio del tipo HVA descritos. Estos fueron llamados tipo L porque sus corrientes son largas y duraderas, indicando sus cinéticas de inactivación lentas (figura 5). Estas corrientes sensibles a las DHPs son igualmente sensibles a las fenilalkilaminas, benzodiazepinas y a la calciseptina. Se han hecho estudios de localización inmunocitoquímica que han revelado la localización de estos en el cerebro de la rata (Charnet, et al; 1994; Westenbroek et al, 1998; Wu, 1997 y 1999 y Budde et al. 1998), encontrándose en los cuerpos celulares neuronales y en dendritas proximales de muchas neuronas centrales (Westenbroek et al., 1998).

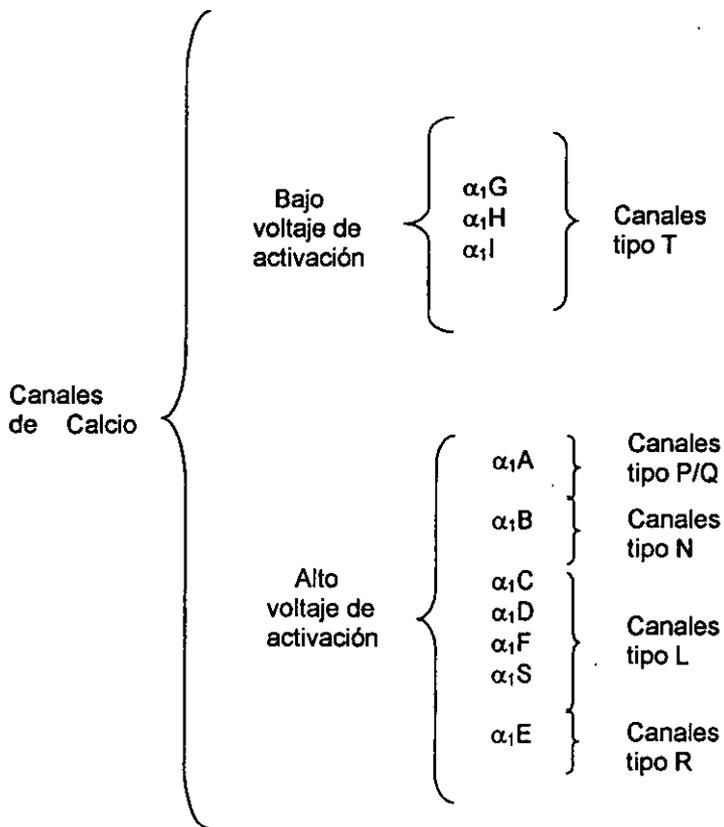


Figura.4. Clasificación de los canales de calcio. Activados por bajo umbral (LVA) y activados por alto umbral (HVA) (Catterall, 1998).

La transmisión sináptica en muchas partes del cerebro no es afectada por las DHPs. Sin embargo, los canales tipo L han sido involucrados en la liberación péptidica de la neurohipofisis, y en la liberación de la adrenalina y noradrenalina de las células cromafines de la médula adrenal (Lemos y Nowycky, 1989).

Canales de calcio tipo N

Los canales de calcio tipo N son activados por largas despolarizaciones. Se inactivan más rápidamente que los canales L pero menos rápido que los canales de calcio tipo T (figura 5). Tienen una conductancia de 20 pS (tabla 1), son insensibles a las DHPs y son bloqueados por la ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) (Olivera et al., 1985; Kasai et al. 1987; Fujita et al; 1993; Stocker et al. 1997; Jones et al, 1997 y 1999; Angulo, et al, 1998; Kaneko et al, 1998; Cox y Duunlap, 1994).

Se ha demostrado que los canales de calcio tipo N intervienen en el proceso de liberación del neurotransmisor, ya que interactúa con la syntaxina que es una proteína membranal presináptica involucrada en la fusión de las vesículas del neurotransmisor (Catterall, 1999).

Canales de calcio tipo P/Q

Los canales de calcio tipo P tienen una conductancia de 14 pS, fueron originalmente descritos en las neuronas cerebelosas de Purkinje (Llinás et al., 1989). Su cinética de inactivación es lenta (figura 5), su corriente es resistente a

las DHPs y a la ω -CgTx GVIA, pero son sensibles a la toxina del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (ω -Agatoxina IVA y ω -Agatoxina TK) (tabla 1) (Linás et al., 1989; Cherksey et al. 1991; Mintz et al., 1992 y Teramoto, 1997). Por otro lado, se ha identificado otro canal de calcio conocido como Q, que es igualmente sensible a esta toxina pero a concentraciones mas altas y que tienen una conductancia de 19 pS (Wheeler et al. 1994).

La diferencia entre estos dos tipos de canales puede deberse a que haya cierta heterogeneidad en la subunidad α_{1A} por un proceso alternativo del gen α_{1A} (Bourinet et al., 1999) o en diferencias en las subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$, lo que les confiere diferentes propiedades tanto farmacológicas, como en sus cinéticas de activación e inactivación. Por ejemplo, las subunidades β_{1b} , β_{b3} y β_{b4} causan una aceleración significativa de las cinéticas de inactivación de las corrientes, la cual se observa en los canales de calcio tipo Q. Mientras que la subunidad β_{2a} enlentece el rango de inactivación de la corriente de la subunidad α_{1A} , lo cual se observa típicamente en las corrientes de calcio tipo P (figura 5) (Stea et al., 1994; Moreno et al, 1997; Namkung et al, 1998 y Mermelstein et al., 1999).

Estos dos canales están fuertemente involucrados en la liberación del neurotransmisor y se localizan en cuerpos celulares, dendritas y en áreas presinápticas y poco en las espinas dendríticas (Linás et al, 1998; Catterall, 1999; Hillman et al, 1991; Cherksey, et al, 1991; Ludwing et al, 1997; Craig et al, 1998; Protti y Uchitel, 1993).

La transmisión sináptica en la mayoría del cerebro no es afectada por la DHPs pero es grandemente inhibida por la ω -Agatoxina IVA, ω -Agatoxina TK, ω -

conotoxina MVIIC y ω -conotoxina GVIA, lo que apoya el que múltiples tipos de canales de calcio (N y P/Q) estén presentes en una sola sinapsis provocando excitotoxicidad sinérgicamente (Mintz et al., 1995).

Canales de calcio tipo R

En algunas neuronas del sistema nervioso central se han descrito otras corrientes las cuales son resistentes a todos estos bloqueadores (DHPs, ω -Agatoxina IVA, ω -Agatoxina TK, ω -conotoxina MVIIC y ω -conotoxina GVIA) y han sido atribuidas a otro tipo de canal llamado R. Estos canales se caracterizan por tener una conductancia unitaria de 20 pS, se ha sugerido que se inactivan por el voltaje y que tienen sensibilidad a la toxina SNX que es extraída del veneno de la tarántula africana *Hysterocrates gigas*. Estos también han sido involucrados en la liberación del neurotransmisor (figura 5) (Schneider et al, 1994; Smith et al, 1999).

PROPIEDADES MOLECULARES DE LOS CANALES DE CALCIO

La subunidad α_1 de los canales de calcio es una proteína de 165-175 KDa, cuya secuencia de aminoácidos está organizada en cuatro dominios repetidos (I a IV), que están conectados por tres asas intracelulares. La asa intracelular que se encuentra entre los dominios I y II tiene sitios de unión para la subunidad β , proteínas G y PKC (Bourinet et al. 1992; Bouron et al. 1995; Strauss et al, 1997; Mermelstein et al, 2000), también presentan un asa intracelular entre el dominio II y III que es variable para cada uno de los tipos de canales de calcio, lo mismo que el

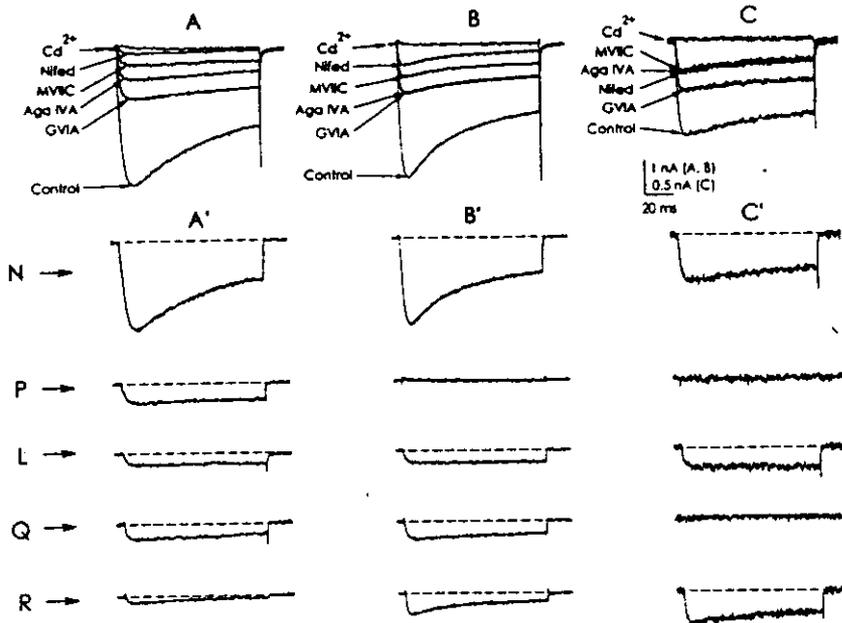


Figura 5. Neuronas del ganglio nodoso expresando diferentes canales de calcio activados por alto voltaje. (A) Registros de cinco tipos de corriente de calcio activados por alto voltaje (L, N, P, Q y R) que se expresan en las neuronas del ganglio nodoso. (B) Registros de una neurona que no expresa canales de calcio tipo P (sensibles a la ω -AgaTK). (C) Registros de otra neurona que no expresa canales de calcio tipo P y Q. Las corrientes fueron dadas en respuesta a pulsos de 100 ms desde los -80mV a los -10mV . (A', B' y C'), muestran la substracción de los trazos antes y después de la aplicación de los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} (Rusin, 1998).

carboxilo terminal de esta subunidad. Cada uno de estos dominos contiene seis segmentos transmembranales (S1 a S6).

El segmento S4 está altamente conservado y está cargado positivamente por varios residuos de aminoácidos (argininas y lisinas). Al recibir una despolarización, el S4 se mueve hacia la parte exterior, cambiando la conformación del poro, por lo que el canal se abre (Yamaguchi et al. 1999).

La selectividad al calcio es provista por una espiral de cuatro residuos de glutamato cargados negativamente los cuales forman parte de cada dominio que está cerca de la región transmembranal del poro (Tanabe et al., 1993). Estas regiones son altamente conservadas entre los subtipos de canales de calcio. Por otro lado, la subunidad α_1 contiene sitios de unión para los diferentes bloqueadores de los canales de calcio.

Las subunidades α_1 de los canales de calcio son producto de diez genes diferentes (S, C, D, F, A, B, E, G, H e I), de los cuales se han identificado las secuencias de las proteínas y han sido funcionalmente expresadas en sistemas celulares heterólogos (Pérez-Reyes y Schneider, 1995).

Con base, en la similitud de su estructura primaria, las subunidades α_1 de los canales de calcio HVA se han dividido en 2 grupos (L y no-L). Los genes clase S, C, D y F que codifican para los canales tipo L (α_{1C} , α_{1D} y α_{1F}), presentan un 75 % de identidad con la del canal tipo L (α_{1S}) del músculo esquelético. Los genes de la clase C se expresan en el corazón y otros tejidos, mientras que los de las clases D y F en neuronas y células neuroendocrinas. En cuanto a los genes clase A, B y E que codifican a los canales no L se expresan primariamente en neuronas y

presentan entre ellos un 60% de identidad en su estructura primaria y entre el 25 y 40% de identidad con las del tipo L.

La regulación de la subunidad α_1 , de los canales de calcio se lleva a cabo a través de varios mecanismos entre los que se encuentran la fosforilación por proteínas cinasas A y C; adicionalmente existe una modulación por múltiples proteínas G (Curtis y Catterall, 1985; Flockerzi et al., 1986; Levitan, 1994; Jahn et al., 1988; Fournier et al, 1993; Uchitel, 1997 y Gray et al 1998).

La subunidad β tiene un peso de 56 KDa, es una proteína hidrofílica que no está glucosilada y se localiza en el sitio intracelular de la membrana (Catterall, 1997 y 1998).

La subunidad γ tiene un peso de 30 KDa, es una glucoproteína con cuatro segmentos transmembranales. La subunidad α_2 es una proteína de 143 KDa, tiene muchos sitios de glucosilación, es una proteína extrínseca, atada a la membrana a través de puentes disulfuro con la subunidad δ , la cual es una proteína de un solo segmento transmembranal que tiene un peso de 27 KDa (Catterall, 1998).

Las corrientes de calcio son grandemente incrementadas cuando las subunidades α_1 son coexpresadas con las subunidades β y $\alpha_2\delta$, del mismo modo, sus cinéticas de activación e inactivación son afectadas por la expresión de las diferentes isoformas de estas subunidades (Catterall, 1995 y 1998; Varadi et al., 1995; Bouron et al., 1995 y Josephson y Varadi, 1996).

Todas estas subunidades son codificadas por diferentes genes y tienen múltiples variantes por procesamiento alternativo, lo que contribuye a una diversidad funcional y molecular de los canales de calcio dependientes del voltaje (Perez-Reyes y Schneider, 1995 y Miljanich et al, 1995).

OBJETIVOS.

En las NEMs se ha identificado que la corriente de calcio esta determinada por diferentes tipos de canales de calcio (L, N, P/Q y R). Sin embargo, aún no se han podido diferenciar las corrientes de calcio de los tipos P y Q, por lo que el objetivo de este trabajo es caracterizar biofísica y farmacológicamente las corrientes de calcio en las neuronas espinosas medianas.

METODOLOGIA

Preparación

Los experimentos se llevaron a cabo en neuronas neocorticales disociadas de cerebro de rata Wistar (100 organismos) de 100 a 120 g de peso.

Las ratas fueron decapitadas después de ser anestesiadas con éter. Se obtuvo el cerebro y se colocó en solución Krebs, cuya composición (en mM) es: 126 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 0.002 tiourea, 0.002 ácido ascórbico, 11 glucosa a un pH de 7.4, ajustado con NaOH y osmolaridad de 300 ± 5 mOsm.

Posteriormente se separó el tallo cerebral, los bulbos olfatorios y se obtuvieron rebanadas sagitales de 400 µm de espesor. Estas se incubaron una hora en solución salina oxigenada con una mezcla de 95 % O₂ y 5% CO₂. Para cada disociación fueron utilizadas 4 rebanadas en las que se diseccionó el neocórtex. Estas se incubaron en solución salina a 32°C con la enzima pronasa E (tipo XIV) (1mg/ml) durante 20 minutos, con el fin de digerir la matriz extracelular. Posteriormente se transfirieron a un tubo de ensayo en donde se realizó la disociación mecánica con pipetas Pasteur de diferentes diámetros. El sobrenadante que contiene las neuronas, se colocó en una caja de Petri de 35 mm (con cargas negativas en el piso) montada en la platina de un microscopio invertido. Se espero

15 minutos para que las neuronas quedaran fijas al piso de la caja. Para el paso anterior se utilizó una solución salina con bajo calcio, que contiene (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 0.2 CaCl₂, 10 HEPES y 10 glucosa. Posteriormente se lavó la disociación con una solución amortiguada de HEPES con bario que contiene (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 5 BaCl₂ (el cual fue utilizado como acarreador de carga), 10 HEPES, 10 glucosa y TTX (Tetrodotoxina) 0.001 a pH 7.4 ajustado con NaOH y osmolaridad de 300 ± 5 mOsm. La preparación se mantuvo con una superfusión constante.

Registros de fijación de voltaje en célula entera

Los registros se realizaron con la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula entera. Se utilizaron microelectrodos de vidrio de 4 a 8 MΩ de resistencia, previamente forjados con calor. Los electrodos se llenaron con la siguiente solución (en mM): 180 de NMDG (N-Metil-D-glucamina), 40 HEPES, 4 MgCl₂, 10 EGTA (etilen-glicol-bis (ámnoetileter)N,N,N, ácido tetracético), 3 Na₂ATP y 0.2 de Na₂GTP; pH 7.2 ajustado con H₂SO₄ y osmolaridad de 270 ± 5 mOsm.

La aplicación de las toxinas se realizó por medio de un sistema de superfusión e intercambio de la solución extracelular.

Para la identificación y caracterización de las corrientes de calcio se usaron: nifedipina a una concentración de 5 μM con el fin de bloquear específicamente las corrientes de calcio tipo L, la ω-Conotoxina GVIA 1 μM que bloquea las corrientes

1000 nM con el fin de inhibir las corrientes de calcio tipo P/Q. El uso de diferentes concentraciones de esta última toxina fue con la finalidad de obtener una curva dosis respuesta la cual nos proporcionó la IC₅₀ (con la cual se obtuvo la concentración de la toxina que es necesaria para inhibir la mitad de la corriente sensible a la ω-Agartoxina TK) y el coeficiente de Hill (con el cual se postuló la existencia de uno o dos canales sensibles a esta toxina), el cual se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\%inhi = \%inhi(max) / (1 + (IC_{50} / [\omega\text{-agaTxTK}]^n))$$

donde: %inhi es igual al % de inhibición incrementado por las diferentes concentraciones de ω-agaTxTK; %inhi (max) es el efecto saturante; EC₅₀ es la mitad del efecto máximo; [ω-agaTxTK] es la concentración de esta toxina y "n" es la pendiente de la función dosis-respuesta, una aproximación del coeficiente de Hill. Los parametros fueron ajustados usando el software comercial Sigma Plot-Jandel, versión 2.0.

Una vez obtenida la inhibición debida a cada una de las toxinas, a la corriente de calcio control se le restó la corriente que es resistente a cada toxina y se obtuvieron las corrientes sensibles para cada una de las toxinas. A estas corrientes sensibles se les determino la permeabilidad membranal estimada como una función del voltaje por medio de la ecuación de corriente constante de Goldman-Hodgking-Katz (Bargas, et al, 1994):

$$I(V_m) = \gamma(V_m) \cdot P(V_m)$$

donde

$$\gamma(V_m) = z^2 \left(\frac{V_m F^2}{RT} \right) \left(\frac{[Ca]_i - [Ca]_e \exp\left(-\frac{zV_m F}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{zV_m F}{RT}\right)} \right)$$

donde $I(V_m)$ = a la corriente transmembranal medida, V_m = potencial de membrana (mV), $z=2$, $F=9.648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$, $R= 8.315 \text{ V C K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T= 273.16 + 20^\circ\text{K}$, $[Ca]_i$ = nominalmente 10 nM, $[Ca]_e = 2 \text{ mM}$, y $P(V_m)$ = permeabilidad membranal al Ca^{2+} o Ba^{2+} como una función del potencial de membrana.

Por otro lado, a los diferentes tipos de corriente de calcio se les determinó su voltaje medio de activación ($V_{1/2}$) y porcentaje de inactivación ante un comando constante (figura 6).

Para conocer la permeabilidad membranal y el voltaje medio de activación de cada tipo de corriente se usaron rampas de voltaje que van desde los -80 mV hasta los 50 mV y comandos de voltaje de -80 mV hasta los 50 mV (estos últimos tuvieron una duración de 30 ms). Por otro lado se aplicaron comandos de voltaje de -80 a -10 mV con una duración de 500 ms, en donde a la corriente control se le resto la corriente resistente a cada uno de los farmacos para obtener la corriente

sensible a cada uno de estos. A estas corrientes sensibles se les determino su porcentaje de inactivación como se ilustra en la figura 6.

El control de voltaje de estos protocolos de estimulación fue controlado por computadora.

Adquisición de datos

Los datos se adquirieron con el programa PCLAMP (CLAMPEX LABMASTER TM100) versión 5.5.

Las gráficas se obtuvieron mediante el uso de los programas Sigma Plot versión 2.0 y Microcal Origin 3.5 y 4.1.

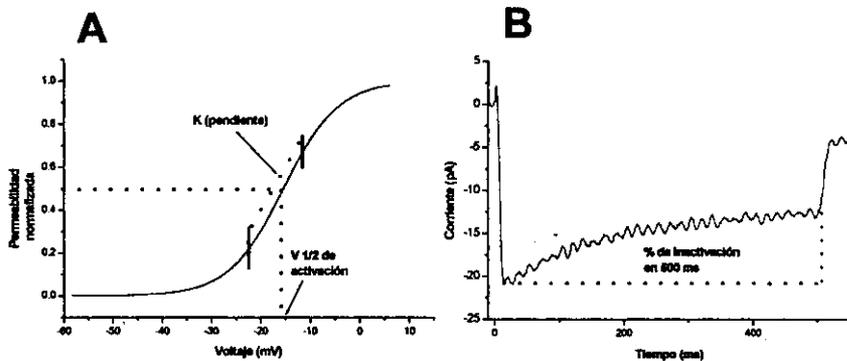


Figura 6. En A se muestra un registro de como se obtiene el $V_{1/2}$ para una corriente de calcio y en B el porcentaje de inactivación a los 500 ms (milisegundos).

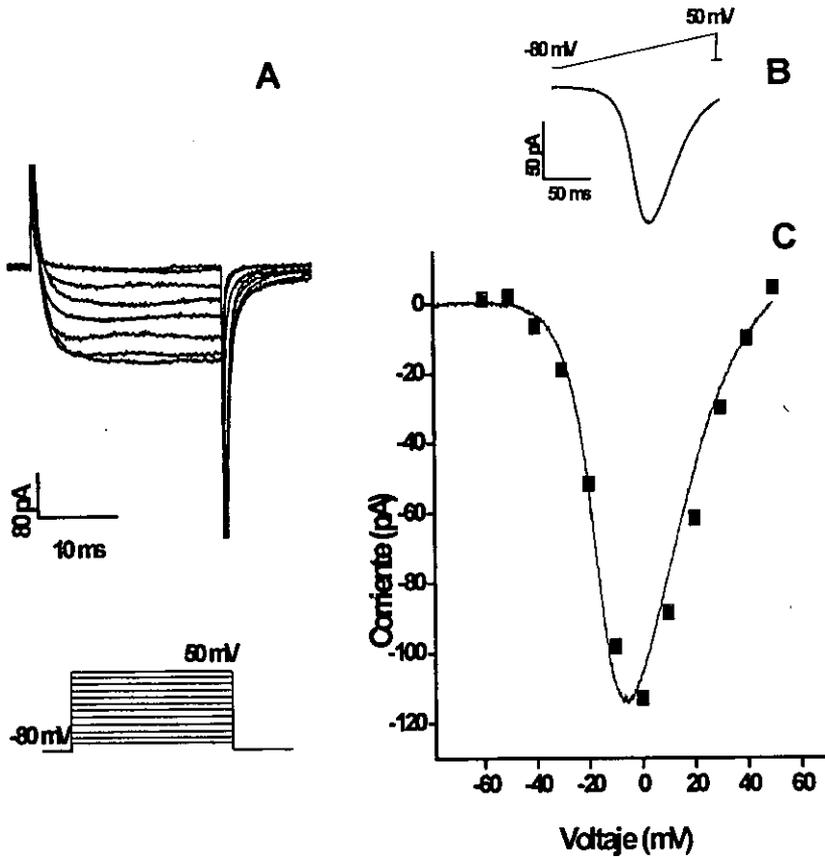
RESULTADOS

Los registros de fijación de voltaje en célula entera se realizan en neuronas neostriatales bipolares de 6-7 pF (picofaradios) de C_N. Estudios previos han demostrado que estas son características de las neuronas espinosas medianas.

La gráfica 1A ilustra corrientes de calcio usando bario como acarreador de carga, típicas de una neurona espinosa mediana. De potenciales de mantenimiento negativos de -80 mV, dando pasos despolarizantes de 10 mV con una duración de 30 ms se provocó la corriente de calcio. Encontrándose en todas las células únicamente corrientes de calcio activadas por alto voltaje. Por otro lado, se utilizaron rampas de voltaje que van desde los -80mV hasta +50 mV (gráfica 1B). Con ambos protocolos de estimulación se muestra que la corriente de calcio tiene dependencia del voltaje. A partir de las corrientes obtenidas por los pasos de voltaje se generó la curva corriente-voltaje (I-V), observándose que su activación es cercana a los -40 mV y alcanzando el pico máximo a los -10 mV. Los datos obtenidos con ambos protocolos pueden sobreponerse, demostrándose que en ambos casos hay un gran parecido (gráfica 1C).

Propiedades farmacológicas de las corrientes de calcio activadas por alto umbral.

En este estudio se caracterizaron biofísica y farmacológicamente las corrientes de calcio activadas por alto voltaje, para lo cual se utilizaron diversos



Gráfica1: La corriente de calcio en las neuronas espinosas medianas usando 5 mM de bario como acarreador de carga (en esta y las gráficas siguientes). (A). Los registros se realizaron con comandos de voltaje en pasos de 10 mV desde -80 a 50 mV. (B). Se muestra la corriente de calcio en respuesta a una rampa de voltaje desde -80 a 50 mV. (C). Se observa la relación corriente-voltaje generada por pasos de voltaje de 10 mV desde -80 a 50 mV sobrepuesta a la corriente generada por una rampa de voltaje.

bloqueadores de los diferentes canales de calcio tales como la nitrendipina (DHP) y las toxinas ω -CgTx GVIA, ω -AgaTx Tk y ω -CgTx MVIC individual y aditivamente.

Efecto del bloqueador nitrendipina sobre la corriente de calcio

La nitrendipina ($5\mu\text{M}$) bloquea canales de calcio tipo L (α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} y α_{1S}) en una gran variedad de neuronas centrales (Hille, 1992; Miller, 1992 y Tsien et al, 1991), incluyendo las del estriado (Bargas et al, 1994; Hoehn et al, 1993). En las neuronas espinosas medianas, $5\mu\text{M}$ de nitrendipina causó un bloqueo parcial de la corriente de calcio obtenida con un protocolo de rampa de voltaje de -80 a $+50$ mV de $25 \pm 3\%$ ($n=11$); en donde n es igual al número de experimentos, como se aprecia en las gráficas 2A y 2B.

Al trazo control se le hizo la sustracción de la corriente resistente a la nitrendipina, obteniéndose la corriente sensible a ésta. Usando la ecuación de corriente constante de Goldman-Hodking y Katz, la relación corriente-voltaje fue convertida a un estimado de la permeabilidad. Esta estimación fue usada para comparar la dependencia de voltaje de las corrientes de calcio. En la gráfica 2C se ilustra la permeabilidad, normalizada a 1, de la corriente de calcio sensible a la nitrendipina (canal tipo L), en donde el voltaje medio de activación fue de -10 ± 3 mV con una K de 6 mV ($n=12$).

Por otro lado, con el protocolo de comandos de voltaje de 500 ms de duración desde los -80 a -10 mV, también se provocó la corriente de calcio. Al trazo control se le hizo la sustracción de la corriente resistente a la nitrendipina,

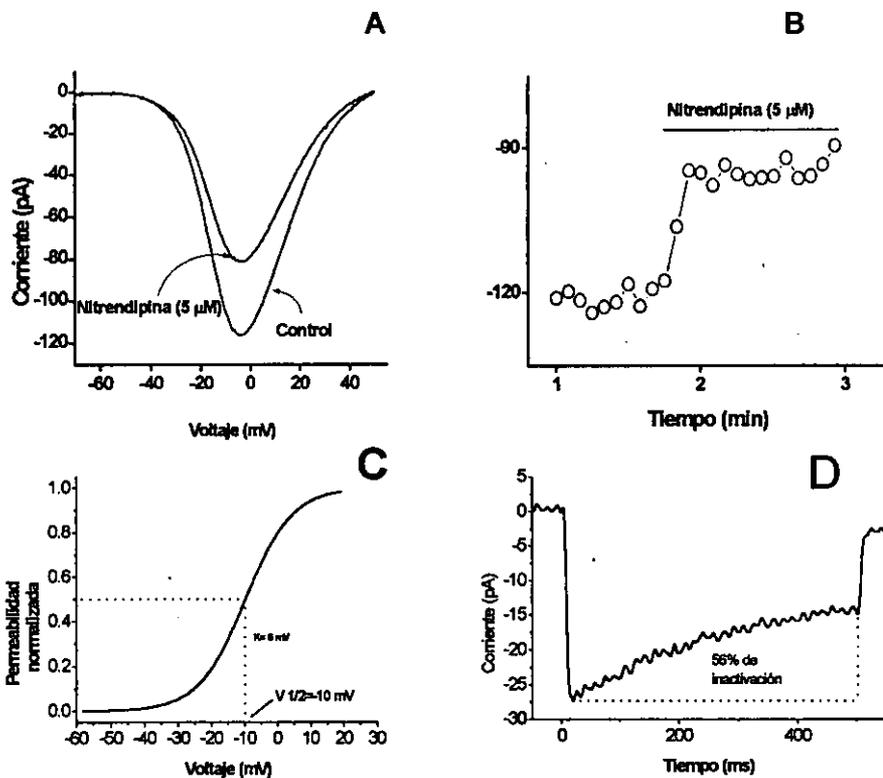
mostrándose la cinética de inactivación de la corriente sensible a esta (gráfica 2D); de donde se obtuvo el porcentaje de inactivación que fue de $56 \pm 7\%$ (n=9).

Efecto de la toxina ω -CgTx GVIA sobre las corrientes de calcio

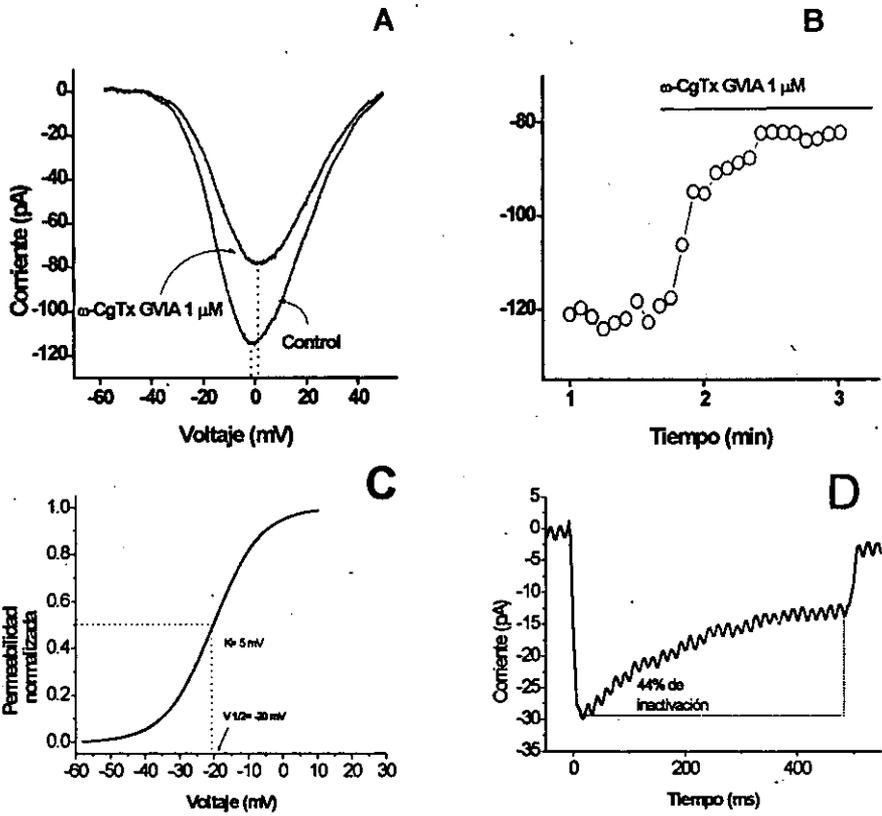
La ω -CgTx GVIA ($1\mu\text{M}$) péptido extraído del caracol marino *Conus geographus*, bloquea los canales de calcio tipo N (α_{1B}) (Kasai et al, 1987; Olivera et al, 1985; Tsien et al, 1991 y Hoehn et al, 1993).

La aplicación de ésta toxina durante la generación de la corriente de calcio por una rampa de voltaje (-80 a +50 mV), disminuye un $41 \pm 10\%$ (n= 6) la corriente total (gráfica 3A); como puede observarse en la gráfica del curso temporal (gráfica 3B).

Una vez obtenida la corriente sensible a la ω -CgTx GVIA ($1\mu\text{M}$) se hizo un estimado de la permeabilidad en donde el valor máximo se tomo como 1 y los valores menores fueron normalizados a este valor, obteniéndose que el voltaje medio de activación de la corriente de calcio tipo N fue de -20 ± 3 mV (n= 5) con una K de 5 mV (gráfica 3C). De la misma manera, con el protocolo de comandos de voltaje de 500 ms de duración se obtuvo el porcentaje de inactivación de ésta corriente fue del $44 \pm 14\%$ (n=5) (gráfica 3D).



Gráfica 2: Aislamiento de la corriente de calcio tipo L. Los registros se obtuvieron aplicando una rampa de voltaje de -80 a 50 mV. (A). La adición de nitrendipina ($5 \mu\text{M}$) bloquea una parte de la corriente de calcio. (B). El curso temporal del bloqueo obtenido con comandos de voltaje de -80 a 50 mV. (C). La permeabilidad normalizada de la corriente sensible a nitrendipina ($5 \mu\text{M}$). Se muestra el voltaje medio de activación de la corriente tipo L ($V_{1/2}$) que es de -10 ± 3 mV ($n=11$). (D). Corriente de calcio sensible a la nitrendipina obtenida por sustracción. Se muestra la inactivación de la corriente de calcio tipo L.



Gráfica 3: Aislamiento de la corriente de calcio tipo N. Los registros se obtuvieron aplicando una rampa de voltaje de -80 a 50 mV. (A). Con la adición de ω -CgTxGVIA ($1 \mu\text{M}$) se bloquea una parte de la corriente de calcio. (B). El curso temporal del bloqueo obtenido por comandos de voltaje de -80 a 50 mV. (C). Permeabilidad normalizada de la corriente sensible a ω -CgTxGVIA ($1 \mu\text{M}$), en donde se muestra el voltaje medio de activación de la corriente tipo N ($V_{1/2}$). (D). Corriente sensible a la ω -CgTxGVIA, en donde se muestra la inactivación de la corriente de calcio tipo N en 500 ms.

Efecto de la toxina ω -AgaTx TK sobre las corrientes de calcio

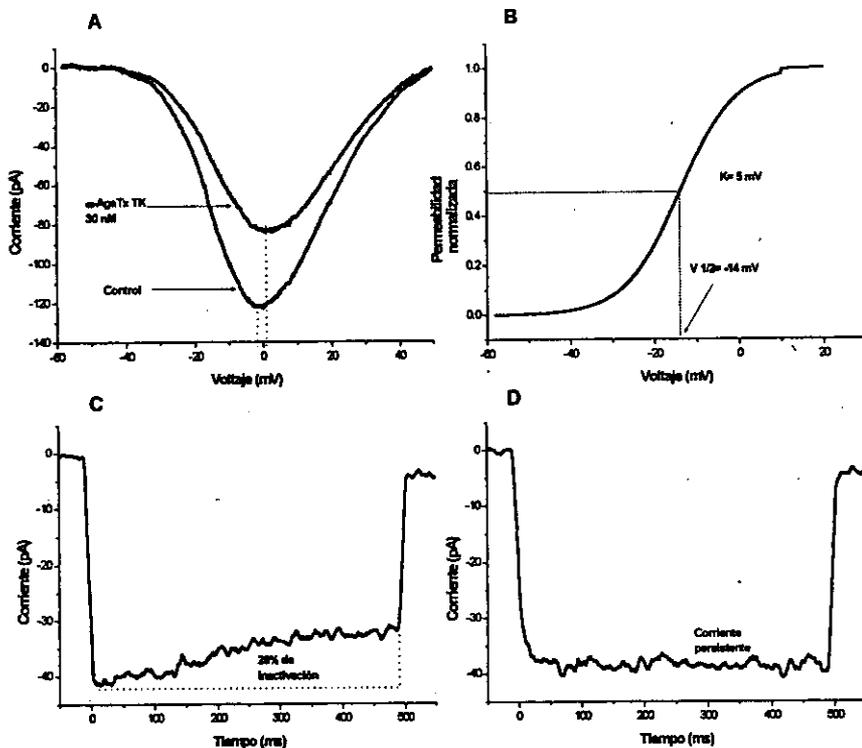
La ω -AgaTx TK es un potente bloqueador ($K_D=30$ nM) de los canales de calcio tipo P (Teramoto, 1995 y 1997), y a altas concentraciones bloquea canales de calcio tipo Q que estan formados por la subunidad α_{1A} (Randall y Tsien, 1995 y Sather et al, 1994).

La gráfica 4A ilustra el efecto producido por la ω -AgaTx TK a una concentración de 30 nM sobre las corrientes de calcio. El bloqueo fue de $23 \pm 3\%$ (n=8).

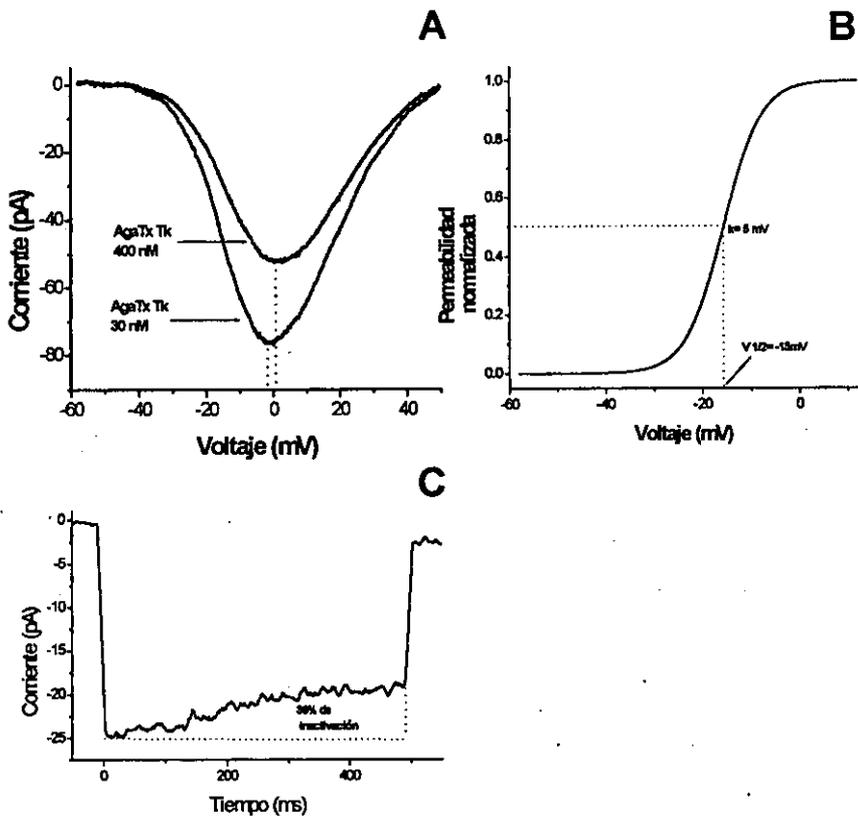
La corriente sensible a la ω -AgaTx TK 30 nM (corriente tipo P) tuvo un voltaje medio de activación de -14 ± 2 mV (n=16) y K de 5 mV (gráfica 4B). Por otro lado, para está corriente se obtuvieron dos tipos de cinéticas de inactivación por el voltaje, una persistente (n=4) y otra que sufre un $28 \pm 10 \%$ de inactivación por el voltaje en 500 ms (n=5) (gráfica 4C y D).

Efecto aditivo de la aplicación de ω -AgaTx TK

Después de la aplicación de 30 nM de ω -AgaTx TK, la misma toxina se aplicó a concentraciones de 400 nM (para bloquear canales tipo Q), observándose un incremento en la inhibición de la corriente de calcio hasta el $41 \pm 4\%$ (n=8) (gráfica 5A). Una vez obtenido el porcentaje de bloqueo, a la corriente resistente a esta toxina a una concentración de 30 nM se le restó la corriente resistente a ω -AgaTx TK (400 nM) con el fin de obtener la corriente sensible (corriente de calcio



Gráfica 4: Aislamiento de la corriente de calcio tipo P. Los registros se obtuvieron aplicando una rampa de voltaje de -80 a 50 mV. (A). Con la adición de ω -AgaTx TK (30 nM) se bloquea una parte de la corriente total de calcio. (B). Permeabilidad normalizada a 1 de la corriente sensible a ω -AgaTx TK (30 nM), (C y D). Corriente sensible a la ω -AgaTx TK, en donde se muestran dos componentes con cinéticas de inactivación de la corriente de calcio tipo P (un componente inactivante y uno persistente).



Gráfica 5: Aislamiento de la corriente de calcio tipo Q. Los registros se obtuvieron aplicando una rampa de voltaje de -80 a 50 mV. (A). Con la adición de ω -AgaTx TK (400 nM) se bloquea una parte de la corriente de calcio. (B). Permeabilidad normalizada a 1 de la corriente sensible a ω -AgaTx TK (400 nM), (C). Corriente sensible a la ω -AgaTx TK, en donde se muestra la cinética de inactivación de la corriente de calcio tipo Q.

tipo Q), la cual tuvo un voltaje medio de activación de -15 ± 1 mV ($n=16$) y K de 5 mV (gráf. 5B) y un porcentaje de $36 \pm 7\%$ ($n=7$) de inactivación por el voltaje (gráfica 5C).

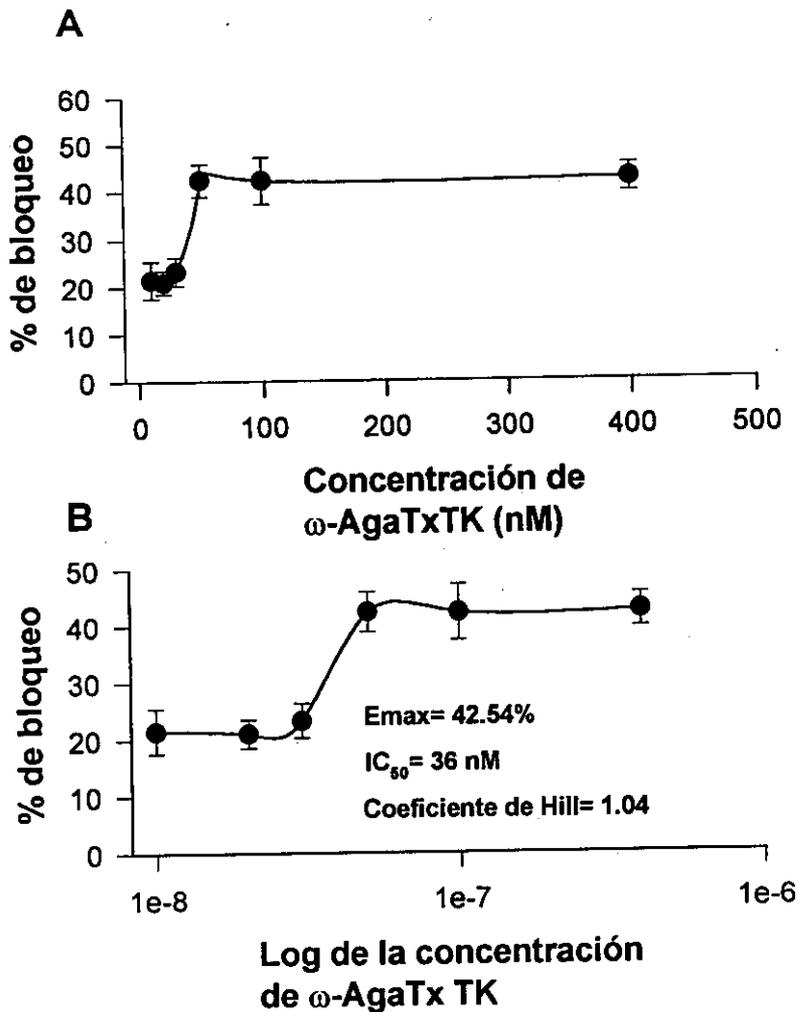
Estos parámetros no son significativamente diferentes con los de la corriente de calcio tipo P. Igualmente, se pudo apreciar que estas corrientes no difieren en su voltaje medio de activación, con lo cual se podría esperar que exista sólo un canal en lugar de dos. Por lo que se prosiguió a hacer una curva dosis respuesta de la ω -AgaTx TK con el fin de obtener los sitios de unión que tiene esta toxina y su IC_{50} .

Los datos obtenidos con la aplicación de 10, 20, 30, 50, 100 y 400 nM, revelan un solo sitio de unión, ya que el coeficiente de Hill para esta toxina fue de 1.04 (no significativamente diferente a 1) y la IC_{50} fue de 36 nM (gráfica. 6). Además, de que el efecto máximo de bloqueo de esta toxina fue de 42.54%.

Efecto del bloqueo por nitrendipina y la toxina ω -CgTx MVIIC juntas sobre las corrientes de calcio

Una vez que se corroboró la existencia de los canales L, N y P/Q, lo que prosiguió fue determinar si en las neuronas espinosas medianas existe el canal tipo R (canal que es resistente a los diferentes bloqueadores de los canales de calcio antes mencionados), para lo cual se aplicó nitrendipina $5\mu\text{M}$ y ω -CgTx MVIIC $1\mu\text{M}$ (que bloquea canales de calcio N y P/Q). Con esta aplicación se pudo observar la

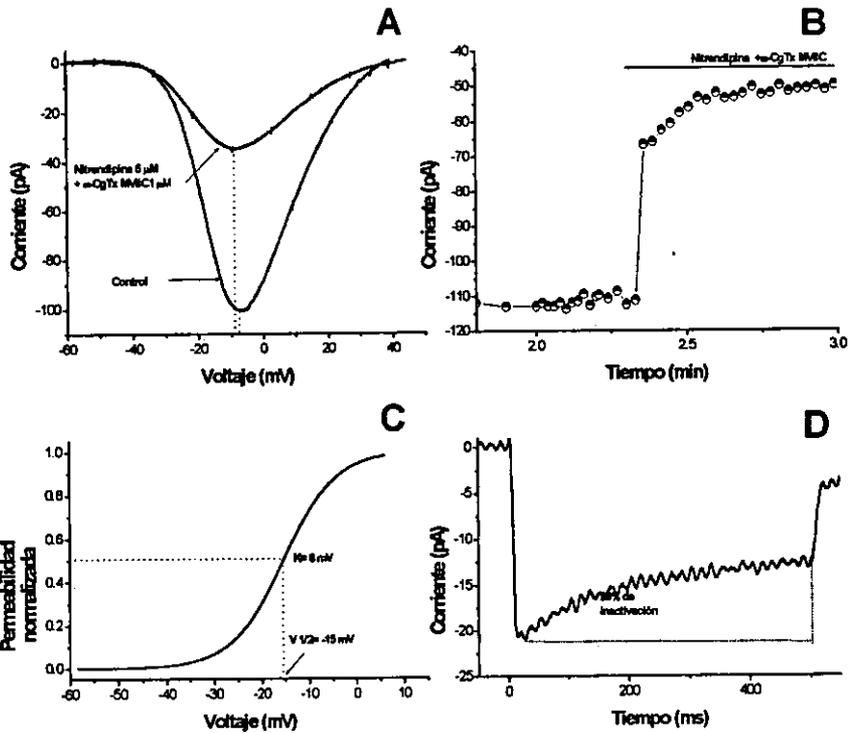
existencia del canal tipo R en estas células, cómo se observa en la gráfica 7A y en la gráfica de curso temporal (gráfica 7B). Esta corriente es cerca del $36 \pm$ del total.



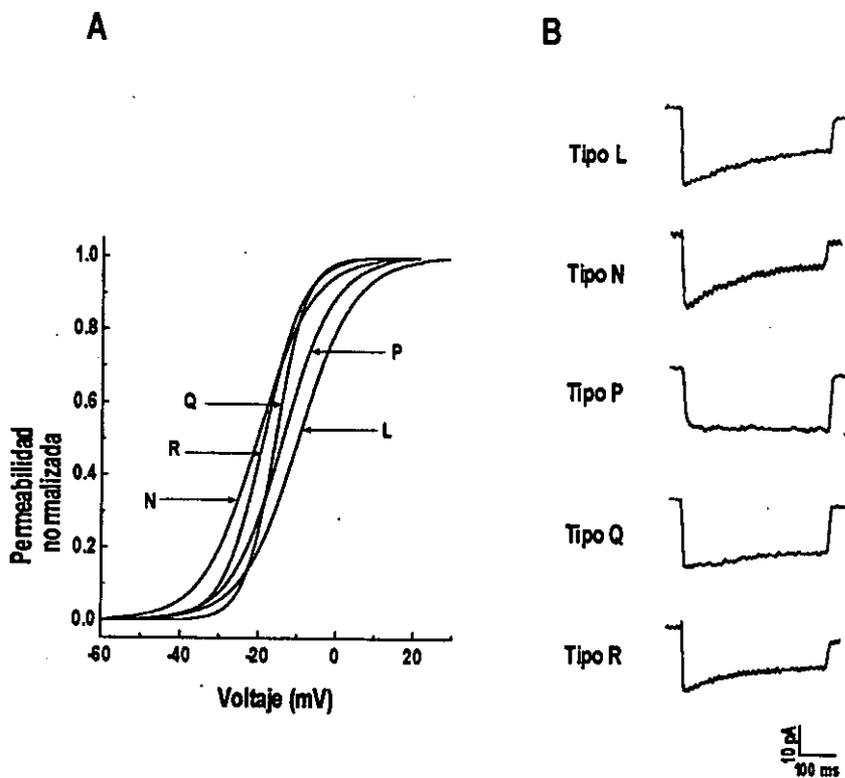
Gráfica 6: (A) Curva dosis-respuesta donde se muestra el efecto de la aplicación de la ω -AgaTx TK sobre la corriente de calcio en las neuronas espinosas medianas. (B) Se ilustra la curva dosis-respuesta derivada de los datos obtenidos usando una escala logarítmica para la dosis. La hipérbola de la gráfica A se transforma en una curva sigmoidea. Emax, efecto máximo; IC_{50} , mitad de la respuesta máxima.

Para esta corriente (tipo R) el voltaje medio de activación fue de -15 ± 4 mV y una K de 6 mV (n=3) y su porcentaje de inactivación a los 500 ms fue de 28 ± 7 (n=3) gráfica 7C y D.

Las cinéticas de activación e inactivación para cada una de las corrientes se ilustran en la gráfica 8. Se observa que la activación media de la corriente de los canales de calcio tipo N es mas negativa (-20 mV) que el de las otras; además, se muestra que las corrientes de tipo L tienen la mas positiva (-10 mV). Sin embargo, estas diferencias no son significativas ($P > 0.05$, ANOVA) para los voltajes medios de activación de las diferentes corrientes de calcio (8A). También, se observan las cinéticas de inactivación de cada una de ellas. En donde la corriente que se inactivo mas fue la de tipo L con un 56%, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0.05$, ANOVA) con las de los tipos N, P, Q y R (gráfica 8B).



Gráfica 7: Aislamiento de la corriente de calcio tipo R. Los registros se obtuvieron aplicando una rampa de voltaje de -80 a 50 mV. (A). Con la adición de nitrendipina ($5 \mu\text{M}$) y ω -CgTx MVIIC ($1 \mu\text{M}$) se bloquea gran parte de la corriente de calcio. (B). La gráfica de curso temporal obtenida por pulsos de voltaje de -80 a 50 mV. (C). Permeabilidad normalizada de la corriente resistente a la nitrendipina ($5 \mu\text{M}$) y ω -CgTx MVIIC ($1 \mu\text{M}$) en donde se muestra el voltaje medio de activación de la corriente tipo R ($V_{1/2}$). (D). Corriente resistente a la nitrendipina y ω -CgTx MVIIC, en donde se muestra la inactivación de la corriente de calcio tipo R.



Gráfica 8. En A se ilustran las cinéticas de activación de las corrientes de calcio de los tipos L, N, P, Q y R. En B se muestran las cinéticas de inactivación para los diferentes tipos de corrientes de calcio presentes en las neuronas espinosas medianas.

DISCUSION

En este estudio se demostró que las neuronas espinosas medianas expresan múltiples tipos de corrientes de calcio, incluyendo corrientes de calcio sensibles a la nitrendipina, la ω -CgTx GVIA, la ω -AgaTx TK y una corriente resistente a todos estos bloqueadores.

La identificación de los tipos de corrientes de calcio activadas por alto voltaje fue basada en su farmacología. En este trabajo se confirmó lo obtenido en otros estudios en donde las diferencias biofísicas entre los diferentes canales de calcio de alto umbral son pocas (Olivera et al, 1994 y Tsien et al, 1991).

Canal de calcio tipo L

La nitrendipina bloquea el 25% de la corriente de calcio, que son similares con las neuronas del núcleo subtálmico en donde representan el 21% de la corriente total de calcio. La corriente sensible a la nitrendipina se inactiva (esta fue del 56% durante un pulso de voltaje de 500 ms de duración) lo que concuerda con la inactivación de la corriente del tipo L en las neuronas piramidales neocorticales que es de 55% en un pulso de voltaje de 2 segundos de duración y difiere de las corrientes de calcio de tipo L examinadas en neuronas centrales, en donde solo se inactiva el 11% (Tsien et al, 1991; Churchill y MacVicar, 1998; Foehring et al. 2000). Estos resultados pueden ser debidos a que las subunidades α_{1C} y α_{1D} esten

interactuando con subunidades auxiliares como la β y la $\alpha_2\delta$, que le estén dando propiedades inactivantes.

El voltaje medio de activación de esta corriente fue de -10 mV, un poco mas positivo que las corrientes de los tipos P/Q y R y que difieren con el voltaje medio de activación de las corrientes tipo L en las neuronas del núcleo subtálmico que es de -20 mV (Song, et al. 2000) y con las neuronas piramidales neocorticales en donde es de -17 mV (Lorenzon y Foehring et al 1995).

Canal de calcio tipo N

Esta corriente es modulada por un gran número de neurotransmisores, incluyendo GABA, acetilcolina, glutamato y dopamina (Anwyl, 1991). Los canales de los tipos N, P/Q, pero no los canales de tipo L, están acoplados a canales de potasio activados por calcio en las neuronas espinosas medianas (Vilchis et al. 2000) y en neuronas motoras (Viana et al. 1993).

La ω -CgTx bloqueo 41 % de la corriente de calcio en las neuronas espinosas medianas. Lo que difiere con la corriente de tipo N expresadas en muchas neuronas centrales, en donde la proporción de ésta corriente es del 20 al 30% del total (Bargas et al. 1994; Cardozo y Bean 1995; Lorenzon y Foehring 1995) y con las neuronas del núcleo subtálmico en donde representan el 52% de la corriente total (Song et al. 2000).

La corriente sensible a esta toxina se inactiva un 44 % durante un pulso de voltaje de 500 ms. Los resultados obtenidos para esta corriente concuerda con lo

reportado en las neuronas piramidales neocorticales y las neuronas del núcleo accumbens donde es aproximadamente del 60% (Churchill y MacVicar, 1998).

El voltaje medio de activación de la corriente del tipo N es de -20 ± 3 mV, poco mas negativo que los de las corrientes de los tipos L, P/Q y R. Esta es similar a las de neuronas del núcleo subtálmico que es de -16 ± 7 mV (Song, et al. 2000) y con las neuronas piramidales neocorticales en donde es de -17 mV (Lorenzon y Foehring et al 1995).

Canales de calcio tipo P y Q

El bloqueo producido por la ω -AgaTx TK a una concentración de 30 nM sobre las corrientes de calcio fue de 23 ± 3 % de inhibición de la corriente total. La corriente sensible a la ω -AgaTx TK (corriente tipo P) tuvo un voltaje medio de activación de -14 ± 2 mV que no difiere de las corrientes de tipo Q que fue de -15 ± 1 mV. Del mismo modo, el voltaje medio de activación de la corriente tipo P es similar a lo reportado en las neuronas piramidales neocorticales que es de -11 ± 3 mV (Lorenzon y Foehring, 1995) y difieren con lo reportado para las neuronas espinosas medianas que es de -7 mV (Mermelstein, 1999).

Para las corrientes de tipo Q su voltaje medio de activación fue de -15 ± 1 mV que es similar a lo encontrado en las neuronas neocorticales que es de -17 ± 2 mV (Lorenzon y Foehring, 1995), en las neuronas del núcleo subtálmico que es de -15 mV (Song et al. 2000) y para las neuronas espinosas medianas en donde es de -15 mV (Mermelstein et al, 1999).

Por otro lado, para las corrientes de tipo P se encontraron 2 cinéticas de inactivación: una persistente y una inactivante ($28 \pm 10 \%$), y que difieren con las cinéticas de inactivación de las corrientes tipo P en las neuronas piramidales neocorticales que es de 63% en un pulso de voltaje con una duración de 2 segundos (Foehring et al. 2000).

La corriente del tipo P que tiene características inactivantes no muestra diferencia significativa con la corriente de calcio tipo Q que fue de $36 \pm 7\%$. Esta última difiere con las de las neuronas piramidales neocorticales que es de 77% (Foehring et al. 2000).

La variabilidad encontrada en las cinéticas de inactivación de la corriente de calcio producida por la subunidad α_{1A} puede ser debida a que esta subunidad presente un procesamiento alternativo que da origen a diferentes tipos de canales de calcio (Tipos P y Q). Además, existe otra explicación que es la coexpresión de la subunidad α_{1A} con diferentes subunidades β y $\alpha_2\delta$, que inducen cambios conformacionales en la subunidad α_{1A} que facilitan el acoplamiento del sensor del voltaje al poro del canal (Nishimura et al, 1993).

Los efectos fisiológicos modulados por las diferentes subunidades β y $\alpha_2\delta$ pueden reflejar distintos estados conformacionales o interacciones únicas que dan como resultado diferentes propiedades para los canales de calcio que son producto de la subunidad α_1 ; dependiendo del tipo neuronal. Cabe mencionar que en algunos cuerpos neuronales se pueden presentar diferentes propiedades en las corrientes de calcio. Asimismo, trabajos recientes han demostrado que las diferentes propiedades biofísicas de los canales de calcio (cinéticas de activación e inactivación, densidad de corriente, etc.) son grandemente afectadas por las

subunidades $\alpha_2\delta$. Sin embargo, para el neocórtex se desconoce que subunidades $\alpha_2\delta$ existen y sólo se conocen las diferentes subunidades β . De las cuales, las que se presentan en mayor proporción son la β_2a y la β_4 , y en menor proporción la β_1b . Las cuales le proporcionan diferentes cinéticas de inactivación a este canal. Por ejemplo, la β_2a le proporciona al canal de calcio cinéticas de inactivación lentas y las corrientes que se producen son tipo P. En cambio las subunidades β_1b y β_4 le confieren una inactivación más rápida.

Dado lo anterior se propone que la corriente de calcio producto de la subunidad α_1A , no es debida a que haya un procesamiento alternativo, sino a que esta subunidad este interactuando con diferentes subunidades β , ya que la curva dosis-respuesta revela un sólo sitio de unión. El coeficiente de Hill para esta toxina fue de 0.9 y la IC_{50} fue de 30 nM. Con estos resultados se puede proponer que la subunidad α_1A en las neuronas espinosas medianas den origen a un solo canal de calcio, el cual probablemente ésta interactuando con diferentes subunidades, β y $\alpha_2\delta$, que le dan diferentes propiedades de inactivación a este canal. Para las neuronas espinosas medianas existen las subunidades β_2a (que le da propiedades de inactivación persistentes y las subunidades β_1b y β_4 que le dan cinéticas de inactivación rápidas).

¿ P, Q o P/Q ?

Los canales P y Q están presentes en una gran cantidad de neuronas del sistema nervioso central, en donde son farmacológica y electrofisiológicamente

distintos. Han sido involucrados en la liberación de neurotransmisores en el cerebro. La naturaleza de la subunidad α_{1A} que forma el poro de estos canales se mantiene sujeta a debate y las aparentes diferencias en las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los canales de calcio tipo P y Q puede ser debida a diferentes isoformas de la subunidad α_{1A} causadas por procesamientos alternativos de un mismo gen o por un procesamiento post-transcripcional.

Alternativamente, la composición de las subunidades del canal de calcio puede alterar sus características funcionales (Stea et al, 1994). Sugiriendo que la subunidad α_{1A} de los canales de calcio de la rata pueden tener propiedades de canales de calcio tipo P o tipo Q dependiendo del tipo de subunidades β y $\alpha_{2\delta}$ que coexpresen (Stea et al, 1994 y Hoborn et al, 2000).

Los primeros acercamientos para determinar la composición de las subunidades de las canales de calcio tipo P/Q mostraron que este canal consiste de al menos una subunidad α_{1A} , una de tres subunidades $\alpha_{2\delta}$ y una de 4 subunidades β y se sugiere que con una asociación de diferentes subunidades β y $\alpha_{2\delta}$, este canal puede tener diferentes propiedades funcionales que le dan las características de canales de calcio de tipo P o de tipo Q (Stea et al, 1994 y Hoborn et al, 2000). Sin embargo, una subdivisión definitiva de los canales de calcio producto de la subunidad α_{1A} , en estos momentos no se puede hacer, ya que una clara distinción entre estos canales requiere aparentemente de mas estudios funcionales los cuales incluyen la identificación exacta de la composición de sus subunidades.

Canal de calcio tipo R

La corriente de tipo L es identificada por su sensibilidad a las DHPs, la de tipo N por ser sensible a la ω -CgTx GVIA y la de los tipos P/Q por su sensibilidad a la ω -AgaTx (Randall y Tsien, 1995). Pero la identificación de la corriente de tipo R es problemática ya que es definida por su resistencia a todos estos bloqueadores. Recientemente se encontró una toxina llamada SNX, la cual bloquea sólo una parte de esta corriente.

La corriente de tipo R es aproximadamente el 36% de la corriente de calcio en las neuronas espinosas medianas. Este porcentaje difiere con el de las neuronas granulosas cerebelares en donde representan del 15 al 20 % (Randall y Tsien, 1995) y las neuronas del núcleo subtálmico que representan el 9%, pero son similares con las del núcleo accumbens donde son aproximadamente el 32% (Churchill y MacVicar, 1998) y con motoneuronas embrionarias en donde representan el 40% de la corriente total (Magnelli et al, 1998).

El voltaje medio de activación de esta corriente fue de -15 mV, un poco mas negativo que las corrientes tipo L y P/Q en estas células (Bargas et al, 1994 y Mermelstein et al, 1999). Voltajes medios de activación mas positivos han sido reportados para ésta corriente en las neuronas granulosas cerebelosas, en donde es aproximadamente de -2 mV (Randall y Tsien, 1997); así como en las neuronas del núcleo accumbens que es cerca de los 0 mV (Churchill y MacVicar, 1998) y en las motoneuronas espinales que es de -6 mV (Magnelli et al, 1998); así como mas negativos en las neuronas del núcleo subtálmico que son de -19 mV.

Importancia funcional de los canales de calcio

Los canales de calcio tipo L se encuentran principalmente localizados en los cuerpos celulares y en dendritas proximales de muchos tipos neuronales (Catterall, 1998). Estos no han sido detectados en alta densidad en las terminales nerviosas, por lo que se ha argumentado que no juegan un papel importante en la liberación del neurotransmisor. Sin embargo, hay evidencia que los canales de tipo L tienen un papel crucial en la regulación de la transcripción génica (Catterall, 1998) y en la generación de una meseta despolarizante que sostiene el disparo repetitivo en neuronas (Hernández-López et al. 1997).

En contraste a los canales de calcio tipo L, los canales N y P/Q están localizados preferencialmente en las terminales nerviosas presinápticas y están involucrados en la liberación del neurotransmisor en una gran cantidad de sinapsis centrales (Randall, 1995; Varadi, 1995 y Catterall, 1998). Estos se colocan con canales de potasio dependientes de calcio en las neuronas espinosas medianas (Vilchis et al. 2000) y en neuronas motoras (Viana et al. 1993), lo que indica su participación en la generación del postpotencial hiperpolarizante en estas células.

Estudios bioquímicos y fisiológicos de los canales de calcio tipo Q han revelado su participación en una gran variedad de funciones celulares. Por ejemplo, los canales tipo Q han sido implicados en la liberación del transmisor (Wheeler et al. 1994). La aceleración de los rangos de inactivación puede resultar en un decremento en la entrada de calcio a la terminal y reducir la liberación del neurotransmisor.

El rango de activación por el voltaje de las corrientes tipo R en células piramidales neocorticales y en las neuronas espinosas medianas facilitan un papel

en la integración sináptica de estas células. Consistentemente, con el papel en la integración sináptica, estos canales están localizados en las dendritas de las neuronas piramidales del hipocampo (Kavalali et al. 1997; Yokoyama et al. 1995). Las corrientes del tipo R contribuyen en los potenciales de acción de calcio en las neuronas granulosas cerebelosas (D' Angelo et al 1997), lo que puede indicar que tengan la misma función en las neuronas espinosas medianas.

CONCLUSIONES

- 1.- La corriente de calcio en las neuronas espinosas medianas se debe a la activación de los canales L, N, P/Q y R, las cuales no presentan diferencias significativas en sus propiedades biofísicas.
- 2.- La curva-dosis respuesta de la ω -AgaTx TK mostró un sólo sitio de unión para ésta con un coeficiente de Hill de 1.04, sugiriendo que existe un sólo canal. Sin embargo, el análisis de la corriente de calcio sensible a ésta toxina presenta dos cinéticas de inactivación (persistente e inactivante). Estos resultados sugieren que la variabilidad en las cinéticas de inactivación de la corriente es debida a que la subunidad α_{1A} este interactuando con diferentes subunidades β y $\alpha_2\delta$ que le confieren distintas propiedades.
- 3.- La presencia de los diferentes tipos de canales de calcio y debido a su participación en diversas funciones celulares, los hace blanco de modulación por los neurotransmisores, lo cual puede generar una gama de respuestas ante un estímulo dado.

BIBLIOGRAFIA

- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* Oct 12:10 366-75.
- Alvarez Maubecin V, Sanchez VN, Rosato Siri MD, Cherksey BD, Sugimori M, Llinás R, Uchitel OD. 1995. Pharmacological characterization of the voltage-dependent Ca^{2+} channels present in synaptosomes from rat and chicken central nervous system. *J Neurochem* Jun 64:6 2544-51
- Angulo MC, Parra P, Dieudonné S. 1998. Chick cerebellar Purkinje cells express omega-conotoxin GVIA-sensitive rather than funnel-web spider toxin-sensitive calcium channels. *Neuroscience* Mar 83:1 1-6.
- Anwyl R. 1991. Modulation of vertebrate neuronal calcium channels by transmitters. *Brain Res Brain Res Rev* Sep-Dec 16:3 265-81.
- Bargas, J., E. Galarraga and D.J. Sumeier. Neuronal networks of the mammalian brain have functionally different classes of neurons: suggestions for a taxonomy of membrane ionic conductances. 1993 En P. Rudomin, M. Arbib, F. Cervantes y R. Romo (comps.), *Neuroscience: From Neuronal Networks to Artificial Intelligence*, Springer-Verlag, heidelberg.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Sumeier DJ. 1994. Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* Nov 14:11 Pt 1 6667-86.
- Bertolino M, Llinás RR. 1992. The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 399-421
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP. 1999. Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* May 2:5 407-15
- Bourinet E, Fournier F, Nargeot J, Chamet P. 1992. Endogenous *Xenopus*-oocyte Ca-channels are regulated by protein kinases A and C. *FEBS Lett* Mar 24 299:1 5-9.
- Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP. 1996. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* Feb 20 93:4 1486-91.
- Bouron A, Soldatov NM, Reuter. 1995. The beta 1-subunit is essential for modulation by protein kinase C of an human and a non-human L-type Ca^{2+} channel. *FEBS Lett* Dec 18 377:2 159-62
- Brodal, P. 1992. *The central Nervous System. Estructure and funcion*. Oxford University Press, Inc. N.Y. Pp 246-261.
- Budde T, Munsch T, Pape HC. 1998. Distribution of L-type calcium channels in rat thalamic neurones. *Eur J Neurosci* Feb 10:2 586-97.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G 1996 The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia *Trends Neurosci* Jan 19:1 19-24
- Catterall WA. 1997. Modulation of sodium and calcium channels by protein phosphorylation and G proteins. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31: 159-81
- Catterall WA. 1999. Interactions of presynaptic Ca^{2+} channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci* Apr 30 868: 144-59

- Catterall WA. 1998. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* Nov-Dec 24:5-6 307-23
- Catterall WA. 1998. Yeasty brew yields novel calcium channel inhibitor [news; comment] *Nat Biotechnol* Oct 16:10 906
- Catterall WA. 1996. Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* Jun 28:3 219-30
- Catterall WA. 1997. Modulation of sodium and calcium channels by protein phosphorylation and G proteins. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31 159-81.
- Catterall, A. W. 1998. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium*. 24 (5/6), 307-323.
- Catterall WA. 1999. Interactions of presynaptic Ca^{2+} channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci* Apr 30 868 144-59.
- Chamet P, Bourinet E, Dubel SJ, Snutch TP, Nargeot J. 1994. Calcium currents recorded from a neuronal alpha 1C L-type calcium channel in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* May 9 344:1 87-90.
- Cherksey BD, Sugimori M, Linás RR. 1991. Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. *Ann N Y Acad Sci* 635: 80-9
- Chesselet, Marie-Francoise and Delfs, M.J.1996. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci.* 19, 417-422.
- Chin H. 1998. Molecular biology of neuronal voltage-gated calcium channels. *Exp Mol Med* Sep 30 30:3 123-30.
- Churchill D, Macvicar BA. 1998. Biophysical and pharmacological characterization of voltage-dependent Ca^{2+} channels in neurons isolated from rat nucleus accumbens. *J Neurophysiol* Feb 79:2 635-47.
- Cox DH, Dunlap K. 1994. Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J Gen Physiol* Aug 104:2 311-36.
- Currie KP, Fox AP. 1997. Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J Neurosci* Jun 15 17:12 4570-9
- Curtis BM, Catterall WA 1985 Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr 82:8 2528-32
- Cunningham MC Shauna, Satoshi M and Hideho H.1998. Presynaptic calcium channels mediating synaptic transmission in submucosal neurones of the guinea-pig. *J. Of physiol.* 509:2:425-435.
- Craig PJ, McAlinsh AD, McCormack AL, Smith W, Beattie RE, Priestley JV, Yip JL, Averill S, Longbottom ER, Volsen SG. 1998. Distribution of the voltage-dependent calcium channel alpha(1A) subunit throughout the mature rat brain and its relationship to neurotransmitter pathways. *J Comp Neurol* Jul 27 397:2 251-67.
- Dolphin AC, Huston E, Scott RH. 1990. Direct and indirect modulation of neuronal calcium currents by G-protein activation. *Biochem Soc Symp* 56 45-60.
- Dunlap, K.; I. L. Jennifer and T. J. Timothy 1995. Exocytic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *TINS.* 18, 2 : 89-98.

- Ellinor PT, Yang J, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. 1995. Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron* Nov 15:5 1121-32
- Ellinor, P. T.; Zhang JF, Randall AD, Zhou M, Schwarz TL, Tsien RW, Home WA et al. 1993. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel *Nature* 363, 455-458.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels [letter] *Neuron* Mar 25:3 533-5
- Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F. 1986. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem* Nov 17 161:1 217-24
- Foehring RC, Paul GM, Wen-Jie S, Sasha U and James S. Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *J. of neurosci.*
- Fossier P, Baux G, Tauc L. 1994. Presynaptic mechanisms regulating Ca²⁺ concentration triggering acetylcholine release at an identified neuro-neuronal synapse of *Aplysia*. *Neuroscience* Nov 63:2 405-14
- Fox AP, Nowycky MC y Tsien RW. 1987. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394, 173-200.
- Fujita Y, Mynlieff M, Dirksen RT, Kim MS, Niidome T, Nakai J, Friedrich T, Iwabe N, Miyata T, Furuchi T. 1993. Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron* Apr 10:4 585-98
- Gray PC, Johnson BD, Westenbroek RE, Hays LG, Yates JR 3rd, Scheuer T, Catterall WA, Murphy BJ. 1998. Primary structure and function of an A kinase anchoring protein associated with calcium channels. *Neuron* May 20:5 1017-26.
- Hille B. 1992. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* Aug 9:2 187-95
- Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinás RR. 1991. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* Aug 15 88:16 7076-80
- Hobom M, Dai S, Marais E, Lacinova L, Hofmann F, Klugbauer N. 2000. Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci* Apr 12:4 1217-26
- Hockerman GH, Peterson BZ, Sharp E, Tanada TN, Scheuer T, Catterall WA. 1997. Construction of a high-affinity receptor site for dihydropyridine agonists and antagonists by single amino acid substitutions in a non-L-type Ca²⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* Dec 23 94:26 14906-11
- Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson BD, Catterall WA. 1997. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 361-96
- Jones OT, Bernstein GM, Jones EJ, Jugloff DG, Law M, Wong W, Mills LR. 1997. N-Type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex, and regional expression. *J Neurosci* Aug 15 17:16 6152-64.
- Jones PL, DeMaria DC y David TY. 1999. N-Type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. *Biophysical Journal*. 76: 2530-2552.

Kaneko S, Akaike A, Satoh M. 1998. Differential regulation of N- and Q-type Ca^{2+} channels by cyclic nucleotides and G-proteins. *Life Sci* 62:17-18 1543-7.

Josephson IR, Varadi G. 1996. The beta subunit increases Ca^{2+} currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J* Mar 70:3 1285-93

Kalivas PW, Nakamura M. 1999. Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* Apr 9:2 223-7

Kasai H, Aosaki T, Fukuda J. 1987. Presynaptic Ca-antagonist omega-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci Res* Feb 4:3 228-35

Katz AM. 1992. Molecular basis of calcium channel blockade. *Am J Cardiol* Apr 30 69:13 17E-22E.

Kawaguchi, T. 1995. Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13:4908-4923.

Lemos JR, Ocorr KA, Nordmann JJ. 1989. Possible role for ionic channels in neurosecretory granules of the rat neurohypophysis. *Soc Gen Physiol Ser* 44: 333-47

Levitan IB. 1994. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu Rev Physiol* 56 193-212.

Lin MJ, Lin-Shiau SY. 1997. Multiple types of Ca^{2+} channels in mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* Apr 9:4 817-23.

Llinás, R.R., Sugimori, M., Cherksey, B. 1989. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann NY Acad Sci*; 560:103-111.

Llinás R, Moreno H. 1998. Local Ca^{2+} signaling in neurons. *Cell Calcium* Nov-Dec 24:5-6 359-66

Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. 1992. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca^{2+} channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* Sep 15:9 351-5.

Lorenzon NM, Foehring RC. 1995. Alterations in intracellular calcium chelation reproduce development differences in repetitive firing and afterhyperpolarizations in rat neocortical neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 16 84:2 192-203

Lovinger, D.M. and E. Tyler. 1996. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Int. Rev. Neurobiol.* 50:381-425.

Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F. 1997. Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* Feb 15 17:4 1339-49.

McBurney RN, Daly D, Fischer JB, Hu LY, Subbarao K, Knapp AG, Kobayashi K, Margolin L, Reddy NL, Goldin SM. 1992. New CNS-specific calcium antagonists. *J Neurotrauma* May 9 Suppl 2 S531-43.

Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. 2000. Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* Jan 1 20:1 266-73

- Mermelstein PG, Foehring RC, Tkatch T, Song WJ, Baranauskas G, Surmeier DJ. 1999. Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with beta subunit expression. *J Neurosci* Sep 1 19:17 7268-77
- Miljanich GP, Ramachandran J. 1995. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35 707-34.
- Miller RJ. 1992. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 267, 1403-1406.
- Mink, J.W. 1996. The basal ganglia: Focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.* 50:381-425.
- Mintz, I.M., Adams, M.E., Bean, B.P. 1992. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*;9:85-95.
- Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, Lory P, Nargeot J. 2000. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem* Jun 2 275:22 16530-5
- Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J. 2000. Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* Mar 3 275:9 6090-100
- Morel JL, Hugues M. 1998. The role of peptidic toxins in the pharmacological approach of the diversity of calcium channels] *C R Seances Soc Biol Fil* 192:3 549-66.
- Moreno H, Rudy B, Llinás R beta subunits influence the biophysical and pharmacological differences between P- and Q-type calcium currents expressed in a mammalian cell line [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 3;95(5):2714] *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Dec 9 94:25 14042-7
- Moreno Davila H. 1999. Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. *Ann N Y Acad Sci* Apr 30 868 102-17.
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. 1996. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* Oct 72:2 83-109
- Murakoshi T, Tanabe T . 1997. [Ca²⁺ channels in the central nervous system]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* May 109:5 213-22.
- Namkung Y, Smith SM, Lee SB, Skrypnik NV, Kim HL, Chin H, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS. 1998. Targeted disruption of the Ca²⁺ channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca²⁺ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca²⁺ channels in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* Sep 29 95:20 12010-5
- Nicoll, R. R. 1989. " The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system functions", *Science* 242: 1654-1664.
- Protti DA, Sanchez VA, Cherksey BD, Sugimori M, Llinás R, Uchitel OD. 1993. Mammalian neuromuscular transmission blocked by funnel web toxin. *Ann N Y Acad Sci* Jun 21 681: 405- 7
- Qian J, Saggau P. 1997. Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Br J Pharmacol* Oct 122:3 511-9
- Parent, A. and L. Hazrati. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Review.* 20: 91-127.

- Perez-Reyes, E. 1998. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J. Bioenerg Biomembr.* 30 : 4 313-318.
- Perez-Reyes E, Schneider T. 1995. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* Oct 48:4 1111-24
- Randall, A. Tsien, R.W. 1995 Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci*; 15:2995-3012.
- Randall AD, Tsien RW. 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* Jul 36:7 879-93
- Richard S, Lory P, Bourinet E, Nargeot J. 1998. Molecular physiology of human cardiovascular ion channels: from electrophysiology to molecular genetics. *Methods Enzymol* 293 71-88.
- Rusin KI, Moises HC. 1998. Mu-opioid and GABA(B) receptors modulate different types of Ca^{2+} currents in rat nodose ganglion neurons. *Neuroscience* Aug 85:3 939-56
- Saggau P, Gray R, Dani JA. 1999. Optical measurements of calcium signals in mammalian presynaptic terminals. *Methods Enzymol* 294: 3-19
- Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Tsien RW. 1994. Biophysical and pharmacological characterization of a class A calcium channel. *Ann N Y Acad Sci* Dec 15 747: 294-301
- Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. 1993. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (B1) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* Aug 11:2 291-303
- Sinha SR, Wu LG, Saggau P. 1997. Presynaptic calcium dynamics and transmitter release evoked by single action potentials at mammalian central synapses. *Biophys J* Feb 72:2 Pt 1 637-51
- Smith SM, Piedras-Rentería ES, Namkung Y, Shin HS, Tsien RW. 1999. Neuronal voltage-activated calcium channels: on the roles of the alpha 1E and beta 3 subunits. *Ann N Y Acad Sci* Apr 30 868: 175-98
- Smith AD, Bolam JP. 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* Jul 13:7 259-65
- Smith AB, Cunnane TC. 1997. Multiple calcium channels control neurotransmitter release from rat postganglionic sympathetic nerve terminals. *J Physiol (Lond)* Mar 1 499 (Pt 2) 341-9.
- Smith, Y.; M.D. Devan; E. Shink and J.P. Bolam. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci.* 86:353-387.
- Snutch TP, Reiner PB. 1992. Ca^{2+} channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol* Jun 2:3 247-53.
- Song WJ, Yosuke B, Takeshi O and Fujio M. 2000. Characterization of Ca^{2+} channels in rat subthalamic nucleus neurons. *J. of Neurosci.*
- Stea A, Tomlinson WJ, Soong TW, Bourinet E, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP. 1994. Localization and functional properties of a rat brain alpha 1A calcium channel reflect similarities to neuronal Q- and P-type channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* Oct 25 91:22 10576-80.
- Stocker JW, Nadasdi L, Aldrich RW, Tsien RW. 1997. Preferential interaction of omega-conotoxins with inactivated N-type Ca^{2+} channels. *J Neurosci* May 1 17:9 3002-1

Strauss O, Mergler S, Wiederholt M. 1997. Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASEB J Sep 11:11 859-67.*

Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ, Glossmann H. 1998. Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci Mar 19:3 108-15.*

Surmeier DJ, Seno N, Kitai ST. 1994. Acutely isolated neurons of the rat globus pallidus exhibit four types of high-voltage-activated Ca²⁺ current. *J Neurophysiol Mar 71:3 1272-80.*

Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Naim AC, Greengard P. 1995. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron Feb 14:2 385-97.*

Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S 1987 Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature Jul 23-29 328:6128 313-8*

Teramoto T, Niidome T, Kimura M, Ohgoh M, Nishizawa Y, Katayama K, Mayumi T, Sawada K. 1997. A novel type of calcium channel sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res May 9 756:1-2 225-30.*

Tomlinson WJ, Stea A, Bourinet E, Charvet P, Nargeot J, Snutch TP. 1993. Functional properties of a neuronal class C L-type calcium channel. *Neuropharmacology Nov 32:11 1117-26.*

Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A. 1995. Reflections on Ca²⁺ channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci Feb 18:2 52-4*

Tsien RW, Ellinor PT, Home WA. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci Sep 12:9 349-54*

Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinás R. 1992. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A Apr 15 89:8 3330-3*

Usovich MM, Sugimori M, Cherksey B, Llinás R. 1992. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron Dec 9:6 1185-99*

Varadi, G.; Mori, Y.; Mikala, G. and Arnold, S. 1995. Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drug action. *TIPS. 16: 43-49.*

Varadi G, Strobeck M, Koch S, Caglioti L, Zucchi C, Palyi G. 1999. Molecular elements of ion permeation and selectivity within calcium channels. *Crit Rev Biochem Mol Biol 34:3 181-214*

Viana F, Hille B. 1996. Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. *J Neurosci Oct 1 16:19 6000-11*

Wheeler DB, Sather WA, Randall A, Tsien RW. 1994. Distinctive properties of a neuronal calcium channel and its contribution to excitatory synaptic transmission in the central nervous system. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 29: 155-71*

Wilson, C. 1998. The basal ganglia. En: Shepherd, G.M. (ed) *The synaptic organization of the brain. 4^a Ed. Oxford University Press. N.Y. Pp 329-375.*

Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA. 1998. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci Aug 15 18:16 6319-30*

Wu LG, Westenbroek RE, Borst JGG, Catterall WA, Sakmann B. 1999. Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* Jan 15 19:2 726-36

Wu LG, Saggau P. 1997. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* May 20:5 204-12

Wu LG, Westenbroek RE, Borst JGG, Catterall WA, Sakmann B. 1999. Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* Jan 15 19:2 726-36.

Yamaguchi H, Muth JN, Varadi M, Schwartz A, Varadi G. 1999. Critical role of conserved proline residues in the transmembrane segment 4 voltage sensor function and in the gating of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* Feb 16 96:4 1357-62

Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit [see comments] *Nature* Jan 30 385:6615 442-6.