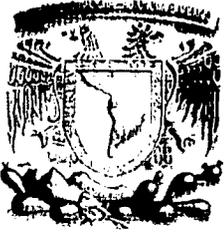


00591

16

UNAM
POSGRADO 



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

*Tesis que para obtener el grado
de Doctora en Ciencias
(Bioquímica) presenta:*

Sheyla Vianey Mejia Gervacio

**Título: Interacción Funcional de Canales de
Ca²⁺ en motoneuronas espinales: Implicaciones
para los potenciales de meseta y el Windup**

Tutor: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Septiembre, 2003



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Mauricio Díaz Muñoz en el laboratorio de Neurobiología celular, en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM
Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Instituto de Neurobiología, UNAM
Dr. Luis Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El proyecto fue apoyado parcialmente por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN200500). Y PAEP-UNAM (103331, 203318 y 103334). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Luis Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Elvira Galárraga Palacio	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Juan Carlos Gómora	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Arturo Hernández Cruz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Jorge Ramírez Salcedo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A PAPÁ

Por tu confianza, por tu amistad, por la fuerza de tu espíritu y tu forma crítica
de ver la vida, que hacen tanta falta.
Porque viviste para dejarnos huellas.
Porque tu alegría nunca se escape de mí...

A Mamá por su original forma de ser madre y amiga, porque siempre estas a mi lado.

A Abraham por enriquecer mi vida y tratar de entender quienes somos.

A ambos por compartir nuestra historia y nuestra amistad.

AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Irma Bernal, Elvira Galárraga, Marina Gavilanes, Juan Carlos Gómora, Arturo Hernández, Marcia Hiriart, Jorge Ramírez y Luis Vaca, por sus excelentes comentarios durante el desarrollo del presente trabajo y por mejorar sensiblemente el texto de esta tesis.

Agradezco al Dr. Mauricio Díaz la dirección del presente trabajo y la dedico con cariño por su gran calidad humana, por su amistad, por su excepcional apoyo, pero principalmente por vivir y compartir el cariño al conocimiento. ¡Gracias por las experiencias de todos estos años!

A los de siempre Karina Simon, Constanza Alcaraz, Diana Posadas y Enrique Pérez-Garci, porque la distancia no necesariamente es el olvido. Por los irrepetibles momentos. Por su enorme amistad y por crecer conmigo a partir de nuestras alegrías y tristezas de tantos años ... y por los que vienen.

A César Casaola, también de siempre, por las bromas, la cercanía y la extrañísima geometría de nuestra amistad. Por la constancia de un cariño que ha sido importante por años.

A Rogelio Arellano, por su inquietud contagiosa, por su cariño, por su apoyo, y por nuestras interminables discusiones de las que siempre surgieron ideas.... algunas buenas.

A mis compañeros y amigos Esther Talavera, Olivia Vázquez, Rafael Cañedo y Verónica Morales por tanto pasteles y por hacer de la vida diaria una oportunidad para conocerlos. ¡Ha sido un placer!

A Rafael Gutiérrez por la excelente amistad que hemos ido formando y transformando a través del tiempo.

A Carla Santana por su amistad, por tantas risas, por el puente de comunicación que establecimos. A Gino Noris por su amistad.

A Jorge Pérez-León por todos los momentos de relajantes risotadas, por el beneficio de una amistad que se siente presente de manera constante.

A la UNAM.

Agradezco también:

A Fernando López por su valiosísima asesoría computacional.

A Pilar Galarza por su excelente apoyo desde la biblioteca del INB.

A Martín García por el cuidado de las tortugas.

A Leticia García por su excelente apoyo desde la coordinación del posgrado.

ÍNDICE

DEDICATORIAS3
AGRADECIMIENTOS5
ÍNDICE7
RESUMEN8
ABSTRACT9
ABREVIATURAS10
ANTECEDENTES11
Señalización por Ca ²⁺11
El Ca ²⁺ y la plasticidad Neuronal21
Patrones de actividad neuronal mediados por Ca ²⁺24
Potenciales de meseta y <i>windup</i>25
OBJETIVOS37
HIPÓTESIS37
METODOLOGÍA37
Sujetos37
Obtención de Rebanadas38
Electrofisiología en Rebanadas38
Soluciones y fármacos38
Análisis de resultados (electrofisiología)39
Microscopía Confocal40
Marcaje retrógrado de motoneuronas40
Procesamiento de tejido para microscopía confocal41
Obtención de imágenes de microscopía confocal41
Análisis de resultados (microscopía confocal)41
Determinaciones Bioquímicas41
Ensayo de unión específica de ligandos41
Actividad ATPasa de Ca ²⁺42
Análisis de resultados42
(determinaciones bioquímicas)42
RESULTADOS43
Electrofisiología en Rebanadas43
Potenciales de meseta43
Disminución de los niveles de Ca ²⁺ citoplásmico.....43	
Manipulación farmacológica de calmodulina44
Manipulación farmacológica de los receptores	
sensibles a ryanodina44
Manipulación farmacológica de los receptores	
sensibles a InsP ₃49
<i>Windup</i>51
Determinaciones Bioquímicas52
Microscopía Confocal53
DISCUSIÓN57
PERSPECTIVAS60
BIBLIOGRAFIA65
ANEXOS: ARTÍCULOS PUBLICADOS72

RESUMEN

La señalización dependiente de calcio es importante para varios procesos neuronales. Por su versatilidad permite a las neuronas el inicio de patrones de actividad, que incrementan sus posibilidades de procesamiento en respuesta a tipos de estimulación específicos. En la presente tesis se investigó el papel del calcio intracelular en la generación de dos tipos de patrones de actividad que dependen de canales de calcio sensibles a voltaje tipo L y que se presentan en motoneuronas espinales en la tortuga: los potenciales de meseta y el *windup*.

Se investigaron los efectos de la disminución en los niveles intracelulares de calcio, y de la manipulación farmacológica de la calmodulina, de la fosfolipasa C y de los receptores sensibles a inositol trifosfato (InsP_3) y a ryanodina en la generación de los potenciales de meseta y el *windup*. Estos fenómenos fueron estudiados mediante el registro electrofisiológico intracelular en una preparación *in vitro* de rebanadas de la sección lumbar de médula espinal de tortuga que permite la inyección de pulsos de corriente

En un grupo de neuronas la sola inyección de pulsos de corriente despolarizante producía potenciales de meseta, que consistían en una despolarización que crece gradualmente en amplitud hasta formar una meseta, lo que produce una aceleración de la descarga neuronal. Algunas de las neuronas de este grupo también presentaban *windup*, que consiste en incrementos sucesivos de la magnitud de los potenciales de meseta activados por estimulación despolarizante repetitiva que produce en consecuencia, incrementos en la frecuencia de disparo asociada a cada estimulación. En otros grupos de células los potenciales de meseta y el *windup* fueron facilitados por la aplicación de agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGlu I), de receptores muscarínicos o de un activador de los canales de calcio tipo L. Se observó que la disminución de los niveles citoplásmicos de calcio, así como el bloqueo de calmodulina disminuyen de manera reversible a los potenciales de meseta tanto facilitados como no facilitados. Por otro lado, el bloqueo de receptores sensibles a ryanodina eliminó ambos tipos de potenciales de meseta y el *windup* de manera no reversible; y la inactivación de la vía de señalización dependiente de InsP_3 inhibió preferencialmente los potenciales de meseta facilitados por la activación de receptores mGlu I y muscarínicos y algunos de los no facilitados, pero no los facilitados por la activación de canales tipo L. Estos resultados sugieren que la elevación en los niveles de calcio citoplásmico es parte de los mecanismos que inducen potenciales de meseta y *windup*, que la actividad de los receptores sensibles a ryanodina es necesaria para generar ambos fenómenos; mientras que los receptores sensibles a InsP_3 participan en mecanismos de modulación y que un posible mecanismo para la facilitación de la actividad de los canales L por calcio implica a la calmodulina.

ABSTRACT

Calcium signaling is relevant for various neuronal processes. Its versatility endows the neurons with the possibility to display several activity patterns that increase their potential to process stimulus. In the present thesis we addressed the role of intracellular calcium signaling mechanism on the generation of two types of neuronal patterns, dependent on L-type calcium channels activity, which are present in spinal motoneurons in the turtle: plateau potentials and *windup*.

The roles of calmodulin, phospholipase C as well as inositol triphosphate (InsP₃) and ryanodine sensitive receptors were addressed on an *in vitro* preparation of turtle lumbar spinal cord slices. Plateau potentials and *windup* were induced through the intracellular injection of depolarizing current pulses, during the intracellular electrophysiological recording in lumbar turtle spinal cord slices.

Groups of cells in which the sole application of depolarizing pulses produced plateau potentials and *windup* were studied. Plateau potentials consisted in a cumulative depolarization produced by continuous stimulation, the cumulative depolarization produced an acceleration of the discharge frequency. Some of these cells also presented *windup*, which consisted in successive increases in the magnitude of cumulative depolarization associated to plateau potentials activation produced by repetitive stimulation, which in consequence produced successive increases in the discharge frequency associated to each stimulation pulse. In other groups of cells plateau potentials and *windup* were facilitated by metabotropic agonists for glutamate (mGlu I), muscarinic receptors or an agonist for L-type calcium channels.

Both, the diminution in the cytoplasmic calcium concentration and the blockade of calmodulin reversibly reduced plateau potentials either facilitated or non-facilitated. Meanwhile, the inactivation of ryanodine receptors eliminated both kinds of plateau potentials and *windup* in an irreversible manner; the inactivation of InsP₃ signaling pathway preferentially inhibited plateau potentials when facilitated by mGlu I or muscarinic receptors and some non-facilitated plateaux, but not the ones facilitated through L-type calcium channels activation. The results suggest that cytoplasmic calcium increase is part of the mechanisms for the generation of plateau potentials and *windup*, also that the activity of ryanodine receptors is necessary for the generation of both phenomena; meanwhile InsP₃ receptors are involved in modulatory mechanisms. Finally, the results also suggest that one possible mechanism for L-type calcium channels facilitation by calcium involves calmodulin activity.

ABREVIATURAS

AP5	(+/-)-2-amino-5 ácido pentanoico
AP7	(+/-)-2-amino-7 ácido pentanoico
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2.3-diona
[Ca ²⁺] _c	Concentración citoplásmica de calcio
2-APB	2-Aminoetoxidifenil borato
AMPA	Alpha-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-ácido propionico
Bapta	1-2, (2-Aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético.
Ca ²⁺	Calcio
CaBP	Proteínas que unen calcio. " <i>Calcium binding proteins</i> "
CAN	Canales cationicos no específicos
FRET	Transferencia de energía de resonancia por fluorescencia.
GFAP	Proteína glial fibrilar
InsP ₃	Inositol trifosfato
InsP ₃ R	Receptores sensible a inositol trifosfato
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
mGluI	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I
NF	Neurofilamentos
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Solución salina amortiguadora
PIP ₂	Bifosfato de inositol
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática.
RE	Reticulo endoplásmico
RyaR	Receptores sensibles a ryanodina
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del reticulo endoplásmico.
SNARE	Receptores de unión al factor soluble, sensible a N-metilmalimida
SOC	Canales operados por vaciamiento " <i>store operated channels</i> "
TRP	" <i>Transient receptor potential</i> "

ANTECEDENTES

El Ca^{2+} es un reconocido segundo mensajero que interviene en una gran gama de vías metabólicas y funciones celulares. En el sistema nervioso, la señalización mediada por Ca^{2+} regula funciones como la excitabilidad neuronal, la síntesis y la liberación de neurotransmisores y la determinación de patrones de actividad neuronal en diversas áreas del sistema nervioso (Kamiya y Zucker, 1994; Lledo, 1997; Cochilla y Alford, 1998; Hanse y Konnert, 1998). El interés del presente proyecto esta centrado en estudiar la participación de la señalización por Ca^{2+} en la regulación de dos tipos de patrones de actividad que se conocen como potenciales de meseta y *windup*, generados por grupos de neuronas localizadas en las astas ventrales de la médula espinal. Ambos fenómenos se consideran mecanismos de plasticidad neuronal, debido a que su activación modifica las propiedades de integración de la información aferente y la respuesta postsináptica.

Señalización por Ca^{2+}

El Ca^{2+} es un versátil mensajero con diversos sitios de acción en la célula; esto le confiere una compleja variedad de acciones de señalización con diferentes escalas temporales. La afinidad de los diversos sitios que unen Ca^{2+} es uno de los factores que determinan la activación de procesos fisiológicos dependientes de este ión. Por esta razón, los mecanismos de señalización por Ca^{2+} dependen de variaciones en su concentración citoplásmica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). En condiciones de reposo la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es baja, de alrededor de 100 nM. por diferentes mecanismos la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ puede súbitamente incrementarse hasta 100 veces -1-10 μM - (Evenas y cols., 1998) (Fig. 1) y activar o inactivar proteínas implicadas con la regulación de funciones fisiológicas en las neuronas. La duración de estas elevaciones está regulada por mecanismos que de manera activa o inactiva regresan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a sus niveles de reposo.

En las neuronas, como en otros sistemas el Ca^{2+} se puede unir a proteínas efectoras (ej. canales iónicos), o a proteínas que forman parte de una cascada de señalización (ej. la unión a calmodulina) (Swandulla y Zeilhofer, 1998). La diversidad de proteínas activadas por el Ca^{2+} , permiten que el rango temporal de las acciones de este ión pueda ir desde la activación o inactivación de canales iónicos en la membrana plasmática, por unión directa de Ca^{2+} a sitios de reconocimiento (milisegundos) hasta la transcripción de proteínas por sus acciones sobre factores de transcripción a nivel nuclear (horas) (Santella y Carafoli, 1997; Dolmetsch y cols., 1998, 2001) (Fig. 2).

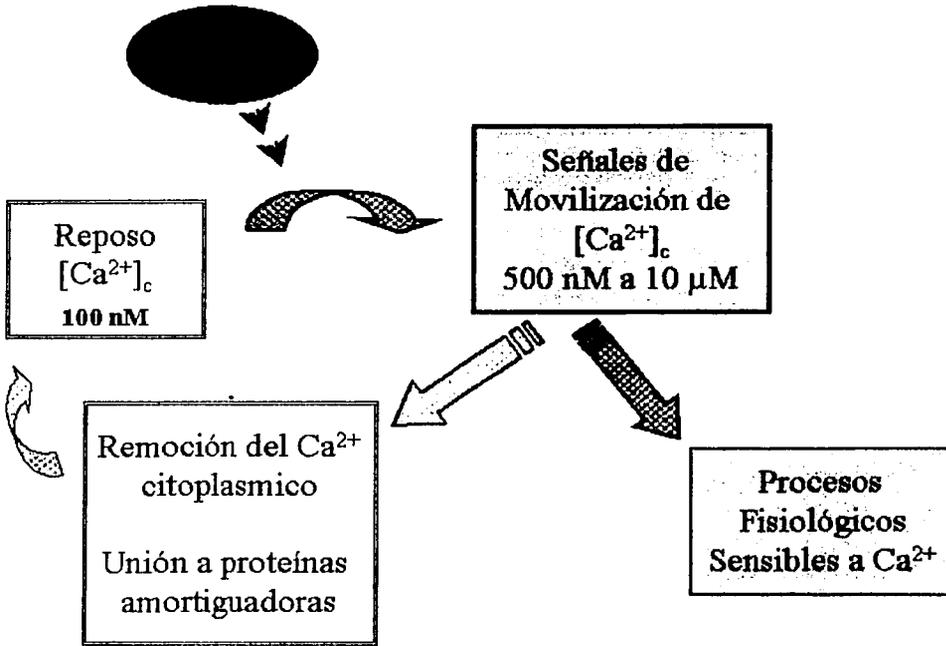


Fig. 1. *Proceso de regulación de la $[Ca^{2+}]_c$* . Esquema que representa que la activación de mecanismos de movilización de Ca^{2+} produce a su vez la activación de procesos fisiológicos sensibles a este ión, así como la activación de mecanismos que tienden a revertir estas súbitas elevaciones citoplásmicas.

En la membrana plasmática existen diversos tipos de canales que movilizan Ca^{2+} . Estos canales iónicos pueden ser altamente selectivos o bien del tipo de canales catiónicos no exclusivamente selectivos para este ión (Swandulla y Zeilhofer, 1998). Los canales de Ca^{2+} pueden ser activados por diferentes señales. De acuerdo con este criterio, los canales pueden ser divididos en:

A) Canales asociados a receptores que reconocen **ligandos**. Éstos pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos.

En las neuronas la principal fuente de Ca^{2+} extracelular son canales asociados a receptores sensibles a glutamato, de los cuales los *ionotrópicos* se clasifican, por la composición de sus subunidades, por las propiedades de los canales y por su afinidad a los siguientes fármacos en receptores sensibles a Alpha-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-ácido propionico (AMPA), kainato y N-metil-d-Aspartato (NMDA) (Madden, 2002). Estos

canales están formados por homo y heteroligómeros que al unirse forman un poro iónico que permite el paso del Ca^{2+} (Fig. 3). Los receptores ionotrópicos se encuentran en localizaciones pre y postsinápticas en el sistema nervioso y son responsables junto con otros canales ionotrópicos de los cambios en el potencial de membrana que ocurren como consecuencia de la transmisión sináptica. Su actividad en las neuronas depende de factores tales como la presencia y la concentración de glutamato en el espacio sináptico y de la cinética de activación y desensibilización del canal formado (Madden, 2002).

Los receptores *metabotrópicos* de glutamato tienen siete dominios transmembranales y una región carboxilo terminal intracelular que les permite la interacción con diversas proteínas y sistemas de señalización intracelular (Fig. 3). Se han dividido, de acuerdo con criterios basados en sus secuencias de aminoácidos, en las vías de transducción asociadas a su actividad y en su farmacología en los grupos I, II y III. Los receptores pertenecientes al grupo I activan a la fosfolipasa C e inducen la producción de diacil-glicerol e InsP_3 , que a su vez induce la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares. (Fig. 2, Fig. 3). Los tipos II y III están asociados a la inactivación de la adenilato-ciclase y en consecuencia a la disminución de la producción de AMP cíclico. (Coutinho y Knopfel, 2002). Los receptores metabotrópicos de glutamato del tipo I pueden localizarse en regiones pre y postsinápticas, en el sistema nervioso central; mientras que los tipos II y III, tienen una localización presináptica.

B) Canales asociados a sensores de voltaje.

Este tipo de canales se activan, en las neuronas, por la despolarización subumbral o asociada a la activación de potenciales de acción y permiten el influjo de este ión. Como se verá más adelante el Ca^{2+} que ingresa a la célula por este medio participa en diversos procesos de señalización.

En general, los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje están formados por combinaciones de 4 tipos de subunidades α , β , δ y γ . La subunidad $\alpha 1$ contiene el poro iónico que define las propiedades de conductividad y dependencia de voltaje de los canales formados. Hasta el momento, se han descrito 10 subunidades α , divididas en 3 familias funcionales Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 , asociadas, respectivamente, a la formación de canales tipo L, tipo N, P, Q, R y tipo T (Catterall, 2000) (Fig. 2). El resto de las unidades se denominan subunidades accesorias, la subunidad β es intracelular y se ha propuesto que tiene propiedades regulatorias sobre la dependencia de voltaje, la cinética de activación e inactivación de los canales, el número de canales que se abren por despolarización, la modulación por proteínas G y la afinidad por fármacos (Mitterdorfer y cols., 1998). El $\alpha 2\delta$ es un complejo, la subunidad $\alpha 2$ es extracelular y se asocia con la δ que está unida a la membrana, y la γ es una glucoproteína que no se encuentra en todos los canales dependientes de voltaje y que puede modular la dependencia de voltaje.

Cada una de las subunidades tiene diferentes sitios de interacción con diversas proteínas intra y extracelulares, entre los cuales destacan sitios blanco para la fosforilación por proteínas cinasas tipo A y C (Catterall, 2000), proteínas G (Dolphin, 1999), sitios de unión para calmodulina (Ehlers y Augustine, 1999; Sencer y cols., 2001), sitios de unión a proteínas del complejo *SNARE* (ver capítulo Ca^{2+} y plasticidad neuronal y Fig. 2) y

receptores sensibles a ryanodina en el caso de los canales tipo L de músculo esquelético (Catterall, 2000). Estos sitios de interacción alostérica representan sitios potenciales de modulación de la actividad de los canales dependiente de voltaje.

Canales tipo L. Una de las características distintivas de este tipo de canales es su sensibilidad a las dihidropiridinas. En las neuronas, los canales tipo L pueden estar formados por subunidades $Ca_v1.2$ ($\alpha1C$) y $Ca_v1.3$ ($\alpha1D$). Estos subtipos de canales L difieren en su umbral de activación que es de alrededor de -35 mV para el $Ca_v1.2$ y de -45 mV para el $Ca_v1.3$, y en su sensibilidad a dihidropiridinas siendo el $Ca_v1.2$ aproximadamente 10 veces más sensible a este tipo de fármacos comparado con el $Ca_v1.3$ cuya sensibilidad se encuentra en el rango micromolar (Koschak y cols., 2001). Estos canales no se inactivan por voltaje.

Canales tipo N. Estos canales están formados por la subunidad $Ca_v2.2$ ($\alpha1B$) y son sensibles a ω -conotoxina GVIA. El potencial de activación de los canales tipo N se encuentra por arriba de -20 mV. Y la τ para su inactivación por voltaje es mayor a 40 ms, por lo que se dice que su inactivación es intermedia.

Canales tipo P/Q. Estos canales están formados por la subunidad $Ca_v2.1$ ($\alpha1A$) y tienen una subunidad γ . Son sensibles a ω -agatoxina y su umbral de activación es de alrededor de -25 mV. Los canales tipo Q tienen una inactivación por voltaje intermedia, mientras que los P no se inactivan por voltaje.

Canales tipo R. Estos canales están formados por la subunidad $Ca_v2.3$ ($\alpha1E$) y no se conoce ningún fármaco que module su actividad de manera específica. Su umbral de activación se encuentra alrededor de los -35 mV. La τ para la inactivación de estos canales es rápida, entre 20-30 ms.

Canales tipo T. Estos canales pueden estar formados de las subunidades $Ca_v3.1$ ($\alpha1G$), $Ca_v3.2$ ($\alpha1H$) o $Ca_v3.3$ ($\alpha1I$). Son considerados de bajo umbral pues se activan en potenciales por arriba de -70 mV. La τ para la inactivación de estos canales es rápida, entre 20-40 ms.

C) Canales asociados a señales reguladas por el **vaciamiento de almacenes intracelulares.**

Los canales activados por vaciamiento (SOC- *store operated channels*) son canales que tienen una gran permeabilidad al Ca^{2+} y permiten el relleno del RE (Berridge, 1996; Catterall, 2000). No se conocen ni la identidad molecular de los canales implicados en el relleno del RE, ni los mecanismos responsables de este fenómeno, pero se ha demostrado una interacción funcional estrecha entre los receptores sensibles a inositol trifosfato (Ma y cols., 2000; Blakstone y Sheng, 2002) y canales análogos a los TRP de *Drosophila*, ubicados en la membrana plasmática, incluso se ha propuesto el acoplamiento físico de ambas proteínas para formar un poro que permite el paso directo de iones Ca^{2+} desde el espacio extracelular al RE (Parekh y Penner, 1997) (Fig. 4).

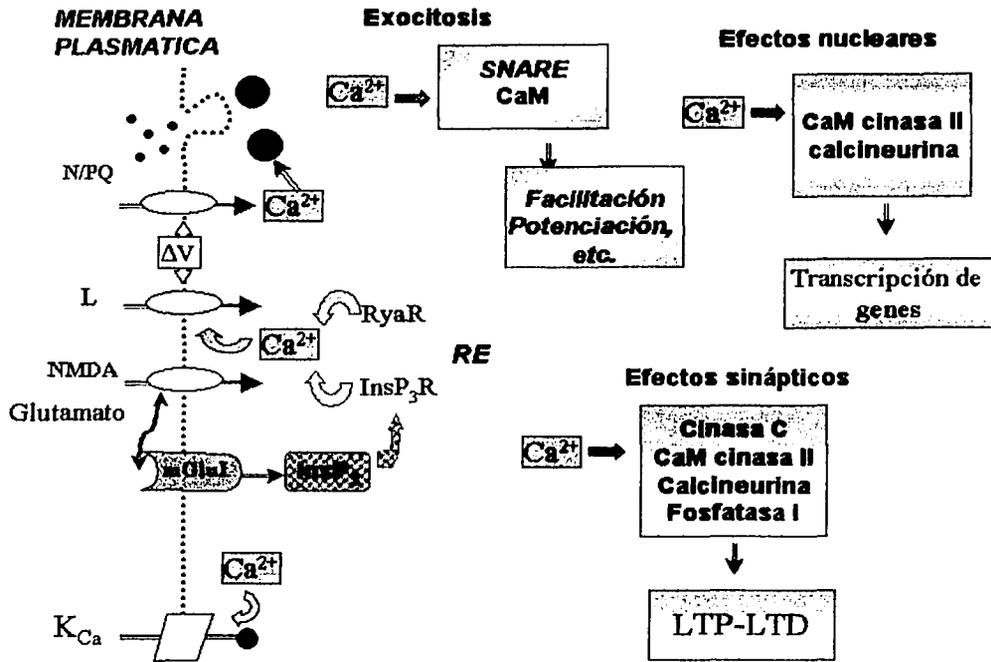


Fig. 2. Señalización dependiente de Ca^{2+} en neuronas. La liberación de neurotransmisores depende de la entrada de Ca^{2+} por canales sensibles a voltaje del tipo N/PQ y la acción de este ión sobre proteínas sensibles a Ca^{2+} , como las *SNARE* y calmodulina que están implicadas en la fusión y la liberación de vesículas. La entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles a voltaje tipo L y de receptores a glutamato tipo NMDA o metabotrópicos tipo mGluR I produce la activación de proteínas cinasas y fosfatasas implicadas en la regulación de la transcripción génica o de fenómenos de plasticidad sináptica como el LTP y el LTD. La entrada de Ca^{2+} o la activación de vías de señalización en el interior celular pueden a su vez activar la liberación de Ca^{2+} de los receptores sensibles a ryanodina (RyaR) o a $InsP_3$ ($InsP_3R$), que participa en varios fenómenos de plasticidad neuronal. El Ca^{2+} puede también unirse a sitios de reconocimiento en canales iónicos de la membrana plasmática y activarlos o inactivarlos.

Adicionalmente existen canales asociados a ligando que permiten la movilización de Ca^{2+} que se almacena en compartimentos intracelulares. En la membrana del retículo endoplásmico existen al menos 2 tipos de receptores-canal sensibles a ligando que liberan grandes cantidades de Ca^{2+} al citoplasma, estos se denominan *receptores sensibles a inositol trifosfato* ($InsP_3$) y *receptores sensibles a ryanodina*.

Receptores sensibles a $InsP_3$

El ligando que activa estos canales - $InsP_3$ - es un producto de la hidrólisis del bifosfato de inositol (PIP_2) de la membrana plasmática. Esta hidrólisis ocurre en respuesta a la

activación de la fosfolipasa C como consecuencia de la unión de hormonas o neurotransmisores a receptores asociados a la activación de cadenas metabólicas mediadas por interacción con proteínas Gq (Fig. 3). Entre los neurotransmisores que activan la vía de señalización de InsP_3 se encuentran receptores sensibles a glutamato (mGlu), a acetilcolina (m1 y m3), a serotonina (2 y 1C) y receptores purinérgicos (P_2).

Se han descrito 5 isoformas de canales sensibles a InsP_3 de las cuales la I y la III son muy abundantes en el sistema nervioso, todas movilizan Ca^{2+} , pero difieren en aspectos como su sensibilidad a este ión. El receptor de InsP_3 está formado por 4 subunidades cuya unión forma un poro iónico, cada subunidad tiene sitios de unión para InsP_3 (Carafoli y cols., 2001). La activación del receptor requiere de la activación cooperativa de al menos 3 subunidades. Estas subunidades presentan varios sitios de modulación (sitios de unión a calmodulina, ATP, sitios susceptibles de fosforilación y sitios de unión para Ca^{2+}). El Ca^{2+} en el lumen de RE estimula la apertura del canal, mientras que la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmica puede tener efectos de desensibilización o activación del canal dependiendo principalmente del tipo celular. La sensibilidad del canal por Ca^{2+} en el subtipo I tiene forma de campana con un máximo alrededor de los 200 nM. El ATP estimula la activación del canal, mientras que la calmodulina puede tener efectos facilitatorios o inhibitorios dependientes de su interacción con cinasas o fosfatasa que modulan al canal (Markin y Bezprozvanny, 1998; Carafoli y cols. 2001).

El receptor de InsP_3 es modulado negativamente por la heparina, xestospongina y 2-APB (Maruyama y cols., 1997; Carafoli y cols., 2001). Las adenosinas son los únicos fármacos agonistas de este receptor hasta el momento (Takahashi y cols., 1993).

Receptores sensibles a ryanodina.

Este tipo de canal liberador de Ca^{2+} es sensible al alcaloide ryanodina aplicado *in vitro*, está constituido por 4 subunidades que al unirse forman un poro iónico cuyo ligando fisiológico puede ser el ADP ribosa cíclico (Berridge, 1996). Se han identificado 3 subtipos de receptores de ryanodina, todos están presentes en el sistema nervioso. Los receptores sensibles a ryanodina tienen sitios susceptibles de fosforilación por calmodulina cinasa II que al activarse inhiben al canal, sitios para calmodulina que al ser activados en la presencia de concentraciones bajas de Ca^{2+} activan al canal y en concentraciones altas lo inhiben. Asimismo, los receptores sensibles a ryanodina tienen sitios de unión de alta afinidad para el Ca^{2+} , que al ser activados por ejemplo por el influjo de Ca^{2+} extracelular, permiten la salida de este ión; a este fenómeno se le conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Berridge, 1996; Verkhatsky y Shmigol, 1996; Cochilla y Alford, 1998; Usachev y Thayer, 1999) (Fig. 3).

Los receptores sensibles a ryanodina son inhibidos farmacológicamente por el alcaloide ryanodina en concentraciones mayores a 10 μM (Carafoli y cols., 2001), rojo de rutenio, dantroleno; y activados por cafeína y ryanodina en bajas concentraciones (rango nM).

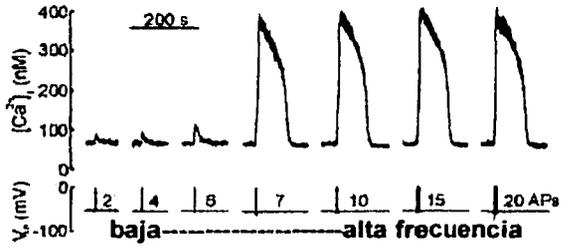
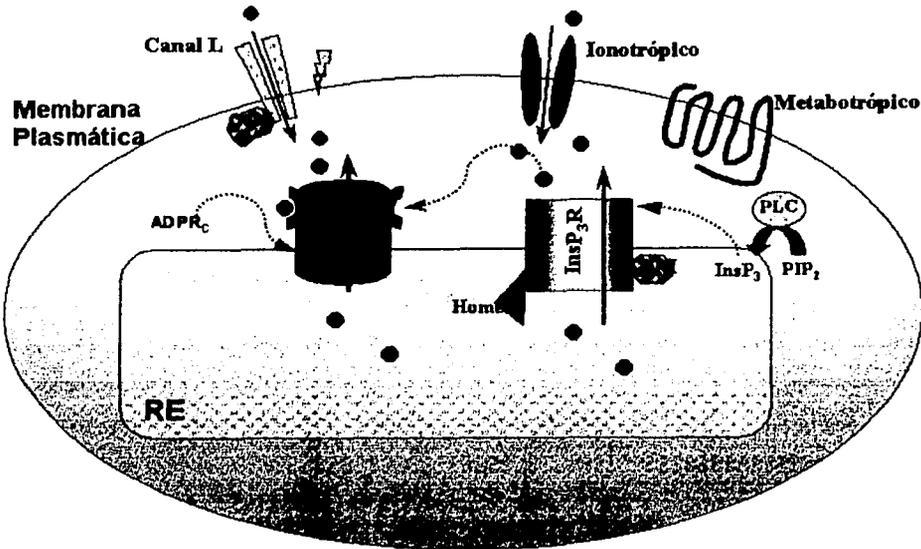


Fig. 3. *Receptores liberadores de Ca^{2+} en el RE.* Arriba. Esquema que representa la activación de los receptores/canal sensibles a ryanodina (RyaR) y los sensibles a $InsP_3$ ($InsP_3R$) en el RE. La activación de algunos receptores metabotrópicos induce la producción de $InsP_3$, que activa al $InsP_3R$ e produce la liberación de Ca^{2+} al citoplasma. Asimismo, debido a que los canales liberadores del RE tienen sitios de alta afinidad para Ca^{2+} , la elevación de la $[Ca^{2+}]_c$ por influjo a través de canales ionotrópicos o sensibles a voltaje, así como por la liberación de canales intracelulares vecinos aumentan la liberación de este ión al citoplasma, este fenómeno se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . Ambos tipos de receptores pueden ser modulados por la interacción con diversas proteínas que se encuentran en el lumen del RE o en el citoplasma (Homer, calmodulina). Algunas de las proteínas que modulan a los RyaR y a los $InsP_3R$, como la calmodulina (calmodulina) son sensibles a Ca^{2+} . Abajo. Ejemplo de la amplificación de las elevaciones por influjo de Ca^{2+} asociadas a trenes de potenciales de acción de baja frecuencia, a estas señales se suman elevaciones de Ca^{2+} provocadas por la liberación de este ión cuando la célula es estimulada con alta frecuencia (frecuencia definida por el número de potenciales de acción, AP, inducidos en un mismo periodo). Modificada de Thayer y cols., 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Lo anterior significa que en las neuronas el Ca^{2+} puede mobilizarse al citoplasma desde el espacio extracelular a través de diversos tipos de canales en la membrana plasmática y desde el RE por la activación de receptores/canal. La actividad de los canales liberadores de RE permite amplificar señales a través de la acción de un mecanismo dependiente de la liberación controlada de Ca^{2+} al espacio citoplásmico (Fig. 3 abajo).

Como se muestra en la figura 1, la duración y la magnitud de las elevaciones de Ca^{2+} son reguladas a través de mecanismos que activa o pasivamente revierten los niveles de este ión a valores de reposo en el citoplasma. Estos mecanismos dependen del transporte activo, en contra de gradiente electroquímico o de la neutralización del Ca^{2+} libre (Shull, 2000). En la membrana plasmática, las elevaciones moderadas de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ activan una ATPasa (PMCA) que une Ca^{2+} con alta afinidad y lo transporta fuera de la célula. Las elevaciones mayores de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, producidas por estimulación de alta intensidad, activan además un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sensible a voltaje que aprovechando el gradiente de Na^+ , une Ca^{2+} con baja afinidad y lo transporta en contra de gradiente hasta restablecer los niveles basales de este ión en el citoplasma (Thayer y cols., 2002) (Fig. 4).

El exceso de Ca^{2+} citoplásmico se almacena además en el RE y la mitocondria (Figs. 3 y 4). La concentración que se almacena en ambos reservorios es de alrededor de $100 \mu\text{M}$ (Blackstone y Sheng, 2002). El mecanismo de almacenaje en el RE depende de la activación de una ATPasa (SERCA) que une a este ión con alta afinidad y lo internaliza (Fig. 4); mientras que en la mitocondria, el Ca^{2+} es internalizado por un acarreador tipo uniportador dependiente del potencial protonmotriz, que une Ca^{2+} con baja afinidad; este Ca^{2+} es liberado lentamente de la mitocondria por la acción de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, disminuyendo así la amplitud de las señales de Ca^{2+} en el citoplasma, pero alargando su duración (Babcock y cols., 1997; Schull, 2000; Thayer y cols., 2002) (Fig. 5).

Adicionalmente, en el citoplasma y en el RE se encuentran una serie de proteínas que unen Ca^{2+} (CaBP) y que controlan la difusión y concentración de Ca^{2+} libre, reduciendo la amplitud de las señales de Ca^{2+} y modificando su cinética de decaimiento. Por su abundancia en algunas regiones de las neuronas, como las terminales, una alta proporción del Ca^{2+} libre es disminuido por unión a estas proteínas que pueden funcionar como *amortiguadoras* (Fig. 4). El campo de las CaBP no ha sido muy estudiado, mucha de la información se restringe a su identificación: así se ha determinado que varias presentan en su estructura un motivo EF que une Ca^{2+} . Se ha descrito una gran cantidad, entre las más sobresalientes se encuentran: calmodulina, gelsoína, parvalbúmina, calpaína, S100 y calbindina. Algunas de las CaBP'S tienen funciones catalíticas descritas, entre las cuales se encuentra la activación de canales permeables a Ca^{2+} como el sensible a InsP_3 . (Meldolesi y Pozzan, 1998; Bootman y cols., 2002; Sabatini y cols., 2002) (Fig. 3). Tampoco se tiene mucha información acerca de los factores que regulan a estas proteínas; sin embargo se han encontrado alteraciones en su expresión correlacionadas con alteraciones en la transmisión sináptica y neurotoxicidad (Palecek y cols., 1999; Thayer y cols., 2002).

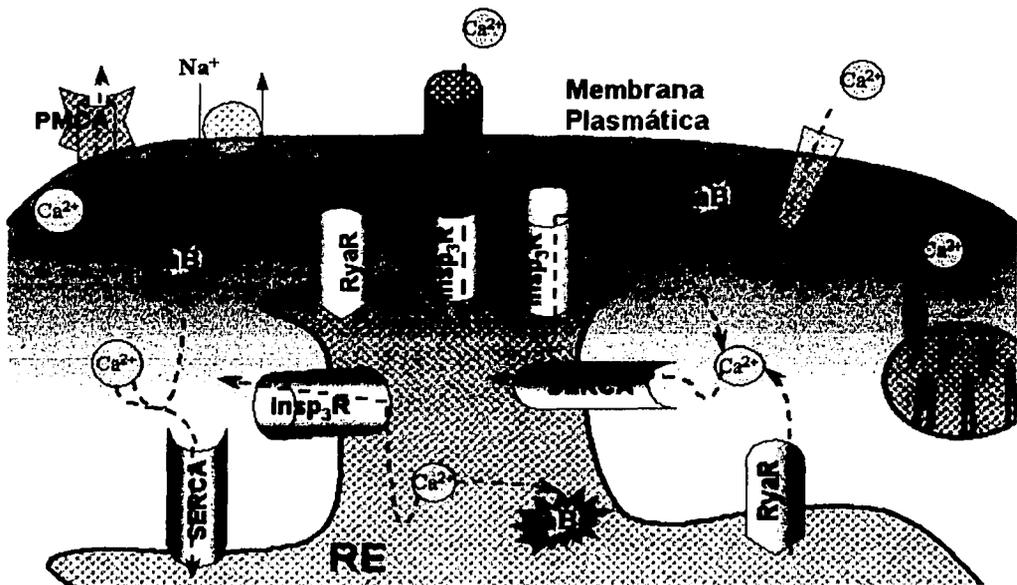


Fig. 4. Mecanismos de remoción de Ca^{2+} citoplásmico. Mecanismos que disminuyen la $[Ca^{2+}]_c$, provocada por el influjo o la liberación intracelular de este ión. En la membrana plasmática se muestran la ATPasa PMCA y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} que extruyen el Ca^{2+} de la célula, en contra de su gradiente electroquímico. En el retículo endoplásmico se representa a la ATPasa (SERCA) que internaliza este ión y lo almacena unido a proteínas amortiguadoras (CaBP). Se muestra también la existencia de proteínas amortiguadoras CaBP en el citoplasma que unen el Ca^{2+} , disminuyendo así las concentraciones del ión libre. En la mitocondria se muestra el uniportador que internaliza este ión, que después será lentamente liberado al citoplasma. Asimismo, se muestra el mecanismo propuesto para el relleno del RE con Ca^{2+} . Se ha propuesto que los canales de $InsP_3$ y los canales operados por el vaciamiento (SOC) de la membrana plasmática se acoplan (se sugiere que físicamente) para formar un canal permeable a Ca^{2+} , continuo desde la membrana plasmática y hasta el interior del RE.

La interacción coordinada de las diversas entidades que movilizan Ca^{2+} entre compartimentos a favor de su gradiente electroquímico y de los que mecanismos que revierten los incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$, producen elevaciones citoplásmicas de este ión que pueden variar en dos dimensiones: amplitud y frecuencia. Así, en las neuronas como en otros sistemas, las señales de Ca^{2+} se presentan en ocasiones en forma de "chispazos" muy breves y localizados, mientras que en otras se producen elevaciones de larga duración que pueden resultar en oscilaciones o mareas (Dolmetsch y cols., 1998; Markin y Bezprozvany, 1998) (Fig. 5).

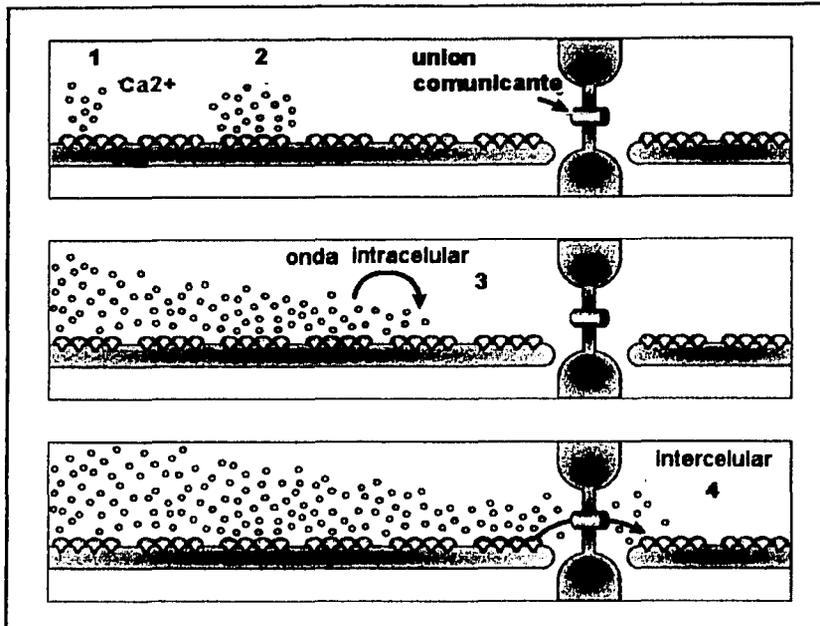


Fig. 5. *Propagación de las señales de Ca^{2+}* . Esquema que representa las escalas espaciales y temporales de las señales de Ca^{2+} , promovidas por la interacción de canales liberadores en el retículo endoplásmico (RE). En el primer panel se observa la liberación de Ca^{2+} localizada en un receptor. Este tipo de liberación se denomina "chispazo" (1) y puede a su vez activar receptores cercanos (2). En el segundo panel se observa como este tipo de mecanismo puede generar una difusión en áreas grandes de la célula formando ondas intracelulares (3) que cuando son de gran amplitud pueden incluso propagarse a otras células a través de uniones comunicantes (4) como se muestra en el tercer panel. Modificada de Berridge y cols., 2000.

En las neuronas, debido a su polarización y a la especialización de sus compartimentos, los efectos de la movilización de Ca^{2+} son determinados por la concentración que este ión alcanza en los diferentes compartimentos. La conformación espacial de los compartimentos modifica la amplitud y la cinética de las movilizaciones de Ca^{2+} debido a factores como la distribución diferencial de las proteínas que movilizan este ión, la concentración local de proteínas amortiguadoras, la cercanía entre los sitios de flujo o liberación de Ca^{2+} y proteínas efectoras activadas por este ión, la concentración y la actividad de mecanismos de extrusión o almacenaje, así como la proporción superficie de membrana/volumen, que hace que movimientos de Ca^{2+} iniciados por las mismas entidades moleculares tengan un impacto diferente, por ejemplo en las espinas dendríticas comparado con la región proximal de las dendritas o el soma, modificando la capacidad de integración de las señales iniciadas por los incrementos de Ca^{2+} (Korkotian y Segal., 1998; Blackstone y Sheng, 2002; Delmas y Brown, 2002; Holthoff y cols., 2002; Sabatini y cols., 2002; Simon y cols., 2003).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El Ca²⁺ y la plasticidad neuronal

En los últimos años, la tecnología para el estudio de los movimientos de Ca²⁺ ha hecho posible relacionar varios tipos de eventos fisiológicos con la regulación de las concentraciones de este ión en el citoplasma, y describir así la participación de proteínas implicadas en los movimientos de Ca²⁺ con diferentes funciones en las neuronas, entre las cuales destacan eventos de plasticidad neuronal dependientes de actividad, que se definen como cambios en la transmisión de información entre neuronas provocados por los patrones de actividad precedentes que pueden durar desde milisegundos hasta semanas (Hanse y Konnerth, 1998).

Relacionados con los incrementos en la [Ca²⁺]_c se han descrito fenómenos de plasticidad a corto y largo plazo que implican cambios en mecanismos relacionados con: a) *la liberación de neurotransmisores* (Mathews, 1996; Schleggenburger y Neher, 2000), b) *excitabilidad de las neuronas* pre o postsinápticas en un circuito (Hanse y Konnerth, 1998), c) *transcripción de genes* (Dolmetsch y cols., 1998; Sherf y Carew, 2002), así como d) *morfología y conectividad* entre neuronas (Lüscher y cols., 2000) (ver Fig. 2). A continuación se presentan ejemplos de fenómenos plásticos neuronales, relacionados con estos diversos procesos fisiológicos definidos por las propiedades de especificidad, convergencia y las variaciones en la temporalidad de la señalización por Ca²⁺.

a) *Liberación de neurotransmisores*. La despolarización de las terminales sinápticas por la propagación de potenciales de acción produce la entrada de Ca²⁺ a través de canales dependientes de voltaje tipo N y P/Q ubicados en las mismas (Llinas y cols., 1981; Llinas y cols., 1992; Hillyard y cols., 1992; Forti y cols., 2000; Schneggenburger y Neher, 2000; Ryan y Reuter, 2001) (Fig. 2), así como la liberación de este ión desde reservorios intracelulares por activación del receptor de ryanodina (Llano y cols., 2000) (Fig. 2).

En condiciones de baja estimulación, la elevación en la [Ca²⁺] en las terminales es rápidamente revertida por extrusión, almacenaje en reservorios intracelulares o unión a proteínas amortiguadoras (Schneggenburger y Neher, 2000; Ryan y Reuter, 2001). En cambio, la despolarización continua de las terminales, produce elevaciones de [Ca²⁺] de larga duración en las terminales, debido al aporte de Ca²⁺ de cada potencial de acción, a modificaciones en la forma del potencial de acción, que producen influjos mayores de este ión y a la facilitación de corrientes de Ca²⁺ por la actividad repetitiva (Felmy y cols., 2003). Estas elevaciones de larga duración en la [Ca²⁺]_c pueden ser mantenidas además por la liberación de reservorios intracelulares (Hanse y Konnerth, 1998) (Fig. 6B), disminución de la actividad de intercambiadores que disminuyen los niveles citoplásmicos de este ión que ocurre como consecuencia del incremento de [Na⁺] en las terminales (Mulkey y Zucker, 1992), y a la saturación de proteínas amortiguadoras (Felmy y cols., 2003).

La presencia prolongada de altas [Ca²⁺] en las terminales por actividad celular repetitiva, modifica la liberación de neurotransmisores. Ya que al menos un tipo de fusión vesicular y los procesos de liberación dependen de la unión de Ca²⁺ a un conjunto de proteínas acopladoras que se conocen como *receptores de unión al factor soluble, sensible a N-*

metilmalimida-SNARE, entre las cuales destacan la sintaxina, sinaptobrevina, y snap-25, además de fosfatasa, calmodulina y una ATPasa de protones (Macker y cols., 2002; Rettig y Neher, 2002). Las elevaciones de Ca^{2+} prolongadas afectan también la endocitosis y la disponibilidad de vesículas “listas para liberarse”; a través de mecanismos dependientes del influjo de Ca^{2+} extracelular, de la actividad de calmodulina o de la liberación de Ca^{2+} del RE (Katz y Miledi, 1968; Katz y Miledi, 1979; Ditmann y Regehr, 1998; Sankaranarayanan y Ryan, 2000; Sakaba y Neher, 2001; Kuromi y Kidokoro, 2002; Rettig y Neher, 2002; Rosenmund y cols., 2002). La velocidad y la duración de los cambios plásticos relacionados con la liberación de neurotransmisores varía de segundos como en el caso de la facilitación, posiblemente mediada por la unión de Ca^{2+} a proteínas del complejo SNARE (Zucker, 1999) a centenas de segundos o minutos como en la depresión sináptica, la *augmentación* y la potenciación posttetánica, mediadas por la activación de calmodulina cinasa II, liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y la mitocondria o la inactivación de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Mulkey y Zucker, 1992; Tang y Zucker, 1997; Hanse y Konnerth, 1998; Zucker, 1999; Scheggenburger, Sakaba y Neher, 2002).

b) *Excitabilidad neuronal*. A nivel postsináptico existen ejemplos en los que la concentración y la dinámica de los movimientos de Ca^{2+} regulan fenómenos de plasticidad que afectan la excitabilidad de las neuronas tales como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (ver Fig. 2).

A pesar de que el efecto en la actividad sináptica de la LTD y la LTP son contrarios, dependiendo de factores como el nivel de actividad de las células así como de la cinética de las vías de señalización por Ca^{2+} activadas, ambos fenómenos se pueden iniciar en una misma célula por la activación de receptores tipo NMDA, tipo AMPA (Ross y Soltesz, 2001), canales de Ca^{2+} tipo L o receptores mGlu I (Wang y Kelly, 1997; Hanse y Konnerth, 1998; Morishita y cols., 2001; Faas y cols., 2002). Así, la LTP dependiente de NMDA requiere que la membrana plasmática se encuentre despolarizada (lo que incrementa el influjo de Ca^{2+} por la remoción del bloque inducido por Mg^{2+}) (Sabatini y cols., 2002) y se asocia con elevaciones de Ca^{2+} de gran amplitud y corta duración (Yang y cols., 1999). Mientras que la LTD dependiente de NMDA se induce cuando la membrana se encuentra en reposo y se asocia con elevaciones de menor amplitud y larga duración (Yang y cols., 1999). La cinética y temporalidad de las elevaciones de Ca^{2+} asociadas a uno y otro fenómeno, corresponden con las cinéticas de activación de las cinasas tipo C y la calmodulina cinasa tipo II (calmodulina cinasa II) responsables de la LTP; y las fosfatasa calcineurina y la fosfatasa I responsables de la LTD, respectivamente (Wang y Kelly, 1997; Yang y cols., 1999; Morishita y cols., 2001; Wang y cols., 2003).

c) *Transcripción de genes*. En varias sinapsis se ha demostrado que la activación de fenómenos de plasticidad sináptica, como la facilitación a largo plazo, requieren la síntesis de ARNm y la expresión de proteínas, iniciadas por señales de Ca^{2+} en diferentes regiones de las neuronas (Sherf y Carew, 2002). Los movimientos de Ca^{2+} pueden modificar la transcripción de genes específicos entre los que destacan bombas de Ca^{2+} y receptores sensibles a InsP_3 , (Kuo y cols., 1997) así como genes relacionados con la plasticidad neuronal (Sheng, 1991; Santella y Carafoli, 1997; Dolmetsch y cols., 1998). El origen de los movimientos de Ca^{2+} asociados a los mecanismos que modulan la transcripción son variados; se ha descrito que la liberación de Ca^{2+} del RE así como su influjo por la

actividad del canal de Ca^{2+} tipo L pueden iniciarla (Kuo y cols., 1997; Tao y cols., 2002). Asimismo, la calmodulina cinasa II puede entrar al núcleo y fosforilar residuos específicos o proteínas que se unen a secuencias que responden a la señalización dependiente de Ca^{2+} y que participan en la inducción o mantenimiento de fenómenos plásticos como la LTP y la LTD (Sheng, 1991; Cammarota y cols., 2002; Tao y cols., 2002). (Fig. 2).

c) *Morfología y conectividad*. Los cambios en la excitabilidad neuronal, en algunos casos, implican cambios morfológicos en la estructura sináptica que permiten la expresión de nuevas proteínas y modificaciones en la función de las ya existentes. De esta forma, la inducción de la LTP, la activación continua de receptores de NMDA, así como la liberación de Ca^{2+} dependiente de los receptores sensibles a ryanodina inducen cambios en la morfología, tales como crecimiento del árbol dendrítico y en la proporción de RE en las espinas (Harris, 1999). Estos cambios pueden presentarse con diferentes escalas temporales en la forma de incrementos en el número de densidades postsinápticas en una misma espina dendrítica, la división en dos puntos de contacto de las espinas, así como la formación de nuevas espinas dendríticas (Cammarota y cols., 2002). La reorganización permite por ejemplo, la translocación de receptores tipo AMPA a la membrana plasmática por inducción de la LTP (Lüscher y cols., 2000) o bien modificaciones en las interacciones entre receptores localizados en las membranas plasmática y en el RE, respectivamente (Delmas y Brown, 2002).

Los mecanismos moleculares asociados a cambios morfológicos coinciden con los mecanismos que inducen cambios en la excitabilidad neuronal, ya que se ha observado por ejemplo que la activación de receptores NMDA asociada a la coactivación de calcineurina (fenómenos que ocurren por la activación de la LTD) produce la retracción de las espinas dendríticas (Lüscher y cols., 2000) y que la activación de la calmodulina cinasa II β es responsable de la formación y alargamiento de dendritas así como de su movilidad (Vaillant y cols., 2002; Fink y cols., 2003). Las modificaciones en la morfología dendrítica pueden influenciar la integración de señales de Ca^{2+} , ya que se ha demostrado que la movilización de este ión desde reservorios intracelulares es distinta para las dendritas y las espinas dendríticas, y que el grado de independencia de la movilización en espinas depende del grosor del cuello dendrítico (Korkotian y Segal, 1998).

Patrones de actividad neuronal mediados por Ca²⁺

Como se puede deducir de los ejemplos anteriores, la actividad de canales dependientes de voltaje permeables a Ca²⁺ permite la transducción de señales eléctricas de la membrana plasmática en señales químicas que inician diversos procesos controlados por la excitación neuronal. Las propiedades de activación e inactivación lenta o rápida de los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje, modifican la duración, así como la amplitud de los cambios en los potenciales de membrana iniciados por la despolarización o la hiperpolarización y pueden amplificar las señales de Ca²⁺ asociadas a la activación de procesos fisiológicos.

La interacción de los canales dependientes de voltaje, permeables a Ca²⁺, con otros canales iónicos dependientes de voltaje y con canales activados por la liberación de factores químicos de otras células del sistema nervioso, aunado a la activación de vías de señalización intracelular (independientes y dependientes de Ca²⁺) determinan la activación de patrones de actividad neuronal. Éstos son específicos de cada tipo neuronal ya que dependen de su composición de canales iónicos así como de las asociaciones de sus vías de transducción intracelular.

Mediados por la activación de conductancias de Ca²⁺ y la modulación de vías de señalización dependientes de este ión se han descrito diversos patrones de actividad neuronal, tales como la actividad rítmica en la oliva inferior, que consiste en periodos de hiperpolarización seguidos por periodos de despolarización acompañada de potenciales de acción. Este patrón está controlado por un lado por el incremento en la actividad de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, responsables de la hiperpolarización que sigue a cada potencial, y por otro por la activación de un potencial de rebote mediado por canales de Ca²⁺ tipo T que produce una despolarización de magnitud suficiente para activar potenciales de acción (Llinas, 1988).

El arreglo de conductancias iónicas específicas de cada tipo neuronal y sus interacciones con vías de señalización intracelular puede modificarse dependiendo de las condiciones de estimulación a las que la neurona está o ha estado sometida. Así, la activación de patrones de actividad específicos permite a la célula una gran variabilidad de respuestas plásticas.

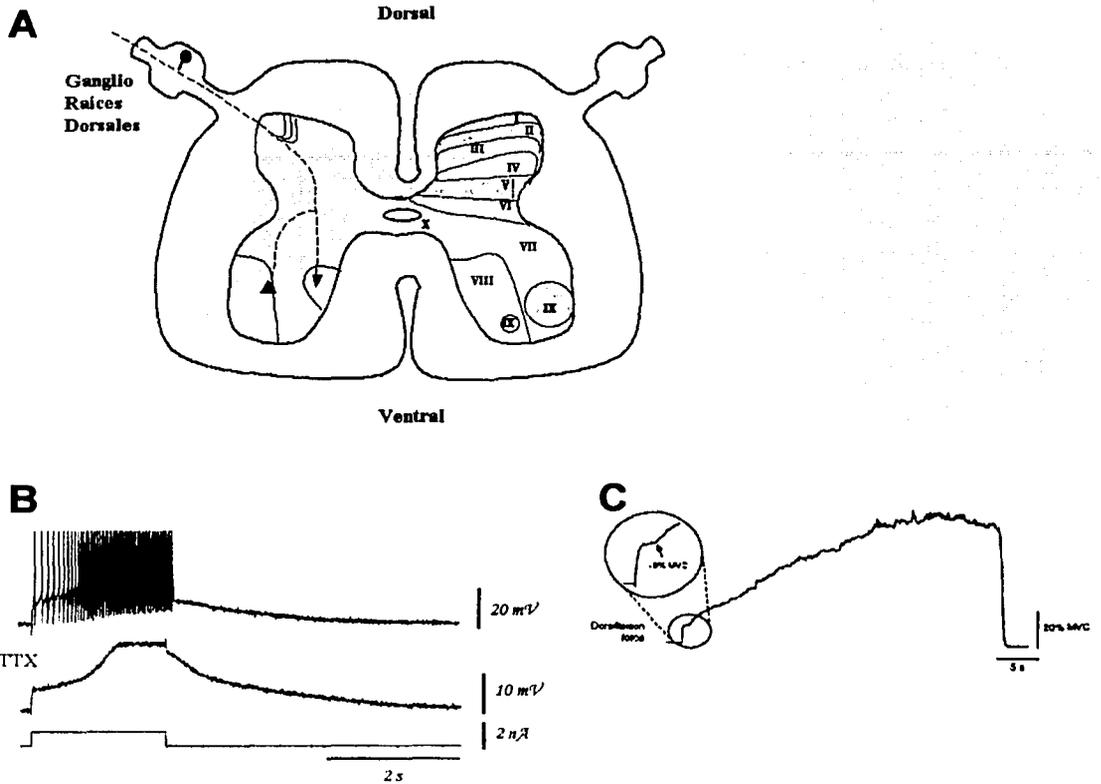
Potenciales de meseta y windup.

Dentro de los fenómenos de plasticidad neuronal en los que está implicado el Ca^{2+} , en el presente proyecto nos hemos interesado en estudiar a los potenciales de meseta, que son un tipo de patrón de actividad que en el sistema nervioso se presenta en la médula espinal, (Fig. 6A), así como en el cerebelo, el estriado, el núcleo del trigémino, el hipocampo y la corteza cerebral (Misgeld y cols., 1986; Hounsgaard y Mintz, 1988, Llinas, 1988; Hounsgaard y Kjaerulff, 1992; Russo y Hounsgaard, 1996; Del negro y cols., 1999; Alberi y cols., 2000; Genet y Delord, 2002; Lo y Erzurumlu, 2002).

Los potenciales de meseta se activan por estimulación despolarizante constante, ya sea por la activación de las aferentes excitatorias de las neuronas que los presentan o *in vitro* por la inyección de un pulso de corriente despolarizante. La respuesta de las neuronas que presentan potenciales de meseta a este tipo de estimulación consiste en una despolarización que crece gradualmente en amplitud hasta formar una meseta, que produce en consecuencia una aceleración de la descarga neuronal (Urban y Dray, 1992; Jefinija y Urban, 1994; Russo y Hounsgaard, 1994) (Fig. 6B). En ocasiones, dependiendo de su magnitud, la despolarización y la descarga neuronal asociadas a la activación de los potenciales de meseta pueden permanecer segundos después de que la estimulación ha terminado (postdespolarización y postdescarga), de esta forma los potenciales de meseta amplifican no solo la magnitud sino también la duración de las despolarizaciones asociadas a la estimulación aferente (Svirkis y Hounsgaard, 1997; Hornby y cols., 2003) (Fig. 10).

En las astas dorsales (laminas II y V) y ventrales (lámina IX) de las regiones cervical y lumbar de la médula espinal, una población de aproximadamente 80% de las neuronas tanto principales como interneuronas, presentan potenciales de meseta. Este tipo de patrón de actividad se preserva en motoneuronas de individuos adultos de varias especies animales: gato (Hounsgaard y cols., 1984), tortuga (Hounsgaard y Mintz, 1988; Hounsgaard y Kjaerulff, 1992) (Fig. 6B), rata (Morriset y Nagy, 1999), ratón (Carlin y cols., 2000), rana (Perrier y Hounsgaard, 2000) y se ha reportado un tipo de patrón equivalente en humanos (Gorassini y cols., 2002) (Fig. 6C).

La activación o la terminación de los potenciales de meseta esta controlada por estímulos que producen un cambio en el potencial de membrana (Hounsgaard y Kiehn, 1985). Esto determina la transición de la actividad basal de las neuronas entre dos estados estables (biestabilidad). En uno de estos estados, el más hiperpolarizado, la estimulación aferente despolarizante o pulsos de corriente equivalentes inician el disparo de potenciales de acción que eventualmente se adaptan; mientras que en el otro, el más despolarizado, la misma estimulación produce disparo continuo que se acelera gradualmente, y que puede permanecer aún después de finalizada la estimulación. La activación de potenciales de meseta tiene como consecuencia la aceleración de la frecuencia de disparo, mientras que su terminación por hiperpolarización celular o por la estimulación de fibras que producen potenciales postsinápticos inhibitorios mediados por la actividad de receptores GABAB y glicinérgicos (fibras A δ) se asocian al patrón de adaptación del disparo celular (Hounsgaard y Kiehn, 1985; Jefinija y Urban, 1994; Russo y Hounsgaard 1996a; Russo y cols., 1998; Sandkühler y cols., 1997).



Como consecuencia de la activación de los potenciales de meseta algunas células presentan además *windup*. Este fenómeno consiste en incrementos sucesivos de las respuestas características a la estimulación despolarizante en células que presentan potenciales de meseta. El fenómeno se produce por la estimulación repetitiva con estímulos despolarizantes idénticos. El incremento en la respuesta consiste en aumentos en el número de espigas que se producen por cada estimulación, como consecuencia de la potenciación sucesiva de la despolarización asociada al potencial de meseta (Fig. 7A y D). El *windup* se puede producir por la activación repetitiva de fibras aferentes del tipo C (0.5-2 cps por 20-30 seg.) o por estimulación con pulsos de corriente despolarizante equivalentes (Jeftinija y Urban, 1994; Russo y Hounsgaard, 1996a; Hornby y cols., 2003). Este fenómeno fue inicialmente descrito por Mendell (1966) en las células de las astas dorsales de mamíferos *in vivo*; por la estimulación repetida de fibras aferentes primarias C.

La función fisiológica de los potenciales de meseta y el *windup* varía dependiendo de la organización de las redes neuronales en las que se encuentran inmersas las neuronas que presentan esos fenómenos. En diversos sistemas se les ha involucrado con la generación de ritmicidad asociada a funciones respiratorias o locomoción (Harris-Warrick, 2002). En las motoneuronas, la activación de estos fenómenos optimiza la relación entre la entrada sináptica y la fuerza de la contracción muscular, ligada a la actividad de las motoneuronas (Fig. 6C) (Collins, 2002; Hounsgaard, 2002). Y de hecho, recientemente se les ha relacionado con funciones de reclutamiento de fuerza muscular debida a la estimulación repetida de aferentes musculares en humanos, gracias al incremento en la excitabilidad de las unidades motoras (Bennett y cols., 2001; Gorassini y cols., 2001; Collins, 2002) (Fig. 6C; 7C). Por esta razón se ha propuesto que los potenciales de meseta, que mantienen a la neurona disparando por periodos de tiempo que pueden alargarse más allá de la estimulación (Fig. 10), favorecen la actividad muscular tónica versus la actividad fásica que estaría ligada al patrón de disparo que se adapta (Collins y cols., 2002; Hounsgaard, 2002 y Derjean y cols., 2003). En las neuronas sensoriales la activación del *windup* modifica el umbral y la latencia de respuesta de las neuronas de las astas dorsales, lo que influye en las características de los campos receptivos (Li, y cols., 1999; Derjean y cols., 2003) (Fig. 7D).

Los potenciales de meseta y el *windup* se han asociado también a condiciones en las que las neuronas sensoriales o motoras presentan actividad persistente que puede ser aguda como en los fenómenos de sensibilización central iniciados por la estimulación sensorial (Woolf, 1996; Li, y cols., 1999; Herrero, y cols., 2000) o en los patrones de actividad locomotora repetitivos (Bennett y cols., 2001). Y con formas crónicas de actividad persistente, como fenómenos de espasticidad provocados por lesiones de la médula espinal (Bennett y cols., 1998; Bennett y cols., 2001; Hornby y cols., 2003) (ver Fig. 6B) o casos de persistencia de sensaciones asociadas a fenómenos de hiperalgesia en animales o de padecimientos de dolor crónico en humanos (Li, y cols., 1999; Herrero y cols., 2000; Staud y cols., 2001).

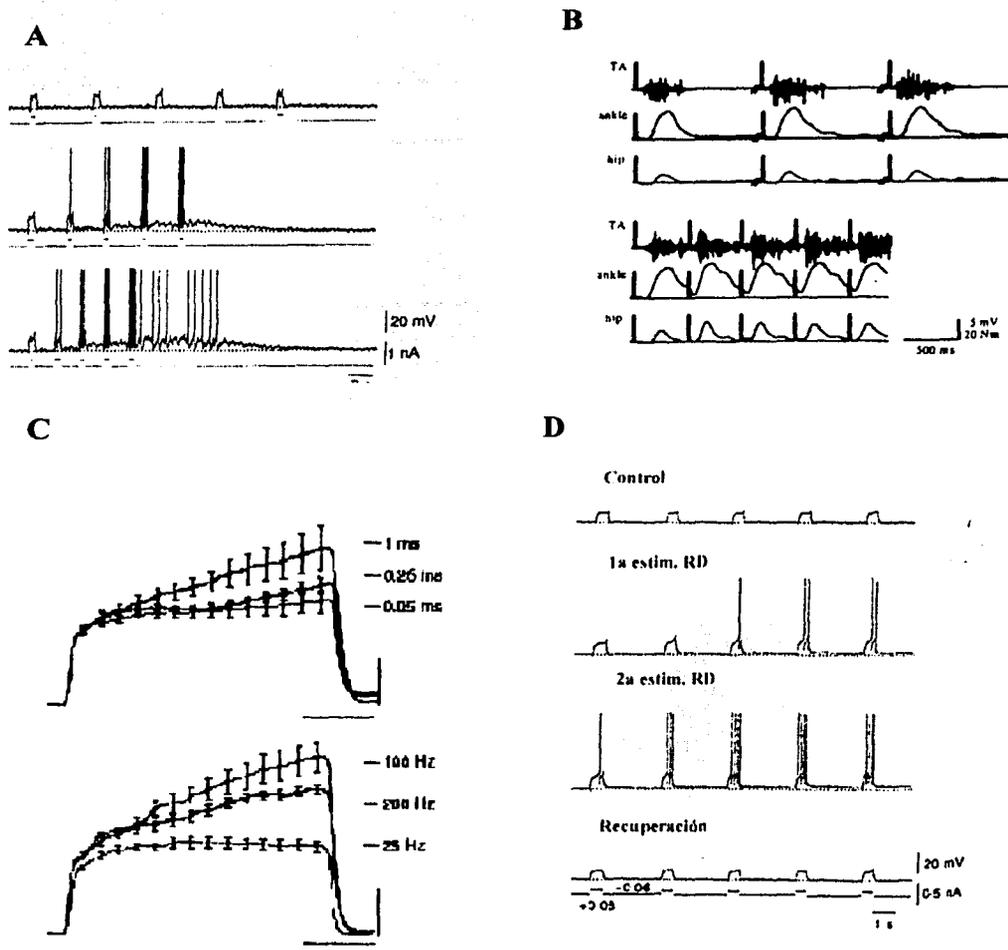


Fig. 7. *Windup*. A) La estimulación repetitiva con pulsos depolarizantes intracelulares, a frecuencias de alrededor de 0.5 cps produce un incremento gradual en el número de potenciales de acción acompañado de una despolarización creciente en respuesta a pulsos de corriente sucesivos. B) Se observa el mismo patrón que en A) pero registrado con un electromiograma en tres diferentes grupos musculares de humano. C) Se observa nuevamente en el humano que la activación del *windup* es dependiente de la duración (ms=mseg) (arriba) y de la frecuencia de estimulación (Hz=cps) (abajo). D) Se observa la influencia del *windup* en el procesamiento de información aferente. En el primer trazo, respuesta de una célula a pulsos subumbrales repetitivos de corriente despolarizante, en el segundo se suma la estimulación también subumbral de las aferentes de las raíces dorsales y se activa el *windup*, el efecto es mayor en una segunda estimulación. Modificadas de Russo y Hounsgaard, 1996; Hornby y cols., 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como ya se menciona, además de la médula espinal, los potenciales de meseta se han descrito en otras regiones del sistema nervioso central como el núcleo del trigémino, el hipocampo, el cerebelo y la corteza cerebral (Llinas, 1988; Del negro y cols., 1999; Alberi y cols., 2000; Lo y Erzurumlu, 2002). En estas otras regiones los potenciales de meseta deben conservar su función de amplificar la relación entre la entrada sináptica y la magnitud de la respuesta de las neuronas que los presentan, teniendo implicaciones para las funciones fisiológicas asociadas a la actividad de estas áreas del sistema nervioso. Adicionalmente, con características propias para cada tejido, los potenciales de meseta se han descrito asociados a la regulación de la excitabilidad en células cardíacas (Coraboeuf, 1976) y a la regulación de la liberación de insulina en el páncreas (Pressel y Misler, 1991).

Respecto de los mecanismos celulares que producen los potenciales de meseta y el *windup* en motoneuronas, se conoce que dependen de la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L; pues la activación farmacológica de los mismos con Bay K 8644 los promueve, mientras que la aplicación de nifedipina, un bloqueador de canales L los inhibe (Sah, 1990; Russo y Hounsgaard, 1994) (Fig. 8B, 9C). Los potenciales de meseta se activan alrededor de los -45 mV y son sensibles a concentraciones en el rango micromolar de Bay K 8644, estas características sugieren que los canales L responsables de los potenciales de meseta están formados por la subunidad $\alpha 1D$ (Xu y Lipscombe 2001; Koschak et al. 2001; Perrier y cols., 2002). Asimismo, evidencia anatómica reciente muestra que esta subunidad se localiza abundantemente en las dendritas y soma de las motoneuronas (Perrier y cols., 2002; Simon y cols., 2003); donde se ha propuesto que se integran los potenciales de meseta (Delgado-Lezama, R. y cols., 1999). Las cinéticas de inactivación de los canales tipo L son muy lentas, lo que los hace buenos candidatos para ser responsables de las corrientes persistentes que subyacen a los potenciales de meseta (Fig. 9C).

Los mecanismos para la producción de potenciales de meseta y el *windup* dependen de la facilitación de las corrientes mediadas por canales tipo L. Esta facilitación consiste en incrementos en la cantidad de corriente registrada por despolarización del potencial de membrana; así como incrementos en la cantidad de corriente y disminuciones del umbral y de la latencia para la activación de las mismas, por la repetición de la estimulación (Russo y Hounsgaard, 1996; Svirakis y Hounsgaard, 1997; Bennet y cols., 1998) (Fig. 9). El fenómeno no se debe a una despolarización acumulativa, ya que como se observa en la figuras 7 y 8, después de cada estimulación el potencial de membrana puede regresar a sus niveles de reposo y la corriente no permanece activa en el intervalo entre estímulos (Fig. 9). La facilitación del canal L en las motoneuronas puede estar mediada por algún mecanismo dependiente del cambio conformacional del canal, promovido por la despolarización y probablemente dependiente de la fosforilación del canal (You y cols., 1995), que disminuye su sensibilidad a la inhibición y favorece la transición de los canales de un estado "reacio" a un estado "dispuesto". Este fenómeno se ha descrito en otros sistemas y se sabe que aumenta el número de canales que se activan por despolarización (Dolphin, 1999).

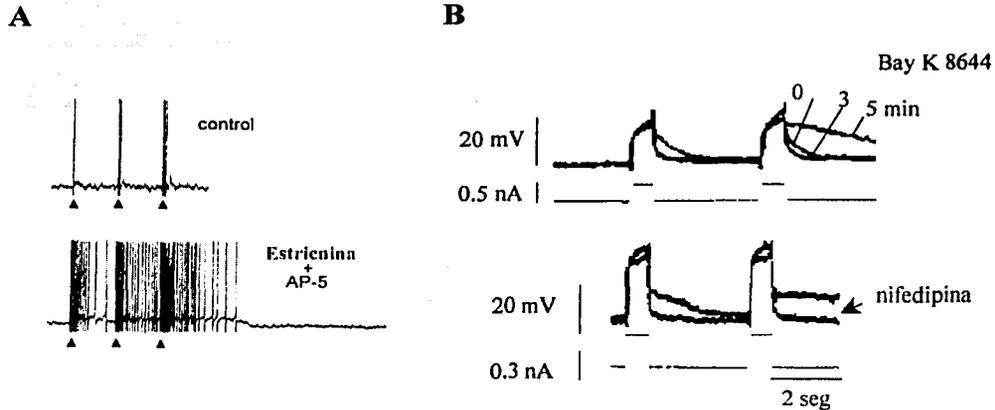


Fig. 8. *Mecanismos moleculares responsables de los potenciales de meseta y el windup.* A) Efecto inhibitorio de la glicina sobre el *windup*, que se facilita por la aplicación del inhibidor de receptores glicinérgicos, estricnina. B) Dependencia de los potenciales de meseta y *windup* de la actividad de canales de Ca^{2+} tipo L. El activador de estos canales, Bay K 8644 aplicado por 3 o 5 min facilita los potenciales de meseta y el *windup*, mientras que el bloqueador, nifedipina los inhibe. Modificadas de Russo y Hounsgaard, 1994 y Russo y cols., 1998.

En algunas regiones del sistema nervioso se ha descrito que los potenciales de meseta se generan por la activación de conductancias de Na^+ de lenta inactivación (Mittman y cols., 1997; Del negro y cols., 1999) o por decrementos en las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Mitgaard, 1992; Booth, y cols., 1997; Hsiao y cols., 1998), este no es el caso de la médula espinal, ya que los potenciales de meseta se presentan aún en la ausencia de Na^+ , en medios en los que este ión ha sido sustituido (Russo y Hounsgaard, 1994; Perrier y Hounsgaard, 1999) y evidencia reciente sugiere la participación de las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} y otras corrientes de K^+ en la determinación de periodos de ritmicidad, algunos de los cuales dependen de la activación y terminación de potenciales de meseta (Russo y Hounsgaard, 1996; Aoyagi y cols., 2002; Genet y Delord, 2002). Asimismo, se ha propuesto que la corriente de Ca^{2+} responsable de los potenciales de meseta es mediada por canales catiónicos no específicos (CAN) (Kawasaki y cols., 1999; Morisset y Nagy, 1999), estos experimentos se han realizado en rata; mientras que en la tortuga se ha demostrado que las corrientes CAN no son responsables de los potenciales de meseta (Perrier y Hounsgaard, 1999).

Por ser fenómenos asociados a la activación de una conductancia sensible a voltaje, y por las características de la facilitación de los canales tipo L, los potenciales de meseta y el *windup* son muy sensibles a factores como el nivel de despolarización del potencial de membrana (Fig. 9). Cuando la membrana está despolarizada, la latencia para la activación de los potenciales de meseta se acorta y la despolarización asociada al potencial de meseta es más grande y duradera, lo que en consecuencia produce un disparo neuronal más vigoroso (Hounsgaard y Kiehn, 1985; Genet y Delord, 2002). Los potenciales de meseta y el *windup*, son asimismo, fenómenos muy sensibles a las características de la estimulación, tales como la intensidad, la duración y la frecuencia (Fig. 7A, B y C), y a la actividad

previa de las células (Jeftinija y Urban, 1994; Russo y Hounsgaard, 1996a; Hornby y cols., 2003) (Fig. 7D, 9C).

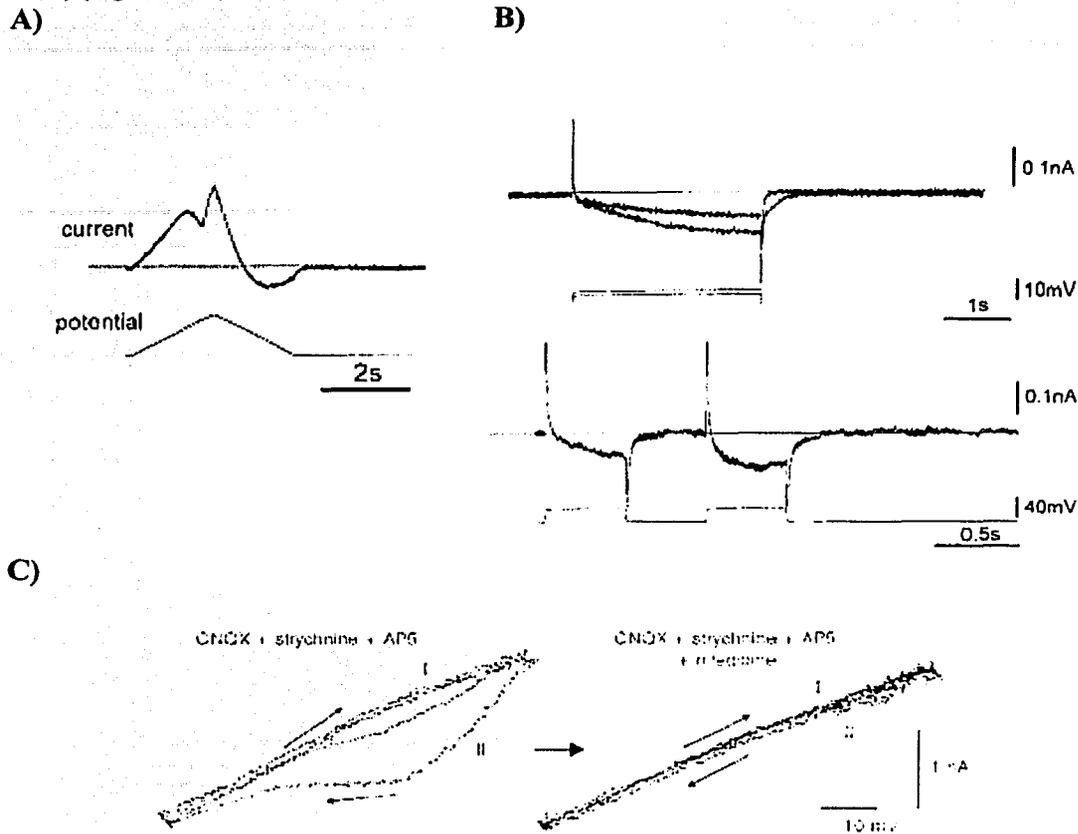


Figura 9. *Facilitación de corrientes del canal L en células con potenciales de meseta.* A) Relación corriente voltaje en una motoneurona con potenciales de meseta. La relación corriente voltaje presenta una histéresis que se debe a la lenta cinética de activación e inactivación de una corriente. B) Arriba. Corriente registrada en una motoneurona con potenciales de meseta, la fase lenta de activación es dependiente de voltaje. Abajo. La misma corriente registrada en C crece por estimulación repetitiva. C) Relación corriente-voltaje provocada por estimulación con una rampa de voltaje después de la estimulación de las raíces dorsales, la histéresis asociada a la activación de potenciales de meseta es dependiente de la actividad de canales L pues se bloquea por nifedipina (Modificadas de Delgado y cols., 1997 y Svirakis y Hounsgaard, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

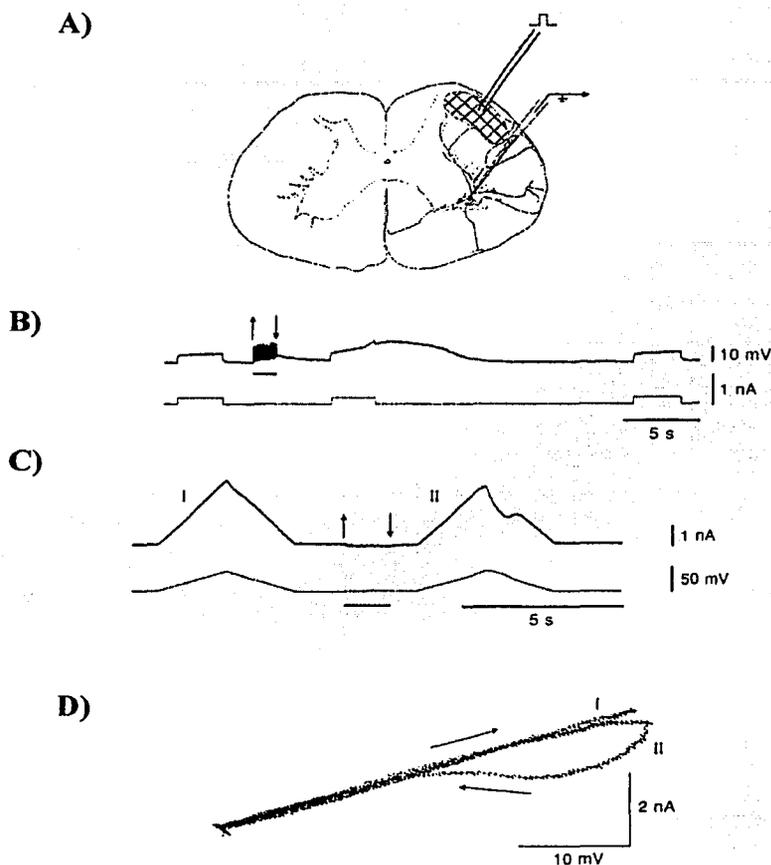


Figura 10. *Inducción de potenciales de meseta por estimulación aferente.* A) Ubicación anatómica de los sitios de estimulación (funiculo dorso lateral) y registro (lámina IX). B) Respuesta de una motoneurona a la inyección de un pulso de corriente despolarizante antes y después de la estimulación del funículo dorsolateral (flechas). La facilitación de la respuesta dura varios segundos y no depende de Na^+ porque se presenta aún cuando estos canales han sido bloqueados con QX-314. Se puede observar claramente el potencial de meseta que se produce por la inyección del pulso aplicado después de la estimulación aferente. C) y D) Relación corriente voltaje producida por una rampa de voltaje antes y después de la estimulación de las aferentes. Se observa la activación de la histéresis asociada a la activación de los potenciales de meseta. Estos experimentos se hicieron en la presencia de inhibidores de canales ionotrópicos, por lo que se infiere que esta modulación ocurre a través de la activación de canales metabotrópicos. Tomada de Delgado-Lezama y cols., 1997.

Existen evidencias que sugieren que los potenciales de meseta y el *windup* dependen de las propiedades intrínsecas de las células que los presentan. Esto significa que el arreglo de sus propios elementos permite la generación de los patrones de actividad aún sin la necesidad de influencias sinápticas. Algunos de estos estudios muestran que la generación de potenciales de meseta mediados por corrientes de Na^+ y Ca^{2+} en mamíferos es posible, en la presencia de Cd^+ , que al bloquear canales de Ca^{2+} inhibe la transmisión sináptica (Li y Bennett, 2003). Asimismo, los potenciales de meseta como el *windup* se pueden registrar en la presencia de TTX cuando se han inducido mediante la inyección de corriente intracelular (Russo y Hounsgaard, 1994; Morisset y Nagy, 1999) y los potenciales postsinápticos excitatorios no son afectados cuando los potenciales de meseta se bloquean con nifedipina (Svirakis y Hounsgaard, 1997). Además, la mayoría de los estudios citados en la presente tesis, se han realizado en preparaciones *in vitro* de rata y tortuga, en la presencia de inhibidores de la actividad presináptica (Fig. 9C). Sin embargo, es claro que en términos del sistema completo la actividad presináptica es importante para coordinar la activación de estos patrones que la célula es potencialmente capaz de emitir. Diversos estudios han mostrado que los potenciales de meseta se generan en respuesta a la estimulación de las aferentes provenientes de las raíces dorsales (Fig. 10). La estimulación tónica de las aferentes disminuye los umbrales de los potenciales de meseta, lo que permite su activación con bajas intensidades de estimulación (Russo y Hounsgaard, 1996; Bennet y cols., 1998).

Los potenciales de meseta y el *windup* son modulados por diversos neurotransmisores, que son liberados por células circundantes y que actúan sobre una gran variedad de receptores presentes en las motoneuronas. Ambos fenómenos son modulados por receptores de glutamato sensibles a NMDA (Budai y Larson, 1996; Russo y Hounsgaard, 1996). Sin embargo, diversos estudios muestran que los potenciales de meseta pueden ser inducidos en la presencia de inhibidores de los receptores ionotrópicos (Fig. 10), en esta condición, los potenciales de meseta inducidos por la estimulación aferente se bloquean por inhibición de receptores metabotrópicos (Russo y Hounsgaard, 1994; Delgado-Lezama y cols., 1997; Morisset y Nagy, 2000) (Tabla I). En un trabajo reciente, se ha mostrado que la activación de receptores metabotrópicos a glutamato del tipo mGlu I y receptores GABAB, que tienen efectos antagónicos sobre los potenciales de meseta y el *windup* (Tabla I), los tienen también sobre un canal de potasio de la familia Kir, cuya función parece estar relacionada con el switch entre diferentes estados estables de las neuronas y la ritmicidad (Derjean y cols., 2003).

TABLA I. EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS A RECEPTORES METABOTRÓPICOS SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN Y EL <i>WINDUP</i> EN NEURONAS DE LA MEDULA ESPINAL			
Acción/ Receptor	Fármaco	Efecto	Referencia Bibliográfica
Agonistas Metabotrópicos Glu	Trans-ACPD, ACPD DHPG	Promueve mesetas y potenciación de <i>windup</i>	Morisset y Nagy, 1996; Svirkis y Hounsgaard, 1998; Russo, Nagy y Hounsgaard, 1997; Budai y Larson, 1998.
Antagonistas Metabotrópicos Glu	MCPG S-4C3H-PG	Inhibe mesetas y <i>windup</i>	Delgado-Lezama, 1997; Budai y Larson, 1998
Agonistas Metabotrópicos ACh	Muscarina	Promueve mesetas	Svirkis y Hounsgaard, 1998
Antagonistas Metabotrópicos ACh	Atropina	Inhibe mesetas	Delgado-Lezama y cols., 1997
Agonistas GABA B	baclofen	Inhibe mesetas	Svirkis y Hounsgaard, 1998
5-HT	5-HT	Promueve mesetas	Skydsgaard y Hounsgaard, 1996; Gjerstad y cols., 1996; Perrier y Hounsgaard, 2003
Antagonistas Metabotrópicos 5HT	NAN-190 Pindobind-5HT1a	Inhibe mesetas	Delgado-Lezama y cols., 1997
Substancia P (SP)	SP	Promueve mesetas potenciación del wind up	Chapman y cols., 1994; Budai y Larson, 1996; Russo y cols., 1997
Antagonistas Metabotrópicos SP	GR 82334; SR 140333 (NK1)	Inhibe mesetas	Russo y cols., 1997; Baranauskas y Nistri, 1998

El mecanismo de acción de varios de los receptores metabotrópicos que modulan los potenciales de meseta y el *windup* (Tabla I) implica el incremento en los niveles citoplásmicos de Ca^{2+} , ya sea a través de la apertura de conductancias a este ión en la membrana plasmática o a través de su liberación desde almacenes intracelulares. Por ejemplo, se sabe que los receptores mGlu I pueden activar cadenas de segundos mensajeros que implican la formación de $InsP_3$ y la correspondiente activación de receptores intracelulares sensibles a este mensajero (Liu y cols., 1997; Nakanishi y cols., 1998; Shen y Slaughter, 1998) (Fig. 3), y que la activación de receptores muscarínicos y mGlu I promueven la liberación de Ca^{2+} de receptores sensibles a ryanodina (Rathous y cols., 1995; Chavis y cols., 1996; Gruol y cols., 1996; Fagni y cols., 2000). Por otro lado, se sabe que la activación de receptores muscarínicos a acetilcolina, de receptores mGlu I y de receptores 5-HT₂ de serotonina promueven potenciales de meseta a través de la facilitación de los canales tipo L (Delgado-Lezama y cols., 1997; Svirkis y Hounsgaard, 1998; Perrier y Hounsgaard, 2003).

La activación de receptores liberadores de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico puede iniciar una interacción funcional con canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática. En particular, en algunas neuronas, se ha documentado la interacción entre el canal de Ca^{2+} tipo L y el receptor de ryanodina. Esta interacción parece ser iniciada y dependiente de la activación repetitiva de los canales tipo L (Chavis y cols., 1996; Tanabe y cols., 1998). En varios sistemas, incluidas las neuronas, se ha demostrado que el incremento de Ca^{2+} citosólico

causado por el influjo de Ca^{2+} extracelular puede producir a su vez la liberación de Ca^{2+} intracelular a través de la activación de receptores sensibles a ryanodina (Cochilla y Alford, 1998; Usachev y Thayer, 1999) (Fig. 11). Y que el aumento de Ca^{2+} intracelular puede facilitar la actividad del canal tipo L, a través de su acción sobre una forma de calmodulina que está permanentemente asociada a este canal (Zuhlke y cols., 1999; Erickson, 2001) o bien mediante la fosforilación del canal por la activación de proteínas cinasas (Alberi y cols., 2000; You y cols., 1995).

Debido a que tanto el efecto de la facilitación de la actividad de los canales tipo L como el de la liberación desde canales de ryanodina e InsP_3 , asociados a las vías de transducción de los receptores metabotrópicos que facilitan a los potenciales de meseta y el *windup*, tienen como consecuencia el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citoplasma. En la presente tesis, nos interesamos en determinar si los potenciales de meseta y el *windup* son sensibles a la manipulación farmacológica de elementos implicados en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} .

En primer lugar nos interesamos en determinar si la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular afectaba la generación de los potenciales de meseta y/o el *windup*. Asimismo, con la finalidad de conocer el mecanismo a través del cual las elevaciones intracelulares de Ca^{2+} afectan el funcionamiento de los canales tipo L, decidimos probar la hipótesis de la posible modulación de los potenciales de meseta y el *windup* por calmodulina. Estos experimentos están basados en los reportes de la existencia de una forma de calmodulina permanentemente unida al canal L, cuya activación resulta en la facilitación del mismo (Elhers y Augustine, 1999; Zülke y cols., 1999). Adicionalmente, con la finalidad de conocer si como ocurre en otros tipos neuronales (Dirksen y cols., 2002), los canales tipo L y los receptores sensibles a ryanodina interactúan en neuronas que presentan potenciales de meseta y *windup*, y de confirmar que la modulación dependiente de la actividad de receptores metabotrópicos está relacionada con la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico en estas neuronas decidimos probar el efecto de la manipulación farmacológica de la vía de señalización dependiente de InsP_3 y de los receptores sensibles a ryanodina sobre la generación de los potenciales de meseta y el *windup*.

NG108-15

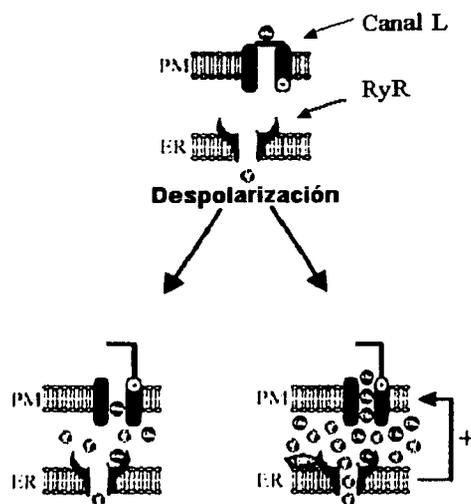


Figura 11. *Interacción funcional entre canal de Ca^{2+} tipo L y receptores sensibles a ryanodina.* En este esquema se representan las interacciones de los canales tipo L de la membrana plasmática (PM) y los receptores sensibles a ryanodina en el retículo endoplásmico (RE), en la ausencia de estimulación (arriba) y después de una despolarización (abajo) en una línea celular neuronal. La despolarización produce la activación de los canales tipo L y la consecuente entrada de Ca^{2+} , que al unirse a sitios de alta afinidad en el receptor de ryanodina producen la liberación de Ca^{2+} del RE. Debido a que el canal tipo L es facilitado por el Ca^{2+} , la liberación produce una facilitación del canal L (Modificada de Dirksen y cols., 2002).

Los receptores sensibles a ryanodina se han descrito distribuidos en las regiones ventrales de la médula espinal (Nakanisshi y cols., 1992) y los de $InsP_3$ en somas y neuropilo de las astas dorsales y ventrales de la médula espinal de mamíferos (Rodrigo y cols., 1993; Sharp y cols., 1993). No se conoce si en la tortuga, especie que se utiliza en este estudio, la distribución de estos receptores es similar, tampoco si coexisten en regiones donde se pueden registrar el *windup* y los potenciales de meseta, ni si su distribución es distinta para estas neuronas y las que no presentan estos patrones de actividad. Por esta razón, en el presente estudio hemos considerado necesario identificar y describir la distribución de los receptores sensibles a ryanodina e $InsP_3$, así como de la ATPasa de Ca^{2+} del RE en la región lumbar de la médula espinal de tortuga y confirmar su actividad mediante ensayos de unión específica a ligandos marcados radiactivamente y mediciones de actividad enzimática en el caso de la ATPasa. En estos ensayos se probaron además, los efectos de fármacos que inhiben estas entidades moleculares con la finalidad de caracterizarlas o de confirmar efectos que validaran nuestros experimentos electrofisiológicos.

OBJETIVOS

- A) Conocer si las variaciones en los niveles citoplásmicos de Ca^{2+} modifican los potenciales de meseta y el *windup*.
- B) En caso de que las modificaciones en los niveles citoplásmicos de Ca^{2+} modifiquen los potenciales de meseta y el *windup*, investigar si el efecto de facilitación del canal tipo L por Ca^{2+} puede estar relacionado con la actividad de calmodulina.
- C) Investigar si la liberación de Ca^{2+} de los canales intracelulares sensibles a ryanodina y a InsP_3 participan en la generación o en la modulación de los potenciales de meseta y/o el *windup*.
- D) Identificar y describir si existe alguna diferencia en la distribución de receptores sensibles a ryanodina e InsP_3 , así como de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico en las láminas II, V y IX de la región lumbar de la médula espinal de tortuga, en virtud de que en estas láminas se presentan los potenciales de meseta y el *windup*.
- E) Confirmar la actividad de los receptores sensibles a ryanodina, y a InsP_3 y de la ATPasa de Ca^{2+} presentes en la médula espinal de tortuga.

HIPÓTESIS

La disminución en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico por la acción de un quelante de este ión inhibirá los potenciales de meseta y el *windup* en neuronas motoras de la médula espinal de tortuga.

La inactivación de calmodulina modulará los potenciales de meseta y el *windup* en neuronas motoras de la médula espinal de tortuga.

La liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico a través de los receptores sensibles a ryanodina y a InsP_3 modulará los potenciales de meseta y el *windup* en neuronas motoras de la médula espinal de tortuga.

METODOLOGÍA

Sujetos

Se utilizaron tortugas adultas de las especies *Chrysemys scripta elegans* y *Kinosternon integrum*. La razón para utilizarlos es que el tejido nervioso de estos animales es altamente resistente a la anoxia y no requiere de control de temperatura, lo que hace que la preparación de rebanadas de médula espinal de tortuga sea muy estable en condiciones *in vitro*. Esto permite el registro de la actividad neuronal por alrededor de 6 horas, condición necesaria para la prueba de los fármacos de interés, ya que su difusión en preparaciones de rebanadas es lenta y a que en varios experimentos se agregó más de un fármaco. Los sujetos fueron alojados en tinas en grupos de 3 a 5 tortugas. Para la disección de la médula espinal los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg i.p.) y decapitados después de la disección.

Obtención de rebanadas

Para la disección de la médula se utilizó un taladro para abrir un acceso en el caparazón de la tortuga que permitió realizar la perfusión intracardíaca de la misma solución Ringer que

se utilizó para el registro, a 4°C (ver soluciones y fármacos). Con el taladro se realizaron después cortes en el caparazón alrededor de la localización de la región lumbar de la médula espinal, que en esta sección se encuentra adosada al caparazón. Para las determinaciones bioquímicas se extrajo además la región cervical de la médula espinal, para lo cual se realizaron incisiones con tijera a la altura del cuello para extraer la región de la médula más cercana a la cabeza. Una vez extraídas ambas regiones se realizaron laminectomías. Las meninges fueron cuidadosamente retiradas bajo el microscopio y el tejido fue cortado en rebanadas transversales (1.5-2 mm) usando un cortador no comercial. Las rebanadas fueron mantenidas a 4°C hasta que se transferían a la cámara de registro electrofisiológico.

Electrofisiología en rebanadas

Se utilizó la técnica de fijación de corriente para el registro intracelular en rebanadas de médula espinal de tortugas (usando amplificadores Axoclamp 2-B de Axon Instruments, Union City, CA, USA y IE 210 DE Warner Instruments, Hamden, CT, USA) para estudiar el efecto de fármacos con acción sobre los receptores sensibles a ryanodina, los receptores sensibles a InsP_3 y la ATPasa del retículo endoplásmico en los potenciales de meseta y el *windup*. Los potenciales de meseta se indujeron mediante la inyección intracelular de pulsos de corriente despolarizante con una intensidad de 0.8-1.2 nA con duración de 2 a 3 s, aplicados cada 10 s. El *windup* se indujo por la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de intensidades de 0.3 a 0.5 nA con frecuencias de 0.5-2 pulsos por segundo (Russo y Hounsgaard, 1994). Se utilizaron micropipetas llenas con una solución 1 M de acetato de potasio con una resistencia de 45-55 M Ω . Las motoneuronas fueron seleccionadas para su estudio si presentaban un potencial de membrana en reposo más hiperpolarizado que -60 mV. Los datos fueron digitalizados usando un convertidor digital (Digidata 1200, Axon Instruments), y guardados en disco duro, para su posterior análisis con el software *Axoscope* (Axon Instruments). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-22 °C).

Soluciones y fármacos

Para el registro, las rebanadas de médula espinal fueron perfundidas continuamente con una solución Ringer compuesta de (mM): 120 NaCl, 5KCl, 15 NaHCO₃, 2 MgCl₂, 3CaCl₂ y 20 glucosa, saturados con una mezcla de 98% O₂ y 2% CO₂ a pH 7.6. En algunos experimentos se utilizaron los agonistas de los receptores mGlu1 o de los receptores muscarínicos de acetilcolina: ácido trans-(+/-)-1-aminociclo-pentano-1,3- dicarboxílico (trans-ACPD/40 μM) y muscarina (25 μM), respectivamente. Todos los registros fueron hechos en la presencia de una mezcla de los siguientes inhibidores de la actividad sináptica 20-40 μM 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona (CNQX) para el bloqueo de receptores sensibles a glutamato sensibles a kainato/quisquilato, 40 μM bicuculina para el bloqueo de receptores GABAA, 10 μM estroscina para el bloqueo de receptores glicinérgicos y 60 μM (+/-)-2-amino-5 ácido fosfopentanoico (AP5) o 40 μM (+/-)-2-amino-7 ácido pentanoico para el bloqueo de receptores NMDA (AP7, Tocris, Bristol, UK). Para disminuir los niveles de Ca²⁺ citoplásmico se utilizó 20-100 μM de 1-2, (2-Aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético (Bapta-AM) (Texas Fluorescence Lab, Inc.). Para el bloqueo de la actividad de

calmodulina se utilizó 50-100 μM de W-7 o 250-500 μM de trifluoperazina. Se utilizaron fármacos que tienen acciones conocidas sobre los receptores sensibles a ryanodina: ryanodina que en concentraciones altas inhibe al canal (80-100 μM), dantroleno (100-200 μM) o rojo de rutenio (40 μM) como inhibidores y cafeína (3-10 mM) o ryanodina (1 μM) como activadores del receptor. Para explorar la participación del receptor de InsP_3 se utilizó el antagonista 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB/75 μM) y para bloquear a la fosfolipasa tipo C se utilizó 1 μM de U-73122. Para vaciar los reservorios intracelulares se utilizó tapsigargina (10 μM /Calbiochem, San Diego, CA, USA), que es un inhibidor de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del RE. En algunos experimentos se utilizó tetrodotoxina (TTX 200-500 nM) para bloquear canales de Na^+ dependientes de voltaje responsables de los potenciales de acción. Todas las drogas fueron de Sigma (St. Louis, Missouri, USA), excepto aquellas en las que esta señalada otro proveedor.

Las concentraciones de los fármacos utilizadas en estudios con rebanadas son altas en comparación con las utilizadas en estudios con células aisladas, los fármacos con acciones sobre los receptores sensibles a ryanodina, a InsP_3 y la fosfolipasa C, utilizados en este estudio han sido previamente utilizados en concentraciones similares en preparaciones de rebanadas (Maruyama y cols., 1997; Savic y Sciancalepore, 1998; Sciancalepore y cols., 1998; Tanabe y cols., 1998; Patridge y Valenzuela., 1999; Chen y cols, 2000 y Llano y cols., 2000).

Análisis de Resultados (electrofisiología)

Se utilizó una versión *Demo* del programa *Mini Analysis Program* (Synptosoftware, Inc) para determinar la frecuencia de descarga neuronal. Los valores de frecuencia fueron agrupados en periodos de 400 ms, la frecuencia de descarga se normalizó al valor del primer periodo de 400 ms que se tomó como frecuencia inicial, el valor de cada periodo de 400 ms fue graficado contra el tiempo, para tener un indicio del desarrollo temporal del fenómeno.

Para evaluar el incremento en la frecuencia de descarga asociada a la activación de potenciales de meseta, se calculó una tasa entre la frecuencia de descarga final (número de potenciales de acción en los últimos 500 ms durante la aplicación de un pulso de corriente despolarizante) y la frecuencia de descarga inicial (número de potenciales de acción en los primeros 500 ms durante la aplicación de un pulso de corriente despolarizante). Este valor se utilizó para hacer las comparaciones de incremento de frecuencia entre las diferentes condiciones farmacológicas.

Debido a que en este estudio se utilizaron dos especies distintas de tortugas: *K. integrum* y *C. scripta*, se realizaron comparaciones de la frecuencia de descarga durante los primeros 500 ms de pulsos de corriente despolarizante de intensidad umbral, en condiciones control; y de la frecuencia de potenciales de meseta no facilitados en rebanadas provenientes de ambas especies. Estas comparaciones fueron evaluadas con una prueba U-de Mann Whitney y una prueba Z, respectivamente.

La amplitud de la postdespolarización se calculó midiendo el cambio en el potencial de membrana a los 300 ms después de terminado el pulso de estimulación, respecto del potencial de membrana basal.

La resistencia de entrada se calculó midiendo el cambio en el potencial de membrana producido por la aplicación de un protocolo de estímulos despolarizantes e hiperpolarizantes.

El umbral de disparo se determinó como el cambio en el potencial de membrana requerido para producir potenciales de acción, comparado con el potencial de membrana en reposo.

Todas estas medidas fueron comparadas en la ausencia y la presencia de los fármacos de prueba usando un ANOVA RM y Tukey como prueba posthoc. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$.

Microscopía Confocal

Marcaje Retrogrado de Motoneuronas

Se realizaron inyecciones de Dextran acoplado a fluoresceína (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) en ambos nervios ciáticos de tortuga (Haeggeli y Kato, 2002). Después de 8 días las tortugas fueron perfundidas con solución salina por vía intracardiaca, la médula espinal fue disectada e incluida en Tissue Tek.

Procesamiento de Tejido para Microscopía Confocal

Se obtuvieron cortes transversales de 20 μm de médula espinal de tortugas adultas en un criostato y se montaron en portaobjetos gelatinados. Los cortes fueron fijados, incubándolos durante 30 min en una solución de glutaraldehído al 3% a 37°C o por 15 min en una solución de paraformaldehído al 4 %, a temperatura ambiente. El glutaraldehído y el paraformaldehído fueron disueltos en una solución salina amortiguadora (PBS) compuesta de 16 g NaCl, 1.24 g Na_2HPO_4 , (pH 7.4) en 1000 ml de agua destilada. Los cortes fijados fueron incubados durante dos horas a temperatura ambiente con 1 μM de ryanodina acoplada a rojo texas diluida en PBS (Bodipy-TX-Ry, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) para marcar los receptores sensibles a ryanodina; durante dos horas con 1 μM de tapsigargina acoplada a fluoresceína diluida en PBS y tritón al 3% (Bodipy-Fl-thapsigargin, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) para marcar la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico; durante 12 horas en 1 μM de heparina acoplada a fluoresceína diluida en PBS y tritón 3% (Bodipy-Fl-Heparin, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) que se une a receptores sensibles a InsP_3 , o por dos horas con brefeldina acoplada a fluoresceína diluida en PBS (Brefeldin A-FL, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), para marcar endomembranas. Para realizar dobles marcajes los cortes se incubaron en las siguientes mezclas: ryanodina acoplada a rojo texas/heparina acoplada a fluoresceína; ryanodina acoplada a rojo texas/tapsigargina acoplada a fluoresceína o ryanodina acoplada a rojo texas/brefeldina acoplada a fluoresceína. Con la finalidad de descartar fluorescencia no específica se llevaron al microscopio cortes fijados, no incubados con fluoróforos, así como cortes incubados con ligando fluorescente y un exceso de ligando no fluorescente

(300 μ M ryanodina por 1 hora, 300 μ M tapsigargina por una hora, para estos dos casos el ligando frío se incubó previo a la aplicación del ligando marcado, heparina 2.5 mg en 500 μ l por 12 horas, incubada simultáneamente con el ligando marcado). Después de la incubación el exceso de ligando se lavó 3 veces con PBS, y se agregó una mezcla de PBS y glicerol (1:1). Se colocó un cubreobjetos que se selló con barniz transparente.

Obtención de Imágenes de Microscopía Confocal.

Los cortes fueron observados en un microscopio confocal equipado con láseres de Argón y Helio-Neón (PCM 2000, Nikon) utilizando diferentes aumentos en el rango de 4x a 100x. Los cortes incubados con ryanodina acoplada a rojo texas se iluminaron con el láser de 543 nm y su emisión se filtró con un filtro de barrera de 560nm. Los cortes incubados con ligandos acoplados a fluoresceína fueron excitados con la línea de 488 nm del láser y su emisión se filtró con un filtro de barrera entre 515-530 nm. Para los experimentos con dobles marcajes las imágenes se obtuvieron de manera simultánea por dos canales del fotomultiplicador. Se obtuvieron 4 imágenes por rebanada, su reconstrucción final se realizó mediante la proyección del máximo valor de cada píxel. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en disco duro, convertidas a formato TIFF utilizando el programa *Simple PCI* (Compix, Inc. Cranberry, Township, Pennsylvania, USA).

Análisis de Resultados (microscopía confocal)

Se cuantificó la fluorescencia total en los cortes incubados con fluoróforos y sus controles sin fluoróforo o incubados con exceso de ligando frío utilizando el programa Confocal Assistant 4.02 (desarrollado por Todd Clark). Los valores obtenidos se compararon usando un ANOVA y Tukey como prueba *posthoc*. Para las comparaciones control sin fluoróforo y con incubación de ligando frío se utilizaron valores de ganancia idénticos en el microscopio confocal y de hecho las comparaciones entre las muestras se realizaron en la misma sesión.

Determinaciones Bioquímicas

Ensayo de Unión Específica de Ligandos

Se prepararon fracciones microsomales de los segmentos lumbar y cervical de la médula espinal de tortugas adultas (0.5-1 g), de acuerdo con los protocolos reportados por Damiani y cols., 1997 y Martínez-Merlos y cols., 1997. El tejido disectado se homogenizó con un POLITRON en 5 volúmenes de solución que contenía 10 mM Hepes, pH 7.4 (ajustado con NaOH), 20 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.5% Chaps y una pastilla de inhibidores de peptidasas (Roche, Basel, Suiza). El homogenizado se centrifugó a 650 g por 10 min y se resuspendió en la misma solución. El sobrenadante se centrifugó a 120,000 g por 90 min para obtener la fracción de membranas totales. Esta fracción se resuspendió en una solución que contiene: 300 mM sacarosa, 10 mM imidazol y una pastilla de inhibidores de peptidasas pH 7.4 (ajustado con NaOH). Se hicieron alícuotas de las muestras y se almacenaron a -20°C . La

concentración de proteína de las muestras se calculó por el método de Lowry (1951) usando albúmina de suero bovino como estándar (Sigma).

Las fracciones de membranas totales se incubaron por 16 hrs a temperatura ambiente con 3nM de [³H]ryanodina en 250 µl de una solución 300 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 20 mM MOPS, 5 mg/ml albúmina de suero bovino pH 7.4 (ajustado con KOH) de acuerdo con el método descrito por Chu y cols. (1990). Para medir la unión inespecífica se realizaron incubaciones de fracciones microsomales con ryanodina tritiada con un exceso de ryanodina fría (10 µM) en ensayos paralelos.

Para las determinaciones de InsP₃ las fracciones de membranas totales se incubaron por 30 min a 0 °C en 4nM de [³H]InsP₃ en 120 µl de una solución con 25 mM Tris HCl, 5 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA y 0.25 mM DTT a pH 8.0 (ajustado con NaOH). Para medir la unión inespecífica se realizaron incubaciones de las fracciones microsomales con InsP₃ tritiado (4nM) y un exceso de InsP₃ sin marca radiactiva (10 µM). Adicionalmente se realizaron ensayos de unión específica de [³H]InsP₃ en la presencia de 75µM de 2-APB, debido a que recientemente se reportó que esta droga podría no estar uniéndose al receptor de InsP₃ (Prakriya y Lewis, 2001).

La radioactividad de las fracciones se determinó utilizando un contador de centelleo para emisiones β de los ligandos marcados unidos al receptor. De esta forma se obtuvo un estimado de la cantidad de receptores por mg de proteína de la muestra.

Actividad ATPasa de Ca²⁺

Para la cuantificación de la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ se incubó la fracción de membranas totales de médula espinal de tortuga (50 µg) por 5 min a 37 °C en una solución que contenía: 25 mM MOPS, 0.2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 5 mM azida de sodio, 0.6 mM de fosfoenolpiruvato, 2.4 u/ml piruvato cinasa, 100 u/ml lactato deshidrogenasa, 0.27 mM NADH (pH 7.0). La reacción se inició con ATP (1 mM) y en presencia de 10 nM ionomicina. Se realizaron 2 ensayos paralelos: uno en la presencia de 200 µM y otro con 21 mM de CaCl₂. La actividad de la ATPasa se midió mediante una reacción que acopla la hidrólisis de ATP a la oxidación de NADH calculada mediante el registro espectrofotométrico a 340 nm. Estas mediciones se realizaron cada 2 min hasta los 12 min. Para el análisis se graficó la oxidación de NADH contra el tiempo y se calcularon las pendientes de los ensayos con Ca²⁺ basal y Ca²⁺ alto, la diferencia de éstas es la actividad de la ATPasa de Ca²⁺. La actividad calculada se comparó contra un ensayo en el que se inhibió a la ATPasa de Ca²⁺ con 1 µM tapsigargina (Saborido y cols., 1999).

Análisis de Resultados (determinaciones bioquímicas)

Se realizaron análisis estadísticos con la prueba t de *student* para determinar las diferencias entre el número de sitios que unieron [³H]InsP₃ en la presencia y en la ausencia de 2-APB; así como para comparar la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ en la presencia y ausencia de tapsigargina. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas a p<0.05.

RESULTADOS

Electrofisiología en Rebanadas

La frecuencia de disparo inicial para las dos especies de tortuga utilizadas en el presente estudio no fue significativamente diferente en condiciones control ($p=0.8$). Los valores de este parámetro fueron (media \pm error estándar) 11.7 \pm 0.9 disparos en 500 ms para *C. scripta* y 15.4 \pm 3.8 disparos en 500 ms para *K. Integrum*. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0.2$) en la frecuencia de potenciales de meseta no facilitados entre una y otra población (0.35% y 0.64%, respectivamente).

Potenciales de Meseta

Disminución en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico

Realizamos experimentos dirigidos a investigar si variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular modificaban la generación de los potenciales de meseta. Para este fin utilizamos Bapta-AM que disminuye los niveles de Ca^{2+} citoplásmico. En esta serie experimental se realizaron registros de la actividad intracelular de 6 motoneuronas. En todas las células se determinaron los patrones de actividad provocados por la aplicación del protocolo para la inducción de potenciales de meseta que consistió en pulsos de corriente despolarizante con duración de 2-3 seg.

3/6 células registradas presentaron potenciales de meseta, caracterizados por una despolarización gradual del potencial de membrana provocada por la inyección de pulsos de corriente despolarizante de intensidad constante. La despolarización gradual provocada por los potenciales de meseta produce una adaptación inicial de la frecuencia de disparo seguida de un incremento gradual en la misma acompañado de postdespolarización que en ocasiones provocaba una postdescarga (Fig. 12). En las 3/6 células restantes, la despolarización del potencial de membrana provocada por pulsos de corriente despolarizante de intensidad constante se mantenía sin cambio a lo largo del pulso. En estos casos, la frecuencia de disparo se adaptó de una frecuencia alta a una frecuencia más baja al final del pulso. En este grupo los potenciales de meseta se facilitaron por la adición de trans-ACPD o muscarina. La aplicación de 20-100 μ M de Bapta-AM disminuyó de manera reversible la amplitud de la postdespolarización asociada a los potenciales de meseta no facilitados en un 47.5 \pm 5.5 % (3 células; Fig. 12) y en 57 \pm 19% para los facilitados por trans-ACPD o muscarina (3 células).

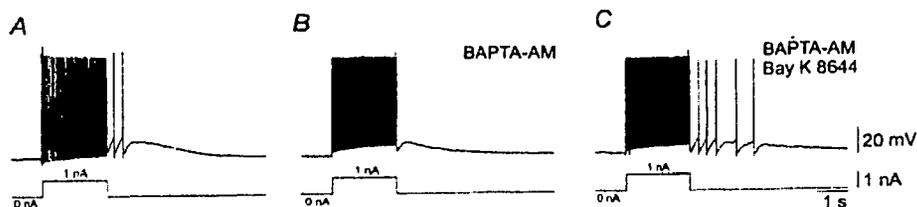


Figura 12. Efecto de la disminución de la $[Ca^{2+}]$ citoplásmica sobre los potenciales de meseta y el windup. Se muestran experimentos en los que se observa que la disminución de Ca^{2+} intracelular por la aplicación del quelante de Ca^{2+} Bapta-AM disminuye los potenciales de meseta no facilitados. Los efectos de esta droga fueron reversibles con Bay K 8644. En esta y las otras figuras los registros fueron obtenidos en una solución ringer que contenía 40 μ M CNQX, 50 μ M AP5, 40 μ M bicuculina, 10 μ M estricnina.

Manipulación farmacológica de calmodulina.

Investigamos también el efecto del bloqueo farmacológico de calmodulina provocado por W-7 o trifluoperazina sobre los potenciales de meseta. Se registraron un total de 15 células de las cuales 9/15 presentaron potenciales de meseta en la ausencia de facilitadores mientras en 6/15 este patrón se indujo por la aplicación de trans-ACPD o muscarina. La aplicación de 50-100 μ M de W-7 (6 células) o 250-500 μ M de trifluoperazina (3 células) disminuyó de manera reversible la amplitud de la postdepolarización en un 67.5 \pm 7.5 % y 72 \pm 14.6% para los potenciales de meseta no facilitados y el W-7 disminuyó en un 68 \pm 10% (6 células) los potenciales de meseta facilitados (Fig. 13).

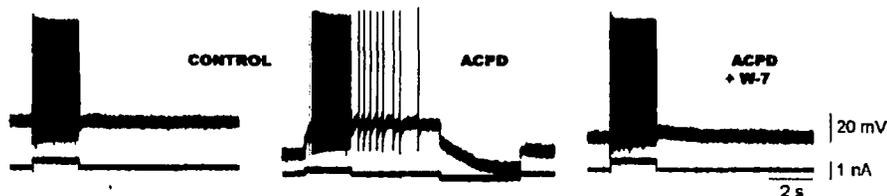


Figura. 13. Efecto del bloqueo de calmodulina sobre los potenciales de meseta y el windup. Se muestra la facilitación de potenciales de meseta con trans-ACPD y la disminución de los mismos con W-7. Los efectos de ambas drogas fueron reversibles con Bay K 8644 (no se muestra).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Manipulación farmacológica de los receptores sensibles a ryanodina

Se realizaron registros intracelulares de la actividad de 15 motoneuronas. El potencial de reposo en promedio fue de -65 mV y la resistencia de entrada tenía en un rango de 15-92M Ω . En todas las células se determinaron los patrones de actividad provocados por la aplicación de pulsos de corriente despolarizante con duración de 2-3 s. 7/15 células registradas en la ausencia de fármacos facilitadores presentaron potenciales de meseta caracterizados por una adaptación inicial seguida de un incremento gradual en la frecuencia de descarga acompañado de postdespolarización que en ocasiones provocaba una postdescarga (Fig. 14A, B arriba). En las 8/15 células restantes, la generación de potenciales de meseta se facilitó por la adición de trans-ACPD o muscarina (3/15 células) (Tabla 2, Fig. 14 B abajo) o por apertura del canal de Ca^{2+} tipo L con Bay K 8644 (2/15 células) (Fig. 15).

Para determinar si los potenciales de meseta requieren la actividad de los receptores sensibles a ryanodina, el protocolo de estimulación para producirlos se aplicó en la presencia de los bloqueadores de estos receptores: 80-100 μ M de ryanodina, 100-200 μ M de dantroleno y 40 μ M de rojo de rutenio. Los efectos de todos los bloqueadores fueron similares por lo que se presentan juntos. Ninguno de los bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina o el Bay K 8644 cambiaron ni el umbral para los potenciales de acción ni la resistencia de entrada de las células (Fig. 14A, arriba) ($p=0.9$ y $p=0.8$, $n=11$, respectivamente).

El efecto de los bloqueadores del receptor de ryanodina fue probado en motoneuronas en las que los potenciales de meseta se facilitaron con una aplicación de 15-25 min de trans-ACPD o muscarina (3 células; Fig. 14B, abajo) y en motoneuronas en las que los potenciales de meseta no fueron facilitados (7 células; Fig. 14A, B arriba). En ambos casos la adición de bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina por periodos entre 20 y 60 min eliminó o redujo el incremento en la frecuencia de descarga así como la amplitud de la despolarización tanto en potenciales de meseta facilitados como no facilitados ($p<0.05$) (Tabla 2).

Los efectos de los bloqueadores de ryanodina no se deben a modulaciones de los umbrales para inducir potenciales de meseta, ya que los potenciales de meseta no pudieron ser reinducidos ni por la inyección de corriente de mantenimiento despolarizante ni por el incremento en la intensidad del estímulo (ambas manipulaciones que facilitan a los potenciales de meseta).

Como se observa en la figura 12, la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L con BayK 8644 aplicado por 10-15 min, recupera los potenciales de meseta bloqueados por manipulaciones farmacológicas. De manera inesperada, encontramos que en todos los casos en los que los potenciales de meseta fueron bloqueados por los inhibidores de los receptores sensibles a ryanodina, la aplicación de Bay K 8644 por 40 min no recuperó ni el incremento en la frecuencia de descarga, ni la postdespolarización asociadas a los potenciales de meseta (8/8 células) (Tabla 2; Fig. 14A, B). Consistentemente con este resultado, los potenciales de meseta inducidos por Bay K 8644 fueron reducidos por la aplicación de bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina (2/2 células; Fig. 15).

Incremento en la Frecuencia de Descarga				
No. de potenciales de acción generados en los primeros/los últimos 500 ms del pulso				
Control No Facilitados	trans-ACPD Muscarina Facilitados	80-100 μ M Ryanodina	Bay K 8644	
0.9 +/-0.0 n=3	2.3+/-0.2 * n=3	1.0+/-0.1 n=3	0.94+/-0.1 n=8	p<0.05
1.86 +/- 1.3 n=7		0.8+/-0.1 * n=7		p<0.05
Postdespolarización		Potencial de membrana 300 ms después del pulso		
Control No Facilitados (mV)	trans-ACPD Muscarina Facilitados (mV)	80-100 μ M Ryanodina (mV)	Bay K 8644 (mV)	
1.1+/-0.1 n=3	9+/-2.0 * n=3	2.1+/-1.4 n=3	2.9+/-0.4 n=8	p<0.05
9.5+/-1.5 n=7		3.1+/-0.9 * n=7		p<0.05
Postdespolarización		Potencial de membrana 300 ms después del pulso		
Sin TTX (mV)	Con TTX (mV)	TTX + 80-100 μ M Ryanodina (mV)		
11.8+/-2.2 n=3	10.6+/-3.7 n=3	4.1+/-1.2 n=3		

Tabla 2. Efectos del bloqueo de receptores de ryanodina sobre el incremento en la frecuencia de descarga y la postdespolarización asociada a los potenciales de meseta. Se presentan los datos calculados del incremento en la frecuencia de descarga y la postdespolarización en neuronas registradas en la ausencia de TTX (primer y segundo paneles). En la primera fila del primer y segundo paneles se presenta el grupo de células en el que los potenciales de meseta fueron facilitados por agonistas del receptor mGlu I o muscarina, y en las filas siguientes se presentan respectivamente los grupos de células con potenciales de meseta que no fueron facilitados. En el tercer panel se presentan los valores de postdespolarización en células registradas en la presencia de TTX (tercer panel). Los valores representados corresponden a la media +/- error estándar.

En tres células se probaron los efectos de los bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina sobre los potenciales de meseta en la presencia de TTX, para confirmar que la actividad que estudiamos correspondía con potenciales de meseta. La aplicación de TTX no produjo cambio en la amplitud de la postdespolarización; pero la aplicación de bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina redujo la postdespolarización asociada a los potenciales de meseta (Tabla 2, tercer panel). En la presencia de TTX, se observa una pequeña meseta al final del pulso aún después de la aplicación de bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina. Este componente residual no implica un cambio en los umbrales para la inducción de potenciales de meseta ya que la aplicación de un pulso despolarizante de mayor intensidad no recuperó los potenciales de meseta. Resultados preliminares de un experimento, sugieren que este componente residual es insensible a la

TESIS CON
 FOLIO DE ORIGEN

actividad de la fosfolipasa C, ya que no es inhibido por U-73122, que es un bloqueador de esta enzima (n=1) (Fig. 16).

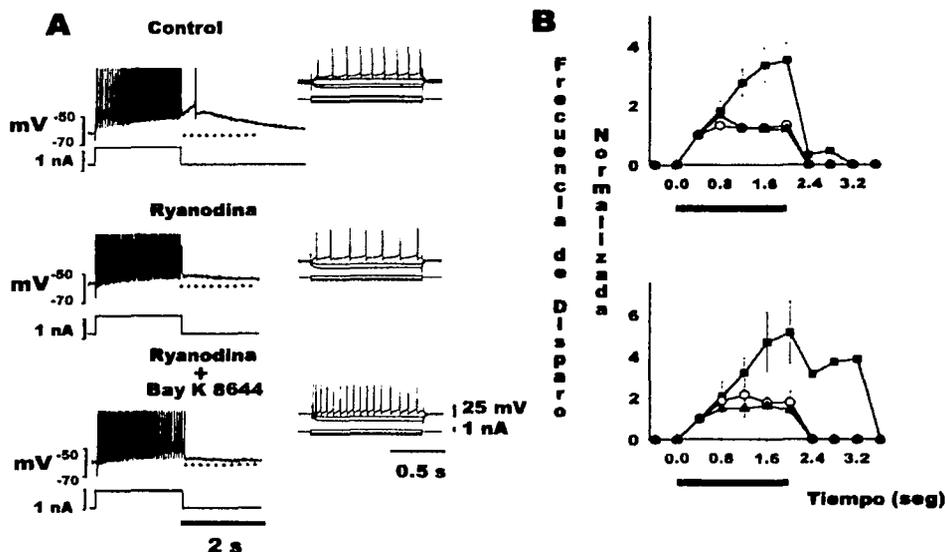


Fig. 14. Efectos de la manipulación farmacológica de receptores sensibles a ryanodina sobre potenciales de meseta facilitados y no facilitados. Se muestran registros del potencial de membrana de motoneuronas de tortuga (trazos superiores) y el efecto de la inyección del pulso de corriente despolarizante (trazos inferiores). La línea discontinua representa el potencial de membrana basal. A) Potenciales de meseta registrados en condiciones control, tras la aplicación de $80 \mu\text{M}$ de ryanodina, y tras la aplicación de $1 \mu\text{M}$ del activador de canales de Ca^{2+} tipo L, Bay K 8644. Arriba (derecha): respuestas a un protocolo de pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante en la presencia de las drogas. Se puede observar que ni la ryanodina ni el Bay K 8644 cambiaron la resistencia de entrada ($p=0.9$), ni el umbral para los potenciales de acción ($p=0.8$). B) Arriba: Gráfica de la frecuencia de disparo normalizada en el tiempo en la presencia de inhibidores de la actividad presináptica (■), tras la adición de diferentes bloqueadores del receptor de ryanodina (●) y tras la adición de $1 \mu\text{M}$ de Bay K 8644 (▲). Abajo: Gráfica de la frecuencia de disparo normalizada contra el tiempo asociada a potenciales de meseta facilitados por $40 \mu\text{M}$ de trans-ACPD o $25 \mu\text{M}$ de muscarina (■), tras la adición de bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina (●) tras la adición de $1 \mu\text{M}$ de Bay K 8644 (▲). La barra horizontal representa el pulso de estimulación despolarizante. En ambos grupos se encontraron diferencias significativas entre la fase de inducción de los potenciales de meseta facilitados y no facilitados (■) con la fase en la que se aplicó ryanodina (●) o Bay K 8644 (▲); debido a que el Bay K 8644 no recuperó a los potenciales de meseta no se encontraron diferencias significativas entre los dos últimos tratamientos (ANOVA $p<0.05$).

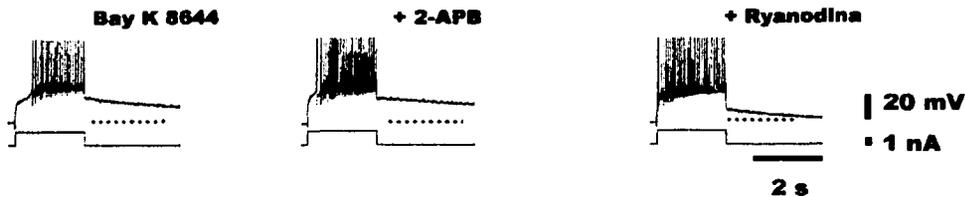


Figura 15. Efectos de la manipulación farmacológica de receptores sensibles a ryanodina sobre potenciales de meseta inducidos por activación del canal de Ca^{2+} tipo L. Potenciales de meseta facilitados con $1 \mu\text{M}$ de Bay K 8644, tras la aplicación de $75 \mu\text{M}$ de 2-APB, y tras la adición de $80 \mu\text{M}$ de ryanodina.

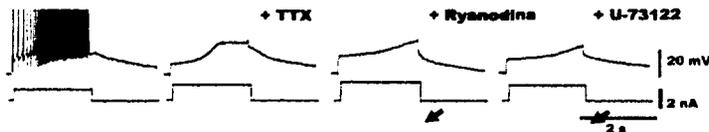


Fig. 16. Efecto de la manipulación farmacológica de receptores sensibles a ryanodina sobre potenciales de meseta, en la presencia de TTX. En el primer trazo se observa el incremento en la frecuencia de descarga y la postdespolarización producidas por un pulso de corriente despolarizante de 2 s. En el segundo trazo, se observan los potenciales de meseta que son desenmascarados con 200 nM de TTX. En el tercer trazo se observa la reducción de la meseta por la aplicación de $80 \mu\text{M}$ de ryanodina. Con TTX y ryanodina, un pulso de corriente más despolarizante puede aun evocar un pequeño componente residual, no suficiente para producir potenciales de meseta (flecha). Este componente residual no fue eliminado por la adición de $1 \mu\text{M}$ U-73122 en este experimento único.

En algunos experimentos utilizamos activadores de los receptores sensibles a ryanodina, con la finalidad de investigar si la aplicación de estos compuestos facilita los potenciales de meseta y el *windup*. Probamos cafeína en concentraciones de 3 a 10 mM (5 células; Fig. 17). En ninguno de estos experimentos observamos la facilitación de potenciales de meseta, pero sí observamos que de manera consistente, la cafeína induce un incremento en la frecuencia de descarga de las motoneuronas (Fig 17). El efecto de la cafeína sobre el umbral de disparo es probablemente debido al aumento en resistencia de entrada que se observo en 2 de las células estudiadas. Los experimentos con activadores de receptores sensibles a ryanodina se realizan en células que no presentan potenciales de meseta, similar a la condición en la que se inducen por la aplicación de agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato y acetilcolina. En estas condiciones, la ausencia de potenciales de meseta o *windup* tras la aplicación de activadores del receptor de ryanodina puede significar una falta de efecto de los activadores sobre estos fenómenos o bien la incapacidad de estas células para generarlos. Estos experimentos con activadores fueron los primeros realizados en la fase de electrofisiología, debido a la problemática relacionada a

su interpretación decidimos continuar probando los efectos de bloqueadores de este receptor que se presentaron anteriormente.

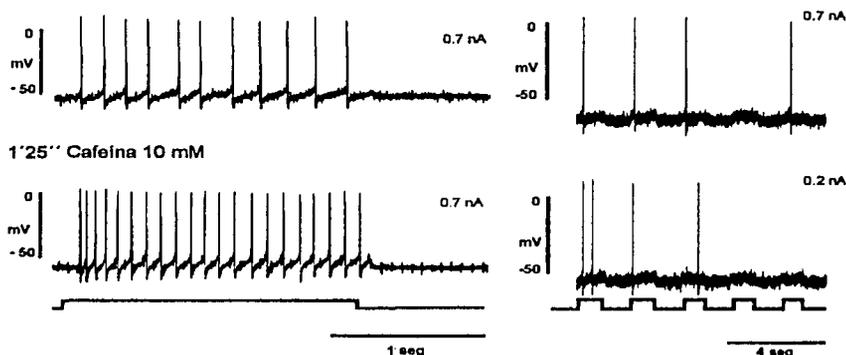


Fig. 17. Efecto de la activación farmacológica de receptores sensibles a ryanodina sobre potenciales de meseta. Se presenta el efecto de 10 mM de cafeína sobre la actividad de una motoneurona en la que se aplicó el protocolo para la inducción de potenciales de meseta (izquierda) y *windup* (derecha). En esta célula, la aplicación de los protocolos no inducía ni potenciales de meseta ni *windup* en la condición control (arriba), ni después de cafeína (abajo). Como se puede observar que la cafeína produce una disminución en el umbral de disparo de las células (comparar la intensidad del pulso utilizado en los dos trazos a la derecha; 0.7 y 0.2).

Manipulación farmacológica de los receptores sensibles a $InsP_3$.

Con la finalidad de investigar la participación de las vías de señalización dependientes de $InsP_3$ en los potenciales de meseta se probó el efecto del bloqueador de los receptores sensibles a $InsP_3$, 2-APB o del inhibidor de la fosfolipasa C y la producción de $InsP_3$, U-73122. Se probaron potenciales de meseta facilitados por trans-ACPD, muscarina, Bay K 8644 y no facilitados.

En 9 de 10 células en las que los potenciales de meseta fueron facilitados por trans-ACPD o muscarina, el incremento en la frecuencia de descarga y la postdespolarización fueron inhibidas por la aplicación por 40-80 min de 2-APB (Fig. 18A, C) o de 60 min de U-73122 (1/1 células) ($p < 0.05$) (Tabla 3). En contraste, el incremento en la frecuencia de descarga y la postdescarga fueron reducidas por el 2-APB en aproximadamente la mitad de las células probadas (3/7 células) y en una célula probada con U-73122 cuando los potenciales de meseta no fueron facilitados por la activación de receptores metabotrópicos. El resto de las células permanecieron sin cambio (4/7 células). Las células con potenciales de meseta no facilitadas fueron separadas en dos grupos, uno sensible a las manipulaciones con bloqueadores de la vía de $InsP_3$ (I) y otro insensible a estas manipulaciones (II). Esto último con el fin de no obscurecer los efectos de las células afectadas (Tabla 3).

Tanto el incremento en la frecuencia de descarga como la posdespolarización asociada a la activación de potenciales de meseta bloqueados por 2-APB (5/8 células Fig. 18A) o por U-73122 (2/3 células) fueron recuperados por la aplicación de 10-15 min de Bay K 8644

(Tabla 3). Además algunos resultados preliminares muestran que los potenciales de meseta inducidos por Bay K 8644 no fueron afectados por 2-APB (1/1 célula) o U-73122 (2/2 células) (t de *student* $p=0.6$ para el incremento en la frecuencia de descarga y $p=0.7$ para la postdepolarización).

Incremento en la Frecuencia de Descarga				
No. de potenciales de acción generados en los primeros/los últimos 500 ms del pulso				
Control No Facilitados	trans-ACPD Muscarina Facilitados	75 μ M 2-APB 1 μ M U-73122	Bay K 8644	
0.7 +/-0.0 n=8	1.2+/-0.0 * n=9	0.8+/-0.0 n=9	2.9+/-0.4 * n=7	p<0.05
1.1 +/- 1.3 n=3 I		0.7+/-0.1 * n=3		p<0.05
1.2+/-0.0 n=4 II		1.1+/-0.0		p>0.05
Postdepolarización Potencial de membrana 300 ms después del pulso				
Control No Facilitados (mV)	trans-ACPD Muscarina Facilitados (mV)	75 μ M 2-APB 1 μ M U-73122	Bay K 8644 (mV)	
0.9+/-0.1 n=8	3.9+/-1.2 * n=9	0.1+/-0.7 n=9	6.4+/-0.6 n=7	p<0.05
7.6+/-0.8 n=3 I		2.8+/-1.2 * n=3		p<0.05
10.4+/-2.7 n=4 II		6.5+/-1.6 n=4		p>0.05

Tabla 3. Efectos del bloqueo de receptores de $InsP_3$ sobre el incremento en la frecuencia de descarga y la postdepolarización asociada a los potenciales de meseta. Se presentan los datos calculados del incremento en la frecuencia de descarga y la postdepolarización en motoneuronas de tortuga. En la primera fila de cada panel se presenta el grupo de células en el que los potenciales de meseta fueron facilitados por agonistas del receptor mGlu I o muscarina, y en las filas siguientes se presentan respectivamente los grupos de células con potenciales de meseta que no fueron facilitados y que fueron sensibles a la inhibición farmacológica de la vía de $InsP_3$ (I) y los que no fueron sensibles a estas manipulaciones (II). Los valores representados corresponden a la media +/- error estándar.

Otra serie de resultados preliminares sugiere que en todos los casos en los que la inhibición de la vía de señalización dependiente de $InsP_3$ no tiene efecto sobre los potenciales de meseta los bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina los eliminan. Estos resultados se observaron en potenciales de meseta no facilitados (1/1 célula) e insensibles a 2-APB o U-73122 (1/1 célula), así como en los casos de potenciales de meseta recuperados con Bay K 8644 después del tratamiento con 2-APB (1/1 célula) o U-73122 (1/1 célula).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente, en 3/3 células en las que los potenciales de meseta fueron insensibles al 2-APB, la depleción de Ca^{2+} del RE con tapsigargina bloqueó completamente a los potenciales de meseta (Fig.18B), sugiriendo que el mecanismo para generar potenciales de meseta era sensible a la liberación intracelular de Ca^{2+} .

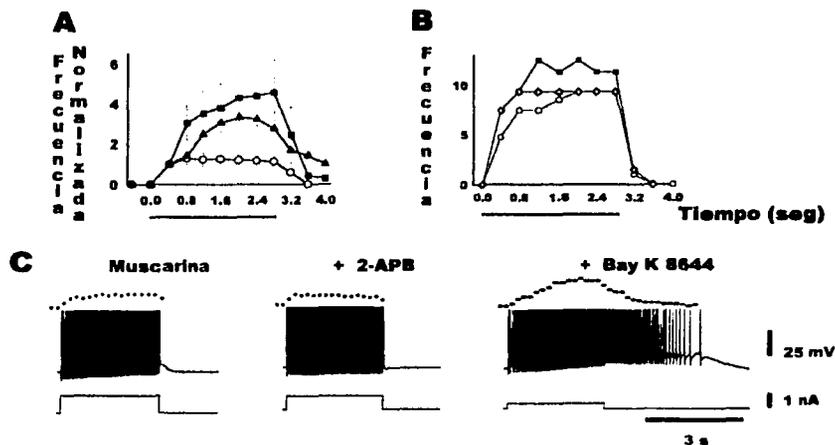


Fig. 18. Efecto de la manipulación farmacológica de receptores sensibles a $InsP_3$ sobre potenciales de meseta. A) Gráfica que muestra la frecuencia de disparo normalizada contra el tiempo de potenciales de meseta facilitados por $40 \mu M$ de trans-ACPD o $25 \mu M$ de muscarina (■), tras la aplicación de $75 \mu M$ del bloqueador de receptores sensibles a $InsP_3$, 2-APB (●) y tras la aplicación por $1 \mu M$ de Bay K 8644 (▲). El incremento en la frecuencia de disparo fue significativamente diferente entre la condición de potenciales de meseta inducidos por activación de receptores metabotrópicos (■) y la aplicación de ryanodina (●) pero no de la aplicación de Bay K 8644 (▲) (ANOVA $p < 0.05$). B) Frecuencia de disparo de una célula contra el tiempo mostrando potenciales de meseta promovidos en la ausencia de facilitadores metabotrópicos (■), después de la aplicación de 2-APB (●) y tras la aplicación de $10 \mu M$ de tapsigargina (◇). C) Potenciales de meseta facilitados por $25 \mu M$ de muscarina, a los que se les aplico $75 \mu M$ del bloqueador de $InsP_3$, 2-APB y posteriormente $1 \mu M$ de Bay K 8644. Los histogramas arriba de los registros representan la frecuencia de disparo en el tiempo.

Windup

En 17/34 células estudiadas la estimulación despolarizante subumbral repetitiva (0.5 cps) produjo *windup*. Este fenómeno se caracteriza por un incremento gradual en la descarga evocada por cada estímulo cuando se aplica de manera repetitiva, provocada por el crecimiento sucesivo de la despolarización asociada a la activación de potenciales de meseta (Fig. 19). La sensibilidad del *windup* a bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina, $InsP_3$ y de la fosfolipasa C fue probada en estas células. En general, el *windup* y los potenciales de meseta fueron afectados de manera similar por estos bloqueadores, aunque el *windup* fue siempre afectado antes que los potenciales de meseta. Los registros de *windup* fueron estables en células no afectadas por las manipulaciones farmacológicas por más de 5 horas.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Los bloqueadores de ryanodina eliminaron el *windup* en todas las condiciones probadas: *windup* facilitado por la aplicación de trans-ACPD o muscarina (2/2 células; Fig. 19A, C), de Bay K 8644 (2 células) o en la ausencia de estos facilitadores (4 células). De manera similar a lo observado con los potenciales de meseta, el Bay K 8644 no recuperó los potenciales de meseta eliminados por los bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina (4 células) (Fig. 19A).

El *windup* facilitado por trans-ACPD o muscarina (4/4 células) (Fig. 19B) fue eliminado por el bloqueador de los receptores sensibles a InsP_3 , 2-APB así como por el inhibidor de la fosfolipasa C, U-73122. En cambio estas drogas solo afectaron aproximadamente la mitad de las células en las que el *windup* no fue facilitado; (2/5 células tratadas con 2-APB y en 1/1 células con U-73122). El bloqueo del *windup* inducido por inhibición farmacológica de la vía de InsP_3 fue revertido por Bay K 8644 en todos los casos probados (7 células). El *windup* facilitado por la aplicación de Bay K 8644 no fue afectado por 2-APB pero fue eliminado por bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina (1/1 células; Fig. 19C). Estos resultados sugieren que el *windup* inducido por la activación de los agonistas de receptores mGlu I o muscarínicos activan la vía de InsP_3 , pero que la activación de esta vía no es obligatoria para la generación del *windup*.

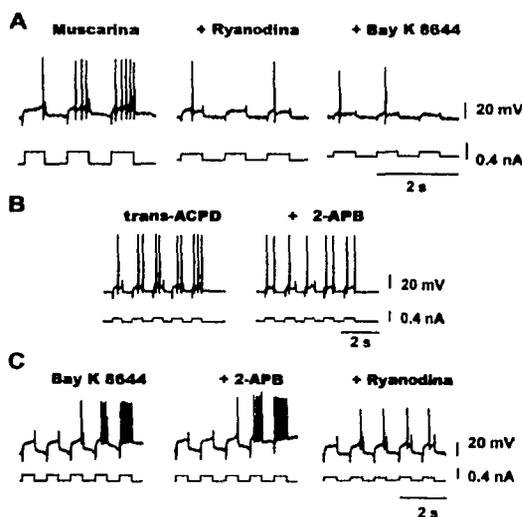


Fig. 19. Efecto de la manipulación farmacológica de los receptores sensibles a ryanodina e InsP_3 sobre el *windup*. Los bloqueadores de los receptores sensibles a InsP_3 y de ryanodina afectan de manera similar a los potenciales de meseta y el *windup*. A) El *windup* facilitado por 25 μM de muscarina, tras la aplicación de 100 μM de ryanodina y tras la aplicación de 1 μM de Bay K 8644. B) *Windup* facilitado por 40 μM de trans-ACPD, tras la aplicación del inhibidor de receptores de InsP_3 2-APB (75 μM). C) *Windup* facilitado por 1 μM de Bay K 8644, tras la aplicación de 75 μM de 2-APB, y tras la adición de 80 μM de ryanodina.

Determinaciones Bioquímicas

Utilizando la técnica de unión específica de ligandos radiactivos encontramos que las secciones cervical y lumbar de la médula espinal de tortuga tienen una cantidad de sitios de unión a [³H]ryanodina y [³H]InsP₃ similar a la reportada previamente para otras estructuras del sistema nervioso central en mamíferos (ver tabla 4).

Recientemente, se ha reportado que el efecto de 2-APB puede deberse a su acción sobre entidades moleculares distintas a los receptores sensibles a InsP₃ (Pakriya y Lewis, 2001). Por esta razón para determinar si el 2-APB interactuaba con los receptores sensibles a InsP₃, decidimos cuantificar la cantidad de sitios de unión a [³H]InsP₃ en la presencia de este fármaco. Como se muestra en la tabla 2 observamos una marcada disminución de los sitios de unión a [³H]InsP₃ cuando el 2-APB era incluido en el ensayo. Este resultado confirma que en la médula espinal de tortuga el 2-APB interactúa con los receptores sensibles a InsP₃.

Tabla 4. Unión de [³ H]ryanodina y [³ H]InsP ₃ a membranas totales de médula espinal de tortuga (cervical y lumbar).					
fmoles/ mg prot.	Rya Zimanyi y Pessah, 1991	Rya n=3	InsP ₃ Martinez-Merlos y cols., 1997	InsP ₃ n=5	InsP ₃ + 2-APB n=3
Hipocampo	117				
Cerebelo	122				
Médula		81.84 +/-		217.56 +/-	16.36 +/-
Tortuga		12.97		29.72	10.61
Cerebro			130-260		

Tabla 4. Se presentan datos de la cantidad de sitios que unieron [³H]ryanodina y [³H]InsP₃ en preparaciones de membranas totales de médula espinal de tortuga. Se presentan también datos obtenidos por otros grupos en otras regiones del sistema nervioso con fines comparativos.

Por otro lado, se realizaron mediciones de la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ en preparaciones de secciones lumbar y cervical de la médula espinal de tortuga y se probó su sensibilidad a la tapsigargina. Obtuvimos una actividad de 33 +/- 9 μmol NADH/min/mg prot y observamos que en la presencia de tapsigargina la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ fue completamente inhibida (n=2), lo que indica que esta actividad corresponde a la ATPasa de Ca²⁺ del RE. Debido a que el bloqueo de la actividad de la ATPasa impide el relleno del RE Ca²⁺, estos resultados sugieren que nuestros datos electrofisiológicos con tapsigargina se pueden deber al vaciamiento de Ca²⁺ del RE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microscopía Confocal

Se realizaron 2 experimentos en los que se incubaron cortes histológicos de médula espinal de tortuga con ryanodina, heparina y brefeldina acopladas a fluoróforos y se observaron al microscopio confocal.

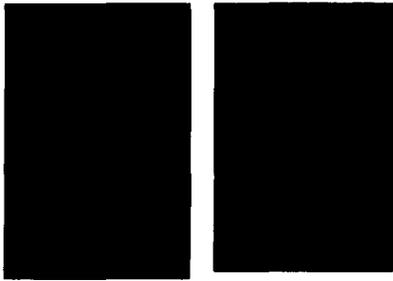
Se observó una distribución homogénea de receptor de ryanodina en la sustancia gris de la médula espinal y coexistencia de receptores sensibles a InsP_3 y ryanodina en la sustancia blanca, también distribuidos homogéneamente (Fig. 20). Se realizaron dobles marcajes de ryanodina con brefeldina y se observa una completa colocalización de ambos marcajes, lo cual nos indica que los receptores sensibles a ryanodina se ubican en endomembranas. Adicionalmente, con la finalidad de corroborar la especificidad de la unión de los ligandos acoplados a fluoróforos se realizaron incubaciones de los ligandos acoplados a fluoróforos con excesos de ligando no marcado, tanto los fluoróforos acoplados a ryanodina como los acoplados a heparina fueron desplazados por los ligandos no marcados. Se observó una diferencia significativa en la intensidad de marcaje en la presencia y ausencia de ligandos no marcados ($P < 0.05$) (Fig. 21).

Tanto el marcaje de ryanodina como el de heparina acopladas a fluoróforos fueron muy intensos y homogéneos (Fig. 20 y 21); esto, aunado a lo intrincado de las proyecciones neuronales impidió hacer observaciones con mayor aumento que permitieran obtener información sobre la distribución de estos receptores en compartimentos neuronales. Por esta razón, en un experimento realizamos marcajes retrógrados de las motoneuronas mediante la inyección de Dextran acoplado a fluoresceína en ambos nervios ciáticos de la tortuga (Fig. 22). En estas condiciones se realizaron incubaciones con ryanodina acoplada a Rojo Texas. Esta variación permitió identificar motoneuronas individuales y observar la distribución reticular del receptor de ryanodina en estas células.



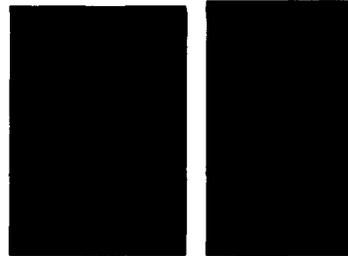
Fig. 20. *Distribución de receptores sensibles a ryanodina e InsP₃ en la región lumbar de la médula espinal de tortuga.* En esta figura se observa la distribución de los sitios de unión de los ligandos ryanodina y heparina acoplados a rojo texas (rojo) y fluoresceína (verde) respectivamente en una hemisección de la sección lumbar de la médula espinal de tortuga (4X). Estos ligandos se unen respectivamente a los receptores sensibles a ryanodina y a InsP₃. Como se observa, ambos receptores colocalizan (amarillo) y se distribuyen de manera homogénea en la sustancia gris y predominantemente en la sustancia blanca. En 10x se observa un acercamiento de la sección ventral de la médula espinal donde se encuentran las motoneuronas de interés en este estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Ryanodina RT 1 μ M

Ryanodina RT 1 μ M + Ryanodina 300 μ M

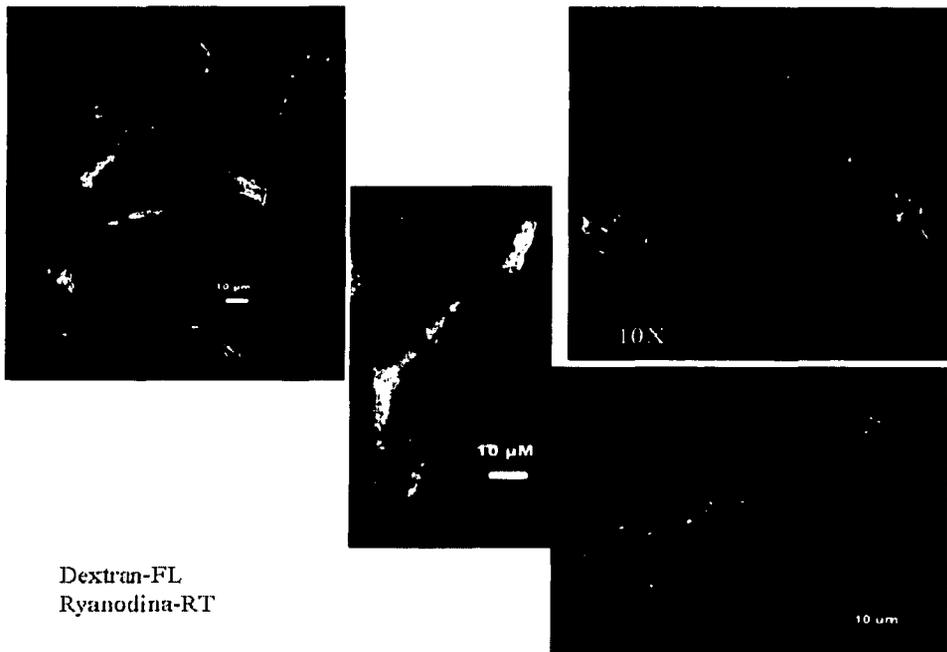


Heparina fl 1 μ M

Heparina fl 1 μ M + Heparina 50 μ M

Fig. 21. *Controles de especificidad del marcaje con ligandos para receptores sensibles a ryanodina e InsP₃ en la región lumbar de la médula espinal de tortuga.* En esta figura se observa el marcaje de con ryanodina acoplada a rojo texas y heparina acoplada a fluoresceína (izquierda) desplazados con un exceso de los mismos ligandos no marcados (derecha). Este experimento muestra que el marcaje es específico de los receptores sensibles a ryanodina e InsP₃, ya que encontramos una diferencia significativa cuando el ligando no marcado es coincubado (ANOVA P<0.05). Las imágenes en la presencia y ausencia de ligandos no marcados se realizaron utilizando valores idénticos de ganancia en el microscopio confocal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Dextran-FL
Ryanodina-RT

Fig 22. Localización de receptores sensibles a ryanodina en neuronas marcadas por transporte retrogrado de Dextran acoplado a fluoresceína. Marcaje de receptores sensibles a ryanodina (rojo texas) en motoneuronas que fueron marcadas retrógradamente a través de la inyección de Dextran acoplado a fluoresceína (verde) en el nervio ciático. Como se puede observar, la distribución del receptor de ryanodina en estas células es reticular y se encuentra también en las proyecciones de las mismas. De izquierda a derecha los aumentos son 60X, 60X y 100X para las imágenes en las que no está indicado.

DISCUSIÓN

Distribución de los receptores sensibles a $InsP_3$ y a ryanodina.

Nuestros resultados de microscopía confocal y las determinaciones bioquímicas indican que la médula espinal de tortuga tiene elementos que controlan la liberación de Ca^{2+} del RE, similares a los reportados en preparaciones más caracterizadas. Los experimentos histológicos comprueban la existencia de receptores sensibles a ryanodina y de $InsP_3$ en las secciones cervical y lumbar de la médula espinal de tortuga. Ambos tipos de receptores se encuentran de manera preponderante en la sustancia blanca; donde no se observa una abundancia mayor para ninguno. En la sustancia gris en cambio, los receptores sensibles a ryanodina parecen ser más abundantes comparados con el de $InsP_3$, esta observación preliminar coincide con la encontrada en nuestros experimentos con rebanadas de rata (no publicado) y con la reportada en otras zonas del sistema nervioso central de mamífero (Nakanishi y cols., 1992, Rodrigo y cols., 1993 y Sharp y cols., 1993). El marcaje para ambos receptores se localiza en endomembranas, lo que confirma la localización de estos receptores en el retículo endoplásmico, igual que en otros sistemas neuronales (Korkotian y Segal, 1998; Kanaseki y cols., 1998). El marcaje retrógrado de neuronas individuales nos permitió observar que el receptor de ryanodina se encuentra distribuido en el soma y proyecciones neuronales (Fig. 22)ó Sin embargo se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

requiere un número mayor de experimentos con marcaje retrogrado que se pueda acoplar al marcaje de receptores con el fin de obtener información de la distribución de estos en las motoneuronas.

Estos resultados que muestran coincidencias entre la composición y distribución de receptores liberadores de Ca^{2+} en la tortuga con la composición y distribución de estos mismos elementos en mamíferos, aunado a la descripción de la distribución de otros elementos relacionados con la generación de potenciales de meseta en motoneuronas de tortuga (Simon y cols., 2003), son importantes ya que sugieren una coincidencia en los mecanismos para la producción de estos fenómenos a lo largo de varias especies animales.

Determinaciones bioquímicas.

El número de sitios que unen [3H]ryanodina y [3H]InsP₃ en preparaciones de membranas totales de médula espinal de tortuga es similar a los reportados para otras regiones del cerebro en diferentes especies de roedores (Zimanyi y Pessah, 1991; Martínez-Merlos y cols., 1997) (Tabla 4), y la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} es sensible a tapsigargina, lo que sugiere su localización en el RE.

Recientemente Prakriya y Lewis (2001) reportaron que el 2-APB no tiene acción sobre receptores sensibles a InsP₃, sino sobre otros canales que movilizan Ca^{2+} . Nuestros experimentos no nos permiten descartar que este fármaco tenga acción sobre entidades moleculares diferentes al receptor de InsP₃; pero confirman que, en nuestro sistema, el 2-APB interactúa con los receptores sensibles a InsP₃.

Efectos de la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular

Nuestros experimentos muestran que los potenciales de meseta dependientes de la actividad de canal de Ca^{2+} tipo L, requieren de incrementos en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico, ya que la aplicación del quelante de Ca^{2+} Bapta-AM los bloquea. Se sabe que los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ facilitan la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo L, incrementando su corriente y disminuyendo su umbral y la latencia para su activación (Chavis y cols., 1995), lo que concuerda con nuestros resultados.

El bloqueo de los potenciales de meseta por Bapta-AM fue revertido por la activación de canales tipo L con Bay K 8644. Esto puede deberse a 1) que la cercanía espacial de los receptores sensibles a ryanodina y el canal L evitan el amortiguamiento Ca^{2+} que entra por el canal L o 2) que los potenciales de meseta estén mediados por la interacción física directa de los receptores de ryanodina y el canal de Ca^{2+} tipo L, lo que haría innecesaria la participación de este ión en la facilitación del canal.

Manipulación farmacológica de la calmodulina

Nuestros resultados con los bloqueadores de la actividad de calmodulina muestran que al menos una vía de inducción de los potenciales de meseta implica la activación de esta proteína. Esto concuerda también con la sensibilidad de los potenciales de meseta y el *windup* a los niveles de Ca^{2+} intracelular ya que la activación de esta proteína es sensible a las concentraciones de este ión (Swandulla y Zeilhofer, 1998). Como se discutirá más adelante la calmodulina es un posible blanco del Ca^{2+} para la facilitación del canal tipo L necesaria para la generación de los potenciales de meseta. En particular, los resultados obtenidos son muy afines con la descripción de una forma de calmodulina que se ha descrito esta asociada permanentemente al canal L (Erickson y cols., 2001) que facilita su actividad (Zuhlke y cols., 1999).

Es posible que la calmodulina tenga también efectos sobre otras proteínas implicadas en la generación de los potenciales de meseta, por ejemplo los canales de InsP₃ o de ryanodina como veremos en la siguiente sección (Verkhatsky y Shmigol, 1996; Markin y Bezprozvanny, 1998; Carafoli y cols, 2001). Además la calmodulina interactúa con una gran cantidad de proteínas en el citoplasma, algunas de las cuales han sido involucradas en la generación de otros tipos de plasticidad neuronal, entre los que destacan la LTP (Wang y Kelly, 1997; Yang y cols., 1999; Morishita y cols., 2001; Cammarotta y cols., 2002; Vaillant y cols., 2002; Fink y cols., 2003).

Manipulación farmacológica de los receptores sensibles a ryanodina e InsP₃

Nuestros experimentos electrofisiológicos con activadores del receptor de ryanodina no arrojaron resultados que permitan hacer conclusiones contundentes. Esta serie experimental fue interrumpida en virtud de que la cafeína no produjo ningún efecto sobre los potenciales

de meseta. La falta de efectos sobre los potenciales de meseta de las células probadas con este activador de los receptores de ryanodina es difícil de interpretar, ya que el diseño experimental utilizado no permite discriminar si las neuronas probadas pertenecen a la población de células que no presentan potenciales de meseta o si la activación farmacológica de los receptores de ryanodina no los afecta. A pesar del bajo número de experimentos, observamos una tendencia de la cafeína a disminuir el umbral de disparo de las neuronas, es probable que este efecto se deba al aumento en la resistencia de entrada que se ha reportado por efecto de la aplicación de cafeína en otros tipos neuronales (Greene y cols., 1985).

Los potenciales de meseta fueron inhibidos por el bloqueo de receptores de ryanodina, independientemente de si fueron facilitados por la activación de receptores mGlu I, receptores muscarínicos, por apertura del canal L o no facilitados farmacológicamente. Esto sugiere que la actividad del receptor de ryanodina es necesaria para la generación de los potenciales de meseta. La sensibilidad de los potenciales de meseta a los niveles de Ca^{2+} intracelular sugiere la posible activación de un mecanismo de retroalimentación positiva de liberación de Ca^{2+} de los receptores sensibles a ryanodina inducida por Ca^{2+} proveniente del influjo por el canal tipo L (ver figura 11). Este tipo de interacciones entre el canal de Ca^{2+} tipo L y los receptores sensibles a ryanodina han sido descritas en diversos tipos neuronales (Chavis y cols., 1996; Tanabe y cols., 1998 y Hashi y cols., 2000) y se sabe que pueden ser promovidas por la activación repetitiva del canal tipo L (Chavis y cols., 1996), lo que es compatible con el requerimiento de estimulación repetitiva para la activación del *windup* en motoneuronas. Los posibles mecanismos responsables de la interacción funcional pueden implicar:

- a) La activación de una forma de calmodulina permanentemente pegada al canal de Ca^{2+} tipo L (Erickson y cols., 2001) que facilita al canal (Zuhlke y cols., 1999). Esto concuerda con la reducción de los potenciales de meseta inducida por bloqueadores de calmodulina (Figura 13).
- b) La interacción directa de los canales de Ca^{2+} con iones liberados por el RE, debido a que se sabe que el canal de Ca^{2+} tipo L tiene varias secuencias consenso de unión a Ca^{2+} (Peterson y cols., 2000). En este punto faltará explorar específicamente que sitios están involucrados y bajo que condiciones el Ca^{2+} puede facilitar la actividad del canal, ya que se conoce que en condiciones de reposo el Ca^{2+} inactiva al canal (Dolphin y cols., 1999).
- c) La fosforilación del canal L mediada por la activación dependiente de Ca^{2+} de la proteína cinasa C (Arenson y Evans, 2001; Son y Brinton, 2001), o de la calmodulina cinasa II cuya inactivación disminuye los potenciales de meseta inducidos por un agonista muscarínico en el hipocampo (Alberi y cols., 2000). La fosforilación de los canales L se ha propuesto como uno de los mecanismos responsables de la facilitación de los canales tipo L (You y cols., 1995).
- d) Interacciones directas entre los receptores sensibles a ryanodina y los canales de Ca^{2+} tipo L (Chavis y cols., 1996), que pudieran estar organizados en microdominios que favorecen su interacción (Delmas y Brown, 2002; Jochenning y Ehrlich, 2002). Respecto de esta hipótesis hay evidencia que sugiere la existencia de sitios en los que la cercanía física entre estas dos membranas podría permitir su interacción directa (Takechi y cols., 1998; Jochenning y Ehrlich, 2002), además de que se han reportado interacciones físicas entre proteínas localizadas en la membrana plasmática y proteínas ubicadas en el RE, entre las que destacan la interacción de canales TRP3 y el receptor de $InsP_3$ como mecanismo para el relleno del RE con Ca^{2+} (Ma y cols., 2000).

Nuestros experimentos no prueban estas hipótesis, ni permiten descartar por ejemplo las interacciones mediadas por Ca^{2+} ya que, de existir, la cercanía espacial de los receptores sensibles a ryanodina y el canal L podría evitar la unión de Ca^{2+} al quelante Bapta-AM y permitir que el bloqueo promovido por este quelante sea reversible por la aplicación de Bay K 8644. Por otro lado, algunos hallazgos como la imposibilidad de promover los potenciales de meseta con Bay K 8644 en la presencia de bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina, favorecen la hipótesis sobre la interacción directa entre proteínas, ya que se ha mostrado que la ryanodina no bloquea la actividad del canal L (Chavis y cols., 1996) por tanto la activación de este canal debería ocurrir aún en la presencia de este fármaco, pero la entrada de Ca^{2+} a través del mismo no parece ser suficiente para activar los potenciales de meseta.

Los potenciales de meseta en las motoneuronas espinales son facilitados por la actividad de receptores metabotrópicos a diferentes neurotransmisores –noradrenalina, serotonina, acetilcolina y glutamato- (Conway y cols., 1988; Hounsgaard y cols., 1988; Delgado-Lezama y cols., 1997; Svirakis y cols., 1997). La activación de estos receptores metabotrópicos puede facilitar las corrientes de Ca^{2+} dependientes del canal tipo L, esta facilitación consiste en incrementos en la cantidad de corriente así como disminuciones en el umbral y la latencia para su activación (Chavis y cols., 1995; Perrier y Hounsgaard, 2003). Varias evidencias sugieren que las vías de transducción asociadas a estos receptores convergen en la vía de fosfolipasa C- $InsP_3$ para facilitar las corrientes de los canales tipo L (Perrier y cols, 2002).

Nuestros resultados muestran que la activación de receptores metabotrópicos mGlu I y muscarínicos facilitó los potenciales de meseta y que este tipo de potenciales de meseta fueron bloqueados por la inactivación de la vía de $InsP_3$ (ver figura 18). Asimismo, a diferencia de nuestros resultados con los bloqueadores de los receptores sensibles a ryanodina, los potenciales de meseta no facilitados o los facilitados por la apertura del canal L no fueron siempre sensibles al bloqueo de la vía de $InsP_3$. Ambos resultados sugieren la participación de esta vía de señalización en la modulación de este patrón de actividad y muestran que la generación de los potenciales de meseta es independiente de la actividad de la vía de $InsP_3$. De acuerdo con nuestros resultados con los inhibidores de calmodulina (figura 13), es posible que el mecanismo para la modulación de los potenciales de meseta dependa de la facilitación del canal tipo L, probablemente mediada por calmodulina activada por la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico.

Por otro lado, la habilidad del Bay K 8644 para facilitar las corrientes tipo L cuando la vía de fosfolipasa C- $InsP_3$ es bloqueada, sugiere que los receptores sensibles a ryanodina y los sensibles a $InsP_3$ regulan la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo L a través de diferentes mecanismos en motoneuronas espinales y nuevamente sugieren que los receptores sensibles a ryanodina están implicados en la generación de los potenciales de meseta; mientras que los receptores sensibles a $InsP_3$, participan en la modulación de este fenómeno. En este sentido es importante mencionar que en nuestros experimentos observamos que la ryanodina es capaz de bloquear potenciales de meseta que se han recuperado por la activación del canal de Ca^{2+} tipo L, después de que han sido bloqueados por 2-APB.

Algunos hallazgos recientes en otros sistemas muestran interacciones físicas o funcionales complejas entre los receptores sensibles a ryanodina, los receptores sensibles a $InsP_3$ y canales de Ca^{2+} tipo L (Johening y Erhlich, 2002; Delmas y Brown, 2002; Fagni y cols., 2000), las cuales pueden también estar presentes en las motoneuronas. En la médula espinal de tortuga las interacciones de los receptores sensibles a $InsP_3$ y a ryanodina parecen posibles, ya que en nuestros experimentos de microscopía confocal observamos la presencia de ambos tipos de receptores. La colocalización de estos tipos de receptores se ha reportado en dendritas de otros tipos neuronales (Korkotian y Segal, 1998; Kanaseki y cols., 1998), y recientemente se ha demostrado la presencia de la subunidad $\alpha 1D$, involucrada con la generación de potenciales de meseta en las dendritas. Estos hallazgos resultan particularmente interesantes, ya que es en estos compartimentos celulares donde se supone que se integran los potenciales de meseta y el *windup* (Delgado-Lezama y cols., 1999).

Respecto del *windup* se sabe que requiere de la activación de potenciales de meseta. De acuerdo con este hecho, nuestros resultados muestran que todas las condiciones que bloquean a los potenciales de meseta eliminan también al *windup* pero lo hacen más rápidamente. Esto indica que los mecanismos responsables del *windup* son muy sensibles a alteraciones en los mecanismos de liberación de Ca^{2+} intracelular. El *windup* requiere de un crecimiento extra de las despolarizaciones asociadas a los potenciales de meseta (ver figura 9), lo que podría explicar que manipulaciones farmacológicas que hacen a los canales tipo L más sensibles a la inactivación, tales como la disminución en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico (Dolphin, 1999) afectan más rápidamente a este fenómeno. Independientemente de esta posibilidad, los mecanismos celulares responsables del *windup* no son completamente conocidos a la fecha, por tanto es probable la participación de elementos independientes que se suman a los que subyacen a los potenciales de meseta, y que estén involucrados específicamente en la generación del *windup*. Esto explicaría el hecho de que exista una proporción de neuronas que a pesar de tener potenciales de meseta vigorosos no presente *windup* (aproximadamente 40% en este estudio).

En el presente estudio se realizaron manipulaciones farmacológicas para inhibir la participación de receptores ionotrópicos a glutamato, estriquina y GABA. Asimismo, en varios de los estudios mencionados se han

realizado manipulaciones farmacológicas dirigidas a discernir si los potenciales de meseta y el *windup* requieren la participación de otras conductancias además de la del canal L. En el sistema de las motoneuronas de tortuga, se sabe que los potenciales de meseta se presentan en la ausencia de Na^+ en el medio de perfusión (Perrier y Hounsgaard, 1999), así como en la presencia de apamina o TEA, que son bloqueadores de canales de K^+ (Svirakis y Hounsgaard, 1997). Esto sugiere que los potenciales de meseta y el *windup* en la médula espinal de tortuga pueden generarse por la actividad del canal L y según nuestros resultados requieren también del receptor de ryanodina pero son independientes de la activación de otras conductancias catiónicas. Esto no significa que *in vivo*, los potenciales de meseta no puedan ser modificados por componentes extras de estas otras conductancias presentes en las células, algunas de las cuales pueden ser activadas por los mismos fármacos que presentamos en esta tesis (Alaburda y cols., 2002; Ito y Dulon, 2002).

PERSPECTIVAS

Estudios futuros deben centrarse en la determinación de los subtipos de receptor de ryanodina e InsP_3 así como de las subunidades del canal de Ca^{2+} tipo L responsables de los potenciales de meseta y el *windup*, estos estudios pueden dar información relacionada con las cinéticas específicas de liberación e influjo de Ca^{2+} (Lee, 1996; Michikawa y cols., 1996; Rossi y cols., 2002). Al respecto, un estudio realizado en motoneuronas de rata identifico ARN mensajero que codifica para receptores sensibles a InsP_3 de las variantes 1 y 2 y para los 3 subtipos de receptores sensibles a ryanodina, además de ARN mensajero de receptores mGlu I (Van Den Bosch y cols., 1999).

Por otro lado, el estudio detallado de la distribución de los receptores sensibles a ryanodina e InsP_3 y de los canales de Ca^{2+} tipo L en los diferentes compartimentos de las neuronas que presentan potenciales de meseta y *windup* darían información de las interacciones moleculares implicadas en la generación de estos patrones de actividad. Para este fin, creemos que el uso del marcaje retrógrado será de utilidad y permitirá en un futuro cercano, realizar estas determinaciones. Además, el uso de técnicas de transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET), será útil para determinar si los receptores sensibles a ryanodina y el canal de Ca^{2+} tipo L interactúan directamente (Erickson y cols., 2001).

Relacionado con la distribución de receptores intracelulares, falta definir las interacciones de estos elementos de movilización de Ca^{2+} con otras proteínas que pueden modular su función, entre las que destacan la calmodulina por la evidencia que existe de su participación en los potenciales de meseta y el *windup* y proteínas acopladoras como las de la familia Homer, que participan en fenómenos de plasticidad sináptica (Brakeman, 1997) y que tienen sitios que acoplan proteínas de membrana plasmática como los receptores mGlu I con receptores sensibles a InsP_3 (Tu y cols., 1998) y sitios de unión a receptores sensibles a ryanodina (Blackstone y Sheng, 1999). En favor de la posible participación de proteínas acopladoras en la función de los potenciales de meseta se sabe que el influjo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje produce el agrupamiento de un tipo de Homer (Okabe y cols., 2001).

Además como se menciono en la introducción algunas otras proteínas como la calmodulina cinasa II tienen efectos que promueven la plasticidad neuronal en varios niveles que pueden involucrar incluso la transcripción de genes y modificaciones en la morfología neuronal (Wang y Kelly, 1997; Yang y cols., 1999; Morishita y cols., 2001; Cammarotta y cols., 2002; Vaillant y cols., 2002; Fink y cols., 2003). Será importante en estudios futuros buscar los blancos de este tipo de proteínas con funciones de señalización de amplio espectro en relación a la generación de potenciales de meseta y el *windup*.

Queda también por determinar en qué condiciones los potenciales de meseta y el *windup* se activan para formar parte de los mecanismos responsables de la locomoción, mantenimiento de la postura o sensibilización. En este punto, debido a que los potenciales de meseta y el *windup* representan

formas de funcionamiento neuronal que se activan en condiciones de estimulación específicas y modifican el procesamiento de información en las neuronas, es importante investigar cómo son afectados los mecanismos moleculares responsables de estos fenómenos en condiciones de patología que afectan el funcionamiento de las motoneuronas.

Durante mis estudios de Doctorado realizamos experimentos dirigidos a desarrollar una preparación con las neuronas de la médula espinal en cultivos primarios. Una ventaja de contar con células aisladas se basa en el hecho de que los potenciales de meseta y el *windup* son fenómenos que se generan gracias al arreglo funcional de elementos propios de la célula y no por efecto de la elevación o disminución de actividad de sus aferentes. Algunos grupos han tratado de tener preparaciones de células neuronas espinales disociadas (Voisin y Nagy, 2001, pero hasta el momento no han logrado reproducir la activación de corrientes L en sus sistemas, una posible causa es la pérdida de dendritas en esas preparaciones, esto es más claro a la luz de la reciente descripción de la distribución diferencial de las subunidades del canal L $\alpha 1D$ en las dendritas distales de las motoneuronas (Simona cols., 2003). Contar con preparaciones aisladas lo más integras posible facilitaría la determinación de las vías de señalización implicadas en la generación de los potenciales de meseta y el *windup*, debido a que permite una interpretación más directa de los efectos de la manipulación farmacológica de vías de señalización. Este tipo de preparaciones son susceptibles de ser estudiadas con técnicas de electrofisiología y además siendo que los mecanismos de generación de ambos fenómenos están relacionados con la señalización por Ca^{2+} , contar con preparaciones aisladas permitiría relacionar el estudio de la dinámica de movilización de este ión con su generación y modulación.

Actualmente contamos con preparaciones de células de médula espinal cultivadas y hemos realizado marcajes con anticuerpos dirigidos a la proteína glial fibrilar (GFAP) y neurofilamentos (NF) para reconocer a la glía y neuronas dentro de las células cultivadas. Además hemos realizado experimentos en los que estudiamos la distribución de los receptores sensibles a ryanodina e $InsP_3$ en estas células con la misma tecnología descrita para los experimentos de microscopía confocal. Estos resultados se muestran en las figuras 23 y 24. Faltaría poder reconocer y aislar específicamente a las motoneuronas dentro de estas células.

Fig. 21. *Localización de receptores sensibles a ryanodina y a $InsP_3$ en células gliales de médula espinal de tortuga en cultivo primario.* A) En esta figura se muestran ejemplos de células gliales de la médula espinal de tortuga en cultivo, las cuales se identificaron por su marcaje con un anticuerpo dirigido a GFAP (verde). B) Se muestra la distribución de ryanodina (rojo) y heparina (verde) en células morfológicamente similares a las marcadas con GFAP en A. Como se puede observar, la distribución de ambos receptores es muy homogénea y esta presente en toda la célula a excepción del núcleo.

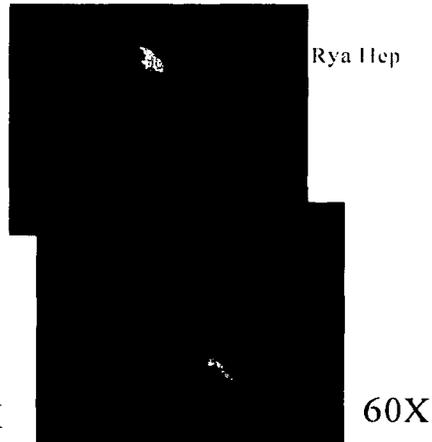
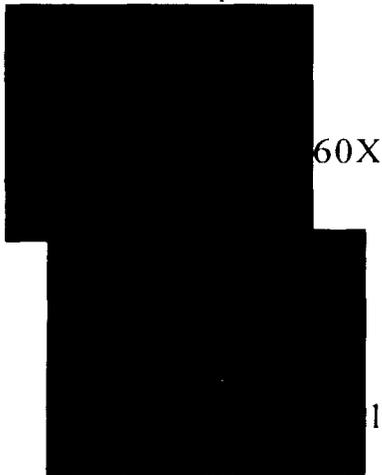
Fig. 22. *Localización de receptores sensibles a ryanodina y a $InsP_3$ en células neuronales de médula espinal de tortuga en cultivo primario.* A) En esta figura, se muestran ejemplos de neuronas de la médula espinal de tortuga en cultivo identificadas por su marcaje con el anticuerpo contra neurofilamentos (NF). B) Se muestran la distribución de los receptores sensibles a ryanodina e $InsP_3$ en células morfológicamente similares a las marcadas con NF en A. Como se puede observar, los receptores sensibles a $InsP_3$ están principalmente localizados en el soma, mientras que los receptores sensibles a ryanodina se localizan más homogéneamente.

A

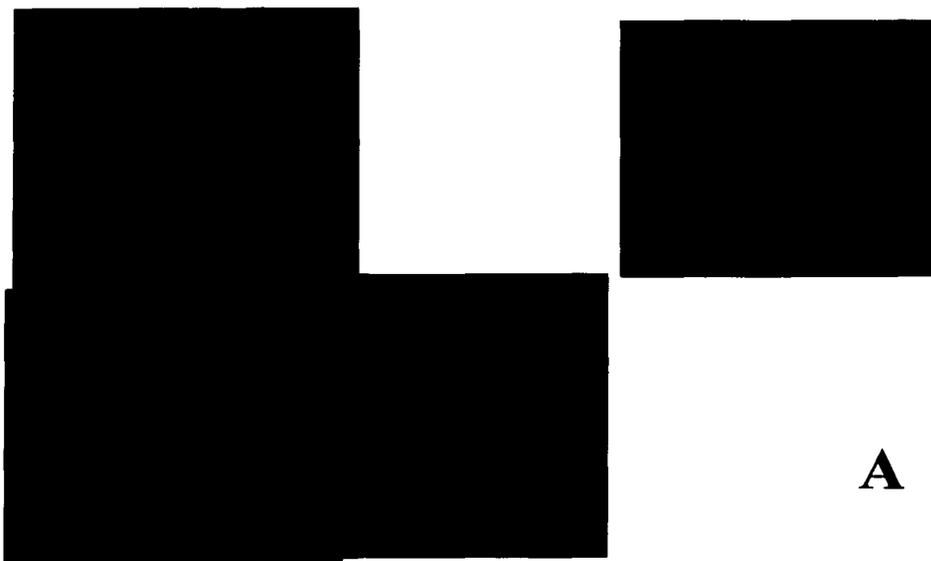


B

Glía en cultivo
Médula espinal de tortuga



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A

Neuronas en cultivo
Médula espinal de tortuga



Rya Hep

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

- Alaburda, A., Perrier, J.F. y Hounsgaard, J. (2002) An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J. Physiol.* 540:875-881.
- Alberi, S., Bocijinga, P.H., Raggembass, M. y Boddeke, G.M. (2000) Involvement of calmodulin-dependent protein kinase II in carbachol-induced rhythmic activity in the hippocampus of the rat. *Brain Res.*, 872:11-19.
- Aoyagi, T., Kang, Y., Terada, N., Kaneko, T. y Fukay, T. (2002) The role of Ca⁺ dependent cationic current in generating gamma frequency rhythmic bursts: modeling study. *Neurosci.*, 115:1127-1138.
- Babcock, D.F., Herrington, J., Goodwin, P.C., Park, Y.B. y Hille, B. (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J. Cell Biol.*, 136:833-844.
- Baranauskas, G. y Nistri, A. (1998) Sensitization of pain pathways in the spinal cord: Cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 54:349-65.
- Bennett D.J., Hultborn, H., Fedirchuk, B y Gorassini, M. (1998) Short-term plasticity in hindlimb motoneurons of decerebrate cats. *J. Neurophys.* 80:2038-45.
- Bennett, D.J., Li, Y. y Siu, M. (2001) Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded *in vitro*. *J. Neurophys.* 86: 1955-71.
- Bennett, D.J., Li, Y., Harvey, P. y Gorassini, M. (2001) Evidence for plateau potentials in tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity. *J. Neurophys.* 86:1972-82.
- Bennett, D.J., Hultborn, H., Fedirchuk, B. y Gorassini, M. (1998) Synaptic activation of plateau in hindlimb motoneurons of decerebrate cats. *J. Neurophysiol.* 80:2023-2037.
- Berridge, M.J. (1996) Elementary and global aspects of calcium signaling. Annual Review Prize Lecture. Meeting of the Physiological Society, University of Edinburgh.
- Blackstone, C. and Sheng, M. (2002) Postsynaptic calcium signaling microdomains in neurons. *Front. In Biosc.* 7:872-885.
- Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Haganir, R.L. y Worley, P.F. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386:284-288.
- Booth, V., Rinzel, J. y Kiehn, O. (1997) Compartmental model of vertebrate motoneurons for Ca²⁺ dependent spiking and plateau potentials under pharmacological treatment. *J. Neurophysiol.* 78:3371-85.
- Berridge, M.J., Lipp, P. y Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. y Roderick, H.L. (2002) Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99:7320-7322.
- Budai, D. y Larson, A.A. (1996) Role of substance P in the modulation of C-fiber evoked responses in the spinal dorsal horn neurons. *Neurosci* 710 :197-203
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. y Brini, M. (2001) Generation, control and processing of cellular calcium signals. *Critical Rev. In Biochem. and Mol. Biol.* 36:107-206.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555.
- Chapman, V., Dickenson, A.H. y Tjlsen, A. (1994) Bi-directional effects of intrathecal NMDA and substance P on the rat dorsal horn neuronal responses. *Neurosci Lett.*, 178:90-94
- Chavis, P., Fagni, L., Bockaert, J. y Lansman (1995) Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 34:926-937.
- Chavis, P., Fagni, L., Lansman, J.B. y Bockaert, J. (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature*, 382:719-722.
- Chen, J., Heinke, B. y Sandkühler, J. (2000) Activation of group I metabotropic glutamate receptors induced long-term depression at sensory synapses in superficial spinal dorsal horn. *Neuropharmacology*, 39:2231-2243.
- Chu, A., Diaz-Muñoz, M., Hawkes, M.J., Brush, K. y Hamilton, S. (1990) Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol*, 37:735-741.
- Cochilla, A.J. y Alford, S. (1998) Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron*, 20:1007-1016.
- Collins, D.F., Burke, D. y Gandevia, S.C. (2002) Sustained contractions produced by plateau-like behaviour in human motoneurons. *J. Physiol.* 538:289-301.

- Coraboeuf, E. (1976) Ionic basis of excitation mechanism in cardiac muscle. *Rec. Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* 11:11-18.
- Coutinho, V. y Knopfel, T. (2002) Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist*, 8:551-561.
- Del Negro, C.A., Hsiao, C.F. y Chandler, S.H. (1999) Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons. *J. Neurophys.* 81:1478-1485.
- Delgado-Lezama, R., Perrier, J.F. y Hounsgaard, J. (1999) Local facilitation of plateau potentials in dendrites of turtle motoneurons by synaptic activation of metabotropic receptors. *J. Physiol.*, 515:203-207.
- Delgado-Lezama, R., Perrier, J.F., Nedergaard, S., Svirskis, G. y Hounsgaard, J. (1997) Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of turtle spinal motoneurons. *J. Physiol.*, 504:97-102.
- Delmas, P. y Brown, D.A. (2002) Junctional signaling microdomains: Bridging the gap between the neuronal cell surface and Ca^{2+} stores. *Neuron*, 36:787-790.
- Derjean, D., Bertrand, S., Le Masson, G., Landry, M., Morisset, V. y Nagy, F. (2003) Dynamic balance of metabotropic input causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Natures Neurosc.*, 6:274-281.
- Dittman, J.S. y Regehr, W.G. (1998) Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to purkinje cell synapse. *J. Neurosci.* 18:6147-6162.
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M. y Greenberg, M.E. (2001). Signalling to the nucleus by an L-type Ca^{2+} channel-calmodulin complex through the MAP-kinase pathway. *Science*, 294:333-339.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K. y Lewis, R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392:933-936.
- Dolphin, A.C. (1999) L-type calcium channel modulation. *Advances in Sec. Messenger and Phosphoprotein Res.*, 33:153-177.
- Ehlers, M.D. y Augustine, G.J. (1999) Calmodulin at the channel gate. *Nature*, 399:105-108.
- Erickson, M.G., Alseikhan, B.A., Peterson, B.Z. y Yue, D.T. (2001) Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca^{2+} channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron*, 31:973-985.
- Esteban, J.A., Shi, S.H., Wilson, C., Nuriya, M., Haganir, R.L. y Malinow, R. (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nature Neurosc.*, 6:136-143.
- Evenas, J., Malmendal, A. y Forsén, S. (1998) Calcium. *Curr Op Chem Biol* 2:293-302.
- Fagny, L., Chavis, P., Ango, F. y Bockaert, J. (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca^{2+} stores and ion channels in neurons. *Trends in Neurosc.*, 23:80-88.
- Felmy, F., Neher, E. y Schneggenburger, R. (2003) Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron*, 37:801-811.
- Fink, C.C., Bayer, K.U., Mayers, J.W., Ferrel, J.E., Shulman, H. y Meyer, T. (2003) Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the β but not the α isoform of CaMKII. *Neuron*, 39:283-297.
- Forti, L., Pouzat, C. y Llano, I. (2000) Action potential-evoked Ca^{2+} signals and calcium channels in axons of developing rat cerebellar interneurons. *J. Physiol*, 527:33-48.
- Genet, S. y Delord, B. (2002) A biophysical model of nonlinear dynamics underlying plateau potentials and calcium spikes in purkinje cell dendrites. *J. Neurophysiol.* 88:2430-2444.
- Gjerstad, J., Tjålsen, A. y Hole, K. (1996) The effect of 5-HT_{1A} receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurons in rats. *Eur J Pharmacol*, 318:315-21.
- Gorassini, M., Yang, J.F., Siu, M y Bennett, D.J. (2001) Intrinsic activation of human motoneurons: reduction of motor unit recruitment thresholds by repeated contractions. *J. Neurophysiol.*, 87:1859-1866.
- Greene, J., Hass, H.L. y Hermann, A. (1985) Effects of caffeine on hippocampal pyramidal cells in vitro. *Br. J. Pharmac.* 85:163-169.
- Groul, D.L., Netzeband, J.G. y Parsons, K.L. (1996) Ca^{2+} signaling pathways linked to glutamate receptor activation in the somatic and dendritic regions of cultured cerebellar purkinje neurons. *J. Neurophysiol.* 76:3325-40.
- Haeggeli, C y Kato, A.C.. (2002) Rapid and reproducible methods using fluorogold for labelling a subpopulation of cervical motoneurons: application in the wobbler mouse. *J. Neurosc. Meth.*, 116:119-124.
- Hamada, T., Liou, S.Y., Fukushima, T., Maruyama, T., Watanabe, S., Mikoshiba, K. e Ishida, N. (1999) The role of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release from InsP₃-receptor in the rat suprachiasmatic nucleus on circadian entrainment mechanism. *Neuroscience Lett.*, 263:125-128.
- Hanse, E. y Konnerth, A. (1998) Calcium and activity-dependent synaptic plasticity. En *Integrative Aspects of Calcium Signalling* ed. by Verhatsky y Toescu, Plenum Press, NY.
- Harris, K.M. (1999) Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12213-12215.

- Harris-Warrick, R.M. (2002) Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Curr. Op. Neurobiol.*, 12:646-651.
- Herrero, J.F., Laird, J.M. y Lopez-García, J.A. (2000) Windup of spinal cord neurons and pain sensation: much ado about something? *Prog. in Neurobiol.*, 61: 169-203.
- Hillyard, D.R., Monje, V.D., Mintz, I.M., Bean, B.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljjanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Imperial, J.S. y Olvera, B.M. (1992) A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*, 9:69-77.
- Holthoff, K., Tsay, D. y Yuste, R. (2002) Calcium dynamics of spines depend on their dendritic location. *Neuron*, 33:425-437.
- Hornby, T.G., Rymer, W.Z., Benz, E.N., y Schmit, B.D. (2003) Windup of Flexion Reflexes in Chronic Human Spinal Cord Injury: A Marker for Neuronal Plateau Potentials? *J. Neurophysiol.*, 89:416-426.
- Hounsgaard, J. y Kjaerulff, O. (1992) Ca²⁺-mediated plateau potentials in a subpopulation of interneurons in the ventral horn of the turtle spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, 4:183-188.
- Hounsgaard, J. and Kiehn, O. (1985) Ca⁺⁺ dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons. *Exp. Brain Res.*, 57:422-425.
- Hounsgaard, J. (2002) Motoneurons do what motoneurons have to do. *J. Physiol.* 538:4.
- Hsiao, C.F., Negro, C.A., Truebold, P.R. y Chandler, S.H. (1998) Ionic basis for serotonin induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 79:2847-2856.
- Ito, K. y Dulon, D. (2002) Non-selective cation conductance activated by muscarinic and purinergic receptors in rat spiral ganglion neurons. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282:1121-1135.
- Jelfinija, S. y Urban, L. (1994) Repetitive stimulation induced potentiation of excitatory transmission in the rat dorsal horn: an *in vitro* study. *J Neurophysiol.* 71:216-228.
- Jo, Y.H., Stoeckel, M.E. y Schlichter, R. (1998) Electrophysiological properties of cultured neonatal rat dorsal horn neurons containing GABA and met-enkephalin-like immunoreactivity. *J. Neurophysiol.* 79:1583-1586.
- Jochenning, F.W. y Ehrlich, B.E. (2002) Signaling microdomains: Insp3 receptor localization takes on new meaning. *Neuron.* 34:173-178.
- Kamiya, H. y Zucker, R. S. (1994) Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603-606.
- Katz, B. y Miledi, R. (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol.*, 195:481-92.
- Katz, B. y Miledi, R. (1979) Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release. *Proceedings R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 205:369-78.
- Korkotian E. y Segal, M. (1998) Fast confocal imaging of calcium released from stores in dendritic spines. *Eur. J. of Neurosci.*, 10:2076-84.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, M., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J. and Striessnig, J. (2001) Alpha 1D (Cav1.3) subunits can form L-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276:22100-22106.
- Kuo, T.H., Liu, B.F., Yu, Y., Wuytack, F., Raeymaekers, L. y Tsang, W. (1997) Co-ordinated regulation of the plasma membrane calcium pump and sarco(endo)plasmic reticular calcium pump gene expression by Ca²⁺. *Cell Calcium*, 21: 399-408.
- Kuromi, H. y Kidokoro, Y. (2002) Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca²⁺ at the drosophila synapse. *Neuron*, 35:333-343.
- Kyrosis, A., Albuquerque, C., Gu, J. y McDermott, A.B. (1996) Ca²⁺ dependent inactivation of NMDA receptors: fast kinetics and high Ca²⁺ sensitivity in rat dorsal horn neurons. *J. Physiol.* 495 :449-63.
- Lee, H. C. (1997) Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* 77:1133-1164.
- Li, J., Simone, D.A. y Larson, A.A. (1999) Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 79:75-82.
- Li, Y. y Bennett, D.J. (2003) Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J. Neurophysiol.* 90:857-869.
- Liu, H.N., Molina-Holgado, E. y Almazan, G. (1997) Glutamate-stimulated production of inositol phosphates is mediated by Ca²⁺ influx in oligodendrocyte progenitors. *Eur. J. Pharmacol* 338:277-87.
- Llano, I., Gonzalez, J., Caputo C., Lai, F.A., Blayney, L.M., Tan, Y.P. y Marty, A. (2000) Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nature Neuroscience*, 3:1256-1265.
- Lledo, P.M. (1997) Exocytosis in excitable cells: a conserved molecular machinery from yeast to neuron. *Eur J Endocrinol.* 137:1-9.

- Llinas, R., Steinberg, I.Z. y Walton, K. (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J.*, 3:323-51.
- Llinas, R., Sugimori, M. y Silver, R.B. (1992) Microdomains of high calcium concentration in a preynaptic terminal. *Science*, 256:677-679.
- Lo, F.S. y Erzurumlu, R.S. (2002) L-type calcium channel-mediated plateau potentials in barrelette cells during structural plasticity. *J. Neurophysiol.*, 88:794-801.
- Lüscher, C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. y Muller, D. (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nature Neurosc.*, 3:544-550.
- Ma, H.T., Patterson, R.L., Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K. and Gill, D.L. (2000) Requirement of the inositol triphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science*, 287:1647-1651.
- Mackler, J.M., Drummond, J.A., Loewen, C.A., Robinson, I.M. and Reist, N.E. (2002) The C₂B Ca²⁺-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature*, 418:340-344.
- Madden, D.R. (2002) Structure and function of glutamate receptors ion channels. *Nature Rev. Neurosc.*, 3:91-101.
- Markin, V.S. y Bezprozvanny, I. (1998) Regulation of InsP₃R by Ca²⁺ and cytosolic Ca²⁺ dynamics. En *Integrative Aspects of Calcium Signalling* Verkhatsky y Toescu. Ed. Plenum Press, NY.
- Martínez-Merlos, T., Cañedo-Merino, R. y Díaz-Muñoz, M. (1997) Ryanodine receptor binding in skeletal muscle, heart, brain and liver of the mexican volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*; rodentia: Cricetidae). Comparison with five other rodent species. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29:529-539.
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. y Mikoshiba, K. (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem.*, 122:498-505.
- Meldolesi, J. y Pozzan, T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *TIBS*, 23:10-14.
- Mendell, L.M. (1966) Physiological properties of unmyelinated fiber projections to the spinal cord. *Exp Neurol*, 16:316-332.
- Michikawa, T., Miyawaki, A., Furuichi, T. y Mikoshiba, K. (1996) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and calcium signaling. *Critical Rev. Neurobiol.*, 10:36-55.
- Misgeld, U., Calabresi, P. y Dodt, H.U. (1986) Muscarinic modulation of calcium dependent plateau potentials in rat neostriatal neurons. *Plügers Arch.*, 409:482-487.
- Mitgaard, J. (1992) Membrane properties and synaptic responses of golgi cells in the turtle cerebellum in vitro. *J. Physiol.* 457:329-354.
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H. y Striessnig, J. (1998) Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J. Bioenerg. and Biomem*, 30:319-334.
- Mittman, T., Linton, T., Schwindt, P. Y Crill, W. (1997) Evidence for persistent Na⁺ current in apical dendrites of rat neocortical neurons from imaging of Na⁺ sensitive dyes. *J. Neurophysiol.* 78:1188-1192.
- Miyata, M., Finch, A.E., Khiroug, L., Hashimoto, K., Hayasaka, S., Oda, S.I., Inouye, M., Takagishi, Y., Augustine, G.J. y Kano, M. (2000) Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression. *Neuron*, 28:233-244.
- Morisset, V y Nagy, F. (1996) Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 76:2794-98.
- Morisset, V y Nagy, F. (1999) Ionic basis of plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J. Neurosc.*, 19:7309-7316.
- Mulkey, R.M. y Zucker, R.S. (1992) Posttetanic potentiation at the crayfish junction is dependent on both intracellular calcium and sodium accumulation. *J. Neurosc.*, 12:4327-4336.
- Nagase, T., Ito, I., Kato, K., Kaneko, K., Kohda, K., Matsumoto, M., Hoshino, A., Inoue, T., Fujii, S., Kato, H. y Mikoshiba, K. (2003) Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the InsP₃ type I receptor. *Neurosc.* 117:821-830
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Yoshiki, U., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S y Okada, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Rev* 26:230-235
- Nakanishi, S., Kuwajima, G. y Mikoshiba, K. (1992) Immunohistochemical localization of ryanodine receptors in mouse central nervous system. *Neurosci Res*, 15:130-42.
- Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H. y Sobue, K. (2001) Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *J. Neurosci.*, 21: 9561-9571.
- Pakriya, M. y Lewis, R.S. (2001) Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *J Physiol* 536: 3-19.

- Palecek, J., Lips, M.B. y Keller, B.U. (1999) Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J. Physiol.* 520:485-502.
- Parekh, A.B. y Penner, R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77:901-930.
- Patridge, L.D. y Valenzuela, C.F. (1999). Ca^{2+} store-dependent potentiation of Ca^{2+} -activated non-selective cation channels in rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol.*, 521:617-627.
- Perrier, J.F. y Hounsgaard, J. (1999) Ca^{2+} -activated non selective cationic current I(CAN) in turtle motoneurons *J. Neurophysiol.* 82:730-735.
- Perrier, J.F. y Hounsgaard, J. (2000) Development and regulation of response properties in spinal motoneurons. *Brain Res. Bull.*, 53:529-535.
- Perrier, J.F., Alaburda, A. y Hounsgaard, J. (2002) Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca^{2+} channels. *Brain Res Rev*, 40:223-229
- Perrier, J.F. y Hounsgaard, J. (2003) 5-HT₂ receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *J. Neurophysiol.*, 89:954-959.
- Peterson, B.Z., Lee, J.S., Mulle, J.G., Wang, Y., de leon, M. y Yue, D.T. (2000) Critical determinants of Ca^{2+} -dependent inactivation within and EF-hand motif of L-type Ca^{2+} channels. *Biophys. J.* 78:1906-1920.
- Pressel, D.M. y Misler, S. (1991) Role of voltage-dependent ionic currents in coupling glucose stimulation to insulin secretion in canine pancreatic islet B-cells. *J. Membr. Biol.* 124:239-253.
- Rathous, M.M., Vijayaraghavan, S. y Berg, D.K. (1995) Acetylcholine differentially affects intracellular calcium via nicotinic and muscarinic receptors on the same population of neurons. *J Biol Chem*, 270:14366-75.
- Rettig, J. y Neher, E. (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{++} -triggered exocytosis. *Science*, 298:781-785.
- Rodrigo, J., Suburo, A.M., Bentura, M.L., Fernández, T., Nakade, S., Mikoshiba, K., Martínez-Murillo, R. y Polak, J.M. (1993) Distribution of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor P400, in adult rat brain. *J Comp Neurol*, 337:493-517.
- Roos, S.T. y Soltesz, I. (2001) Long-term plasticity in interneurons of the dentate gyrus. *PNAS*, 98:8874-8879.
- Rose, C.R. y Konnerth, A. (2001) Stores not just for storage: Intracellular calcium release and synaptic plasticity. *Neuron*, 31:519-522.
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N. y Rhee, J.S. (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc-13 isoforms. *Neuron*, 33:411-424.
- Rossi, D., Simeoni, I., Micheli, M., Bootman, M., Lipp, P., Allen, P.D. y Sorrentino, V. (2002) RyR1 and RyR3 isoforms provide distinct intracellular Ca^{2+} signals in HEK 293 cells. *J. Cell Sci.* 115:2497-2504.
- Russo, R. E. y Hounsgaard, J. (1996a) Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol.* 493:39-54.
- Russo, R. E. y Hounsgaard, J. (1996) Burst-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol.* 493:55-66.
- Russo, R.E. y Hounsgaard, J. (1994) Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca^{2+} channels. *Neurosci.* 61:191-7.
- Russo, R.E., Nagy, F. y Hounsgaard, J. (1998) Inhibitory control of plateau properties in dorsal horn neurones in turtle spinal cord in vitro. *J. Physiol.* 506:795-808.
- Ryan, T.A. y Reuter, H. Measurements of vesicle recycling in central neurons. *News Physiol Sci*, 16:10-14.
- Sabatini, B.L., Oertner, T.G. y Svoboda, K. (2002) The life cycle of Ca^{2+} ions in dendritic spines. *Neuron*, 33:439-452.
- Saborido, A., Delgado, J. y Megías, A. (1999) Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and E-type Mg^{2+} -ATPase activity in rat heart homogenates. *Anal. Biochem.*, 286:79-88.
- Sah, D. W. (1990) Neurotransmitter modulation of calcium current in rat spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 10:136-141
- Sakaba, T. y Neher, E. (2002) Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron*, 32:1119-1131.
- Sandkühler, J., Chen, J.G., Cheng, G y Randic, M (1997) Low-frequency stimulation of afferent A δ -fibers induces long-term depression at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurons in the rat. *J. Neurosci.* 17:6483-91.
- Sankaranarayanan, S. y Ryan, T.A. (2000) Real-time measurements of vesicle SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nature Cell Biol.*, 2:197-204.

- Santella, L. y Carafoli, E. (1997) Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J.* 11:1091-1109.
- Savic, N., y Sciancalepore, M. (1998) Intracellular calcium stores modulate miniature GABA-mediated synaptic currents in neonatal rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.*, 10:3379-3386.
- Schneggenburger, R. y Neher, E. (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature*, 406:889-893.
- Schneggenburger, R., Sakaba, T. y Neher, E. (2002) Vesicle pools and short term synaptic depression: lessons from a large synapse. *TINS*, 25:206-212.
- Sciancalepore, M., Savic, N., Gyori, J. y Cherubini, E. (1998) Facilitation of miniature GABAergic currents by ruthenium red in neonatal hippocampal neurons. *J Neurophysiol.*, 80:2316-2322.
- Sencer, S., Papineni, R.V.L., Halling, D.B., Pate, P., Krol, J. Zhang, J.Z. y Hamilton, S. (2001) Coupling of RYR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains. *J. Biol. Chem.*, 276:38237-241.
- Sharp, A.H., Dawson, T.M., Ross, C.A., Fotuhi, M., Mourey, R.J. y Snyder, S.H. (1993) Inositol 1,4,5-triphosphate receptors: immunohistochemical localization to discrete areas of rat central nervous system. *Neurosci*, 53:927-42.
- Shen, W. y Slaughter, M.M. (1998) Metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulate calcium channel currents in salamander retinal ganglion cells. *J. Physiol.* 510:815-28.
- Sheng, M., Thompson, M.A. y Greenberg, M.E. (1991) CREB: a Ca²⁺ regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 252:1427-1430.
- Sherf, C.M. y Carews, T.J. (2002) Coincident induction of long-term facilitation at sensory-motor synapses in Aplysia: Presynaptic and postsynaptic factors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78:498-507.
- Shull, G.E. (2000) Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases. *Eur. J. Biochem.*, 267:5284-5290.
- Simon, M., Perrier, J.F. y Hounsgaard, J. (2003) Subcellular distribution of L-type Ca²⁺ channels responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord in the turtle. *Eur. J. Neurosci.*, 18:258-266.
- Skydsgaard, M. y Hounsgaard, J. (1994) Spatial integration of local transmitter responses in motoneurons of the turtle spinal cord in vitro. *J. Physiol.* 479:233-246.
- Svirakis, G. y Hounsgaard, J. (1997) Depolarization-induced facilitation of a plateau-generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord. *J. Neurophysiol.* 78:1740-1742.
- Svirakis, G. y Hounsgaard, J. (1998) Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons. *J. Neurophysiol.*, 79:45-50.
- Swadulla, D. y Zeilhofer, H.U. (1998) Calcium regulation of ion channels. En *Integrative Aspects of Calcium Signalling*. Verkhatsky y Toescu. Ed. Plenum Press, NY.
- Takahashi, M., Tanzawa, K. y Takahashi, S. (1994) Adenophostins, newly discovered metabolites of Penicillium brevicompactum, act as a potent agonists of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 269:369-372.
- Takechi, H., Eilers, J. y Konner, A. (1998) A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines. *Nature*, 396:757-760.
- Tanabe, M., Gahwiler, B.H. y Gerber, U. (1998) L-type Ca²⁺ channels mediate the slow Ca²⁺-dependent afterhyperpolarization current in rat CA3 pyramidal cells in vivo. *J. Neurophysiol.* 80:2268-2273.
- Tao, X., West, A.E., Chen, W.G., Corfas, G. y Greenberg, M.E. (2002) A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron*, 33:383-395.
- Thayer, S.A., Usachev, Y.M. y Pottorf, W.J. (2002) Modulating Ca²⁺-clearance from neurons. *Front. In Biosci.* 7:1255-1279.
- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M. y Worley, P.F. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins. *Neuron*, 23:583-592.
- Urban, L. y Dray, A. (1992) Synaptic activation of dorsal horn neurons by selective C-fibre excitation with capsaicin in the mouse spinal cord in vitro. *Neurosci*, 47:693-702.
- Usachev, Y. y Thayer, S. (1999) Ca²⁺ influx in resting rat sensory neurons that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores. *J. Physiol.* 519:115-130.
- Vaillant, A.R., Zanassi, P., Walsh, G.S., Aumont, A., Alonso, A. y Miller, F.D. (2002) Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron*, 34:985-998.
- Van Den Bosch, L., Verhoeven, K., De Smedt, H., Wuytack, F., Missiaen, L. y Robberecht, W. (1999) Calcium handling proteins in isolated spinal motoneurons. *Life Sci.* 65:1597-1606.
- Verkhatsky, A. y Shmigol, A. (1996) Calcium-induced calcium release in neurons. *Cell Calcium*, 19:1-14

- Voisin, D.L. y Nagy, F. (2001) Sustained L-type calcium currents in dissociated deep dorsal horn neurons of the rat: characteristics and modulation. *Neuroscience*, 102:461-472.
- Wang, J.H. y Kelly, P.T. (1997) Attenuation of paired-pulse facilitation associated with synaptic potentiation mediated by postsynaptic mechanisms. *J. Neurophysiol.*, 78:2707-2716.
- Wang, J., Liu, S.H., Haditsch, U., Tu, W.H., Cochrane, K., Ahmadian, G., Tran, L., Paw, J., Wang, Y.T., Mansuy, I., Salter, M.M. y Lu, Y.M. (2003) Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor $\gamma 2$ receptor subunits produces long-term depression of CA1 inhibitory synapses. *J. Neurosci.*, 23:826-836.
- Woolf, C.J. (1996) Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* 105-108.
- Xu, W. and Lipscombe, D. (2001) Neuronal $Ca_v1.3\alpha 1$ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J. Neurosci* 21:5944-5951.
- Yang, S.N, Tang, Y.G. y Zucker, R.S. (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic Ca^{2+} elevation. *J. Neurophys.*, 81:781-787.
- You, Y., Pelzer, D.J. y Pelzer, S. (1995) Trypsin and forskolin decrease the sensitivity of L-type calcium current to inhibition by cytoplasmic free calcium in guinea pig Herat muscle cells. *Biophys. J.* 69:1838-1846.
- Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L. y Malinow, R. (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, 110:443-455.
- Zimanyi, I y Pessah, I. (1991) Pharmacological characterization of the specific binding of 3H ryanodine to rat brain microsomal membranes. *Brain Res.*, 561:181-191.
- Zucker, R. S. (1999) Calcium-and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9:305-13
- Zülke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W. y Reuter, H. (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*, 399:159-162.

ANEXOS: ARTÍCULOS PUBLICADOS

Rapid Report

Facilitation of plateau potentials in turtle motoneurons by a pathway dependent on calcium and calmodulin

Jean-François Perrier, Sheyla Mejia-Gervacio* and Jørn Hounsgaard

Department of Medical Physiology, Panum Institute, University of Copenhagen, DK 2200 Copenhagen N, Denmark and *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México

(Received 2 May 2000; accepted after revision 10 August 2000)

1. The involvement of intracellular calcium and calmodulin in the modulation of plateau potentials in motoneurons was investigated using intracellular recordings from a spinal cord slice preparation.
2. Chelation of intracellular calcium with BAPTA-AM or inactivation of calmodulin with W-7 or trifluoperazine reduced the amplitude of depolarization-induced plateau potentials. Inactivation of calmodulin also inhibited facilitation of plateau potentials by activation of group I metabotropic glutamate receptors or muscarinic receptors.
3. In low-sodium medium and in the presence of tetraethylammonium and tetrodotoxin, calcium action potentials evoked by depolarization were followed by a short hyperpolarization ascribed to the calcium-activated non-selective cationic current (I_{CAN}) and by a dihydropyridine-sensitive afterdepolarization. The amplitude of the afterdepolarization depended on the number of calcium spikes and was mediated by L-type calcium channels.
4. The dihydropyridine-sensitive afterdepolarization induced by calcium spikes was reduced by blockade of calmodulin.
5. It is proposed that plateau potentials in spinal motoneurons are facilitated by activation of a calcium-calmodulin-dependent pathway.

Plateau potentials in spinal motoneurons are thought to play an important role in generating the spike patterns in motor axons that underlie movement (Kiehn & Eken, 1998; Delgado-Lezama & Hounsgaard, 1999). Plateau properties are well documented in motoneurons of terrestrial vertebrates including turtle (Hounsgaard & Mintz, 1988) and cat (Schwindt & Crill, 1977; Hounsgaard *et al.* 1984; Lee & Heckman, 1996; Bennett *et al.* 1998). Their presence in human motoneurons has also been suggested (Kiehn & Eken, 1997; Gorassini *et al.* 1998). In turtle motoneurons, plateau potentials are mediated by low-threshold, non-inactivating L-type Ca^{2+} channels and not by a calcium-activated non-selective cationic current (I_{CAN}) (Hounsgaard & Mintz, 1988; Perrier & Hounsgaard, 1999). Also, in this species, the voltage sensitivity of L-type Ca^{2+} channels is facilitated by activation of certain metabotropic receptors including group I metabotropic glutamate receptors (mGluRI) and muscarinic receptors (Delgado-Lezama *et al.* 1997; Svizsis & Hounsgaard, 1998) allowing dynamic synaptic regulation of plateau properties. However, the

molecular pathway linking activation of metabotropic receptors to the modulation of L-type Ca^{2+} channels has not been identified.

It is generally accepted that L-type Ca^{2+} channels are inactivated by a Ca^{2+} -dependent process (Eckert & Chad, 1984) that may involve calmodulin (Peterson *et al.* 1999; Ehlers & Augustine, 1999). Recent observations have also shown that calmodulin can facilitate the activity of L-type Ca^{2+} channels (Ehlers & Augustine, 1999; Zühlke *et al.* 1999). This raises the possibility that the level of cytosolic Ca^{2+} directly or via calmodulin is involved in the regulation of L-type Ca^{2+} channels in spinal motoneurons. The fact that mGluRI and some muscarinic receptors exert their action via the phospholipase C, diacylglycerol and inositol trisphosphate pathways also suggests that an increased intracellular Ca^{2+} concentration could mediate the facilitation of plateau properties in response to synaptically released glutamate and acetylcholine (Delgado-Lezama *et al.* 1997).

The present paper investigates these possibilities. We show that plateau potentials are inhibited when intracellular Ca^{2+} is chelated or when calmodulin is antagonized. Our results support the hypothesis that a transient increase in Ca^{2+} concentration facilitates depolarization-induced activation of L-type Ca^{2+} channels via a calmodulin-dependent mechanism. We suggest this as a possible pathway for dynamic regulation of response properties and excitability in spinal motoneurons.

METHODS

Transverse slices (1.5–2 mm thick) were obtained from the lumbar enlargement of adult turtles (*Careyemys scripta elegans*) anaesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg sodium pentobarbitone and killed by decapitation. The surgical procedures complied with Danish legislation and were approved by the controlling body under the Ministry of Justice. Experiments were performed at room temperature (20–22°C) in a solution containing (mM): 120 NaCl; 5 KCl; 15 NaHCO_3 ; 2 MgCl_2 ; 3 CaCl_2 ; and 20 glucose, saturated with 98% O_2 and 2% CO_2 to obtain pH 7.6.

Intracellular recordings in current-clamp and voltage-clamp mode were performed with an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments). Pipettes were filled with 1 M potassium acetate for current clamp and

with 1.5 M KCl or a mixture of 1.5 M KCl and 0.5 M potassium acetate for voltage clamp. Voltage-clamp recordings were performed in discontinuous service mode at a sample rate of 5.0–10 kHz, with a gain of 0.7–1.5 nA mV^{-1} and a low-pass filter of 0.1 kHz. A triangular voltage waveform command (0–8 s duration) was used to depolarize the motoneurons from the resting potential (for details see Svirskis & Hounsgaard, 1997). Motoneurons were selected for study if they had a stable membrane potential of more than –60 mV. Data were sampled at 10 kHz with a 12-bit analog-to-digital converter (Digidata 1200, Axon Instruments) and displayed by means of Axoscope software (Axon Instruments) and stored on a hard disk for later analysis.

Plateau potentials were facilitated by activation of mGluR1 with *cis*-(±)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (*cis*-ACPD, 40 μM ; Tocris) or muscarinic receptors with muscarine (25–50 μM ; Sigma) (Svirskis & Hounsgaard, 1998), after elimination of synaptic potentials with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 20–50 μM ; RBI), either (±)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, 50–100 μM ; RBI) or 1(-)-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP7, 25 μM ; Tocris), and strychnine (10 μM). Plateau potential amplitude was measured as the maximal amplitude of the afterdepolarization following a 2 s depolarizing current pulse at an intensity subthreshold for spike generation during the afterpotential. Ca^{2+} spikes were mediated by N-type Ca^{2+} channels since they were blocked by ω -conotoxin (1–2 μM ; Sigma; $n = 3$). Ca^{2+} spikes were facilitated by addition of tetra-ethyl-ammonium (TEA; 10 mM) to the medium (Hounsgaard & Mintz, 1988). Calmodulin was

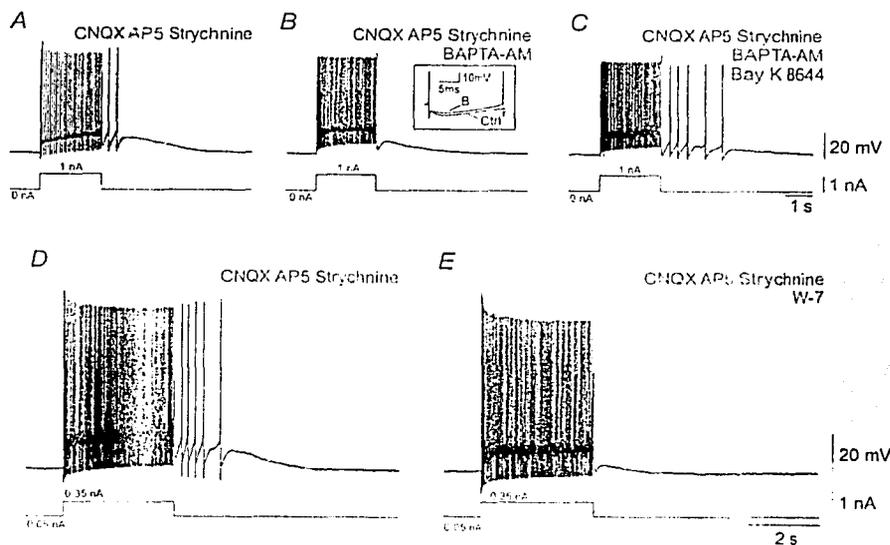


Figure 1. Modulation of plateau potentials by intracellular Ca^{2+} and calmodulin.

A, response to a 2 s depolarizing current pulse. Note the acceleration of the discharge frequency during the pulse and the large afterdepolarization associated with an afterdischarge. *B*, response to the same current pulse in the presence of BAPTA-AM (100 μM). The afterdepolarization was smaller and the afterdischarge had disappeared. Inset, superimposition of a sweep before (control, Ctrl) and after addition of BAPTA-AM (*B*). Note the reduction in afterhyperpolarization amplitude. *C*, plateau response induced following addition of Bay K 8644 (1 μM). *D*, control response from a motoneurone. *E*, reduced plateau response after addition of W-7 (100 μM). Traces in *A–C* were recorded from a motoneurone in the presence of 20 μM CNQX, 50 μM AP5 and 10 μM strychnine. Traces in *D–E* were recorded from a motoneurone in the presence of 20 μM CNQX, 125 μM AP5 and 10 μM strychnine.

blocked by *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide HCl (W-7; Calbiochem) or trifluoperazine (Sigma). In concentrations of 50–200 μM, W-7 started to act within 20–40 min depending on the depth of the recording. A full effect was seen after 2 h or more.

BAPTA-AM (20–100 μM; Texas Fluorescence Labs, Inc.) was used as a calcium chelator. When present in the extracellular medium it could increase the input resistance of the recorded cell (+48 ± 20%; n = 6). This effect disappeared as soon as BAPTA-AM was removed from the extracellular medium. However, the effect on plateau potentials was the same with or without the drug in the extracellular medium.

Low-sodium medium was prepared by substituting choline chloride or *N*-methyl-D-glucamine chloride (NMDG; Sigma) for sodium chloride. The pH of the medium prepared with NMDG was carefully adjusted to 7.6 by addition of the necessary amount of HCl.

Other drugs used were Bay K 8644 (1 μM; Sigma), tetrodotoxin (TTX, 1–2 μM; Sigma) and nifedipine (10 μM; Sigma).

Data are presented as means ± s.e.m.

RESULTS

Plateau potentials depend on the level of intracellular Ca²⁺

A fraction of the motoneurons in transverse slices of the turtle spinal cord expressed plateau potentials even in the absence of facilitating neuromodulators. The response pattern evoked in these cells by a depolarizing current pulse was characterized by: (1) an accelerating discharge from an early low level to a higher level in steady state and (2) an afterdepolarization that sometimes generated an afterdischarge following the current pulse (Fig. 1*A*). To test whether the [Ca²⁺]_i affected the generation of plateau potentials in motoneurons, we used BAPTA-AM, a membrane-permeable form of the Ca²⁺ chelator that becomes active only when hydrolysed by cytosolic esterases, to reduce the cytosolic level of Ca²⁺. In all

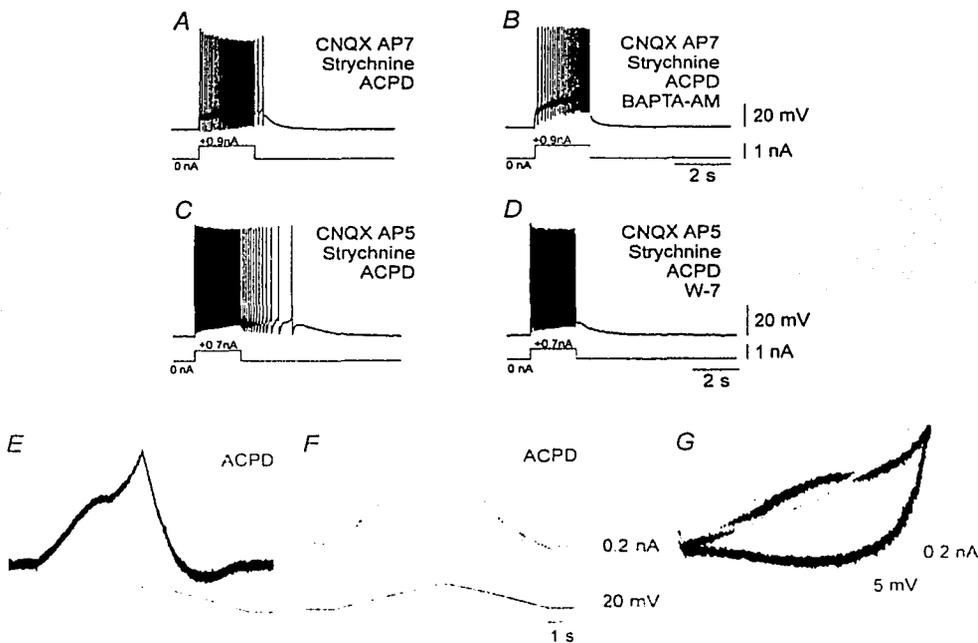


Figure 2. Modulation of pharmacologically enhanced plateau potentials by intracellular Ca²⁺ and calmodulin

A, ACPD (40 μM) enhanced a plateau potential. *B*, response to the same current pulse in the presence of BAPTA-AM (50 μM). The afterdepolarization was smaller and the afterdischarge had disappeared. Records for this motoneurone were obtained in the presence of CNQX (25 μM), AP7 (25 μM) and strychnine (10 μM). *C*, a plateau potential enhanced by ACPD (40 μM) in another motoneurone. *D*, addition of W-7 (100 μM) reduced the plateau potential. Records for this motoneurone were obtained in the presence of CNQX (20 μM), AP5 (50 μM) and strychnine (10 μM). *E*, current response of another motoneurone to a triangular voltage command, in the presence of CNQX (25 μM), AP7 (25 μM), strychnine (10 μM), ACPD (40 μM) and TTX (1 μM). *F*, addition of W-7 (100 μM) reduced the inward current (red trace). *G*, *I*-*V* plots of the current generated during the triangular voltage command before and after addition of W-7 (red trace). W-7 reduced the hysteresis. The cell was clamped from its resting membrane potential (-65 mV).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

75

motoneurons tested, addition of BAPTA-AM (20–100 μM) reduced the Ca^{2+} -dependent slow afterhyperpolarization (Fig. 1*B*, inset) and the amplitude of the plateau potential following depolarizing current pulses (Fig. 1*B*; mean reduction of subthreshold plateau afterpotentials, $47 \pm 5.5\%$; $n=3$). Subsequent addition of Bay K 8644 (1 μM), a direct agonist of L-type Ca^{2+} channels, enhanced plateau potentials, despite the presence of BAPTA-AM (Fig. 1*C*; $n=2$) showing that the effect of BAPTA-AM was not due to a direct block of L-type Ca^{2+} channels or to a change in pH, which is known to affect plateau potentials in motoneurons (Perrier & Hounsgaard, 1999). Since the cleavage of the ester bond of BAPTA-AM produces formaldehyde, we checked that addition of formaldehyde (100 μM) did not affect plateau potentials ($n=4$; not illustrated).

Since these results suggested that intracellular Ca^{2+} can facilitate the development of plateau potentials, we tested whether inhibition of calmodulin could also reduce the amplitude of plateau potentials. Addition of the calmodulin antagonist W-7 (50–100 μM) to the medium always reduced the amplitude of the evoked plateau

potentials (Fig. 1*E*; mean reduction, $67 \pm 7.5\%$; $n=6$). Trifluoperazine (250–500 μM), another calmodulin antagonist, also reduced the amplitude of the plateau potential (mean reduction, $72 \pm 14.6\%$; $n=3$; not illustrated).

mGluRI and muscarinic facilitation of plateau potentials requires calmodulin

To determine whether mGluRI- and muscarine-induced facilitation of plateau potentials also depended on a calcium-calmodulin-dependent pathway, we selected motoneurons that did not show depolarization-induced plateau properties. Plateaus were then induced by activation of mGluRI by addition of 40 μM ACPD ($n=6$; Fig. 2*A* and *C*) or muscarinic receptors by addition of 25–50 μM muscarine ($n=3$; not illustrated) to the medium. For all motoneurons tested, ACPD and muscarine facilitated plateau potentials, in agreement with previous studies (Svirskis & Hounsgaard, 1998). In these motoneurons, facilitated plateau potentials were reduced by addition of BAPTA-AM (20–50 μM ; Fig. 2*B*; mean reduction, $57 \pm 19\%$; $n=3$) or W-7 (50–100 μM ;

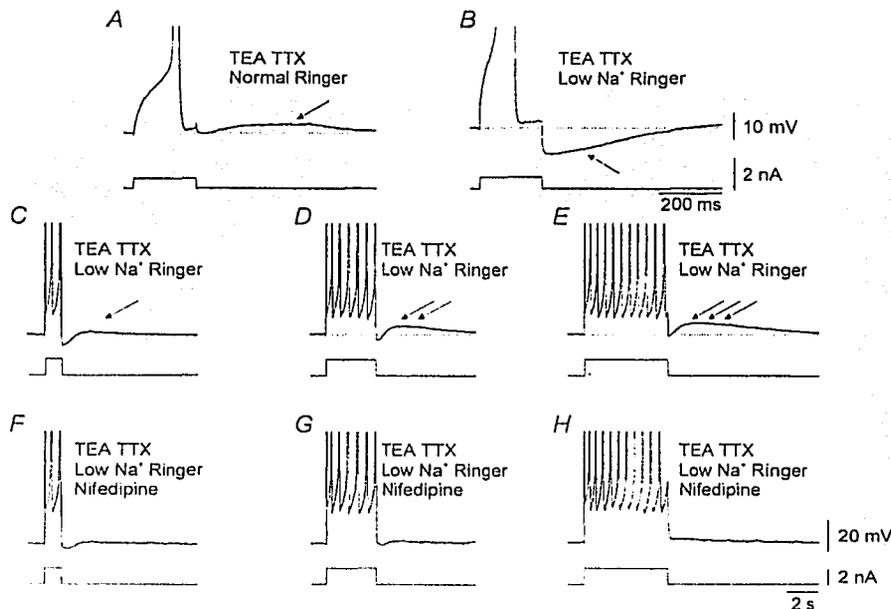


Figure 3. Ca^{2+} spikes induce Ca^{2+} influx through L-type channels

All records were obtained from the same motoneurone in the presence of TEA (10 mM) and TTX (2 μM). *A*, response to a depolarizing current pulse generating a Ca^{2+} action potential followed by an afterdepolarization ascribed to I_{CaX} (arrow). Records in *B–H* were obtained in a low- Na^+ Ringer solution. *B*, in low- Na^+ Ringer solution the afterdepolarization was replaced by an afterhyperpolarization (arrow). *C–E*, response to depolarizing current pulses of increasing duration. The afterhyperpolarization was followed by an afterdepolarization (arrows) whose amplitude gradually increased with the number of Ca^{2+} spikes. Scale bars in *A* and *B* also apply to *C–E*. *F–H*, addition of nifedipine (10 μM) removed the afterdepolarization. Ca^{2+} spikes have been truncated to fit in the figure frame.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2*D*; mean reduction, $68 \pm 10\%$; $n=6$). Moreover, when slices were pre-incubated (10–12 h) in W-7 ($50 \mu\text{M}$), addition of ACPD ($40 \mu\text{M}$) did not facilitate plateau potentials ($n=8$; not illustrated). This effect of W-7 remained after several hours in normal medium.

In $I-V$ plots obtained from the current generated during triangular voltage commands, the plateau current was characterized by a clockwise hysteric configuration which reflects the slow kinetics of the inward current or changes in gating properties (Svirskis & Hounsgaard, 1997; Delgado-Lezama *et al.* 1997; Fig. 2*E* and *G*). Addition of W-7 ($100 \mu\text{M}$) reduced or suppressed the hysteresis ($n=4$; Fig. 2*F* and *G*).

Increased [Ca²⁺]_i facilitates plateau potentials

These results suggested that intracellular Ca²⁺ was involved in metabotropic facilitation of plateau potentials in motoneurons. We therefore hypothesized that facilitation might be induced by a transient increase in [Ca²⁺]_i, *per se*. To test this hypothesis, we induced transient increases in [Ca²⁺]_i by generating calcium action potentials in the presence of TEA (10 mM) and TTX ($1-2 \mu\text{M}$) (Hounsgaard & Mintz, 1988; Hounsgaard & Kiehn, 1993; Perrier & Hounsgaard, 1999). As shown in a previous study, Ca²⁺ spikes in turtle motoneurons are followed by an afterdepolarization mediated by a calcium-activated non-selective cationic current (I_{CAN} ; Perrier &

Hounsgaard, 1999; Fig. 3*A*, arrow). When the extracellular medium was replaced by a low-sodium Ringer solution (see Methods), I_{CAN} was an outward current at the resting membrane potential generating an afterhyperpolarization (Perrier & Hounsgaard, 1999; Fig. 3*B*, arrow). However, when, under the same conditions, the number of calcium spikes generated was increased during a longer depolarizing current pulse, this afterhyperpolarization was followed by a depolarizing potential. Both the amplitude and duration of the late afterdepolarization depended on the number of Ca²⁺ spikes evoked (Fig. 3*C*, *D* and *E*, arrows; $n=20$). Since addition of nifedipine ($10 \mu\text{M}$) abolished the afterdepolarization (Fig. 3*F*, *G* and *H*; $n=4$) we concluded that it was mediated by a Ca²⁺ current through L-type Ca²⁺ channels.

Ca²⁺ facilitation of L-type Ca²⁺ channel activity requires calmodulin

To test whether the effect of a transient rise in [Ca²⁺]_i on L-type Ca²⁺ channels was direct or through a pathway including calmodulin, we tested the effect of W-7 ($100-200 \mu\text{M}$) on the afterdepolarization following calcium spikes in normal or in low-sodium Ringer solution. For all the neurones tested, addition of W-7 reduced the amplitude of the afterdepolarization (Fig. 4; mean reduction, $56 \pm 19\%$; $n=5$).

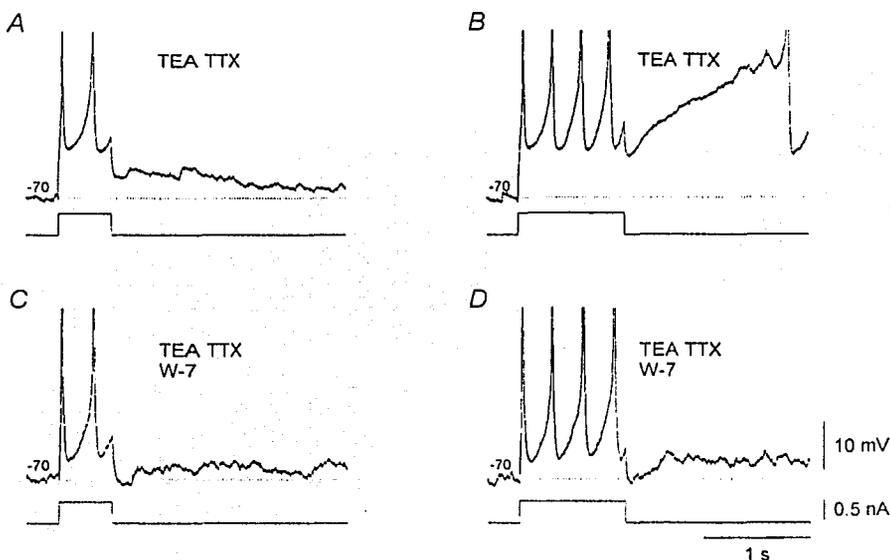


Figure 4. Block of calmodulin inhibits the Ca²⁺-induced plateau potential

All records were obtained in the presence of TEA (10 mM) and TTX ($1 \mu\text{M}$). *A* and *B*, response to depolarizing current pulses of increasing duration. Ca²⁺ spikes were followed by an afterdepolarization whose amplitude was strong enough to elicit an afterdischarge in *B*. *C* and *D*, in the presence of W-7 ($100 \mu\text{M}$) the afterdepolarization was reduced.

DISCUSSION

The main finding of this study is that chelation of intracellular Ca^{2+} or inhibition of calmodulin inhibits plateau potentials, suggesting that both are involved in pathways leading to the facilitation of plateau potentials.

Chelation of intracellular Ca^{2+} with BAPTA-AM reduced plateau potentials, indicating that plateau potentials are supported by a Ca^{2+} -dependent conductance. Moreover, a transient Ca^{2+} influx through the plasma membrane facilitated plateau potentials mediated by L-type Ca^{2+} channels and not by Ca^{2+} -activated Na^+ current (Perrier & Hounsgaard, 1999). Morriset & Nagy (1999) reported that chelation of intracellular Ca^{2+} with BAPTA-AM decreased the late phase of plateau potentials in deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord. They ascribed their result to the inhibition of a Ca^{2+} -activated non-selective cationic current (I_{CAN}) thought to mediate part of the plateau potentials in these neurones. Our results suggest, however, that chelation of Ca^{2+} inhibits L-type Ca^{2+} channels.

Inactivation of calmodulin with W-7 or trifluoperazine reduced the amplitude of plateau potentials *per se* and prevented facilitation of plateau potentials by ACPD. This was not due to extracellular effects of W-7 since plateau facilitation remained suppressed for several hours after preincubation with W-7. A recent study showed that calmodulin may be required for activation of group III metabotropic glutamate receptors (O'Connor *et al.* 1999). Although such a mechanism has not been implicated for mGluR1, one could argue that the inhibition of calmodulin might affect mGluR1 rather than L-type Ca^{2+} channels. However, inhibition of calmodulin also prevented the facilitation of plateau potentials by muscarine. It is therefore unlikely that the involvement of calmodulin occurs at the receptor level. Moreover, the fact that the plateau potential induced by Ca^{2+} spikes was reduced by W-7 also supports the idea that at least part of the effect of calmodulin is at a level closer to L-type Ca^{2+} channels. This finding suggests that the calcium-calmodulin-dependent pathway could also mediate the depolarization-induced facilitation of L-type Ca^{2+} channels proposed to be the mechanism for windup in turtle spinal neurones (Russo & Hounsgaard, 1994; Svirsakis & Hounsgaard, 1997).

Calmodulin is usually thought to mediate the Ca^{2+} -induced inactivation of L-type Ca^{2+} channels (Peterson *et al.* 1999). Our results, however, show that plateau potentials in spinal motoneurons are facilitated by calmodulin. This is compatible with the recent finding that calmodulin can also facilitate L-type Ca^{2+} channels (Zühlke *et al.* 1999). We are well aware, however, that calmodulin could act on earlier steps in the pathway.

- BENNETT, D. J., HULTBORN, H., FEDIRCHUK, B. & GORASSINI, M. (1998). Synaptic activation of plateaus in hindlimb motoneurons of decerebrate cats. *Journal of Neurophysiology* **80**, 2023–2037.
- DELGADO-LEZAMA, R. & HOUNSGAARD, J. (1999). Adapting motoneurons for motor behavior. *Progress in Brain Research* **123**, 57–63.
- DELGADO-LEZAMA, R., PERRIER, J. F., NEDERGAARD, S., SVIRSKIS, G. & HOUNSGAARD, J. (1997). Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of spinal motoneurons. *Journal of Physiology* **504**, 97–102.
- ECKERT, R. & CHAD, J. E. (1984). Inactivation of Ca channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **44**, 215–267.
- EHLERS, M. D. & AUGUSTINE, G. J. (1999). Cell signalling. Calmodulin at the channel gate. *Nature* **399**, 105–108.
- GORASSINI, M. A., BENNETT, D. J. & YANG, J. F. (1998). Self-sustained firing of human motor units. *Neuroscience Letters* **247**, 13–16.
- HOUNSGAARD, J., HULTBORN, H., JESPERSEN, B. & KIEHN, O. (1984). Intrinsic membrane properties causing a bistable behaviour of alpha-motoneurons. *Experimental Brain Research* **55**, 391–394.
- HOUNSGAARD, J. & KIEHN, O. (1993). Calcium spikes and calcium plateaus evoked by differential polarization in dendrites of turtle motoneurons *in vitro*. *Journal of Physiology* **468**, 245–259.
- HOUNSGAARD, J. & MINTZ, I. (1988). Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *Journal of Physiology* **398**, 591–603.
- KIEHN, O. & EKEN, T. (1997). Prolonged firing in motor units: evidence of plateau potentials in human motoneurons? *Journal of Neurophysiology* **78**, 3061–3068.
- KIEHN, O. & EKEN, T. (1998). Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons. *Current Opinion in Neurobiology* **8**, 746–752.
- LEE, R. H. & HECKMAN, C. J. (1996). Influence of voltage-sensitive dendritic conductances on bistable firing and effective synaptic current in cat spinal motoneurons *in vivo*. *Journal of Neurophysiology* **76**, 2107–2110.
- MORISSET, V. & NAGY, F. (1999). Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* **19**, 7309–7316.
- O'CONNOR, V., EL FAR, O., BOFILL-CARDONA, E., NANOFF, C., FREISMUTH, M., KARSCHIN, A., AIRAS, J. M., BETZ, H. & BOEHM, S. (1999). Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* **286**, 1180–1184.
- PERRIER, J. F. & HOUNSGAARD, J. (1999). Ca^{2+} -activated nonselective cationic current (ICAN) in turtle motoneurons. *Journal of Neurophysiology* **82**, 730–735.
- PETERSON, B. Z., DEMARIA, C. D., ADELMAN, J. P. & YUE, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549–558.
- RUSSO, R. E. & HOUNSGAARD, J. (1994). Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca^{2+} channels. *Neuroscience* **61**, 191–197.
- SCHWINDT, P. C. & CRILL, W. E. (1977). A persistent negative resistance in cat lumbar motoneurons. *Brain Research* **120**, 173–178.
- SVIRSKIS, G. & HOUNSGAARD, J. (1997). Voltage dependent facilitation of a plateau generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **78**, 1740–1742.

78

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- SVIRSKIS, G. & HOUNSGAARD, J. (1998). Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons. *Journal of Neurophysiology* **79**, 45-50.
- ZUHLKE, R. D., PITT, G. S., DEISSEROTH, K., TSIEN, R. W. & REUTER, H. (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**, 159-162.

Acknowledgements

This work was kindly funded by the European Union, the Danish MRC, The Lundbeck Foundation, The Novo-Nordisk Foundation and The Foundation Agnes and Poul Friis. J.-F. Perrier was supported by a Marie Curie Research Training Grant (ERB4001GT070998) and a grant from the Danish MRC.

Corresponding author

J. Hounsgaard: Department of Medical Physiology, Panum Institute, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3, DK-2200 Copenhagen N, Denmark.

Email: jhounsgaard@mfi.ku.dk

ROLES OF RYANODINE AND IP₃ RECEPTORS IN REGULATION OF PLATEAU POTENTIALS IN TURTLE SPINAL MOTONEURONS

Mejia-Gervacio, S. ¹, Hounsgaard, J. ² and Diaz-Muñoz, M. ¹

1: Dept. de Neurobiología celular y molecular. Instituto de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Qro., México.

2: Dept. of Medical Physiology. Panum Institute. University of Copenhagen. DK 2200, Copenhagen N, Denmark.

Running title: RyRs and IP₃Rs promote plateau potentials

Section Editor: Prof. Stephen J. Redman

Corresponding Author: S. Mejia-Gervacio
Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 1-1141, Querétaro, México
C. P. 76001
Phone: (52) 55-56234035
Fax: (52) 55-56234035
e-mail: mejiag@calli.inb.unam.mx

Abbreviations

ER- endoplasmic reticulum

RyRs- ryanodine receptors

IP₃Rs- inositol triphosphate receptors

PLC- phospholipase C

I_i- inward current

i.p.- intraperitoneal

RM ANOVA- repeated measures analysis of variance

mGluRI- group I metabotropic glutamate receptors

trans-ACPD- trans-(+/-)-1-aminocyclo-pentane-1,3-dicarboxylic acid

CNQX- 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

Bic- bicuculline

Str- strychnine

AP5- (+/-)-2-amino-5-phosphopentanoic acid

AP7- (+/-)-2-amino-7-phosphopentanoic acid

2-APB- 2-aminoethoxydiphenyl borate

SERCA ATPase- ER Ca²⁺ ATPase (SERCA ATPase)

TTX- tetrodotoxin

TM- total membranes

LSP- low speed pellet

SF- soluble fraction

SE- standard error

Abstract

Generation of plateau potentials in spinal motoneurons depends on activation of voltage sensitive L-type Ca^{2+} channels. These channels are facilitated by metabotropic receptors known to promote release of Ca^{2+} from intracellular stores. The aim of this study is to determine if Ca^{2+} -release receptors in the endoplasmic reticulum (ER) that are sensitive to ryanodine (RyRs) and to IP_3 (IP_3 Rs) contribute to the generation of plateau potentials. The effects of antagonists to RyRs, IP_3 Rs and phospholipase C (PLC) were tested on discharge patterns associated with plateau potentials in motoneurons in slices from the spinal cord of the turtle. Plateau-related discharge patterns, un-facilitated or facilitated by agonists for group I glutamate metabotropic receptors, muscarine-sensitive cholinergic receptors or L-type Ca^{2+} channels were inhibited by blockade of RyRs. In contrast, antagonists of IP_3 Rs or PLC preferentially inhibited plateau-related discharge patterns when facilitated by activation of metabotropic receptors but in only half of the cells when promoted in the absence of metabotropic facilitators. Our findings show that RyRs and IP_3 Rs regulate the generation of plateau potentials in motoneurons and suggest that RyRs may be directly involved with activation of the plateau potential.

Keywords: spinal cord, Ca^{2+} microdomain, intracellular release receptors

Synaptic integration in postsynaptic neurons involves non-linear properties mediated by voltage-sensitive ion channels (Llinas, 1988). In spinal motoneurons a slowly activating, persistent inward current, I_p (Schwindt and Crill, 1977), mediated by L-type Ca^{2+} channels (Hounsgaard and Mintz, 1988) contributes to these properties. This current is thought to be responsible for plateau potentials and the bistable firing pattern in spinal motoneurons in cat (Hounsgaard et al. 1984), mouse (Carlin et al. 2000), turtle (Hounsgaard and Mintz, 1988), frog (Perrier and Hounsgaard, 2000) and humans (Gorassini et al. 2002; Hornby et al. 2003). The ability to generate plateau potentials in spinal motoneurons is a latent property that can be uncovered by activation of metabotropic receptors for nor-adrenalin, serotonin, acetylcholine and glutamate (Conway et al. 1988; Hounsgaard et al. 1988; Delgado-Lezama et al. 1997; Svirakis and Hounsgaard, 1998). The signal pathway from the metabotropic receptors activated by these transmitters to facilitation of plateau potentials is not known. There is evidence that facilitation of L-type Ca^{2+} channels is involved (Hounsgaard and Kiehn, 1989; Svirakis and Hounsgaard, 1998; Perrier et al. 2002) through steps that include activation of calmodulin by an increased concentration of intracellular Ca^{2+} (Perrier et al. 2000). This has led to the hypothesis that facilitation of L-type Ca^{2+} channels by metabotropic receptors is preceded by release of Ca^{2+} via IP_3 Rs in response to activation of PLC (Perrier et al. 2002). The activation of Ca^{2+} -release channels in the ER can initiate a functional interaction with plasma membrane Ca^{2+} channels. In particular, in several types of nerve cells, an interaction between L-type Ca^{2+} channels and RyRs has been documented (Chavis et al. 1996; Tanabe et al. 1998; Hashii et al. 2000). This interaction seems to be initiated by and dependent on repetitive activation of L-type Ca^{2+} channels (Chavis et al. 1996; Tanabe et al. 1998). It is not known if L-type Ca^{2+} channels and RyRs interact in plateau-generating motoneurons and if Ca^{2+} induced Ca^{2+} release contributes to the generation of plateau potentials. In this study, we used intracellular recordings from motoneurons in slices of turtle lumbar spinal cord, to test the effects of pharmacological manipulation of RyRs, IP_3 Rs and PLC on plateau-related firing patterns in spinal motoneurons.

Experimental Procedures

Experimental animals

For electrophysiological and biochemical studies, adult turtles (*Chrysemys scripta elegans* and *Kinosternum integrum*) were housed in groups of 3-5 individuals. *C. scripta* was used in experiments in Denmark and *K. integrum* in México. To obtain slices, animals were anaesthetized with pentobarbital (100 mg i.p.) and killed by decapitation.

Slice preparation

The spinal cord lumbar enlargement was isolated, meninges were carefully dissected under a stereoscopic microscope and, using a non-commercial chopper system, transverse slices (1.5-2 mm thick) were obtained and kept in Ringer solution at 4°C until they were transferred to the experimental chamber. The procedures follow the guidelines of Animal Care Committees in México and Denmark, which are in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Electrophysiological recordings

Intracellular recordings in current clamp mode were performed using Axoclamp-2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) or IE 210 amplifiers (Wamer instruments, Hamden, CT, USA). Micropipettes filled with 1 M potassium acetate had a resistance of 45-55 M Ω . Lumbar motoneurons were selected for study if they had membrane potentials greater than -60 mV. Data were sampled at 10 KHz with a 12-bit analog to digital converter (Digidata 1200, Axon Instruments), displayed by means of Axoscope software (Axon

Instruments) and stored on hard disk for analysis. Experiments were performed at room temperature (20-22 °C).

Solutions and Drugs

Spinal cord slices were bathed in a Ringer solution containing (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 15 NaHCO₃, 2 MgCl₂, 3 CaCl₂, and 20 glucose, saturated with 98% O₂ and 2% CO₂ at pH 7.6. In some experiments, plateau potentials were facilitated by activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1) with 40 μM trans-(+/-)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD) or activation of muscarinic acetylcholine receptors with 25 μM muscarine. Synaptic potentials were eliminated in all the experiments with a mixture of 20-40 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), 40 μM bicuculline (Bic), 10 μM strychnine (Str) and either 50 μM (+/-)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (AP5) or 40 μM (+/-)-2-amino-7-phosphopentanoic acid (AP7 from Tocris, Bristol, UK). The RyR blockers tested were 100-200 μM dantrolene (Patridge and Valenzuela, 1999), 40 μM ruthenium red (Sciancalepore et al. 1998) or 80-100 μM ryanodine (Tanabe et al. 1998; Llano et al. 2000), while IP₃Rs were blocked by 75 μM 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB from Tocris, Bristol, UK) (Maruyama et al. 1997). ER Ca²⁺ ATPase (SERCA ATPase) and PLC were blocked with 10 μM thapsigargin (Calbiochem, San Diego, California, USA) (Savic and Sciancalepore, 1998; Tanabe et al. 1998) and 1 μM U-73122 (Chen et al. 2000), respectively. When indicated, 1 μM Bay-K 8644 was used to activate L-type Ca²⁺ channels and 200-500 nM tetrodotoxin (TTX) was used to block voltage-dependent Na⁺ channels. All the drugs were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri, USA) unless otherwise stated.

Biochemical measurements

In order to confirm the presence of Ca²⁺-refilling mechanisms dependent on SERCA ATPases, the activity of Ca²⁺-ATPases and their sensitivity to the specific blocker, thapsigargin, were assessed in total membrane fractions of turtle spinal cord. In addition, the interaction between 2-APB and IP₃Rs was confirmed using binding studies.

Membrane fractionation

Lumbar and cervical segments of turtle spinal cords (0.5-1 g) were used for membrane preparations. The protocols reported by Damiani et al. (1997) with the modifications introduced by Martínez-Merlos et al. (1997) were followed. This method yields membrane preparations suitable for [³H]IP₃ binding assays. Briefly, three fractions, total membranes (TM), low speed pellet (LSP), and soluble fraction (SF) were obtained by the following procedure. Tissue was homogenized with a POLITRON in 5 vol of buffer containing (mM) 10 Hepes, pH 7.4, 20 KCl, 1 EGTA, 0.5% Chaps and a pellet of COMPLETE INHIBITORS of peptidases (Roche, Basel, Switzerland). LSP was obtained after centrifugation of the homogenate at 3,000 rpm for 10 min and resuspended in the same buffer. The supernatant was centrifuged at 42,500 rpm for 90 min to obtain the SF and the TM fraction. TM (mitochondrial and microsomal membranes) was resuspended in a buffer containing (mM) 300 sucrose, 10 imidazol, and COMPLETE INHIBITORS of peptidases and used for radioactive ligand-binding assays.

Protein concentration was quantified by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

[³H]IP₃ binding

[³H]IP₃ (4nM) was incubated for 30 min at 0 °C with 100 μg of TM fraction from turtle spinal cords in 120 μl of a buffer containing (mM) 25 Tris-HCl, pH 8.0, 5 NaHCO₃, 1 EDTA, 0.25

DTT following the method of Furuichi et al. (1993). Non-specific binding was determined in the presence of 10 μM unlabeled IP_3 . The incubated samples were filtered with Whatman GF/F glass fiber filters using a Millipore apparatus (Bedford Mass, USA). Filters were washed five times with 5 ml aliquots of cold buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM NaHCO_3 , 1 mM EDTA and counted in a liquid scintillation counter after the addition of 10 ml Tritosol (Fricke, 1975). The inhibitory effect of 2-APB was tested by measuring [^3H] IP_3 binding in the presence of 75 μM of this drug.

SERCA ATPase activity

SERCA ATPase activity was measured according to the method of Saborido et al. (1999), with modifications from Chu et al. (1990), by a coupled enzymatic assay in which the rate of ATP hydrolysis was calculated from spectrophotometric recordings at 340 nm following NADH oxidation. The reaction mixture contained 50 μg of TM fraction from turtle spinal cords (mM) 25 MOPS, pH 7.0, 0.2 EGTA, 0.27 NADH, 5 MgCl_2 , 100 KCl, 5 sodium azide, 0.6 phosphoenol pyruvate, 0.004 ionophore A23187, 0.78 CaCl_2 , 2.4 U/ml pyruvate kinase and 100 U/ml lactate dehydrogenase. 16.4 mM CaCl_2 was added to the assay to eliminate Ca^{2+} -ATPase activity, in order to determine the contribution of Ca^{2+} -independent ATPase activity. The assay was started with the addition of 4 mM ATP, and the activity was determined by following the decrease in optical density at 340 nm for the next 10 min. The sensitivity of Ca^{2+} -ATPase activity to 1 μM thapsigargin (Calbiochem, San Diego, CA) was measured under the same conditions.

Data analysis

A demo version of Mini Analysis program (Synaptosoft, inc.) was used to determine the motoneuron discharge frequency. A ratio between the discharge frequency during the last 500 ms of the pulse and the 500 ms in the beginning of the pulse was calculated in order to assess the acceleration in the discharge frequency due to plateau potentials activation. For plotting, the discharge frequency of the cells was divided into 400 ms bins and normalized to the value of the first bin, which was considered as the initial discharge frequency. The initial discharge frequency for the two species of turtles studied was compared using a Mann-Whitney test, and the frequency of non-facilitated plateau potentials in each turtle population was compared using a z-test.

Afterdepolarization amplitude was assessed 300 ms after the end of the stimulation pulse. Input resistance and threshold for action potentials were calculated in each drug condition. Acceleration in the discharge frequency, afterdepolarization, input resistance and threshold for action potentials were all compared in the absence and in the presence of the tested drugs using a RM ANOVA and Tukey as the posthoc test. The difference in the acceleration of the discharge frequency and in the afterdischarge after 2-APB and RyR blockers treatments were compared using a T-student test. For [^3H] IP_3 binding assays the difference between the number of [^3H] IP_3 binding sites in the presence and in the absence of 2-APB was compared using a T-student test. In all cases the differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

The database includes intracellular recordings from 34 motoneurons. The average membrane potential was -65 mV, and input resistance was in the range of 15-92 M Ω . In all cells, firing properties were assessed in response to suprathreshold depolarizing current pulses with a duration of 2-3 s. 15 cells, recorded in the absence of any pharmacological promoter, showed a discharge pattern characteristic of plateau potentials consisting in an initial adaptation at the onset of the depolarizing current pulse followed by a gradual

increase in frequency reaching a maximum at the end of the pulse. At the resting membrane potential the pulse was followed by an afterdepolarization, often accompanied by an afterdischarge (Fig. 1A). In the remaining 19 cells, in the absence of promoters of plateau potentials, firing adapted from a high initial frequency to a lower frequency at the end of the pulse. In this later group, plateau potentials-related pattern was induced by adding either 40 μM trans-ACPD (7/34) or 25 μM muscarine for 15-25 min (7/34 cells), or by direct facilitation of L-type Ca^{2+} channels by application of 1 μM Bay K 8644 for 10-15 min (5/34 cells; Fig. 1C). Plateau-related firing pattern was stable in control conditions for up to 6 h and depended on activation of L-type Ca^{2+} channels since the monotonously adapting pattern was restored in the presence of nifedipine (not illustrated). The plateau-related discharge pattern was similar between *K. integrum* and *C. scripta* and we did not find significant differences neither for the discharge frequency in control conditions ($x \pm \text{SE}$: 11.7 \pm 0.9 and 15.4 \pm 3.8, respectively $P=0.8$) nor between the frequency of non-facilitated plateau potentials for both populations of turtles (0.64 and 0.35, respectively $P=0.2$).

RyR blockade abolishes plateau-related firing pattern

To determine if plateau potentials require RyR activity, the stimulation protocol was applied in the presence of the following RyR blockers: ryanodine (80-100 μM), dantrolene (100-200 μM) and ruthenium red (40 μM). Although the intensity of the current needed for inducing firing activity was sometimes decreased in the presence of RyR blockers (Fig. 4 A, C) we did not find a significant change in threshold for action potentials or in input resistance in response to application of RyR blockers or Bay K 8644 (Fig. 1A) ($P=0.9$, $n=11$ and $P=0.8$, $n=11$; respectively). The effect of RyR blockers was tested in motoneurons in which plateau potential-related activity was facilitated by application of trans-ACPD or muscarine (3 cells; Fig. 1B) as well as in motoneurons with non-facilitated plateau-related firing (7 cells; Fig 1A, B). In both cases, addition of either dantrolene (3 cells), ryanodine (6 cells) or ruthenium red (1 cell) eliminated or reduced the increase in the discharge frequency from ($x \pm \text{SE}$) 2.1 \pm 0.4 in the control to 0.7 \pm 0.2, from 3.7 \pm 0.9 to 0.8 \pm 0.1 and from 1.9 to 0.7 and the afterdepolarization from 9.5 \pm 2.3 to 4.5 \pm 2.0 mV, from 7.8 \pm 1.9 to 0.6 \pm 0.6 mV and from 16 to 2 mV, respectively. Since the effects of all the RyR blockers tested were similar, the statistical analysis was performed considering them as a single category. RyR blockers reduced the discharge frequency acceleration from 2.3 \pm 0.2 ($x \pm \text{SE}$) in the control to 1.0 \pm 0.1 after 20-60 min of RyR blockers for facilitated plateaus and from 1.8 \pm 0.3 to 0.8 \pm 0.1 for non-facilitated plateaus ($P<0.05$). Also the afterdepolarization associated with plateau potentials was significantly reduced from 9.0 \pm 2.0 to 2.1 \pm 1.4 mV and 9.5 \pm 1.5 to 3.7 \pm 0.9 mV ($P<0.05$), in the presence of RyR blockers (Fig. 1A, B); this effect was observed even with depolarizing holding current and increased stimulus intensity (not shown). Unexpectedly, in all cases tested (8/8 cells), application of Bay K 8644 for 40 min recovered neither the acceleration in discharge frequency (0.9 \pm 0.1) ($P>0.05$ compared to the presence of RyR blockers) nor the afterdepolarization (2.9 \pm 0.4 mV) ($P>0.05$ compared to the presence of RyR blockers) related to plateau potentials in the presence of RyR blockers (Fig. 1A, B). Consistent with these results, the plateau-related firing pattern promoted by Bay K 8644 was abolished by RyR blockers (2/2 cells; Fig. 1C).

In three cells the effects of RyR blockers on plateau potentials were tested in the presence of the voltage-dependent Na^+ channels blocker TTX (200-500 nM). TTX application by itself did not change the amplitude of the afterdepolarization; 11.8 \pm 2.2 to 10.6 \pm 3.7 mV (Fig. 2), but RyR blockers strongly reduced plateau potentials afterdepolarization to

4.1 \pm 1.2 mV, either when facilitated with trans-ACPD (1 cell) or when non-facilitated (2 cells) (Fig. 2). In the presence of TTX, the plateau potential reduced by RyR blockade could not be restored by increasing the stimulus intensity, and the remaining plateau was insensitive to the PLC inhibitor, U-73122, (Fig. 2).

Plateau-related firing induced by activation of mGluRI or muscarinic receptors is abolished by inhibition of PLC and IP₃Rs.

In order to investigate the involvement of the IP₃-dependent second messenger pathway in the generation of plateau potentials, the sensitivity of the plateau-related firing pattern to application of the IP₃R blocker 2-APB (75 μ M) (Maruyama et al. 1997) or to U-73122 (1 μ M), which inhibits PLC activity and prevents IP₃ production (Bleasdale et al. 1989) was assessed. The non-facilitated plateau-related firing pattern and the pattern facilitated by trans-ACPD, muscarine or by Bay K 8644 were tested. We did not find any significant change in threshold for action potentials nor in input resistance in response to application of 2-APB (P=0.9, n=16 and P=0.6, n=17; respectively).

In 9 of 10 cells, in which the plateau-related firing pattern was facilitated either by trans-ACPD or muscarine, the acceleration in the discharge frequency was strongly diminished from 1.2 \pm 0.0 to 0.8 \pm 0.0 and the afterdepolarization from 3.9 \pm 1.2 to 0.1 \pm 0.7 mV either by 2-APB for 40-80 min (Fig. 3A, C) or U-73122 for 60 min (1/1 cells). The diminution in the discharge frequency acceleration, but not in the afterdepolarization, was significantly smaller with 2-APB compared to the one produced by RyR blockers for facilitated plateau potentials (P=0.0 and P=0.1, respectively). In contrast, the acceleration in the discharge frequency and afterdepolarization associated to non-facilitated plateau-related firing pattern was reduced from 1.1 \pm 0.0 to 0.7 \pm 0.1 and from 7.6 \pm 0.8 to 2.8 \pm 1.2 mV by 2-APB in only a fraction of motoneurons (3/7 cells) and in one cell with U-73122, meanwhile in the rest the values remained unchanged from 1.2 \pm 0.0 to 1.1 \pm 0.0 and 10.4 \pm 2.7 to 6.5 \pm 1.6 mV. Neither the reduction in the discharge frequency nor in the afterdepolarization produced by 2-APB or RyR blockers in non-facilitated plateau potentials were significantly different (P=0.6 and 0.7, respectively). Besides, in contrast with the results with ryanodine receptor blockers, direct facilitation of L-type Ca²⁺ channels with bath application of 1 μ M Bay K 8644 for 10-15 min restored the increase in the discharge frequency (2.0 \pm 0.5) and afterdepolarization (6.4 \pm 0.6 mV) associated with plateau potentials even in presence of 2-APB (5/8 cells) (Fig. 3A, C) or U-73122 (1/1 cells). Consistent with these results, 2-APB (1/1 cell; Fig. 1C) or U-73122 (2 cells) did not affect neither the discharge frequency (4.0 \pm 2.4 to 4.0 \pm 2.6; t-test P=0.6) nor the afterdepolarization (10.1 \pm 3.7 to 9.5 \pm 5.0 mV; t-test P=0.7) when plateau-related firing pattern was induced by Bay K 8644.

In the cases where blocking of the IP₃ pathway did not reduce the plateau-related firing pattern, RyR blockers always did, namely, in cases of non-facilitated plateau-related firing patterns insensitive to 2-APB (1/1 cell) or U-73122 (1/1 cell) (not shown) and in cases of plateau-related firing patterns recovered by Bay K 8644 after treatment with 2-APB (1/1 cell) or U-73122 (1/1 cell). Consistently, in 3 cells out of 3 in which the non-facilitated plateau-related firing pattern was insensitive to 2-APB, the depletion of ER Ca²⁺ with thapsigargin (10 μ M) for 60 min completely blocked the plateau-related firing pattern (3/3 cells) (Fig. 3B), suggesting that the mechanism for generating plateau potentials was still sensitive to intracellular calcium release.

Windup and plateau related firing were affected in parallel by block of RyRs, IP₃Rs and PLC

Windup of the response to repeated depolarizations is a property of spinal neurons expressing L-type Ca²⁺ channels and plateau potentials (Russo and Hounsgaard, 1994). In 17 cells windup of spike discharge evoked by repetitive (0.5 Hz), initially subthreshold, depolarizing current pulses was studied. Windup was identified as a constant increase in the number of spikes produced by at least 5 consecutive current pulses. The sensitivity of windup to blockers of RyRs, IP₃Rs and PLC was tested. In all cases, windup and the plateau-related firing pattern were similarly affected by the blockers, although effects on windup were evident earlier.

RyR blockers eliminated windup in facilitated motoneurons (muscarine, 1 cell (Fig. 4A); Bay K 8644, 2 cells (Fig. 4C)) as well as in non-facilitated motoneurons (4 cells). In accordance with the effects of RyR blockers on the plateau-related firing pattern, Bay K 8644 did not restore windup that was eliminated by RyR blockade (4 cells) (Fig. 4A). Application of the IP₃R blocker, 2-APB, eliminated windup facilitated by trans-ACPD or muscarine (4/4 cells) (Fig. 4B); but 2-APB and U-73122 only affected non-facilitated windup in a fraction the cells (2/5 cells; 1/1 cell, respectively) (not shown), and their effects were reversed by Bay K 8644 (2/2 and 1/1 cells, respectively) (not shown). 2-APB did not affect windup when induced with Bay K 8644, although it was eliminated by ryanodine (1 cell; Fig. 4C). These results suggest that windup induced through activation of mGluRI or muscarinic receptors activated the IP₃ second messenger pathway, but activation of this pathway seemed not obligatory for generation of plateau potentials and windup.

IP₃Rs interact with 2-APB in turtle spinal cord.

It was recently reported that 2-APB may act on a molecular entity different from IP₃Rs (Paprika and Lewis, 2001). [³H]IP₃ binding was measured in the presence and in the absence of 2-APB, in order to determine a possible interaction with IP₃Rs in the turtle spinal cord. High affinity specific binding sites for [³H]IP₃ were markedly ($P < 0.05$) reduced from 217.5 ± 29.7 fmol/mg prot ($x \pm SE$; 5 assays) to 16.3 ± 10.6 fmol/mg prot ($x \pm SE$; 3 assays) when 2-APB (75 μM) was added to the binding assay. This result confirmed that 2-APB interacts with IP₃Rs in turtle spinal cord.

Turtle spinal cord has SERCA ATPase activity.

Ca²⁺-ATPase activity and its sensitivity to 1 μM thapsigargin, a specific blocker for SERCA ATPase, were measured. Turtle spinal cord has Ca²⁺-ATPase activity of 33 ± 9 mg NADH/min/mg prot, which was completely abolished by thapsigargin. This result indicates that the turtle spinal cord is capable of refilling the ER with Ca²⁺ through a mechanism involving SERCA ATPase activity and supports the idea that the electrophysiological results with thapsigargin are due to the Ca²⁺ depletion of the ER.

Discussion

L-type Ca²⁺ channels mediate plateau potentials in spinal motoneurons (Hounsgaard and Mintz, 1988). The present findings show that generation of plateau potentials is antagonized by blockade of ryanodine receptors, independently of the way they were induced. We also confirm and extend the evidence that facilitation of plateau potentials by group-I metabotropic glutamate receptors and muscarinic acetylcholine receptors is

coupled to the PLC-IP₃ signaling pathway and involves activation of IP₃ receptors. IP₃ receptors blockade, unlike ryanodine receptors blockade, does not always affect plateau potentials when not induced by metabotropic receptors activation and can be overcome by direct opening of L-type Ca²⁺ channels. These findings suggest that generation and regulation of plateau potentials involves intricate interactions between receptors and channels in the dendritic membrane and in the ER.

The most striking observation is the sensitivity of plateau potentials to a block of RyRs. An increased intracellular Ca²⁺ concentration is known to facilitate L-type Ca²⁺ channels; in accordance with this, activation of L-type Ca²⁺ channels and generation of plateau potentials in motoneurons are inhibited when the concentration of intracellular Ca²⁺ is reduced by BAPTA (Perrier et al. 2000). This could suggest a positive feedback mechanism in which influx of Ca²⁺ through activated L-type Ca²⁺ channels induced release of Ca²⁺ from the ER resulting in facilitation of L-type Ca²⁺ channels. The inhibition of plateau potentials by BAPTA and by the block of RyRs is not equivalent, however, since Bay K 8644 can recover plateau potentials when reduced by BAPTA (Perrier et al. 2000) but not when reduced by blockade of RyRs. In other systems several mechanisms for bidirectional augmentation between L-type Ca²⁺ channels and RyRs have been described (Chavis et al. 1996; Tanabe et al. 1998; Hashii et al. 2000). These interactions can be promoted by repetitive activation of L-type Ca²⁺ channels (Chavis et al. 1996) compatible with windup in motoneurons. The mechanisms may involve 1) activation of calmodulin permanently attached to L-type Ca²⁺ channels (Erickson et al. 2001) that facilitates the channel activity (Zuhlke et al. 1999). In spinal motoneurons facilitation of plateau potentials is calmodulin dependent (Perrier et al. 2000); 2) direct interaction of L-type Ca²⁺ channels with Ca²⁺ ions released from the ER. This suggestion is based on the existence of Ca²⁺ binding consensus sequences within the cytoplasmic domain of L-type Ca²⁺ channels (Peterson et al. 2000); 3) Ca²⁺ dependent activation of protein kinase C, that can phosphorylate L-type Ca²⁺ channels and modulate their activity (Arenson and Evans, 2001; Son and Brinton, 2001); or 4) through direct interactions between RyRs and L-type Ca²⁺ channels (Chavis et al. 1996).

Our experiments do not test these alternatives directly. Even the Ca²⁺ mediated interactions cannot be ruled out since close physical proximity of L-type Ca²⁺ channels and RyRs could protect against Ca²⁺ buffering by BAPTA. In favor of direct interaction, however, is the inability of Bay K 8644 to facilitate plateau potentials in the presence of RyR antagonists.

Plateau potentials in spinal motoneurons are facilitated by metabotropic receptors for noradrenaline, serotonin, acetylcholine and glutamate (Conway et al. 1988; Hounsgaard et al. 1988; Delgado-Lezama et al. 1997; Svirakis and Hounsgaard, 1998). The activation of these metabotropic receptors can facilitate L-type Ca²⁺ currents (Chavis et al. 1995; Perrier and Hounsgaard, 2003). Several lines of evidence suggest that these receptors converge on the PLC-IP₃ pathway to facilitate L-type Ca²⁺ channels (Perrier et al. 2002). This hypothesis is strengthened by the present finding that facilitation of plateau potentials by trans-ACPD and muscarine is antagonized by blockade of PLC and IP₃Rs. The link from activation of IP₃Rs to facilitation of L-type Ca²⁺ channels depends on release of Ca²⁺ and activation of calmodulin (Perrier et al. 2000). The ability of Bay K 8644 to facilitate L-type Ca²⁺ channels when this pathway is blocked suggests that RyRs and IP₃Rs regulate L-type Ca²⁺ channels through different mechanisms in spinal motoneurons. Recent findings in other systems clearly indicate that intimate and complex physical and functional relationships exist between metabotropic receptors, RyRs, IP₃Rs and L-type Ca²⁺ channels

(Johanning and Ehrlich, 2002; Delmas and Brown, 2002; Fagni et al. 2000). These relationships need to be worked out for spinal motoneurons.

Acknowledgments

The authors thank Dr. K. Simon, Dr. R Arellano, Dr. JF Perrier and Dr. A Marty for valuable comments and Dr. Dorothy Pless for language revision. Pilar Galarza Barrios and Martin Garcia Servin for bibliographic assistance and animals care.

This work was kindly supported by CONACyT (project number 32364-N) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (project number IN200500) grants to M Diaz and R Arellano.

References

- Arenson, M.S. and Evans S.C., 2001. Activation of protein kinase C increases acetylcholine release from frog motor nerves by a direct action on L-type Ca^{2+} channels and apparently not by depolarization of the terminal. *Neuroscience* 104: 1157-1164.
- Bleasdale, J.E., Bundy, G.L., Bunting, S., Fitzpatrick, F.A., Huff, R.M., Sun, F.F. and Pike, J.E., 1989. Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73122. *Adv Prostaglandin Thromboxane and Leukot Res* 19: 590-593.
- Carlin, K.P., Jones, K.E., Jiang, Z., Jordan, L.M. and Brownstone, R.M., 2000. Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* 12: 1635-1646.
- Chavis, P., Fagni, L., Bockaert, J. and Lansman, J.B., 1995. Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 34: 926-937.
- Chavis, P., Fagni, L., Lansman, J.B. and Bockaert J., 1996. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature* 382: 719-722.
- Chen, J., Heinke, B. and Sandkühler, J. 2000. Activation of group I metabotropic glutamate receptors induced long-term depression at sensory synapses in superficial spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 39: 2231-2243.
- Chu, A., Diaz-Muñoz, M., Hawkes, M.J., Brush, K. and Hamilton, S., 1990. Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol* 37: 735-741.
- Conway, B.A., Hultborn, H., Kiehn, O. and Mintz, I., 1988. Plateau potentials in alpha-motoneurons induced by intravenous injection of L-dopa and clonidine in the spinal cat. *J Physiol* 405: 369-384.
- Damiani, E., Tobaldin, G., Bortoloso, E., and Margreth, A., 1997. Functional behaviour of the ryanodine receptor/ $\text{Ca}(2+)$ -release channel in vesiculated derivatives of the junctional membrane of terminal cisternae of rabbit fast muscle sarcoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 22: 129-150.
- Delgado-Lezama, R., Perrier, J.F., Nedergaard, S., Svirakis, G. and Hounsgaard, J., 1997. Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of turtle spinal motoneurons. *J Physiol* 504: 97-102.
- Delmas, P. and Brown, D.A., 2002. Junctional signaling microdomains: bridging the gap between the neuronal cell surface and Ca^{2+} stores. *Neuron* 36: 787-790.
- Erickson, M.G., Alseikhan, B.A., Peterson, B.Z. and Yue, D.T., 2001. Preassociation of calmodulin with voltage gated Ca^{2+} channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron* 31: 973-985.
- Fagni, L., Chavis, P., Ango, F. and Bockaert, J., 2000. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca^{2+} stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23: 80-88.

Fricke, U., 1975 Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100 Anal Biochem 63: 555-558.

Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guénet, J.L. and Mikoshiba, K., 1993. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. Receptor Channels 1: 11-24.

Gorassini, M. A., Yang, J.F., Siu, M. and Bennet, D.J., 2002. Intrinsic activation of human motoneurons: Reduction of motor unit recruitment thresholds by repeated contractions J Neurophysiol 87: 1859-1866.

Hashii, M., Minabe, Y. and Higashida, H., 2000. cADP-ribose potentiates cytosolic Ca²⁺ elevations and Ca²⁺ entry via L-type voltage-activated Ca²⁺ channels in NG108-15 neuronal cells. Biochem J 345: 207-215.

Hornby, T.G., Rymer, W.Z., Benz, E.N., y Schmit, B.D., 2003. Windup of Flexion Reflexes in Chronic Human Spinal Cord Injury: A Marker for Neuronal Plateau Potentials? J Neurophysiol, 89:416-426.

Hounsgaard, K., Hultborn, H., Jespersen, B. and Kiehn, O., 1984. Intrinsic membrane properties causing a bistable behavior of alpha-motoneurons. Exp Brain Res 55: 391-394.

Hounsgaard, J., Kiehn, O. and Mintz, I., 1988. Response properties of motoneurons in a slice preparation of turtle spinal cord. J Physiol 398: 575-589.

Hounsgaard, J. and Mintz, I., 1988. Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. J Physiol 398: 591-603.

Hounsgaard, J. and Kiehn, O., 1989. Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. J Physiol 414: 265-282.

Johanning, F.W. and Ehrlich, B.E., 2002. Signaling microdomains: InsP₃ receptor localization takes on new meaning. Neuron 34: 173-178.

Joux, N., Chevalyere, G., Alonso, G., Boissin-Agasse, L., Moss, F.C., Desarmenien, M.G. and Hussy, N., 2001. High voltage-activated Ca²⁺ currents in rat supraoptic neurons: Biophysical properties and expression of the various channel α 1 subunit. J Neuroendocrinol 13:638-349.

Koschak, A., Reimer, D., Huber, M., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J. and Striessnig, J., 2001. Alpha 1D (Cav1.3) subunits can form L-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. J Biol Chem 276:22100-22106.

Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F.A., Blayney, L.M., Tan, Y.P. and Marty, A., 2000. Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. Nature Neurosc 3:1256-1265.

Llinas, R.R., 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system function. Science 242: 1654-1664.

Lowry, O., Rosebrough, N., Far, A. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Martínez-Merlos, T., Cañedo-Merino, R. and Díaz-Muñoz, M., 1997. Ryanodine receptor binding constants in skeletal muscle, heart, brain and liver of the Mexican volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*; Rodentia:Cricetidae). Comparison with five other rodent species. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 529-539.

Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. and Mikoshiba, K., 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* 122, 498-505.

Paprika, M. and Lewis, R.S., 2001. Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *J Physiol* 536: 3-19.

Patridge, L.D. and Valenzuela, C.F., 1999. Ca²⁺ store-dependent potentiation of Ca²⁺-activated non-selective cation channels in rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol* 521:617-627.

Perrier, J.F. and Hounsgaard, J., 2000. Development and regulation of response properties in spinal motoneurons. *Brain Res Bull* 53: 529-35.

Perrier, J.F., Mejia-Gervacio, S. and Hounsgaard, J., 2000. Facilitation of plateau potentials in turtle motoneurons by a pathway dependent on calcium and calmodulin. *J Physiol* 528: 107-113.

Perrier, J.F., Alaburda, A. and Hounsgaard, J., 2002. Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Rev* 40:223-229.

Perrier, J.F. and Hounsgaard, J., 2003. 5-HT₂ receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *J Neurophysiol* 89: 954-959.

Peterson, B.Z., Lee, J.S., Mulle, J.G., Wang, Y., de Leon, M. and Yue, D.T., 2000. Critical determinants of Ca²⁺-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca²⁺ channels. *Biophys J* 78: 1906-1920.

Russo, R.E. and Hounsgaard, J., 1994. Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca²⁺ channels *Neuroscience* 61: 191-197.

Saborido, A., Delgado, J. and Megias, A., 1999. Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and E-type Mg²⁺-ATPase activity in rat heart homogenates. *Anal Biochem* 268: 79-88.

Savic, N., and Sciancalepore, M., 1998. Intracellular calcium stores modulate miniature GABA-mediated synaptic currents in neonatal rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosc* 10:3379-3386.

Schwandt, P. and Crill, W.T., 1977. A persistent negative resistant in cat lumbar motoneurons. *Brain Res* 14: 173-178.

Sciancalepore, M., Savic, N., Gyori, J. and Cherubini, E., 1998. Facilitation of miniature GABergic currents by ruthenium red in neonatal hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 80:2316-2322.

Son, M.C. and Brinton, R.D., 2001. Regulation and mechanism of L-type calcium channel activation via V1a vasopressin receptor activation in cultured cortical neurons. *Neurobiol Learn Mem* 73: 388-402.

Svirkis, G. and Hounsgaard, J., 1998. Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 79: 45-50.

Tanabe, M., Gahwiler B.H. and Gerber, U., 1998. L-Type Ca^{2+} channels mediate the slow Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarization current in rat CA3 pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol* 80: 2268-2273.

Xu, W. and Lipscombe, D., 2001. Neuronal $Ca_v1.3\alpha1$ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21:5944-5951.

Zulkhe, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W. and Reuter, H., 1999. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399: 159-162.

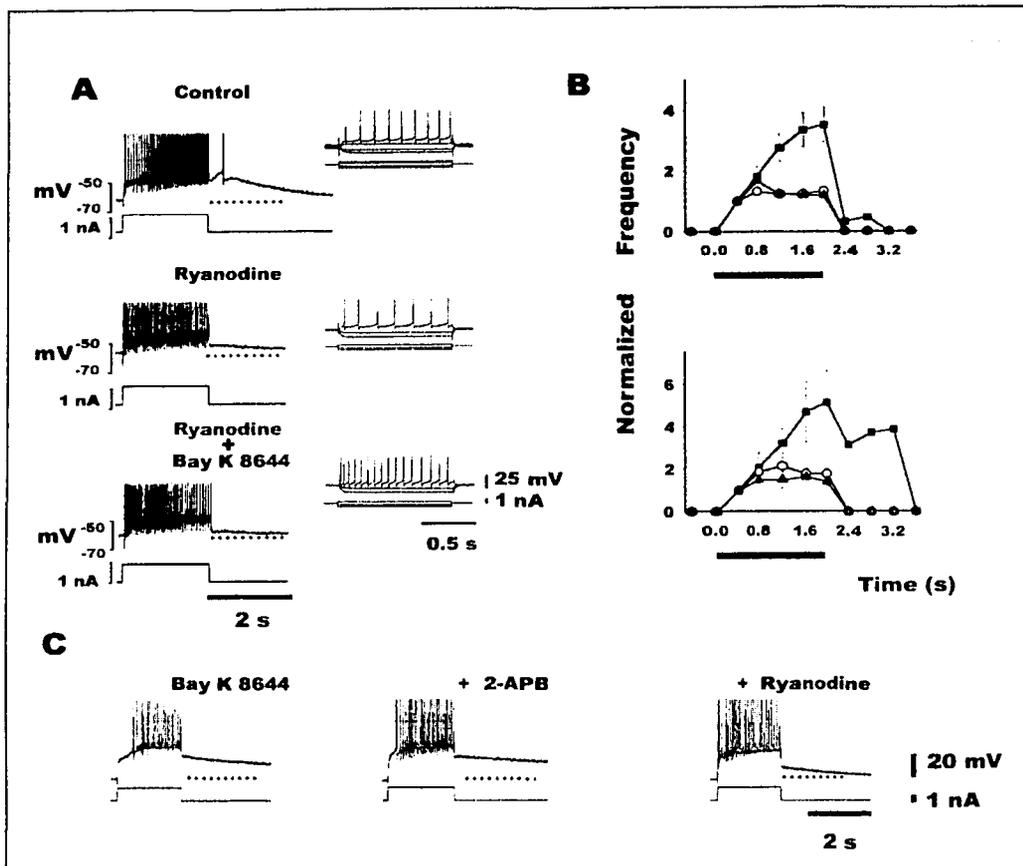


Fig. 1 RyR blockers reduce plateau potential-associated activity

A) The plateau potential recorded in control conditions was reduced by 80 μM ryanodine and was not recovered by facilitation of L-type Ca^{2+} channel with 1 μM Bay K 8644. Right: responses to a protocol of hyperpolarizing and depolarizing current pulses in each drug condition. Neither ryanodine nor Bay K 8644 changed the input resistance ($P=0.9$) or threshold for action potentials ($P=0.4$). B) Above: normalized firing frequency plotted against time for 5 motoneurons. Note the acceleration in the firing frequency and the afterdischarge associated with non-facilitated plateau potentials, recorded in the presence of presynaptic activity inhibitors (\blacksquare), both inhibited by different RyR blockers (\bullet) and non-reversed by 1 μM Bay K 8644 (\blacktriangle). Below: normalized firing frequency plotted against time for 3 motoneurons. Plateau potentials facilitated by either 40 μM trans-ACPD or 25 μM muscarine (\blacksquare), inhibited after addition of RyR blockers (\bullet) and non-reversed after 1

μM Bay K 8644 (\blacktriangle). The horizontal bar represents the depolarizing stimulation pulse. In both groups were significantly different to \bullet and \blacktriangle ; as Bay K 8644 did not recovered plateau potentials \bullet and \blacktriangle were not significantly different (ANOVA $P < 0.05$). C) Plateau potentials facilitated by $1 \mu\text{M}$ Bay K 8644 unaffected by $75 \mu\text{M}$ of the IP_3R blocker 2-APB and eliminated by $80 \mu\text{M}$ ryanodine. All the recordings were obtained in an external ringer solution containing $40 \mu\text{M}$ CNQX, $50 \mu\text{M}$ AP5, $40 \mu\text{M}$ Bic, $10 \mu\text{M}$ Str. Top traces represent the recorded membrane potential, bottom traces signal the pulses of current injected and the discontinuous lines represent the baseline membrane potential.

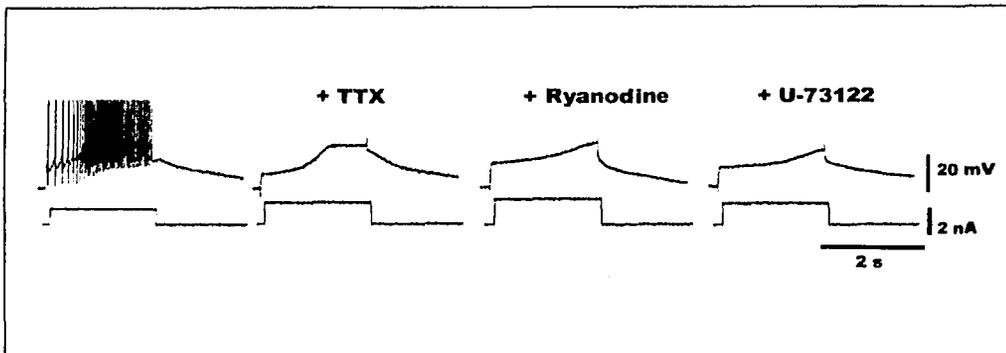


Fig. 2. RyR blockers reduce plateau potentials in the presence of TTX. Acceleration in the discharge frequency and afterdepolarization produced by a 2 s stimulation pulse, 200 nM TTX unmasks the underlying plateau potential, which is reduced by $80 \mu\text{M}$ ryanodine. In presence of TTX and ryanodine a more depolarizing current pulse can still evoke a small residual depolarizing component, not enough to produce plateau potentials. This residual component was not eliminated by further addition of $1 \mu\text{M}$ of the PLC inhibitor, U-73122.

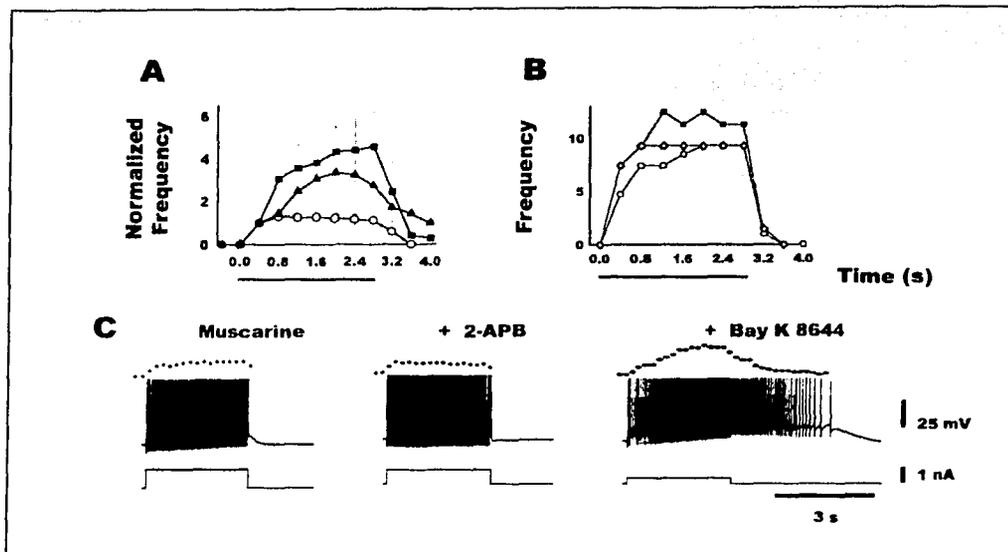


Fig. 3. Inhibition of IP₃Rs and phospholipase C eliminate plateau potential-associated activity facilitated by metabotropic receptor activation.

A) Normalized firing frequency plotted against time showing plateau potentials facilitated either by 40 μ M trans-ACPD or 25 μ M muscarine (■), eliminated by superfusion of 75 μ M of the IP₃R blocker, 2-APB (●) and subsequently recovered by 1 μ M of Bay K 8644 (▲). ■ was significantly different to ● but not to ▲ (ANOVA $P < 0.05$). B) Normalized firing frequency plotted against time from an experiment in which plateau potentials were promoted in the absence of metabotropic facilitators (■), unaffected by 2-APB (●) and eliminated by 10 μ M of the ER Ca²⁺ ATPase blocker thapsigargin (◇); SE range 0-1.23, 0-0.3 and 0-0.68, respectively $n=3$. C) Plateau potentials facilitated by 25 μ M of muscarine were eliminated by 75 μ M of 2-APB, and subsequently recovered by 1 μ M of Bay K 8644. The histogram above the recordings represent the discharge frequency over the time.

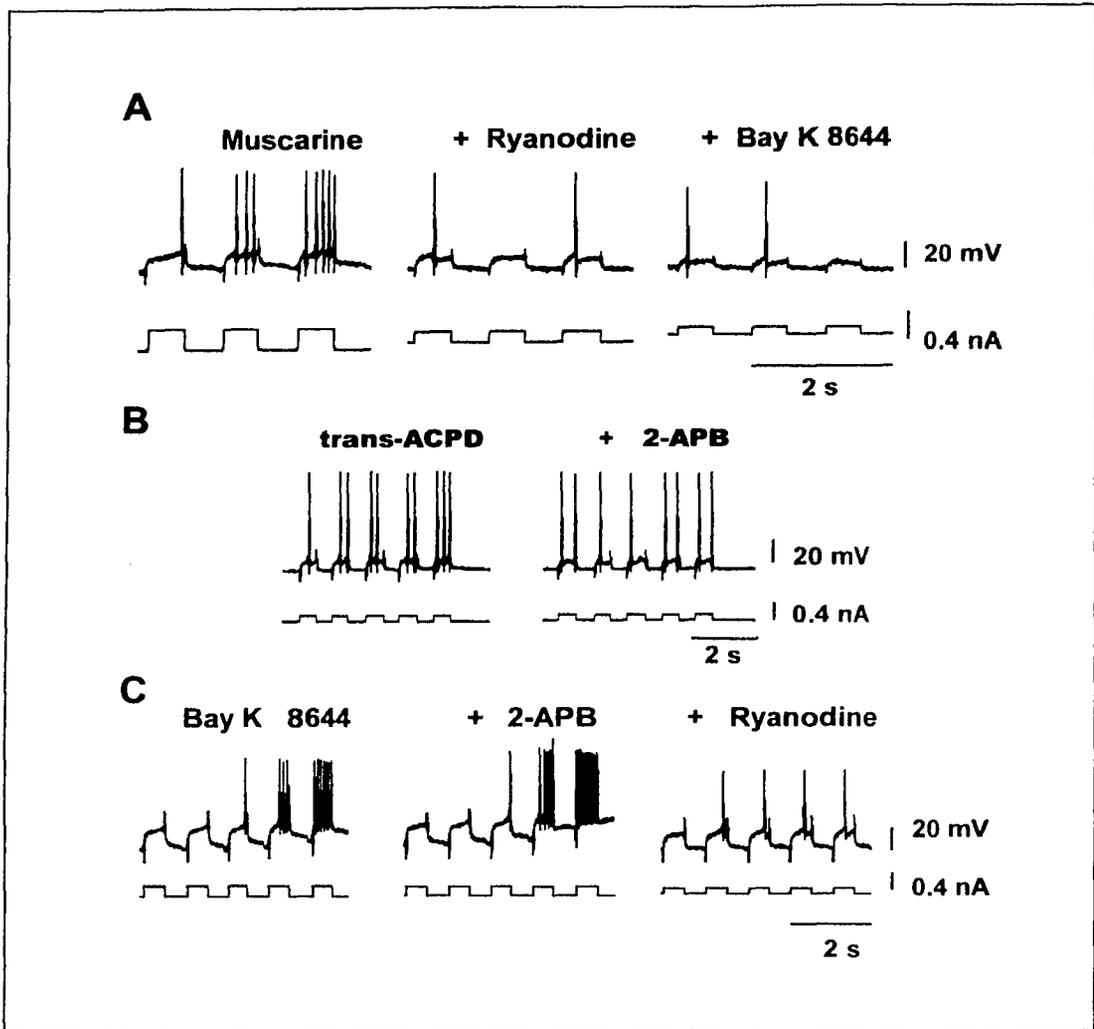


Fig. 4. Windup is sensitive to IP₃R inactivation and dependent on RyR activity. IP₃R and RyR blockers affected plateau potentials and windup in similar ways. A) Windup facilitated by 25 μ M muscarine was abolished by 100 μ M ryanodine and was not recovered with 1 μ M of Bay K 8644. B) Windup facilitated by 40 μ M trans-ACPD and eliminated by the inactivation of IP₃R with 75 μ M 2-APB. C) Windup facilitated by 1 μ M Bay K 8644 application was insensitive to 75 μ M 2-APB but completely eliminated by 80 μ M ryanodine