

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS G SOBRE EL
MOVIMIENTO DE CARGA INTRAMEMBRANAL Y SU
CORRELACIÓN CON LA MODULACIÓN DE CORRIENTES
IÓNICAS EN NEURONAS SIMPÁTICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MED. CIR. ERICK O. HERNÁNDEZ OCHOA

D I R E C T O R :

DR. DAVID E. GARCÍA DÍAZ

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2007



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia,

A Miguel Hernández y Cristina Ochoa, mi padre y mi madre,

a Gabriela Hernández Ochoa, mi hermana.

Por su dedicación, apoyo y ejemplo que me han dado desde el primer día, por que sin ellos esta posibilidad, no podría ser, porque siempre han sido y serán mis amigos, me han motivado, me han dado valor y me ayudaron a ser mejor.

A Minerva (Mine),

Por que llegaste a mi vida, por tu incansable apoyo y motivación. Por tu cariño y compañía en este camino, en esta lucha. Por que te quiero a ti.

A mis maestros y profesores, a cada uno de ellos. En especial a aquellos de la Facultad de Medicina, por enseñarme, guiarme y darme consejos. A los Drs. José Bargas, Arturo Rosales, Jaime Encinas, Alicia Cea Bonilla, Teresa Fortoul, y Maria Dolores Ramírez; por sus clases, que fueron una motivación. A los miembros de mi comité. A los Drs. Froylan Gómez-Lagunas y Carlos Rosales. A mis compañeros del laboratorio, Alfonso, Jania, Juan Manuel, Isabel y Santiago. Al Dr. José Maria Farias (Chema), por darme su apoyo incondicional y su ayuda en momentos muy difíciles de mi vida. A Manuel Hernández, Guillermo Luna y el Ing. Amado García, por su amistad y apoyo. Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Al Dr. Gabriel Roldan, por que siempre tuvo tiempo para escuchar y charlar. A los Drs. Ramón Latorre y Osvaldo Álvarez, del Centro de Estudios Científicos, Valdivia, Chile, por su ayuda con el análisis de ruido.

Al Dr. Martin Schneider, de la Universidad de Maryland, por creer en mí y darme una oportunidad en su laboratorio. Por todo su apoyo, por que sin su ayuda esto no hubiera sido posible. A Zoltan Cseresnyés y Ben Busby, por su amistad en Baltimore. A Ben Prosser, por su gran ayuda con el manuscrito.

A David García, por apoyarme hasta el final, por todo lo que aprendí de el, a pesar de todo, a pesar de los problemas, discusiones y malentendidos, a pesar de la distancia y por todo, gracias David. Por que también sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Finalmente, dedico este trabajo a la memoria de Rafael E. García-Ferreiro, mi amigo, hermano, maestro, compañero de trabajo, de locuras, de viajes, de sueños, de ilusiones, de dolor, de penas, de alegrías. No importa, si no venís conmigo, este viaje es mejor hacerlo solo, yo te voy a recordar todos los días, por que yo no voy a olvidar.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	pag. 4
ABSTRACT	pag. 5
AGRADECIMIENTOS	pag. 6
ABREVIATURAS	pag. 8
1. INTRODUCCIÓN	pag. 9
1.1 Función y estructura de los canales activados por voltaje.	pag. 12
1.2 Operación de un canal activado por voltaje.	pag. 15
1.3 Origen de la dependencia de voltaje.	pag. 17
1.4 Modulación de la excitabilidad celular.	pag. 22
2. ANTECEDENTES	pag. 33
2.1 Modulación de la actividad de canales activados por voltaje por mecanismos de señalización mediadas por receptores acoplados a proteínas G.	pag. 36
2.2 Propiedades de las neuronas del ganglio cervical superior de la rata.	pag. 37
2.3 Corrientes iónicas activadas por despolarización en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de rata.	pag. 39
2.4 Características de la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo N mediada por receptores acoplados a proteínas G en las neuronas simpáticas de la rata.	pag. 40
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	pag. 46
4. HIPÓTESIS	pag. 51
5. OBJETIVOS	pag. 53
6. METODOS	pag. 54
7. RESULTADOS	pag. 73
7.1 Corrientes de membrana en las neuronas del ganglio cervical superior (GCS).	pag. 73
7.2 Registro del movimiento de carga.	pag. 76

7.3 ¿Que canales operados por voltaje contribuyen al movimiento de carga intramembranal que estamos registrando?.	pag. 79
7.4 Inmovilización de la carga y su correlacion con la inactivación de poblaciones de canales operados por voltaje.	pag. 80
7.5 Análisis de ruido en condiciones no estacionarias.	pag. 86
7.6 La activación de proteínas G produce inhibición del movimiento de carga intramembranal.	pag. 88
7.7 Inhibición del movimiento de carga por noradrenalina y subunidades G β 1 γ 4.	pag. 90
7.8 Inhibición de las corrientes de calcio por activación de proteínas G.	pag. 93
7.9 Inhibición de la corriente de sodio.	pag. 100
8. DISCUSIÓN	pag. 107
8.1 Una gran proporción del movimiento de carga deriva del movimiento de los sensores de voltaje de canales de sodio y calcio.	pag. 107
8.2 Inhibición voltaje dependiente y voltaje independiente de los canales de calcio.	pag. 108
8.3 Modulación de canales de sodio por vías que dependen de la activación de proteínas G	pag. 111
9. CONCLUSIONES	pag. 114
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	pag. 115
11. ANEXOS: TRABAJOS PUBLICADOS	pag. 127
12. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	pag. 130

ABREVIATURAS

AC	adenilato ciclasa
AMPc	adenosin monofosfato ciclico
angioII	angiotensina II
ATP	adenosin trifosfato
BK	bradikinina
C	Coulomb
CCOV	canales de calcio operados de voltaje
CIOV	canales ionicos operdos por voltaje
DAG	diacilglicerol
DHPs	dihydropiridinas
e^0	carga elemental
EGTA	ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N', N' –tetraacetic acid
F	Faraday
GDP	guanosin difosfato
GDP β S	guanosin difosfato-beta-S
RAPG	receptores acoplados a proteinas G
G	conductancia
G_{max}	conductancia maxima
GTP	guanosin trifosfato
GTP γ S	guanosin trifosfato-gamma-S
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazina-N'-(2-ethanesulfonic acid)
Hp	potencial de mantenimiento
I	corriente
I_{max}	corriente maxima
IP ₃	inositol trofosfato
k	factor pendiente, parámetro Boltzmann
NA	noradrenalina
Ω	ohms
PA	potencial de accion
PIP ₂	fosfatidil inositol bifosfato
PKA	proteina kinasa A
PKC	proteina kinasa C
PKD	proteina kinasa D
PLC	fosfolipasa C
PP	prepulso
Q	carga
Q_{max}	carga maxima
Q_{on}	carga al ON del pulso de prueba
Q_{off}	carga al OFF del pulso de prueba
R	resistencia
σ^2	varianza
SubHp	potencial de mantenimiento para resta de componentes lineales
TEACl	cloruro de tetraethylamonio
TTX	tetrodotoxina
V	voltaje
V_h	punto medio de activacion, parámetro Boltzmann
V_{Na}	potencial de Nerst para el ion sodio
ω -CgTx	ω -conotoxina GVI

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Modelo inicial de un canal activado por voltaje.
- Figura 2. Estructura y topología de membrana de canales activados por voltaje.
- Figura 3. Estructura de un canal de potasio KvAP.
- Figura 4. Componentes funcionales de un canal activado por voltaje.
- Figura 5. Modelo simple de dos estados.
- Figura 6. Operación de un sensor de voltaje.
- Figura 7. Origen y naturaleza de las corrientes de compuerta.
- Figura 8. La noradrenalina (NA) modifica las propiedades del potencial de acción en neuronas simpáticas.
- Figura 9. Primera demostración que la noradrenalina afectaba las propiedades del potencial de acción como resultado de la modulación de la corriente de calcio en neuronas sensoriales.
- Figura 10. Inhibición y Estimulación Sináptica.
- Figura 11. Características electrofisiológicas de la inhibición de los canales de calcio tipo-N mediada por receptores acoplados a proteínas G.
- Figura 12. Vías de modulación inhibitoria que convergen en canales de calcio tipo N mediadas por neurotransmisores que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de rata.
- Figura 13. El efecto de la inhibición voltaje dependiente a nivel registros de actividad unitaria.
- Figura 14. Implicaciones mecanísticas de los efectos de las proteínas G en la vía de activación de los canales de calcio tipo-N.
- Figura 15. Morfología típica de una neurona principal del ganglio cervical superior.
- Figura 16. Figura 16. Circuito eléctrico básico de amplificadores del sistema de 'patch-clamp' y del circuito equivalente formado por la pipeta y la membrana.
- Figura 17. Características de la corriente capacitiva no lineal.

- Figura 18. Corrientes iónicas activadas por despolarizaciones de membrana en las neuronas del GCS de la rata.
- Figura 19. Corrientes capacitivas no lineales y movimiento de carga evocado por despolarizaciones de membrana en neuronas simpáticas de la rata.
- Figura 20. Inmovilización de la carga e inactivación de canales activados por voltaje.
- Figura 21. Análisis de ruido en condiciones no estacionarias de las corrientes macroscópicas de sodio y calcio.
- Figura 22. La activación de las proteínas G inducida por GTP γ S modula el movimiento de carga.
- Figura 23. La NA y las subunidades $\beta 1\gamma 4$ de las proteínas G modulan el movimiento de carga.
- Figura 24. La diálisis intracelular con GTP γ S inhibe las corrientes de calcio.
- Figura 25. La NA y las subunidades $\beta 1\gamma 4$ de las proteínas G inhiben las corrientes de calcio.
- Figura 26. Comparación entre las curvas de activación del movimiento de carga y la corriente de calcio en condiciones de modulación por proteínas G.
- Figura 27. La diálisis intracelular de GTP γ S y angiotensina II inhiben las corrientes de sodio.
- Figura 28. Comparación entre las curvas de activación del movimiento de carga y la corriente de sodio en condiciones de modulación por proteínas G.
- Tabla 1. Composición de cada una de las soluciones externas para lograr el asilamiento de las corrientes de Ca²⁺, Na⁺, K⁺ y capacitivas no lineales.
- Tabla 2. Composición de cada una de las soluciones de pipeta empleadas para lograr el asilamiento de las corrientes de Ca²⁺, Na⁺, K⁺ y capacitivas no lineales.
- Tabla 3. Parámetros del ajuste a la Eqn., 5, para los datos mostrados en las Figs. 21 y 22.
- Tabla 4. Parámetros del ajuste a la Eqn., 7, para los datos mostrados en las Figs. 23 y 24.

RESUMEN

Una gran variedad de neurotransmisores y neuropéptidos inducen sus efectos a través de la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas G. Los receptores acoplados a proteínas G, y las vías de señalización celular que estos activan, regulan distintas funciones neuronales mediante la modulación de canales iónicos operados por voltaje, los cuales son el fundamento de excitabilidad del sistema nervioso. En los canales operados por voltaje, el movimiento de carga intramembranal, el cual se origina de los rearrreglos conformacionales de grupos de aminoácidos cargados que se localizan dentro de su estructura, precede y/o acompaña las transiciones que conducen a la apertura de este tipo de canales. En este trabajo evaluamos si la activación preferencial de vías de señalización mediadas por proteínas G tiene algún efecto sobre el movimiento de carga intramembranal asociado a mecanismos de activación de canales iónicos operados por voltaje presentes en las neuronas simpáticas de la rata. El presente estudio revela que el movimiento de carga total en las neuronas simpáticas es modulado de manera diferencial tras la activación de proteínas G. Esta modulación del movimiento de carga ocurre de una manera muy similar a la modulación de los canales de calcio tipo N, la cual ha sido estudiada ampliamente en este tipo de neuronas) y a la modulación de los canales de sodio, mecanismo que no había sido reportado en estas neuronas. Nosotros proponemos que un impedimento parcial o completo del movimiento de los sensores de voltaje precede o acompaña a distintas formas de modulación y/o endocitosis de los canales iónicos operados por voltaje.

Este proceso de regulación de los sensores de voltaje puede representar un mecanismo común en las vías de señalización intracelular que son activadas por receptores acoplados a proteínas G y que en última instancia modulan la actividad de distintos miembros de la familia de los canales operados por voltaje.

ABSTRACT

G-protein-coupled receptors (GPCR) control neuronal functions via ion channel modulation. For voltage-gated ion channels, gating charge movement precedes and underlies channel opening. Therefore we sought to investigate the effects of G-protein activation on gating charge movement. Non-linear capacitive currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique in cultured rat sympathetic neurons. Our results show that gating charge movement depends on voltage with average Boltzmann parameters: $Q_{max} = 6.1 \pm 0.6$ nC/ μ F, $V_h = -29.2 \pm 0.5$ mV and $k = 8.4 \pm 0.4$ mV. Intracellular dialysis with GTP γ S produces a non-reversible, $\sim 34\%$ decrease in Q_{max} , a ~ 10 mV shift in V_h and a $\sim 63\%$ increase in k with respect to the control. Noradrenaline (NA) induces a ~ 7 mV shift in V_h and $\sim 40\%$ increase in k . Overexpression of G-protein $\beta 1\gamma 4$ subunits produces a $\sim 13\%$ decrease in Q_{max} , a ~ 9 mV shift in V_h and a $\sim 28\%$ increase in k . We correlate charge movement modulation with the modulated behavior of voltage-gated channels. Concurrently, G-protein activation by transmitters and GTP γ S also inhibit both Na⁺ and N-type Ca²⁺ channels. These results reveal an inhibition of gating charge movement by G-protein activation that parallels the inhibition of both Na⁺ and N-type Ca²⁺ currents. We propose that gating charge movement decrement may precedes or accompanies some forms of GPCR-mediated channel current inhibition or down regulation. This may be a common step in the GPCR-mediated inhibition of distinct populations of voltage-gated ion channels.

INTRODUCCIÓN

La actividad de las células eléctricamente excitables y su comunicación entre ellas, esta determinada, en gran medida, por la distribución asimétrica y el movimiento de iones de un lado al otro de la membrana plasmática. El movimiento de iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , es en casi todos los casos, el responsable de dicha actividad. El flujo de estas especies cargadas ocurre a través de vías de conducción o poros acuosos, formados por proteínas intrínsecas de la membrana plasmática conocidas como canales iónicos. Existen distintos tipos de canales iónicos, los cuales responden primariamente a estímulos de naturaleza física y/o química particulares (p.e. cambios en el voltaje de membrana, neurotransmisores, hormonas u otros estímulos químicos, deformaciones mecánicas de la membrana, cambios en la osmolaridad, e incluso a los mismos iones, etc.). Los canales iónicos se encuentran en las membranas de cualquier tipo celular; tanto procariontes como eucariontes exhiben estas estructuras especializadas para el transporte de especies iónicas. Sus funciones bien conocidas incluyen: el establecimiento del potencial de membrana en reposo, la iniciación, generación y propagación de potenciales de acción, como transductores electroquímicos, regulando el volumen celular, y el flujo neto de iones y fluidos en las células epiteliales. En las células excitables, los canales iónicos trabajan de forma concertada, ya sea abriéndose o cerrándose, para moldear las señales eléctricas.

Bajo una visión reduccionista y debido a que la esencia del funcionamiento del sistema nervioso es la transferencia de información, mediada en parte por canales iónicos, podría afirmarse que, el conocimiento detallado acerca del como los canales iónicos funcionan es necesario incluso para un entendimiento rudimentario de como el sistema nervioso controla nuestra habilidad para hacer gimnasia, tocar una guitarra, percibir el mundo en colores, soñar, imaginar, procesar el

lenguaje, aprender, recordar, determinar nuestras conductas y emociones (Armstrong y Hille, 1998; Kaczmarek y Levitan, 1987).

Perspectiva Histórica

A comienzos de la década de 1950 Alan Hodgkin y Andrew Huxley (HH), usando la técnica de fijación de voltaje desarrollada por Cole y Curtis, y empleando como modelo de estudio el axón gigante de calamar, describieron los mecanismos de permeabilidad responsables del potencial de acción, distinguidos en función de su selectividad iónica y sus cinéticas. Uno de estos mecanismos de permeabilidad, selectivo para iones Na^+ , el otro para iones K^+ . Ambos mecanismos exhibían cinéticas que dependían del voltaje. Estos mecanismos y su formulación matemática por HH daban cuenta del potencial de acción (Hodgkin y Huxley, 1952). Aunque HH no denominaron como canales iónicos a los elementos responsables de los cambios en la permeabilidad, sus experimentos representan hoy día la base los primeros estudios detallados de la actividad de canales iónicos. A mediados de la década de 1960, habían pocos indicios del como se daba el movimiento de iones a través de la membrana de las células excitables. Algunos experimentos de carácter biofísico y farmacológico realizados entre 1965 y 1975, mostrarían que las conductancias al Na^+ y K^+ eran entidades separadas. En ese entonces Clay Armstrong y Bertil Hille, propondrían que las conductancias de Na^+ y al K^+ eran el resultado del paso de dichos iones a través de poros acuosos formados por proteínas de membrana (Hille 1977; Armstrong, 1981). En la Fig. 1 se ilustran algunos modelos iniciales de la estructura de los canales iónicos. Dichos poros acuosos tenían que ser muy estrechos de modo que podían sentir el flujo de iones, sus compuertas se ubicarían en el lado citoplasmático y tanto la activación como la inactivación se modelaron como procesos interdependientes a diferencia del modelo inicial de Hodgkin y Huxley (HH). En 1981, el desarrollo de la técnica de *patch-clamp* por Neher y Sakmann permitió el registro de la actividad de canales

unitarios, y una de sus variantes, el modo de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (*whole-cell voltage clamp*), permitió la posibilidad de practicar registros de fijación de voltaje de manera rutinaria en cualquier tipo celular (Hamill et al., 1981). A partir del trabajo monumental de HH, el progreso en el entendimiento de los canales iónicos en los últimos 50 años ha sido remarcable.

Dentro de los distintos tipos de canales iónicos estudiados y caracterizados hasta la fecha, los canales iónicos activados por cambios en el voltaje transmembranal constituyen una familia muy diversa de proteínas de membrana estructuralmente y funcionalmente relacionadas que juegan un papel central en la iniciación, propagación y transducción de señales celulares (Hille, 2001).

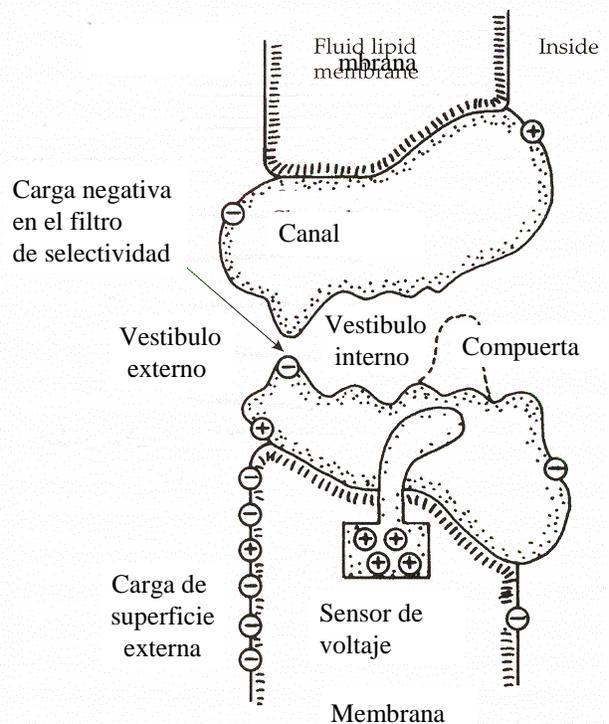


Figura 1. Modelo inicial de un canal activado por voltaje. Este canal está representado esquemáticamente como una proteína con un poro central y con la terminología prevaiente en 1975. Las regiones funcionales -la compuerta, el sensor de voltaje, y el filtro de selectividad- se dedujeron a partir de experimentos de fijación de voltaje. A partir de Hille, 1977.

Función y estructura de los canales activados por voltaje

Los canales iónicos activados por voltaje de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} constituyen las bases funcionales para la generación y propagación de potenciales de acción. La apertura de canales de sodio y calcio resulta en despolarización de la membrana; la apertura de canales de potasio hiperpolariza la membrana. El papel funcional de los canales de sodio y calcio es la iniciación y propagación del potencial de acción, respectivamente. Los canales de calcio poseen un rol adicional; se comportan como transductores electroquímicos pues el calcio que fluye a través de estos canales incrementa transitoriamente los niveles de calcio intracelular, dando lugar a la regulación de procesos celulares que dependen del Ca^{2+} . La terminación del potencial de acción esta determinada por la inactivación de los canales de Na^+ y Ca^{2+} , y por la apertura de canales de K^+ (Armstrong y Bezanilla, 1977; Catterall 2000a y 2000b; Hille, 2001).

Estos canales son distinguibles entre si por exhibir selectividades iónicas distintas, cinéticas y rango de activación diferente, así como propiedades farmacológicas muy específicas. Sin embargo existen características estructurales que son similares entre estos tipos de canales, las cuales fueron evidentes tras la clonación molecular de genes que codifican para proteínas que conforman canales de sodio, calcio y potasio (ver Fig. 2; Hille, 2001).

El complejo proteico que conforma un canal iónico posee una pseudo-simetría tetramérica. Se requiere del ensamble de cuatro subunidades α del canal de K^+ , para formar un canal funcional, mientras que las subunidad α de los canales de Na^+ y Ca^{2+} alberga la pseudo-simetría tetramérica en una sola cadena polipeptídica, la cual exhibe cuatro dominios homólogos (Fig. 2; ver Fig 3).

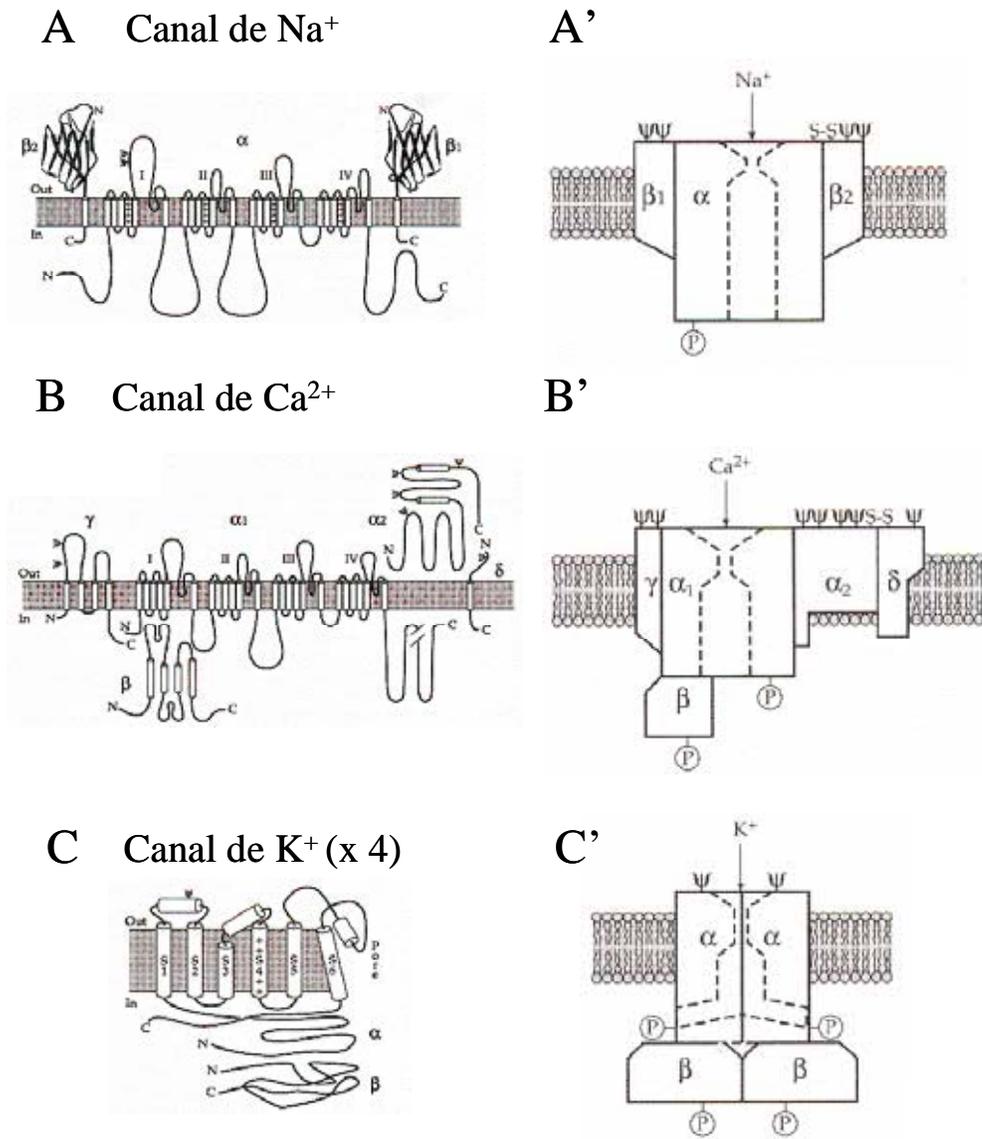


Figura 2. Estructura y topología de membrana de canales activados por voltaje. (A-C) Topología membranal de la subunidad α_1 que conforma distintos tipos de canales activados por voltaje. Se ilustra la localización de los grupos terminales N- y C-, sitios de glucosilación (Ψ), segmentos transmembranales S4 (S4), con cargas positivas (++++). Nótese que los canales de Na^+ y Ca^{2+} exhiben 4 dominios (I-IV) homólogos, y los canales de K^+ se conforman a partir de cuatro subunidades α . (A'-C') Subunidades de los canales activados por voltaje de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ . Sitios de glucosilación (Ψ), uniones bisulfuro (-SS-), sitios de fosforilación (P). Modelos propuestos a partir de evidencias de carácter bioquímico. A partir de Catterall, 1995 y tomado de Hille 2001.

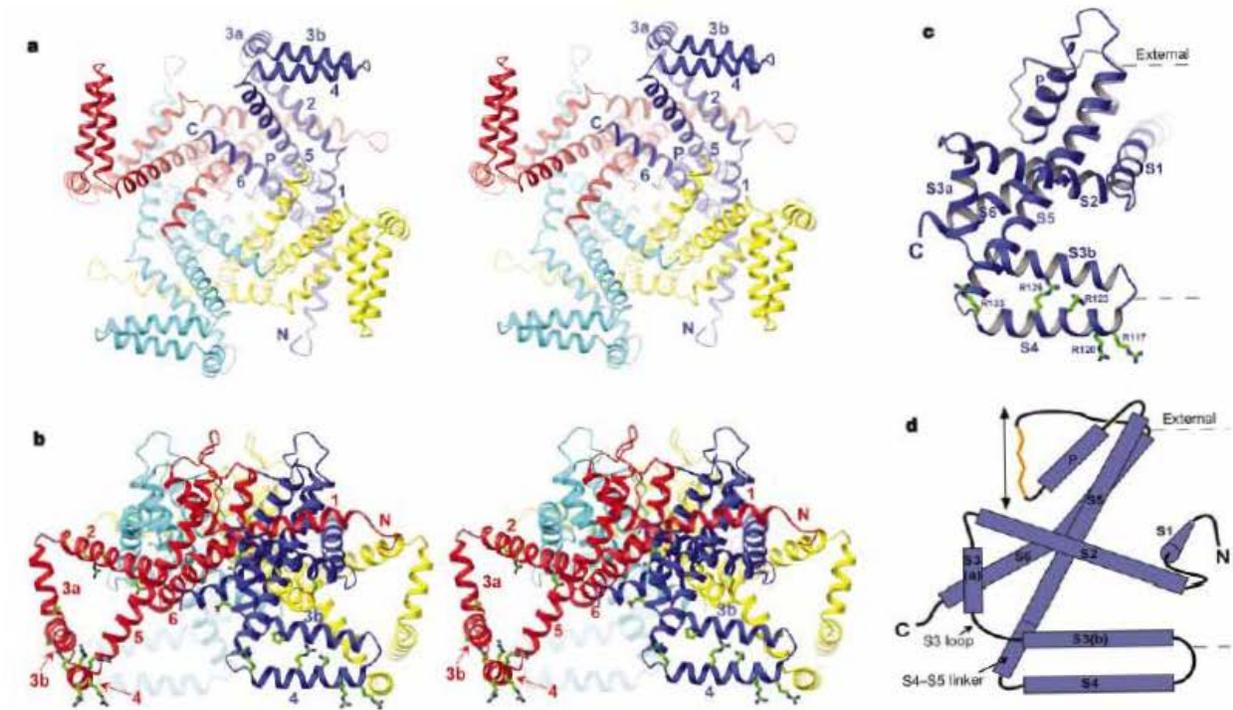


Figura 3. Estructura de un canal de potasio KvAP. (A) Imágenes en estereo del homo tetrámero formado subunidades del canal de potasio KvAP, visto desde el plano intracelular de la membrana. (B) Imagen estereo del mismo tetrámero, vista lateral en el plano de la membrana. (C) Vista lateral, como en B, de una sola subunidad del KvAP. (D) Esquema de la topología de una subunidad del KvAP, con el filtro de selectividad ilustrado en color naranja y la flecha indicando la vía del flujo iónico (tomado de Jiang et al., 2003).

En todos los casos, tanto el grupo amino terminal, como la terminal carboxilo, se localizan en la cara citoplasmática. La cadena polipeptídica de la subunidad α de la subfamilia de canales de potasio Kv (una de las familias de canales de potasio más diversa y mejor caracterizadas), exhibe seis segmentos transmembranales (STM 1-6; S1-S6; ver Fig. 3); la subunidad α de los canales de Na^+ y Ca^{2+} , exhibe cuatro dominios homólogos de seis segmentos transmembranales (I-IV STM 1-6; ver Fig. 2).

Operación de un canal activado por voltaje

Se requieren de al menos tres componentes funcionales para que un canal iónico activado por voltaje funcione apropiadamente: 1) una vía de conducción (poro); 2) compuertas que permitan o limiten el movimiento de los iones, y 3) un sensor de voltaje, que cambie su conformación en respuesta a cambios en el potencial de membrana (Fig. 3 y 4). El movimiento del sensor de voltaje necesariamente debe estar energéticamente acoplado a las compuertas. Este acople energético entre el sensor de voltaje y las compuertas, es el atributo característico que hace a estos canales dependientes de voltaje.

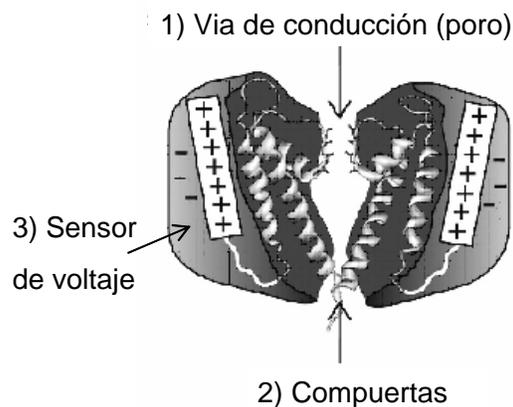


Figura 4. Componentes funcionales de un canal activado por voltaje. Representación esquemática del como los sensores de voltaje rodean las regiones que forma el poro del canal de potasio KcsA. Solo se muestran dos subunidades vistas desde un plano lateral. Tomado de Gandhi e Isacoff, 2002.

A continuación se expondrán brevemente dos propiedades fundamentales: A) Cierre-apertura (*gating*) y B) permeabilidad.

A) *Cierre-Apertura (gating)*. En una forma muy simple, los canales iónicos dependientes de voltaje pueden existir en dos conformaciones funcionales: cerrado y abierto. Estas conformaciones existen en un equilibrio dinámico y las transiciones entre estos estados son controladas y favorecidas por cambios en el potencial de membrana.

Algo común a los canales iónicos que subyacen al potencial de acción de distintos tipos de células eléctricamente excitables y que muestran una topología en la membrana como se ilustran en la Fig. 5, es su activación (apertura) tras la despolarización de la membrana. Los canales iónicos usualmente se encuentran cerrados para preservar los gradientes iónicos a través de la membrana y abren sus “compuertas” solo cuando son llamados a llevar a cabo trabajo eléctrico. De tal forma que el “regulador primario” del proceso de cierre-apertura de los canales denominados dependientes de voltaje es el voltaje transmembranal (Fig. 5).

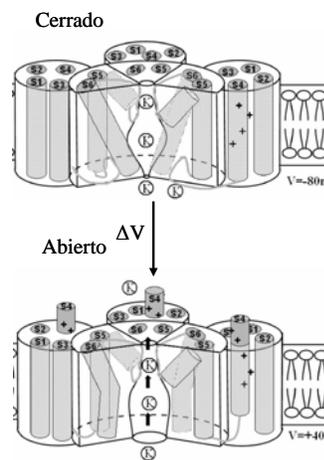


Figura 5. Modelo simple de dos estados. Representación de dos estados conformacionales funcionales de un canal activado por voltaje. En una forma muy simple, los canales iónicos dependientes de voltaje pueden existir en dos conformaciones funcionales: cerrado y abierto. Estas conformaciones existen en un equilibrio dinámico y las transiciones entre estos estados son controladas y favorecidas por cambios en el potencial de membrana. Tomado de Larsson, 2002.

El potencial de membrana ejerce dos papeles en los canales iónicos activados por voltaje. Controla la probabilidad de apertura y conduce a los iones a través de los canales abiertos (Horn, 2002; Larsson, 2002). El proceso de activación, en esta clase de canales tiende a ser exquisitamente sensible a pequeños cambios en el potencial de membrana, de modo que solo un cambio de 5 mV

puede producir un incremento de 10 órdenes de magnitud en la probabilidad de apertura. Este proceso ocurre en una escala de tiempo del orden de milisegundos y parece involucrar grandes cambios conformacionales en la estructura de la proteína (Bezanilla, 2000; Jiang et al., 2003, Chanda et al., 2005).

Origen de la dependencia de voltaje.

“Details of the mechanism [the dependence of g_{Na} and g_K on membrane potential] will probably not be settled for some time, but it seems difficult to escape the conclusion that the changes in ionic permeability depend on the movement of some component of the membrane which behaves as though it had a large charge or dipole moment”

(Hodgkin and Huxley, 1952)

Para Hodgkin y Huxley (Hodgkin y Huxley, 1952), esta fue la base de una de sus hipótesis, para dar cuenta de la dependencia de voltaje, en la que el gran flujo de iones a través de la vía de conducción era controlada por la posición de unas cuantas partículas cargadas y la distribución de dichas partículas era modificada por el potencial de membrana. Esta hipótesis visionaria implicaba la existencia de un gran número de “unidades conductoras” cada una regulada por el voltaje a través de la operación de un “sensor de voltaje”. Estas unidades conductoras constituyen lo que hoy día conocemos como canales iónicos activados por voltaje. Después del trabajo de Hodgkin y Huxley los avances en las herramientas y técnicas de la electrofisiológicas en conjunto con la biología molecular, la cristalografía de rayos X, y la óptica, han incrementado significativamente nuestro entendimiento de la operación del poro y del sensor de voltaje (ver Figs. 3, 4, 5 y 6).

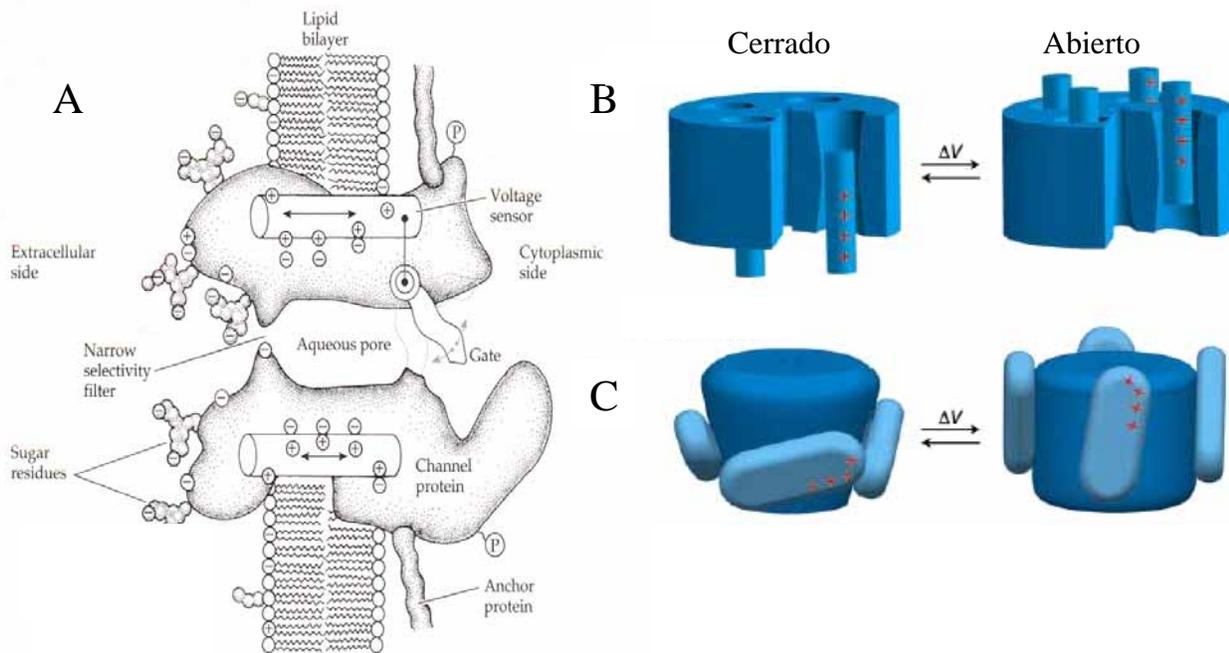


Figura 6. Operación de un sensor de voltaje. (A). Modelo de Hille (Hille, 1977; 1992; 2001). (B) Modelo clásico del la operación del sensor de voltaje. En este modelo, el segmento S4 se localiza en regiones centrales con respecto al resto de los segmentos transmembranales, alejado de un entorno puramente lipídico y cercano a la vía de conducción. En este modelo, basado en estudios electrofisiológicos y de espectroscopia de fluorescencia, el Segmento S4 se desplaza de manera saliente y rotacional en relación al plano perpendicular a la membrana. (C) Modelo del ‘paddle’ o remo. Este modelo se deriva de la cristalización de un canal de potasio activado por voltaje. En este modelo, los sensores de voltaje, se localizan en la periferia con respecto al resto de los segmentos transmembranales. El segmento S4 y parte de S3, se desplazan parcialmente en dirección saliente con respecto al plano perpendicular de la membrana, de una manera análoga a la acción de un ‘remo’. Nótese que en este modelo el movimiento de los sensores ocurre en la periferia del canal, en relación al resto de los segmentos transmembranales; en un ambiente altamente hidrofóbico y alejado de la vía de conducción (B y C tomados de Jinag et al., 2003).

En los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , la despolarización de la membrana evoca el desplazamiento de grupos cargados localizados dentro la estructura de los canales. Se ha propuesto que aproximadamente 4 a 8 residuos de lisinas y argininas positivamente cargados que se localizan en el segmento transmembranal S4 de estos canales, constituyen el sensor de voltaje. Como resultado del movimiento de los grupos cargados ubicados en el STM S-4 se genera una corriente, que por su origen y naturaleza es de tipo capacitivo no lineal (Figs. 6 y 7).

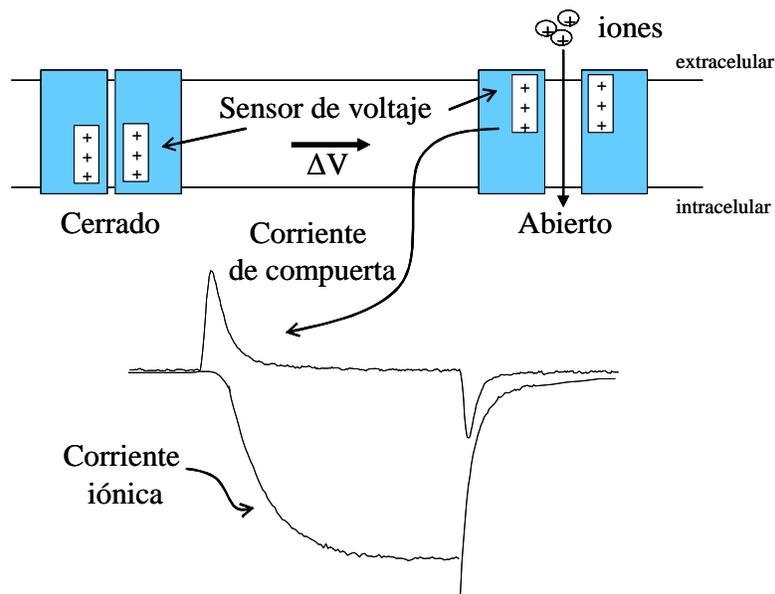


Figura 7. Origen y naturaleza de las corrientes de compuerta. Estas corrientes capacitivas no lineales, también denominadas como corrientes de compuerta o corrientes de desplazamiento asimétrico, representan la manifestación electrofisiológica del movimiento de los sensores de voltaje y los cambios conformacionales en la estructura de los canales que preceden y dan lugar a la apertura de la vía de conducción. También se ilustra una corriente iónica entrante asociada a esta corriente de compuerta. Nótese como la corriente de compuerta precede en el tiempo a la corriente iónica.

El desplazamiento de los sensores de voltaje transporta una carga por canal de $\sim 12\text{-}13 e^0$ (e^0 ; carga elemental = 1.6022×10^{-19} C) a través del campo eléctrico entre la conformación completamente cerrada hasta el estado abierto (Bezanilla, 2000; Chanda et al., 2005). El

desplazamiento de los sensores induce una serie de cambios conformacionales que provoca que los canales pasen de un estado de no conducción al estado abierto (ver Figs. 5 y 6).

Al igual que las corrientes iónicas, mediante el empleo de técnicas de fijación de voltaje y en condiciones favorables, las corrientes de capacitivas no lineales son susceptibles de ser registradas en cualquier tipo celular que exprese una densidad considerable de canales iónicos activados por voltaje (Almers, 1979; Bean y Rios, 1989; ver el apartado de Métodos). Las corrientes capacitivas no-lineales se han registrado y analizado en un gran número de preparaciones que incluyen el músculo esquelético (Schneider y Chandler, 1973), axón gigante de calamar (Armstrong y Bezanilla, 1974), el nodo de Ranvier (Nonner et al., 1975), neuronas de molusco y en neuronas centrales de la rata (Adams y Gage, 1976; Kostyuk et al., 1977; Chameau et al., 1995). En todas estas preparaciones, a las corrientes capacitivas no-lineales se le ha correlacionado con la activación de canales iónicos activados por voltaje presentes en dichas membranas.

Estudios de mutagénesis y de cristalografía han logrado identificar el dominio de la “compuertas” dentro de la proteína que conforma el poro, así como la existencia de un “*sensor de voltaje*” dentro la secuencia primaria de la familia de canales iónicos activados por voltaje (Jiang et al., 2003; Chanda et al., 2005).

Algunos canales poseen una propiedad adicional, denominada *inactivación*, la cual causa que los canales cierren ‘espontáneamente’ durante una despolarización sostenida (Armstrong y Bezanilla, 1977; Armstrong 1981; Patil et al., 1998; Catterall 2000a’ 2000b; Hille 2001). Estudios de mutagénesis dirigida en conjunto con el análisis funcional han identificado regiones de la proteína involucradas en el proceso de inactivación de canales de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺.

B) *Permeabilidad*. Los canales iónicos proveen vías de conducción altamente selectivas para el transporte de especies iónicas en favor de su gradiente electroquímico a través de la membrana

plasmática. La selectividad iónica de los canales es una propiedad asociada con la vía de permeación, usualmente llamada poro (Figs. 1, 2 y 3).

La alta selectividad ocurre en conjunto con una alta eficiencia de transporte de iones (en el rango de 10^7 a 10^8 iones por segundo). El mecanismo de esta selectividad en el transporte involucra múltiples sitios de unión para la especie iónica permeable dentro de la región del poro en la proteína que conforma un canal iónico (ver Figs. 1, 2, 3). Estudios de biología molecular, mutagénesis y cristalográficos han identificado parte de esta región que conforma el poro, así como la que es responsable de la selectividad dentro de la secuencia primaria que codifica para algunos tipos de canales iónicos (Figs. 2 y 3). La magnitud de la corriente a través de la membrana depende de la densidad en el número de canales, la conductancia por canal, y del tiempo que el canal(es) permanezca en el estado conductor (abierto).

De lo mencionado en los puntos A y B se desprende que los canales dependientes de voltaje son regulados *intrínsecamente* por dos procesos operacionalmente separables, la activación (excitación) y la apertura (permeabilidad) (Hille, 2001).

Modulación de la excitabilidad celular

“Neuromodulation confers context-sensitive flexibility to the signalling properties of neurons. The neuron is the central point of integration for an array of extracellular signals, and the output of the neuron, namely electrical activity and neurotransmitter release, is a function of the biochemical integration process. Remarkably, the choice between behaviours in different environmental or physiological contexts can often be ascribed to the biochemical processing that occurs at the level of a single neuron”.

Wilson GF, 2001

Sabemos que en solo pocas membranas, la excitabilidad es fija, pero en muchas otras, puede ser ajustada finamente a requerimientos variables. Por ejemplo, la membrana de los axones, la cual propaga los impulsos que se le proveen, exhibe una excitabilidad que requiere de pocos ajustes. Cuando el axóplasma es substituido por solución salina, la membrana del axón continua conduciendo potenciales de acción; de lo anterior se concluye que probablemente los sistemas citoplasmáticos no sean esenciales para la conducción.

Sin embargo, las propiedades eléctricas del músculo cardíaco, músculo liso, glándulas secretoras, así como el soma y las dendritas de las neuronas se ajustan minuto a minuto a las demandas y experiencias de los organismos. En la actualidad es ampliamente aceptado que los patrones de la actividad eléctrica celular, la comunicación entre las células, así como la comunicación dentro las mismas varían considerablemente. Incluso neuronas estrechamente relacionadas, pueden exhibir distintas propiedades eléctricas, reflejando la distinta composición de canales iónicos que son funcionales bajo distintas condiciones.

Un hecho extremadamente importante para el funcionamiento del sistema nervioso, e igual de importante para la perspectiva de esta tesis, es el hecho de que los patrones de actividad eléctrica

no son fijos, y pueden ser modulados por las acciones de neurotransmisores, hormonas y entradas sensoriales. La diversidad de los cambios -que son el resultado de algún tipo de modulación- observados en las células excitables se ajusta a la diversidad de las propiedades eléctricas endógenas, sin embargo algunos patrones pueden ser discriminados: la modulación generalmente resulta en un cambio en la tasa de despolarización, amplitud, duración de los potenciales de acción, la frecuencia de disparo o en la eficiencia de la transmisión sináptica.

“The gating of ion channels is not simple...In a particular kind of ion channels, like voltage- dependent ones, others factors more than membrane potential could influence the open-shut behaviour”

Hille, 2001

En la actualidad es ampliamente aceptado que la actividad de los canales iónicos dependientes de voltaje puede ser *modulada* de manera secundaria, en una escala de tiempo de segundos a minutos por neurotransmisores y neuropéptidos y hormonas que activan a otras proteínas de membrana, los receptores metabotrópicos (p. e. receptores acoplados a proteínas G) y sistemas de segundos mensajeros. Estos procesos moduladores han demostrado ser cruciales para el control de la secreción de hormonas, neurotransmisores y péptidos, la contracción muscular y la regulación de la expresión de genes.

La modulación inducida por la acción de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas que activan a receptores acoplados a proteínas G, puede ocurrir de forma indirecta, involucrando sistemas de segundos mensajeros así como procesos de fosforilación-defosforilación, mediada por proteínas con actividad de cinasas y fosfatasa, respectivamente, o de forma directa, debido a la unión de las subunidades de las proteínas-G activas a canales iónicos. A este tipo de modulación

por sistemas de señalización celular lo denominaremos regulación secundaria, para distinguirlo del proceso regulador primario (voltaje transmembranal).

La manera en como los sistemas de regulación secundaria podrían afectar a los canales dependientes de voltaje teóricamente podría darse de múltiples modos, ocurrir a varios niveles y a distintas escalas de tiempo. Por ejemplo ya sea afectando la permeabilidad (el poro), la activación (dependencia de voltaje), y la expresión funcional (transcripción, traducción, ensamble y reciclamiento en la membrana plasmática). Sin embargo, existen evidencias experimentales que sugieren que los mecanismos moduladores mediados por neurotransmisores alteran la probabilidad de apertura (el grado con el cual los canales iónicos llevan a cabo un cambio conformacional de un estado a otro), o afectan la sensibilidad de estas transiciones al voltaje transmembranal. Al parecer, las propiedades fundamentales de los canales dependientes de voltaje como la selectividad iónica y la conductancia unitaria no son usualmente alteradas por sistemas moduladores.

Algunos ejemplos de modulación de canales iónicos extensamente estudiados, desde el punto de vista biofísico y bioquímico, son: la modulación de canales de calcio y potasio del músculo cardíaco y la modulación de canales de calcio y potasio neuronales.

“Channel modulation which governs the intensity of cardiac function so strikingly, also colors the activities of neurons”

Kaczmarek and Levitan, 1987

En el caso de las neuronas periféricas de mamíferos, Horn y McAfee en 1980 y Dunlap y Fishbach en 1981, fueron los pioneros en demostrar que la NA, algo que posteriormente se demostraría ocurre mediante vías que dependen de la activación de proteínas G, afectaban las propiedades temporales

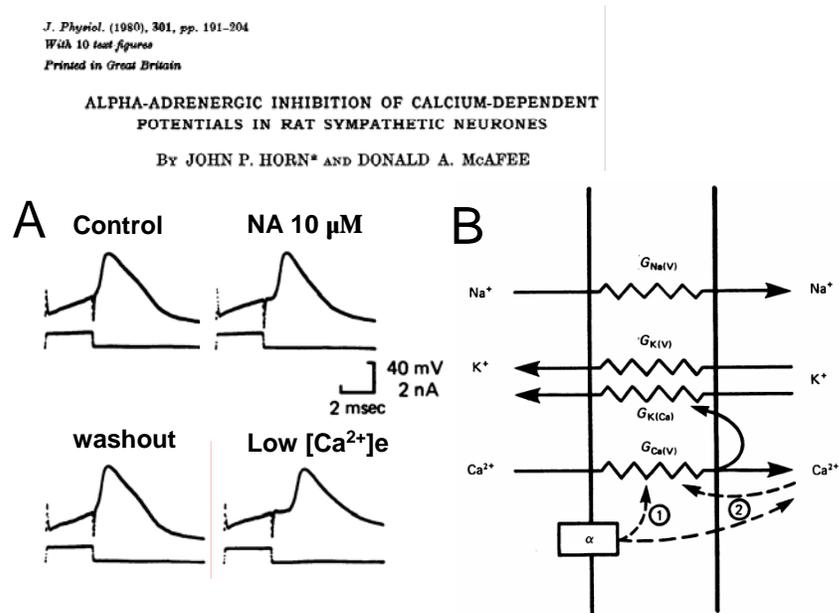


Figura 8. La noradrenalina (NA) modifica las propiedades del potencial de acción en neuronas simpáticas.

(A) Primera demostración de la regulación de las propiedades del potencial de acción por noradrenalina de que en neuronas simpáticas del GCS. (B) Modelo propuesto por Horn y McAfee, 1980).

del potencial de acción (Fig. 8A). Horn y McAfee postularon un mecanismo en el cual el receptor de la NA modulaba directamente con la conductancia de calcio (Fig. 8B), pero fueron Dunlap y

Fishbach los primeros en demostrar la modulación de la corriente de calcio inducidas por NA (Fig. 9 A y B); también fueron los primeros en postular un mecanismo de acción el cual implicaba una reducción en el número de canales funcionales.

J. Physiol. (1981), 317, pp. 519-535
With 12 text-figures
Printed in Great Britain

519

**NEUROTRANSMITTERS DECREASE THE CALCIUM
CONDUCTANCE ACTIVATED BY DEPOLARIZATION OF EMBRYONIC
CHICK SENSORY NEURONES**

By KATHLEEN DUNLAP AND GERALD D. FISCHBACH

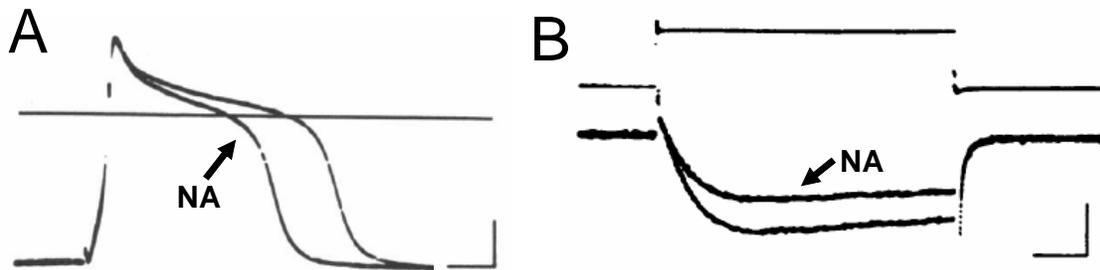


Figura 9. Primera demostración que la noradrenalina afectaba las propiedades del potencial de acción como resultado de la modulación de la corriente de calcio en neuronas sensoriales. (A) Efectos de la NA en las propiedades temporales del potencial de acción. (B) Inhibición de la corriente de calcio inducida por la NA (a partir de Dunlap y Fishbach, 1981).

Dunlap y Fishbach, en su carácter de visionarios, también propusieron que este mecanismo, que fue observado en el soma de las neuronas sensoriales, podría también estar presente en las terminales nerviosas y ser importante en procesos de inhibición presináptica. Hoy día está claramente establecido que neuronas periféricas y centrales, la modulación de canales de sodio, calcio y potasio por neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G constituye uno de los múltiples mecanismos de modulación más ubicuos.

En la Fig. 10 se ilustran algunas acciones moduladoras inducidas por transmisores sobre canales de potasio y calcio, en una sinapsis hipotética. Estos tipos de canales los patrones de modulación que son inducidos por distintos transmisores han sido caracterizados y ampliamente estudiados en neuronas de invertebrados y mamíferos. Por más de dos décadas el foco de la investigación en el campo de la modulación de canales de calcio y potasio por proteínas G en neuronas, ha sido demostrar su existencia, las características electrofisiológicas, los sustratos bioquímicos y los elementos estructurales responsables de este fenómeno.

En nuestra sinapsis hipotética, los transmisores modulan la transferencia de señales de una célula a otra mediante la modificación del potencial de acción y/o la entrada de Ca^{2+} a la terminal presináptica, o a través de modificaciones en la excitabilidad de la terminal postsináptica.

Uno de los ejemplos ilustrado en la Fig. 10 es la modulación de canales de potasio tipo M. Estos canales pertenecen a la familia de los canales activados por voltaje. En neuronas simpáticas, la actividad de estos canales es inhibida por un gran número de transmisores.

En nuestra sinapsis hipotética, estos canales han sido colocados en la membrana postsináptica (Fig. 10B). En ausencia de agonistas, la actividad de estos canales limita las propiedades de disparo repetitivas, pues estos canales se activan a valores de voltaje cercanos al umbral del potencial de acción. Cuando los canales tipo M son inhibidos por transmisores (o en este caso por un bloqueador selectivo de la corriente tipo M, XE991 $10\mu M$; Fig. 10B' y B'') la transmisión sináptica rápida (mediada por canales catiónicos operados por ligando) se ve facilitada, dando lugar a un incremento de potenciales excitatorios postsinápticos (Fig. 10B'; panel inferior derecho, trazos de color gris).

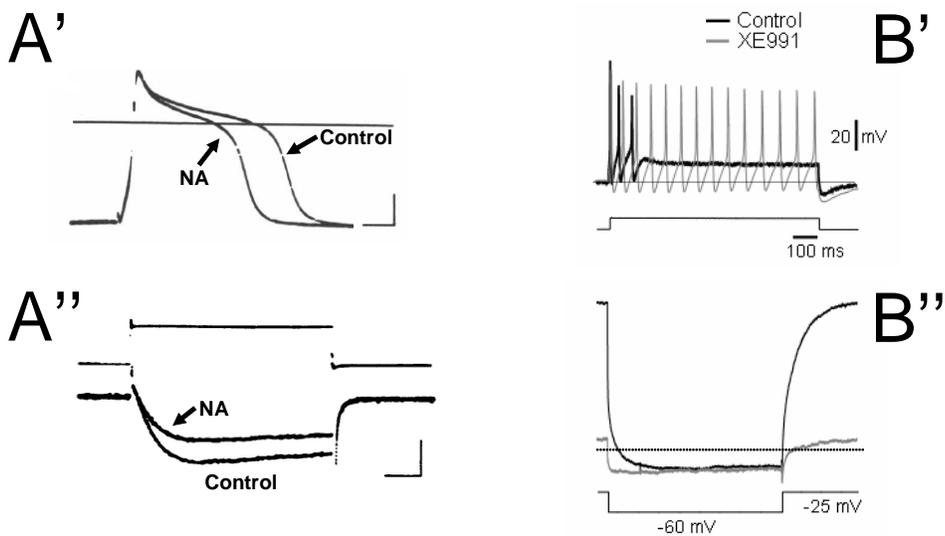
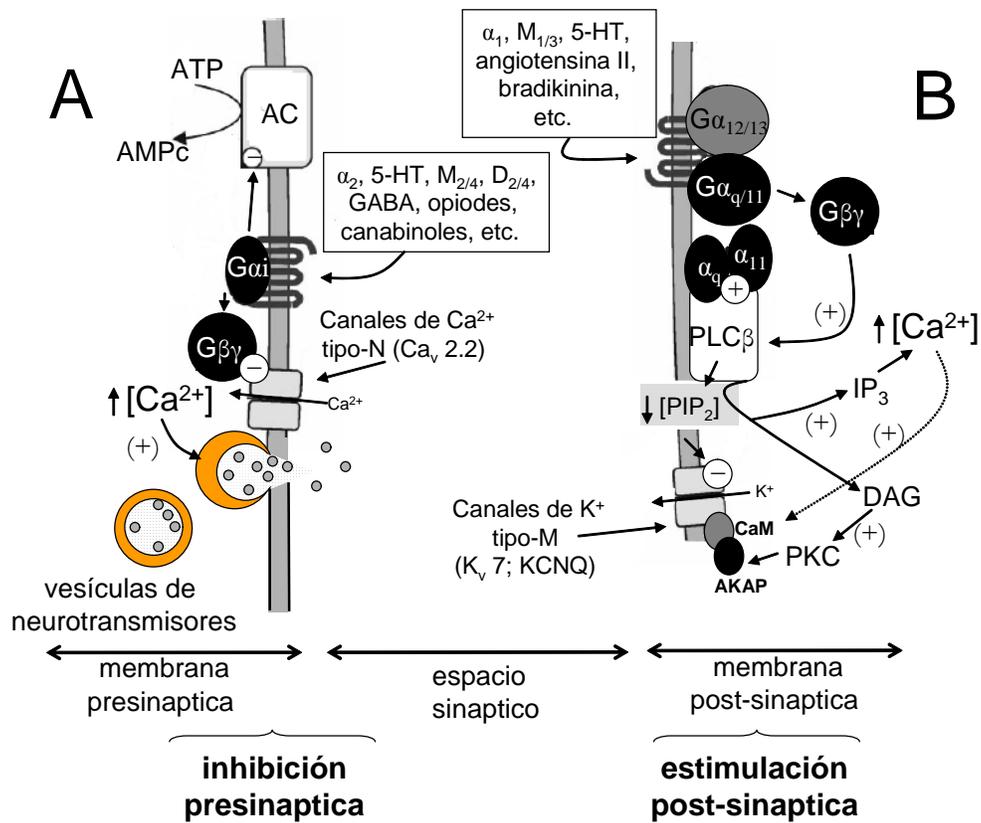


Figura 10. Inhibición y Estimulación Sináptica. (A y B) Elementos pre y post sinápticos de una sinapsis química hipotética. Efectos de la modulación de canales iónicos sobre el potencial de acción. Modulación de potenciales de acción (A' y B'), corrientes de Ca²⁺ (A'') y corrientes de K⁺ tipo M (B'') inducida por neurotransmisores.

Las vías de señalización que acopla distintos transmisores a la inhibición de la corriente tipo M se conocen solo parcialmente. Es iniciada por un gran número de transmisores que activan a receptores acoplados a proteínas G; generalmente involucra proteínas G del tipo insensibles a PTX. En este tipo de modulación, se ha excluido la participación de segundos mensajeros clásicos como el AMPc, GMPc, IP3, PKC, PKA, AA y Ca²⁺. La hipótesis que prevalece, establece que es una reducción en la concentración de los niveles de PIP2, en las vecindad de la membrana que rodea a los canales tipo M, uno de los mecanismos responsables de esta modulación (Suh y Hille, 2002; Zhang et al., 2003; Winks et al., 2005; Delmas y Brown 2005).

Los canales de calcio activados por voltaje también son modulados por vías que dependen de la activación de proteínas G. Esta forma de modulación, ha sido quizás la más ampliamente estudiada en las últimas dos décadas. En la Fig. 10A se ilustra que los canales de calcio de la membrana presináptica son inhibidos por distintos neurotransmisores que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G. Dado que la liberación de neurotransmisores es un proceso que depende en parte del influjo de calcio a través de CCAV, una reducción en la entrada de calcio resulta en una disminución de la liberación de neurotransmisores en la membrana presináptica. En la Fig. 10A se muestra el efecto que la NA ejerce a nivel del potencial de acción (Fig. 10A') así como a nivel de las corrientes de calcio (Fig. 10A''). En neuronas centrales distintos subtipos de canales de calcio son modulados por transmisores, sin embargo en neuronas simpáticas periféricas en cultivo, el subtipo N es el más fuertemente modulado.

La modulación ocurre, a través de dos principales rutas bioquímicamente y biofísicamente distintas (Hille, 1994; Jones y Elmslie, 1997; Elmslie 2003). La más comúnmente documentada, es aquella mediada tras la activación de receptores que reclutan proteínas G sensibles a la toxina de Bordetella pertussis (PTX), que rápidamente (en un lapso de tiempo < 1 seg.) reducen la magnitud de la corriente de CCDV tipo-N, además provocan un enlentecimiento en la cinética de activación y

cambios en la dependencia de voltaje (Bean, 1989; Grassi y Lux, 1989; Ikeda, 1991). Esta inhibición es mediada por el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G, que se liberan de su asociación con la subunidad $G\alpha$, cuando esta última es activada por el receptor, y las cuales presumiblemente interactúan directamente con dominios intracelulares del canal, actuando a través de un mecanismo de interacción directa (Herlitze et al., 1996; Ikeda 1996; García et al., 1998; Elmslie 2003; Jones 2003).

La otra principal forma de inhibición, la cual es varios ordenes de magnitud más lenta, no produce cambios ni en la cinética de activación ni corrimientos en la curva de activación, y por definición, ocurre de una manera independiente del voltaje (IV); este tipo de inhibición resulta generalmente de la activación de proteínas G insensibles a la PTX y la activación subsecuente de cascadas intracelulares de mensajeros difusibles (Hille, 1994; Ikeda y Dunlap, 1999; Elmslie 2003; Jones 2003). En este caso, similar a como ocurre la modulación de la corriente de potasio tipo M, se cree que es algún mensajero intracelular aun no caracterizado (o posiblemente la subunidades de las proteínas G) el responsable bioquímico de la inhibición (Hille, 1994; Ikeda y Dunlap, 1999; Elmslie 2003; Jones 2003).

Como lo sustentan infinidad de trabajos en la literatura, virtualmente todo tipo de canal iónico es sujeto de algún tipo de modulación; su actividad se puede ver aumentada o disminuida tras la activación de algún tipo de receptor de membrana.

El foco de esta tesis está dirigido a inferir los mecanismos operacionales que subyacen a la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje, en particular los canales de calcio tipo-N. El estudio de la modulación de canales de Ca^{2+} activados por voltaje, mediante el empleo de técnicas de fijación de voltaje, bioquímicas y de biología molecular, sin duda nos ha brindado un conocimiento muy detallado y amplio de la existencia de dos patrones generales de modulación inhibitoria que controlan la actividad de estos canales de calcio presentes en la membrana somato-dendrítica de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (modelo celular de esta tesis).

A pesar de que el escenario bioquímico de los patrones de modulación inhibitoria ha sido extensamente estudiado y esta aparentemente resuelto, el escenario biofísico es aun mas oscuro y existen pocos indicios del como la activación de receptores acoplados a proteínas G resulta en una inhibición directa (DV) o indirecta (IV) de la corriente de los CCDV tipo-N. Ya que no resulta obvio el como la unión de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G, o las acciones del mensajero difusible, resultan ya sea en una inhibición directa (DV) o en una inhibición indirecta (IV), respectivamente.

A partir de estudios electrofisiológicos de la corriente macroscópica y de registros de la actividad unitaria, se ha propuesto que los canales de calcio tipo-N inhibidos por proteínas G son menos propensos a abrir con despolarizaciones moderadas de membrana, que se presentan incrementos en la latencia a la primera apertura y no se encontraron cambios sustanciales en la conductancia unitaria (Lee y Elmslie, 2000; ver Fig. 13). Lo anterior sugiere que el efecto(s) de las proteínas G ocurre antes de que los canales se abran.

En los estudios en donde únicamente se analiza la corriente iónica que fluye a través de los canales, solo se pueden obtener inferencias limitadas acerca de las transiciones de las distintas conformaciones que preceden a la apertura de los canales, en particular aquellas relacionas con el movimiento de carga que subyace a la activación de los canales (Bezanilla y Stefani, 1998, Bezanilla, 2000).

El registro de las corrientes capacitivas no lineales (también conocidas como corrientes de compuerta '*gating currents*'), que derivan de la reorientación de los "sensores de voltaje" y que reflejan los cambios conformacionales de los canales desde los estados cerrados al estado abierto, puede proveer información detallada acerca del como las proteínas G afectan la probabilidad de apertura de los canales iónicos dependientes de voltaje (Bezanilla 2000).

La tesis que se somete a consideración, se circunscribe al estudio del movimiento de carga (evento que constituye la manifestación electrofisiológica de los cambios conformacionales que preceden a la apertura de los canales iónicos dependientes de voltaje) y una de las hipótesis que sostenemos es que la modulación de canales iónicos por vías de señalización celular iniciadas por receptores acoplados a proteínas G se manifiesta a nivel de el movimiento de carga.

Usando como modelo experimental a las neuronas simpáticas de la rata, aquí he estudiado los efectos de neurotransmisores y neuropéptidos que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G y de las subunidades $G\beta\gamma$ sobre el movimiento de carga total, las corrientes macroscópicas de calcio tipo-N y las corrientes de sodio. El conjunto de las observaciones a nivel de la corriente macroscópica de calcio y sodio en condiciones de activación de proteínas G y aquellas observadas en el movimiento de carga serán comparadas. Las implicaciones del mecanismo y operación de los efectos moduladores de las proteínas G sobre las corrientes de los CIDV tipo N, de canales de sodio y el movimiento de carga serán discutidas.

Para constituir el marco teórico en el que se circunscriben los planteamientos e hipótesis particulares que en esta tesis se abordan, en el siguiente apartado se expondrá el conocimiento que se tiene en relación a las características morfológicas, electrofisiológicas y bioquímicas de nuestro modelo celular de estudio, así como las propiedades de las patrones de modulación de una de las poblaciones de canales iónicos de este tipo de neuronas, los canales de calcio tipo-N.

ANTECEDENTES

It is implicit in Hodgkin & Huxley's (1952) description of the changes in ionic permeability underlying excitation and conduction in nerve that the mechanism depends fundamentally on the effect of the electric field on the distribution or orientation of membrane molecules with a charge or dipole moment. When, therefore, the membrane is depolarized, the passage of ionic current must be preceded not only by the surge of capacity current, but also by what has come to be known as the 'gating current', corresponding to the movement of these charged controlling particles in the membrane. However, Hodgkin & Huxley found no direct evidence for the existence of the gating current, and concluded that its contribution amounted to no more than a few per cent of the maximum ionic current, because many ions cross the membrane through each open channel.

Keynes y Rojas, 1974.

Décadas antes de que cualquier canal regulado por voltaje fuera clonado se propusieron algunas de las características estructurales y operacionales de tales proteínas. En la discusión sobre el origen de la dependencia de voltaje de las conductancias que subyacen al potencial de acción, Hodgkin y Huxley (1952) propusieron que el gran flujo de iones a través de la vía de conducción era regulada por la posición de unas cuantas partículas cargadas, cuya distribución era modificada por el potencial de membrana.

Hodgkin y Huxley no encontraron evidencia experimental directa de lo que serían las corrientes de compuerta, pero predijeron la naturaleza transitoria de dicha señal. Un intento

posterior por identificar tal señal transitoria fue hecho por Chandler y Meves (Chandler y Meves, 1965), pero no lo consiguieron y concluyeron que la densidad de los canales de sodio era muy baja, imposibilitando su detección. La hipótesis visionaria de Hodgkin y Huxley no fue corroborada si no hasta principios de los años setenta. Primero por Schneider y Chandler (Schneider y Chandler, 1973), quienes trabajando en una preparación de músculo de la rana, encontraron una señal de naturaleza transitoria, y probablemente originada por un sensor de voltaje. A partir de sus mediciones, realizaron estimaciones de la cantidad de carga movida en función de la magnitud de la despolarización, la dependencia de voltaje de dicho movimiento de carga, sugirieron la localización de este movimiento de carga en el sistema tubular T del sarcolema y propusieron a dicho movimiento de carga como un evento asociado al acople excitación-contracción. Simultáneamente, Armstrong y Bezanilla (1973) y Keynes y Rojas (1974), trabajando en el axón gigante de calamar, registraron exitosamente corrientes capacitivas no lineales y demostraron que dichas corrientes mostraban una correlación estrecha con la activación de los canales de Na⁺.

Hoy sabemos que cuando la membrana de una célula excitable es despolarizada experimentalmente, el pasaje de la corriente iónica, no solo es precedida por la corriente capacitiva lineal, la cual es una consecuencia de las propiedades físico-químicas de las membranas biológicas, sino también por corrientes capacitivas no lineales, que son la consecuencia del movimiento y/o reorientación de partículas cargadas, asociadas con los rearreglos moleculares que conducen a la apertura y/o cierre de los canales regulados por voltaje en respuesta a cambios en el campo eléctrico de la membrana plasmática (Bezanilla, 2000; Jiang et al., 2003; Chanda et al., 2005).

En condiciones experimentales favorables (ver apartado de metodología), las corrientes capacitivas no lineales pueden ser registradas en casi cualquier célula que exprese

una alta densidad de canales regulados por voltaje (Almers, 1978; Bean y Rios, 1989). Lo anterior se sustenta por el hecho de que estas se han registrado exitosamente y analizado en un gran número de preparaciones incluyendo el axón gigante de calamar, el nodo de Ranvier, músculo esquelético y cardíaco, en neuronas de molusco y en neuronas centrales de hipocampo y cerebelo de ratón (Schneider y Chandler, 1973; Armstrong y Bezanilla, 1973; Keynes y Rojas, 1974; Nooner et al, 1975; Bean y Rios, 1989; Josephson y Sperelakis, 1992; Adams y Gage, 1976; Kostyuk et al, 1977; Chameau et al, 1995; Melliti et al, 1996). De hecho, en estos estudios llevados a cabo en músculo cardíaco y en neuronas, las corrientes capacitivas no lineales, mediante el uso de estrategias electrofisiológicas y farmacológicas, se ha encontrado que están asociadas con la activación y/o inactivación de canales de Na^+ y Ca^{2+} .

Modulación de la actividad de canales activados por voltaje por mecanismos de señalización mediadas por receptores acoplados a proteínas G.

En los canales denominados regulados por voltaje de Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} de la membrana plasmática, la probabilidad de apertura es controlada por el potencial de membrana (Armstrong y Hille, 1998). Esto es llevado a cabo por medio de un “sensor de voltaje” que detecta los cambios en el voltaje y transmite esta energía al poro del canal para controlar su actividad (Bezanilla, 2000; Jiang et al., 2003; Chanda et al., 2005). Este mecanismo de activación constituye el regulador primario de la actividad de los canales dependientes de potencial de membrana, ocurre en una escala de tiempo del orden de milisegundos y les permite responder rápidamente a cambios en el voltaje transmembranal (Catterall, 1997, 2000a; 2000b; Bezanilla, 2000). Sin embargo la ‘conducta’ de los canales activados por voltaje puede ser regulada por vías de señalización intracelular que se encienden tras la activación de receptores acoplados a proteínas G, estos fenómenos ocurren en una escala temporal del orden de segundos a minutos (Miller, 1990; Hille, 1994; Breitweiser, 1996; Cukierman, 1996; Catterall, 1997; Jones y Elmslie, 1997).

El uso de criterios electrofisiológicos, farmacológicos y bioquímicos ha permitido establecer una caracterización de la modulación de canales iónicos inducida por neurotransmisores (Hille, 1994; Clapham, 1994). El efecto de activar tales vías de señalización puede resultar en la estimulación o en la inhibición de la actividad de los canales iónicos. La activación de estos receptores puede afectar la dependencia de voltaje y modificar las propiedades cinéticas de activación y de inactivación de canales regulados por voltaje. Cuando lo anterior ocurre se dice que el efecto regulador de tal vía sobre los canales, sea este estimulador o inhibidor, es voltaje- dependiente, y cuando no afecta ninguno de estos parámetros es voltaje-independiente (Hille, 1992 y 1994).

El conocimiento actual del fenómeno revela que en algunos casos los canales iónicos dependientes de potencial eléctrico pueden ser regulados vía un segundo mensajero difusible (AMPc, ATP, GTPc, Ca^{2+} , y lípidos como metabolitos del ácido araquidónico, DAG, etc.; Miller, 1990; Clapham, 1994; Wickman & Clapham, 1995; Bretweiser, 1996; Cukierman, 1996; Jones y Elmslie, 1997; Marrion, 1997; Suh y Hille, 2002; Zhang et al., 2003), y en otros casos, la regulación del canal iónico es independiente de vías que emplean mensajeros difusibles y la ausencia de tales mensajeros, se ha interpretado como una interacción directa entre las proteínas G y el canal (Clapham, 1994; Hille, 1994; Wickman y Clapham, 1995; Clapham y Neer, 1997). De hecho uno de los ejemplos de modulación mejor estudiados, como es el caso de la modulación inhibitoria voltaje-dependiente de canales de calcio neuronales tipo N y P/Q, las evidencias experimentales sostienen que el heterodímero $G\beta\gamma$ es el efector de dicha modulación (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996; García et al., 1998).

De lo anterior se desprende que existen vías señalización que regulan la actividad de los canales ya sea por mecanismos que involucran un mensajero difusible, que por convención se denominan vías no delimitadas a membrana y/o indirectas y en otros casos la modulación es mediada de manera directa por las subunidades activas de las proteínas G (p.e., el heterodímero $G\beta\gamma$) y se denominan vías de modulación delimitadas a membrana y/o directas (Hille, 1992 y 1994; Clapham, 1994; Wickman y Clapham, 1995).

Propiedades de las neuronas del ganglio cervical superior de la rata.

Son varias las características por las que las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (GCS), representan una excelente modelo celular para el estudio de la modulación de canales iónicos regulados por potencial eléctrico.

1. Una de las características más importantes de estas neuronas es la de preservar, en condiciones de cultivo, su sensibilidad a múltiples agonistas y poseer la maquinaria bioquímica para mediar acciones reguladoras sobre canales iónicos activados por voltaje (Schofield e Ikeda, 1988; Hille, 1994).
2. De los distintos componentes de la corriente iónica que se activan con despolarizaciones de la membrana (ver cuadro 1), el único que se ha demostrado es susceptible de modulaciones tanto voltaje-dependientes como voltaje-independientes por neurotransmisores es el componente de corriente entrante de Ca^{2+} tipo N. Además este componente representa cerca del 90% del total de la corriente de calcio (Plummer et al, 1991; Song et al, 1991; García-Ferreiro, Hernández-Ochoa y García, 2001).
3. Sus propiedades morfológicas en cultivo dentro de las primeras 24 hrs. posteriores al sembrado, como el ser células de soma esférico y con pocas ramificaciones (ver Fig. 15), las vuelve electrotónicamente compactas y apropiadas para estudiarlas en condiciones de fijación de voltaje con la variante de patch-clamp de célula completa, permitiendo una mejor caracterización electrofisiológica de sus corrientes, que la que se obtendría con la técnica de dos microelectrodos en ganglios intactos (Freschi, 1983; Schofield y Ikeda, 1988 y 1989).
4. Son células relativamente homogéneas y fáciles de aislar y mantener en cultivo de forma consistente (Hille, 1994).

Las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior no constituyen a priori un sistema más interesante que las otras neuronas, u otros sistemas celulares, pero las características antes mencionadas ofrecen grandes ventajas. Por ejemplo, sin pretender hacer a un lado a

los sistemas de expresión y considerando las ventajas que estos ofrecen, algunos intentos de reconstituir estos canales y sus vías de modulación no han sido muy exitosos y solo han logrado reproducir algunas, pero no todas las características de la corriente y su modulación (Jones et al, 1997).

De lo anterior solo queremos mencionar, que las estrategias de estudio en neuronas o en sistemas de expresión no son excluyentes, sino más bien complementarias, y su utilización depende del objetivo particular de cada estudio.

Corrientes iónicas activadas por despolarización en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de rata.

En estas células, escalones de voltaje despolarizantes entre -80 mV y $+40$ mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, evocan las siguientes corrientes macroscópicas dependientes de voltaje y tiempo:

1. Una corriente entrante de Na^+ de rápido desarrollo, inactivante y sensible a TTX (Schofield y Ikeda, 1988; PN1 o Na_v 1.7; Toledo-Aral et al., 1997; Catterall et al., 2005a).
2. Una corriente saliente de K^+ , la cual se divide en cuatro subcomponentes:
 - Un componente lento y no inactivante, con características similares a las del rectificador tardío del axón.
 - Uno rápido e inactivante, similar a la corriente de potasio tipo A.

- Un componente lento y activado por Ca^{2+} . Estos componentes de la corriente se activan con despolarizaciones de la membrana cercanas a -40 mV, y son susceptibles al boqueo extracelular con tetraetilamonio (TEA) e intracelularmente por iones Cs^+ , (Schofield y Ikeda, 1989). Nótese que las identidades moleculares de estos canales en las neuronas del GCS, basado en la información existente, no han sido descritas en esta preparación y no tomaron en consideración en el presente trabajo, sin embargo revisar (Gutman et al., 2005 y Wei et al., 2005).
 - Existe un componente de la corriente saliente que se activa lentamente dentro de rangos de voltaje cercanos al umbral de disparo del potencial de acción (-60 y -40 mV), y se denomina corriente M (IK_M ; formado por subunidades K_v 7.2, 7.3 y 7.5; Gutman et al., 2005). Su activación es sostenida y es blanco de un tipo de inhibición voltaje-independiente mediada por distintos receptores a neurotransmisores (incluyendo acetilcolina y angiotensina II) y es bloqueada por Ba^{2+} (Hille, 1994; Marrion, 1997; Delmas y Brown, 2005).
3. Una corriente entrante de Ca^{2+} e inactivante (Schofield y Ikeda, 1988). Se ha demostrado que aproximadamente el 90% de la corriente de Ca^{2+} en las neuronas simpáticas es sensible al bloqueo por la ω -conotoxina GVIA y es acarreada por canales de calcio tipo N (Ca_v 2.2; Catterall et al., 2005b), 5 % por canales de calcio sensibles a dihidropiridinas tipo L y 5% por canales de calcio tipo R (Plummer et al, 1991; Boland et al, 1994; García-Ferreiro, Hernández-Ochoa y García, 2001).

Características de la inhibición de los canales de Ca²⁺ tipo N mediada por receptores acoplados a proteínas G en las neuronas simpáticas de la rata.

Uno de los mecanismos de modulación de canales iónicos por proteínas G mejor conocidos y mas extensamente estudiado por distintos grupos de trabajo incluyendo el nuestro (Herlitze et al., 1996; García et al., 1998; García-Ferreiro, Hernández-Ochoa y García, 2000 y 2001), es el de la inhibición voltaje-dependiente de canales de calcio neuronales tipo N en cultivos primarios de neuronas simpáticas (Bean, 1989; Elmslie y Jones, 1990; Plummer et al, 1991; Song et al, 1991; Beech et al, 1992).

El efecto predominante de distintos neurotransmisores y neuropéptidos en neuronas simpáticas es inhibitorio (Hille 1992 y 1994; Jones y Elmslie, 1997; Ikeda y Dunlap, 1999; Elmslie 2003). En nuestro laboratorio hemos realizado una extensa caracterización electrofisiológica de la vía inhibitoria inducida por norepinefrina, angiotensina y GTP γ S, un análogo no hidrolizable del GTP, activador no selectivo de las proteínas G

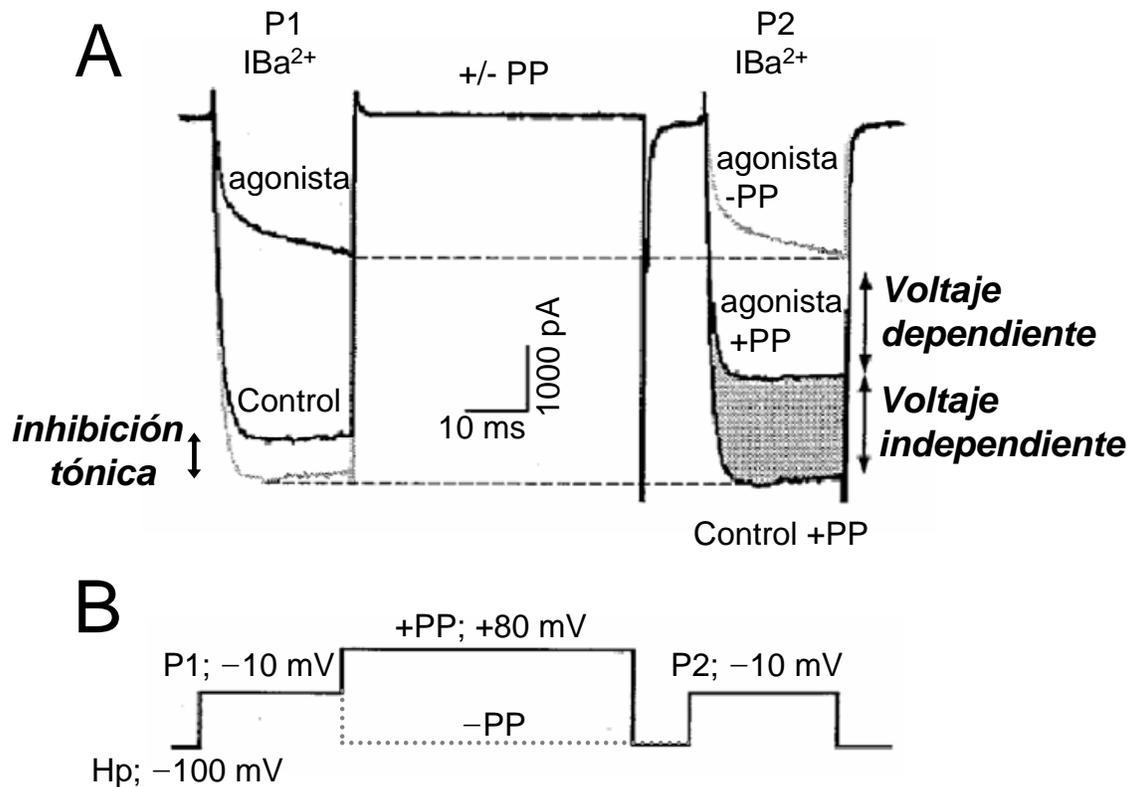


Figura 11. Características electrofisiológicas de la inhibición de los canales de calcio tipo-N mediada por receptores acoplados a proteínas G.

(ver: García et al., 1998; García-Ferreiro, Hernández-Ochoa y García, 2000 y 2001). En estas células, en condiciones de fijación de voltaje, el componente macroscópico HVA tipo N, comienza a activarse con despolarizaciones de la membrana cerca de los -40 mV, llega a un máximo a -10 mV e invierte cerca de $+35$ mV, cuando se usa Ba^{2+} como acarreador de carga.

La aplicación de norepinefrina ($10 \mu\text{M}$) al medio extracelular produce alteraciones en la amplitud de la corriente y modificaciones voltaje y tiempo dependientes como (ver Fig. 11):

- 1) Disminución parcial en la magnitud de la corriente.

- 2) Enlentecimiento en la cinética de activación de la corriente, de casi un orden de magnitud, con respecto al control.
- 3) La inhibición es voltaje-dependiente por las siguientes razones:
 - 3.1) La inhibición es pronunciada dentro del rango del cual se activa la corriente (entre -30 y -10 mV), pero disminuye a medida que se vuelve más positivo el valor del pulso de prueba.
 - 3.2) La magnitud de la inhibición, así como las características cinéticas, son revertidas transitoriamente y casi por completo cuando un prepulso fuertemente despolarizante precede al pulso de prueba.
 - 3.2) Existe un corrimiento hacia potenciales más despolarizantes en la curva de activación de la corriente tras la administración de norepinefrina.

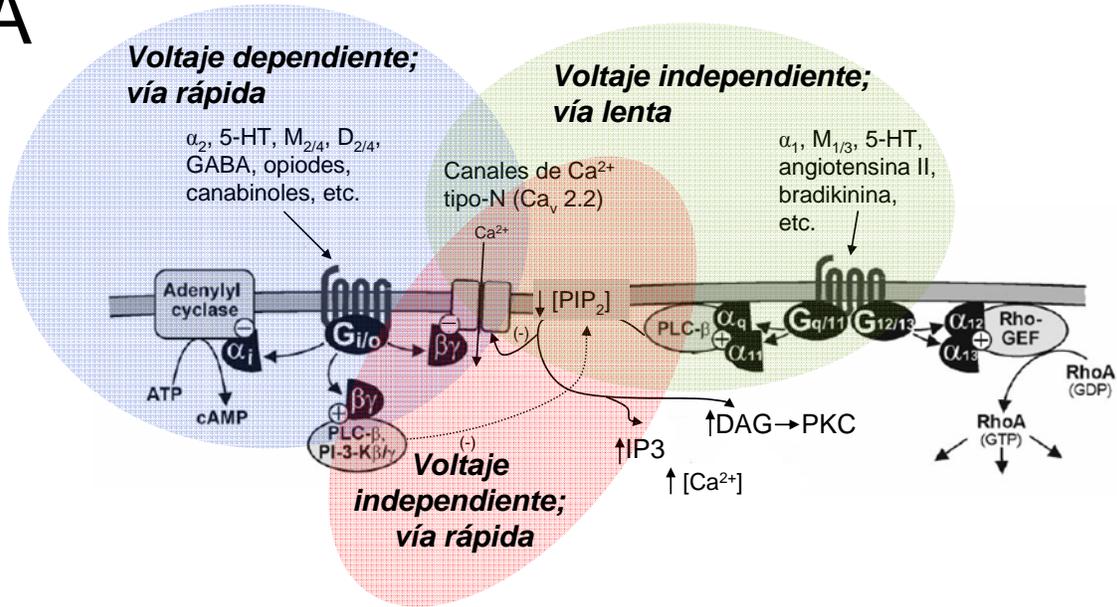
La vía de inhibición mediada por norepinefrina, ha sido descrita primordialmente como voltaje-dependiente, y el hecho de no involucrar a mensajeros difusibles típicos (AMPc, IP3, DAG, PKA, etc.), así como su rápido desarrollo, < 1 s, pronto llevo a pensar en el complejo $G\beta\gamma$ como el efector de dicha modulación ver Fig. 12 A (Hille, 1994, Clapham, 1994).

Actualmente es ampliamente aceptado que la norepinefrina actuando sobre receptores adrenérgicos α_2 , conduce a una inhibición primordialmente voltaje-dependiente e involucra al complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G, como el efector final de dicha modulación, el cual actúa de manera rápida, directa y delimitada a la membrana, sobre uno o varios sitios de la subunidad α_1B , ver Fig. 12A y B (Herlitz et al, 1996; Ikeda, 1996; García et al, 1998; Qin et al, 1997; De Waard et al, 1997; ver Ikeda y Dunlap 1999; Jones 2003 y Elmslie 2003) que

es la subunidad de canal que forma la vía de conducción y confiere parte de la responsividad al voltaje (Dubel et al, 1992; Bezanilla, 2000).

Sin embargo, especialmente en las neuronas simpáticas, existen evidencias considerables de otros mecanismos de inhibición de los canales de calcio (Hille 1994; Jones y Elmslie, 1997; ver Fig. 12A y B). Una de estas vías resulta de la hidrólisis de PIP_2 (Wu et al., 2002; Gamper et al., 2004) y podría involucrar mas de un segundo mensajero y/o efectores, con ningún o poco efecto sobre canales de calcio tipo L. Esta vía se caracteriza por su lento desarrollo y por ser voltaje-independiente (Mathie et al, 1992; Hille, 1994; Wu et al., 2002; Gamper et al., 2004). El mecanismo de inhibición de esta forma de modulación es muy similar a la inhibición voltaje-independiente de la corriente de potasio tipo M (Hille, 1994; Marrion, 1997; Suh y Hille 2002; Zhang et al., 2003; Winks et al., 2005; Delmas y Brown 2005). Otra forma de inhibición se ha descrito como una vía rápida, delimitada a la membrana y voltaje-independiente (Shapiro y Hille, 1993; Hille 1994; Elmslie 2003; ver Fig. 12A y B). De modo que en estas células distintos tipos de neurotransmisores utilizan vías voltaje-dependientes y vías voltaje-independientes, delimitadas a membrana o que emplean mensajeros difusibles, con cursos temporales rápidos o lentos, la cuales quizás están involucradas en el ajuste fino de la neurotransmisión intra y postganglionica y así ajustar minuto a minuto las necesidades de adaptación del sistema nervioso simpático.

A



B

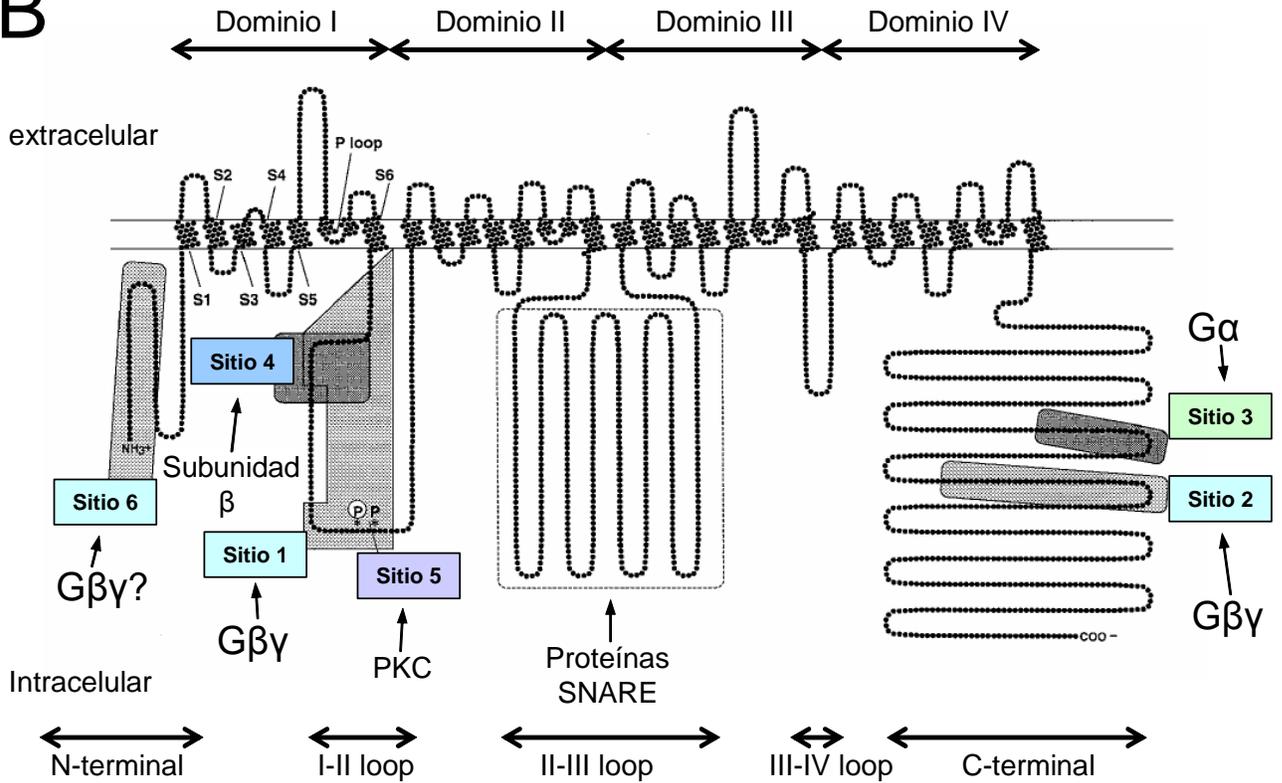


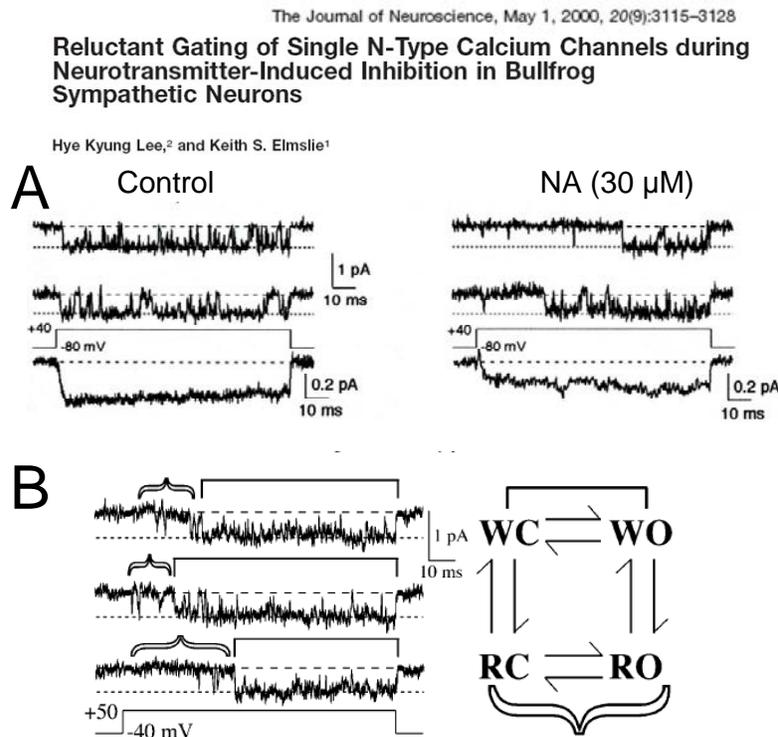
Figura 12. Vías de modulación inhibitoria que convergen en canales de calcio tipo N mediadas por neurotransmisores que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de rata. (A) La vía de inhibición voltaje dependiente ha sido la más estudiada. Su desarrollo es rápido < 1 seg. Es delimitada a la membrana. Las proteínas G involucradas, pueden ser sensibles a PTX o no-PTX. El complejo $G\beta\gamma$ es el efector (Herlitz et al., 1996; Ikeda 1996; García et al, 1998). La vía voltaje independiente y de desarrollo lento, requiere de algunos minutos, en algunos casos también depende o se correlaciona temporalmente con cambios la concentración intracelular de Ca^{2+} . No exhibe cambios cinéticos, ni corrimientos en la curva de activación (Mathie et al 1992; Hille, 1994; Marrion, 1997; Elmslie, 2003). Inhibición voltaje independiente de desarrollo rápido. Las proteínas G involucradas, son insensibles a PTX. Es una vía delimitada a membrana, desarrollo rápido y sin cambios cinéticos, ni corrimientos en la curva de activación (Shapiro y Hille, 1993, Hille, 1994; Elmslie 2003), en la cual probablemente el heterodímero $G\beta\gamma$ es el efector (Ikeda y Dunlap, 1999; Elmslie 2003). (B) Mapa de la topología de la subunidad α_{1B} del canal de calcio tipo-N ($Ca_v 2.2$) que muestra los sitios donde interaccionan las subunidades de las proteínas G y otras proteínas moduladoras de la actividad del canal. Las regiones sombreadas dentro de la secuencia primaria muestran los sitios de interacción con: 1) las subunidades de las proteínas G (sitios 1, 2 y 3; se piensa que el sitio 6 es necesario durante la inhibición mediada por las subunidades $G\beta\gamma$; sin embargo no hay evidencias bioquímicas de tal interacción); 2) con la subunidad β del canal, una proteína citoplásmica que estimula la actividad del canal, cuando se une a la subunidad α (sitio 4), y 3) con la proteína cinasa C (PKC; sitio 5).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la mayoría de los estudios sobre la inhibición de la corriente de los canales de calcio tipo N, en esta preparación y en sistemas de expresión, se han analizado las características de la corriente macroscópica y la actividad unitaria (Bean, 1989; Elmslie et al., 1990; Beech et al, 1992; Delcour y Tsien, 1993; Carabelli et al, 1996; Patil et al, 1996; Lee y Elmslie, 2000). Estos estudios han conducido a la observación de algunas de las predicciones del modelo Willing-Reluctant (Bean, 1989, Elmslie et al 1990; Lee y Elmslie, 2000). Bean (1989) distinguió dos tipos de poblaciones de canales en equilibrio en condiciones básicas, y las denominó como willing y reluctant a la apertura (ver Fig. 13A y B). En el modo willing, predominante en ausencia de neurotransmisores, la probabilidad de apertura es alta y la apertura de los canales ocurre con despolarizaciones moderadas (dentro del rango normal de despolarizaciones capaces de activar corrientes HVA); mientras que en el modo reluctant, predominante en presencia de neurotransmisores o en condiciones de activación de proteínas G, la probabilidad de apertura de los canales disminuye y los canales exhiben aperturas breves (aperturas reluctant), la latencia a la primera apertura aumenta, y la apertura de los canales ocurre cuando de una manera similar al control solo cuando se emplean despolarizaciones de magnitudes considerablemente mayores. A partir de varios estudios (Patil et al 1996; Carabelli et al, 1996; Lee y Elmslie, 2000; ver aperturas reluctantes Fig. 13 A) se ha propuesto que el efecto de las proteínas G sobre los canales de calcio tipo N es el de disminuir la probabilidad de apertura probablemente mediante la estabilización de la conformación del los canales en los estados cerrados profundos e inducir alteraciones en las

características cinéticas del estado abierto, sin modificar la conductancia del unitaria (ver Fig. 13B).

Sin embargo, estos estudios permiten analizar únicamente la corriente que fluye a través de los canales. Dichas observaciones limitan las inferencias acerca de las transiciones



de los canales,

Figura 13. El efecto de la inhibición voltaje dependiente a nivel registros de actividad unitaria. (A) La actividad de un canal de calcio tipo N se muestra durante una despolarización a +40 mV durante un periodo de 100 ms en dos diferentes parches de membrana. En condiciones control (trazo de la izquierda), predomina el modo de actividad *'willing'* (un modo de alta probabilidad de apertura) el cual se caracteriza por exhibir un tiempo de apertura prolongado, así como una latencia breve a la primera apertura. La adición de NA a la solución de pipeta induce una inhibición voltaje dependiente en la actividad del canal tipo N (trazos de la derecha). Esta inhibición se caracteriza por inducir un incremento en la latencia a la primera apertura del modo de actividad *'willing'* y por aperturas breves, características del modo de actividad *'reluctant'*, las cuales ocurren durante el periodo de latencia a aperturas *'willing'*. Note que en la presencia de NA, una vez que el canal transita

al modo de actividad willing, las propiedades de la apertura son indistinguibles de aquellas que ocurren en condiciones control. (B) Interpretación del modelo 'willing-reluctant'. El modelo se muestra en la parte derecha del panel B. WC y WO, representan los estados cerrado y abierto del modo *willing*, respectivamente; RC y RO representan los estados cerrado y abierto del modo *reluctant*. Los corchetes curvados sobre los trazos de la actividad unitaria muestran las regiones del registro durante las cuales la actividad del canal es de tipo reluctant, mientras que los corchetes cuadrados, muestran las regiones de los registros de actividad unitaria durante las cuales la actividad del canal es del tipo willing (tomado de Lee y Elmslie, 2000 y Elmslie 2003).

Journal of Physiology (1997), 498.3, pp.601-610

G-protein modulation of N-type calcium channel gating current in human embryonic kidney cells (HEK 293)

Lisa P. Jones, Parag G. Patil, Terry P. Snutch* and David T. Yue†

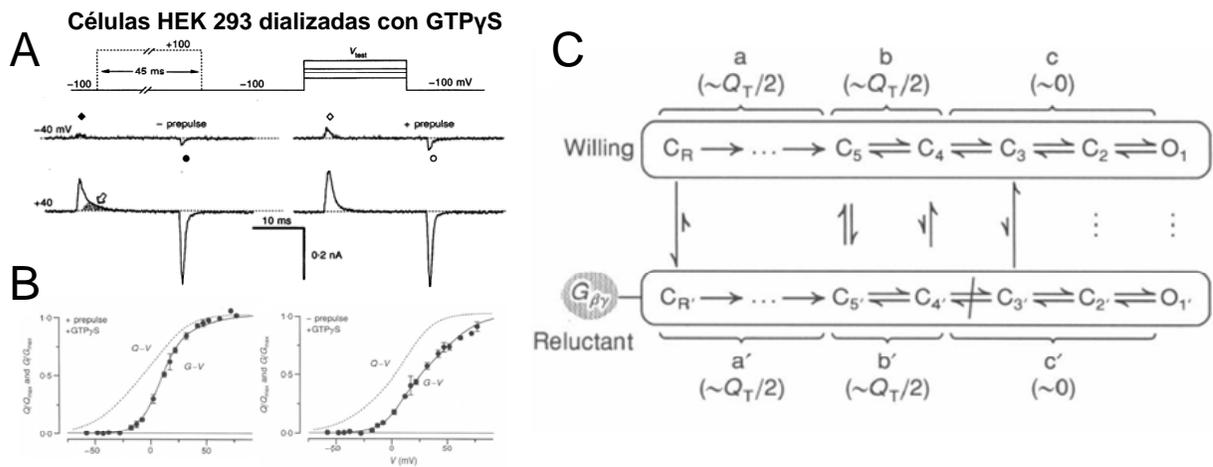


Figura 14. Implicaciones mecanisticas de los efectos de las proteínas G en la vía de activación de los canales de calcio tipo-N. (A) Corrientes de compuerta durante la diálisis intracelular con GTPγS. Los registros muestran la respuesta a despolarizaciones sin (columna de la izquierda) y con (columna derecha) un prepulso despolarizante (-/+ prepulse). Nótese, que el trazo a +40 mV en la ausencia del prepulso es de menor amplitud comparado con el trazo de la derecha obtenido con un prepulso (B) Comparación de Relaciones la carga Q_{off} en función del voltaje (Q_{off}-V) y de las curvas conductancia en función del voltaje (G-V) obtenidas en células dializadas con GTPγS. (C) Mismas condiciones y formato que en B pero sin prepulso. (C) Implicaciones mecanisticas de los efectos de las proteínas G en la vía de activación de los canales de calcio. Las proteínas G inducen dos efectos primarios durante la inhibición voltaje dependiente: 1) estabilizar la actividad de los canales en los estados cerrados intermedios y 2) interrumpir la vía de activación del canal en

transiciones cercanas al estado abierto, aquellas en donde poca carga se mueva. Sin embargo este efecto es suficiente para afectar profundamente el acople excitación-conducción. En condiciones de modulación tónica, como la inducida por la diálisis con GTP γ S, solo un pulso de voltaje muy despolarizante es capaz de inducir una disociación transitoria del complejo canal-G $\beta\gamma$ y permite que los canales transiten al estado *willing* abierto.

desde la conformación cerrada(s) al estado abierto, en especial aquellas relacionadas con el movimiento de carga de la maquinaria responsable de la sensibilidad a los cambios de potencial de membrana, evento que precede a la apertura del canal (Bezanilla, 2000).

En un estudio (Jones et al, 1997), donde se registraron corrientes de compuerta y el movimiento de carga asociado a canales tipo-N en un sistema de expresión no neuronal (línea celular HEK283, derivada del epitelio renal) se reportó que en la inhibición voltaje-dependiente, las proteínas G actúan sobre el sensor del voltaje y sobre la transducción de la activación del sensor del voltaje. Llama nuestra atención respecto este estudio, que no todas las características de inhibición mediada por proteínas G se lograron reproducir. Por ejemplo, la utilización de un activador no selectivo de las proteínas G (GTP γ S), que en las neuronas simpáticas activa tanto vías voltaje-dependientes así como vías voltaje-independientes (Elmlslie et al., 1990; García-Ferreiro, Hernández-Ochoa y García, 2000) en las células HEK283 solo reproduce algunas de las características de la inhibición voltaje-dependiente.

Lo anterior puede ser debido a la clona del canal tipo-N que se empleo en ese estudio. Se ha reportado que existen variantes del canal tipo-N originadas por splicing-alternativo (Snutch et al, 1991; Stea et al, 1999; Lin et al, 1999). Algo que es importante mencionar es que este mecanismo de splicing alternativo no solo genera distintos subtipos del mismo canal, sino que parece afectar y determinar la expresión funcional, así como las propiedades biofísicas intrínsecas (p.e., activación e inactivación) e incluso modifica y/o

determina la modulación por proteínas G del canal de manera dramática (Thaler et al., 1999; Castiglioni et al., 2006; Raingo et al., 2007). Otra razones se deben quizás a que el procesamiento pre y post-transcripcional y pre y post-traducciona es diferente en este sistema de expresión de células renales, pues se ha demostrado que estos procesos pueden variar entre las células de la misma especie animal y aun dentro del mismo tejido (ver Genes VI). Además este tipo de canal se expresa primariamente en el sistema nervioso (Dubel et al, 1992).

A pesar de que escenario bioquímico y biofísico de la vía de inhibición voltaje-dependiente de los canales de calcio tipo N esta aparentemente resuelto, poco se conoce del mecanismo(s) mediante el cual los neurotransmisores actuando a través de receptores acoplados a proteínas G, conducen a los cambios observados en la corriente de calcio tipo N, y aun restan por estudiar dentro de otros muchos fenómenos inherentes, aquellos relacionados con la inhibición voltaje-independiente y la propiedad de dependencia de voltaje intrínseca de los canales de calcio tipo N.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Es posible registrar el movimiento de carga intramembranal (asociado a los rearreglos moleculares que conducen a la activación de canales iónicos dependientes de voltaje) en las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior en condiciones de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa.
2. A partir de métodos y criterios electrofisiológicos, farmacológicos y bioquímicos es posible estudiar y distinguir los distintos componentes del movimiento de carga asociado a la activación de distintas poblaciones de canales iónicos.
3. Lo anterior es posible tomando en consideración las características de dependencia de voltaje y cinéticas de activación de cada población de canales iónicos que están presentes en la membrana de las neuronas del GCS, las características de la modulación inducida por distintas manipulaciones experimentales que conducen a la activación de proteínas G.
4. Es muy probable que los fenómenos de modulación inhibitoria de canales de calcio activados por voltaje, conduzcan a alteraciones en el comportamiento del movimiento de carga, y que a su vez podrían explicar las alteraciones en la

probabilidad de apertura que se observan en los registros macroscópicos de la corriente iónica.

5. La modulación tanto voltaje-dependiente y voltaje-independiente que hemos caracterizado y descrito en registros de la corriente de calcio macroscópica, a través de canales tipo N de neuronas simpáticas, tiene un correlato dentro del movimiento de carga general asociado a esta población de canales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la activación preferencial de vías inhibitorias voltaje-dependientes y/o voltaje-independientes mediadas por proteínas G tiene algún efecto sobre el movimiento de carga intramembranal asociado a mecanismos de activación de canales iónicos activados por voltaje en neuronas simpáticas de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar los componentes capacitivos no lineales, asociados al movimiento de carga, de la corriente total registrada.
2. Tratar de disecar los componentes del movimiento de carga total en asociación con las distintas corrientes evocadas por el protocolo de registro.
3. Estudiar el movimiento de carga intramembranal y determinar si vías moduladoras acopladas a proteínas G tienen acciones sobre este.
4. Determinar los componentes de la corriente iónica total de nuestro modelo que son afectadas por nuestro paradigma experimental.

METODOS

“Even when the neurons in culture do not completely resemble their counterparts in situ, because important cell components and interactions have been disrupted, cell culture offers an opportunity to dissect out these interactions and to elucidate the mechanisms that underlie. The success with which cell culture can be used to address scientific problems depends directly on the rigor with which it can be demonstrated that the cell culture model selected accurately mimics the key features of the neurobiological phenomenon under study”

Banker G and Goslin K, 1988.

El desarrollo de las técnicas básicas de cultivo celular comenzó a principios del siglo XX, en el laboratorio de Ross G. Harrison. Utilizando fragmentos del tubo neural de pollos y ranas colocados en portaobjetos y usando como medio de crecimiento gotas de linfa y plasma, Harrison pudo observar que el crecimiento de las fibras nerviosas se originaba a partir del soma neuronal y no de la fusión de células que migraban fuera del tubo neural (Harrison, 1915 y 1917). Harrison también pudo visualizar el movimiento protoplasmático asociado a la elongación de las fibras nerviosas, las zonas de crecimiento axónico que Cajal había denominado como *conos de crecimiento* (Ramon y Cajal, 1890). Las observaciones de Harrison, sin duda, condujeron al establecimiento de lo que hoy llamamos Neurociencia. Pero en particular, sus experimentos abrieron el camino para el cultivo de tejidos y células en las manos de Montrose Burrows, Alexis Carrel and Warren and Margaret Lewis (Witkowski, 1980).

A mediados del siglo pasado, los avances que para entonces se habían dado en las ciencias biológicas (p. e., la composición de los fluidos celulares, el descubrimiento de antibióticos, etc.)

permitieron un conocimiento y desarrollo mas preciso de la composición de los medios de cultivo. Este hecho condujo a la obtención de cultivos de casi cualquier tipo celular provenientes de una gran diversidad de tejidos.

Cultivo de neuronas periféricas obtenidas del ganglio simpático cervical superior

En comparación con neuronas centrales, las neuronas simpáticas ganglionares no son ni más ni menos interesantes. Los ganglios simpáticos constituyen una colección de tipos celulares relativamente uniformes y fácilmente identificables. Los ganglios de la cadena simpática cervical superior (GCS), son ganglios paravertebrales que se desarrollan a partir de la migración y fusión de células del primordio. Están constituidos por tres tipos celulares: 1) neuronas ganglionares principales, las cuales son multipolares, con dimensiones de 20-60 μm de diámetro, un promedio de 13 dendritas y un solo axón; 2) neuronas pequeñas (15-30 μm), fácilmente identificables por su típica agrupación en racimos y por la presencia de abundantes gránulos vesiculares, los cuales contienen catecolaminas, GABA, neuropéptidos, y otras sustancias neuroactivas como la histamina y 3) Células de Schwann (Ramón y Cajal, 1906 y 1995; Eranko 1972; Klimaschewski et al., 1996). Las neuronas principales en estos ganglios simpáticos coordinan y transfieren múltiples entradas provenientes del sistema nervioso autónomo central y otros ganglios cercanos (p. e. los ganglios prevertebrales) hacia efectores específicos localizados en la cabeza y el cuello (p. e. músculo pilo-erector, glándulas salivales, vasos sanguíneos, el iris y la glándula pineal).

Algunas simplificaciones experimentales pueden lograrse mediante el empleo de técnicas de cultivo de tejidos. Este tipo de neuronas han sido estudiadas extensivamente, tanto en términos morfológicos, bioquímicos y electrofisiológicos, dada su accesibilidad experimental y la diversidad de sus interacciones sinápticas; en particular para examinar los procesos bioquímicos que gobiernan el funcionamiento de canales de calcio y potasio dependientes de voltaje.

In situ, estas neuronas normalmente exhiben una morfología multipolar, sin embargo en condiciones de cultivo, temporalmente adoptan una morfología esférica. En esta etapa las corrientes de membrana pueden ser estudiadas sin las complicaciones de las dendritas.

Para los experimentos de esta tesis, nosotros empleamos cultivos primarios de neuronas periféricas, obtenidos a partir de la disociación del tejido del ganglio simpático cervical superior de la rata. Las neuronas fueron estudiadas dentro de las primeras 24 horas posteriores al sembrado.

-Preparación del sustrato:

L-Polylysine: Tratar los platos de cultivo con L-Polylysine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua estéril por un mínimo de dos horas. Lavar con agua estéril inmediatamente antes de sembrar las neuronas.

-Material

Material quirúrgico básico para macro y microdissección.

Microscopio de disección.

Caja de petri de 10 cm con fondo de Sylgard seco.

4 cajas petri de vidrio de 35 mm de diámetro.

Solución de Hanks.

Nota: Es indispensable, trabajar durante todo el proceso de cultivo de neuronas en las mejores condiciones posibles de esterilidad.

Paso 1. Identificación y disección de los ganglios de la cadena cervical superior (GCS).

Los ganglios de la cadena cervical superior (GCS) se localizan en la región cervical, cerca a la bifurcación de la arteria carótida.

- 1) Bajo anestesia, sacrificar una rata macho Wistar de cinco semanas de edad, posteriormente decapitar y colocar la pieza en un contenedor con solución antiséptica.

- 2) Lavar con agua estéril, colocar y fijar la cabeza con la porción ventral hacia la parte superior en una caja de petri con una base de Sylgard seco.
- 3) Hacer una incisión en la parte medial y disecar la piel, aponeurosis y músculos del cuello.
- 4) Identificar la traquea y el esófago, retraer ambos hacia la porción rostral con pinzas de disección y fijar con agujas.
- 5) Bajo microscopio de disección identificar en la porción caudal de la preparación, el paquete vasculo-nervioso que contiene al nervio vago, los nervios preganglionares simpáticos y la arteria carótida. Siguiendo la trayectoria de la carótida y el nervio vago uno puede hallar a los ganglios cervicales que se localizan dorsalmente a la bifurcación de la carótida. Su forma es ovoide ligeramente alargada, como la de un grano de arroz y su color nacarado semi-traslucido, con un tronco preganglionar muy delgado.
- 6) Una manera sencilla de obtener los ganglios sin manipularlos demasiado y así evitar el daño del tejido, consiste disecar a los músculos y tejido conectivo que rodea al paquete vasculo-nervioso. Aplicar una ligera tracción en la porción caudal de la arteria carótida, con este procedimiento se logra exhibir al ganglio, y una vez identificado se corta el extremo rostral del paquete vasculo-nervioso y el ganglio junto con una porción del paquete vasculo-nervioso se transfiere a una caja petri con solución de Hanks.
- 7) Se separan las porciones de la arteria carótida y el nervio vago de cada ganglio. Los ganglios se encuentran rodeados por una capa de tejido conectivo, esta capa es removida mediante sujeción y tracción de la misma empleando pinzas de disección finas del numero 5.
- 8) Una vez removida la vaina de tejido conectivo que rodea a los ganglios, se transfieren a una segunda caja petri con solución de Hanks estéril y se procede a cortar troncos nerviosos de los ganglios. Para este proceso se emplean tijeras de disección de McVannas y pinzas de disección finas. Una vez que se encuentra libre de troncos nerviosos, los ganglios son

cortados varias veces (10-15 cortes) de manera simétrica, parcial y perpendicularmente al eje longitudinal de los ganglios.

Paso 2. Cultivo de neuronas del GCS.

Materiales:

-Seis cajas de cultivo de 35 mm de diámetro tratadas con L-Polylysine.

-Solución de Hanks

-Enzimas: Papaina, Colagenasa tipo I y Dispasa

-Medios de Cultivo: L-15 y DMEM suplementados con 5 % (v/v) de suero fetal bovino y 1% de una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina)

- 1) Después de la disección y remoción del tejido conectivo y de que los ganglios fueron seccionados aproximadamente en 12 fragmentos similares, son sometidos a un tratamiento enzimático secuencial y agitación mecánica.
- 2) Los fragmentos de los ganglios se incuban por 20 min. a 37° C en solución de Hanks adicionada con Papaina 20 UI/ml y L-cisteina 4mg/ml.
- 3) Se lavan los fragmentos de los ganglios con Hanks estéril y se transfieren a una solución de Hanks adicionada con 1 mg/ml de Colagenasa tipo I y 10 mg/ml de Dispasa por 40 min a 37° C, intercalando cada 20 min. con periodos breves de agitación mecánica.
- 4) La dispersión se complementa mediante esta agitación mecánica de la solución enzimática y los fragmentos de ganglios, haciéndola pasar cuidadosamente a través de una pipeta de 5 ml con una punta de bordes romos.

- 5) La dispersión se completa en el momento en que ya no son visibles los fragmentos de los ganglios. En este punto la solución enzimática que en un principio tenía una apariencia traslúcida y de color ámbar se torna un poco turbia.
- 6) A la solución de la mezcla enzimática y células se le adiciona medio L-15 complementado con suero fetal bovino (10 % v/v). Centrifugar por 8 minutos a 2000 rpm. Terminada la centrifugación aspirar el sobrenadante y repetir este paso una o dos veces más con el pellet celular. Este paso tiene el propósito de lavar la mezcla enzimática y evitar que la acción prolongada de las enzimas dañe a las células.
- 7) Posterior al último centrifugado de la suspensión celular, resuspender el pellet en 350 µl de DMEM. Aproximadamente un volumen de 50-60 µl de esta suspensión se colocan en platos de cultivo de poliestireno cubiertos con L-polylisina, en medio de cultivo DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) suplementado con 5 % (v/v) de suero fetal bovino y 1% de una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina).
- 8) Es recomendable el uso de anillos de clonación para evitar la dispersión de las células en toda la caja de cultivo y concentrarlas en el área delimitada por los anillos.
- 9) Las cajas de cultivo se almacenan en un incubador en atmósfera 95% aire y 5% de CO₂ a 37° C. Las neuronas fueron estudiadas dentro de las primeras 8 y 18 hrs. después del sembrado.

Algunas observaciones respecto a la disociación y el cultivo.

Inmediatamente después de la disociación las neuronas exhiben largas arborizaciones dendríticas, pero aproximadamente 4 horas después del sembrado las células adquieren una morfología casi

esférica, se encuentran ya adheridas al sustrato y listas para su empleo. Sin embargo pasadas 48 hrs. las células retoman su morfología multipolar.

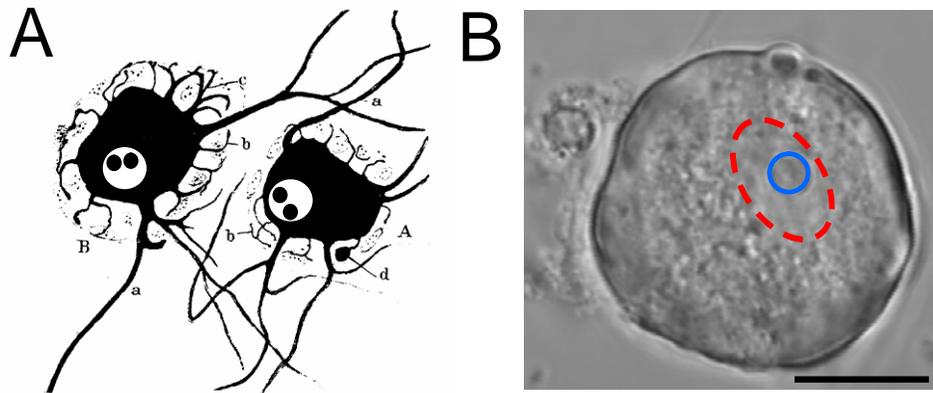


Figura 15. Morfología típica de una neurona principal del ganglio cervical superior. (A) Características *in situ* del las neuronas simpáticas de la cadena simpática. Nótese la forma multipolar. Estas neuronas poseen un axón, y hasta 13-18 dendritas proximales (a, axón; b, dendritas proximales; y d varicosidad: Tomado de Ramón y Cajal, 1906). (B) Características *in vitro*, 24 hr posterior a la disociación enzimática del las neuronas simpáticas del GCS de la rata. Imagen obtenida usando un microscopio confocal Olympus Fluoview 500, objetivo 60x, inmersión en agua, en el modo de luz transmitida.

Para nuestros propósitos la forma esférica es la ideal. Para apreciar lo anterior, considérese que sucede conforme una neurona extiende sus dendritas. Una célula perfectamente esférica de 20 μm de diámetro tendría un volumen de $4190 \mu\text{m}^3$, y un área superficial de $1257 \mu\text{m}^2$, con una capacitancia alrededor de 12.6 pF. Si de esta célula crecieran cuatro dendritas hipotéticas de 100 μm de longitud y de 1 μm de diámetro, su área superficial se incrementaría al doble y su volumen total aumentaría un 7%. Mucho del área superficial adicional nunca sería isopotencial con respecto al soma (bajo fijación de voltaje) debido a la alta resistividad interna de las dendritas.

Registro de corrientes de membrana usando la técnica de 'patch-clamp'.

Utilizamos la técnica de fijación del voltaje denominada patch-clamp en su modalidad célula completa (whole-cell, patch-clamp; Hamill, 1981) para obtener los registros de corrientes iónicas y corrientes capacitivas no lineales. El empleo de esta técnica obedece a nuestros intereses y las ventajas que esta modalidad ofrece con respecto a otras técnicas de fijación de voltaje.

Pipetas de registro.

Para los experimentos de '*patch-clamp*' se utilizó pipetas de vidrio de borosilicato Kimax 51 (García et al., 1998), obtenidas a partir de del estiramiento con calor en un estirador de pipetas horizontal (modelo Sutter P-87). Las pipetas utilizadas fueron dentro del rango de 0.5-1.2 μm de diámetro con una resistencia de entre 0.8-1.5 $\text{M}\Omega$. Los electrodos de alambre de plata fueron recubiertos con cloruro de plata (AgCl), sumergiendo el alambre de plata en una solución de hipoclorito de sodio posterior a un lavado con etanol, agua bi-destilada.

Fundamentos Teóricos de la técnica de fijación de voltaje

La técnica de patch clamp (Hamill et al., 1981; Neher 1992) permite registrar tanto corrientes de canal único como corrientes de macroscópicas que son la suma de las corrientes que fluyen a través de decenas de canales. En esta técnica se usa como electrodo una pipeta de vidrio de con un orificio del orden de 1 μm de diámetro. Esta se coloca en la superficie de la membrana plasmática y después de establecer un ligero contacto con ella se aplica una presión negativa al interior de la pipeta lo cual produce que el área de la membrana, incluida dentro del diámetro de la pipeta, se invagine y posteriormente se un sello de alta resistencia eléctrica (del orden de los $\text{G}\Omega$). Este proceso permite un aislamiento perfecto entre la región de la membrana circunscrita por la pipeta y el resto de la membrana, haciendo posible un cambio de potencial de membrana solo en dicha región.

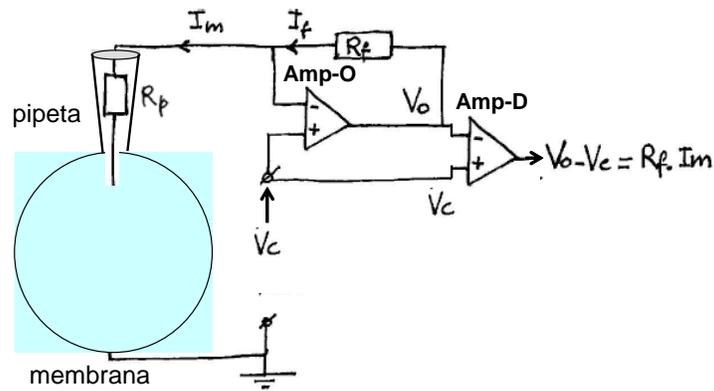


Figura 16. Circuito eléctrico básico de amplificadores del sistema de ‘patch-clamp’ y del circuito equivalente formado por la pipeta y la membrana.

La Fig. 16 ilustra un sistema de fijación de voltaje en un parche de membrana que incluye los circuitos equivalentes en la pipeta y de la membrana de la célula así como de las conexiones básicas de la pipeta y dos amplificadores (a partir de: Ypey y DeFelice, 1995). En este sistema, un potencial comando (V_c) aplicado a la entrada positiva del amplificador operacional (Amp-O) aparece en la entrada negativa del mismo debido a la retro-alimentación y a la alta ganancia del amplificador. Como resultado de esto, la pipeta, cuya resistencia es R_p , adquiere el potencial V_c y la corriente requerida para imponer este potencial, fluye a través de ella y por la membrana aislada por la pipeta. La corriente proveniente de la salida del amplificador, fluye a través de la resistencia de retro-alimentación R_f . Por lo tanto, el V_o a la salida del amplificador esta dado por:

$$V_o = -I_m R_f + V_c \quad \text{Eqn. (1)}$$

El segundo amplificador es un amplificador diferencial (Amp-D) de ganancia 1x. Su función será sustraer V_c de V_o , para obtener un voltaje proporcional a la corriente de membrana. De aquí que el voltaje de salida ($V_o - V_c$) del segundo amplificador, es:

$$V_o - V_c = I_m R_f \quad \text{Eqn. (2)}$$

Componentes del sistema de registro.

El sistema de registro está formado por un microscopio invertido equipado con un sistema óptico para epifluorescencia (excitación: 488 nm; emisión: filtro LP; 505 nm), una cámara donde se coloca el plato de cultivo, el amplificador de patch clamp (EPC-10, HEKA Instruments, Germany), un osciloscopio de dos canales, una tarjeta de adquisición (Instrutech) y un computador basado en un procesador Pentium III.

El microscopio se montó en una mesa anti-vibratoria fabricada en el laboratorio. La posición y el desplazamiento de la pipeta se controló con un manipulador motorizado (InjectMan, Eppendorf) con un desplazamiento axial desviado 45° en relación al plano horizontal.

¿Que tan adecuadamente pueden ser fijado el potencial de membrana en estas neuronas?

Un punto importante para este propósito es la morfología casi esférica que adoptan las neuronas en cultivo, la cual las vuelve un sistema isopotencial. Pero este hecho podría ser solo el comienzo de una buena fijación. El control del potencial de membrana puede ser excelente si los experimentos son diseñados dentro de los límites de los sistemas de registro empleados. Sin embargo, algunos problemas más complejos surgen en relación a otros aspectos que hay que considerar, por ejemplo, la densidad (magnitud) de las corrientes a estudiar, los errores debidos a una inadecuada cancelación de los componentes capacitivos lineales, resistencias en serie y a la inapropiada compensación de la velocidad de fijación del voltaje, las variaciones de la capacitancia de la pipeta debido a variaciones el volumen de la solución de la cámara de registro, etc., etc.

A continuación se mencionan algunas estrategias empleadas para minimizar los errores de fijación de voltaje: Se prefirió el registro de neuronas de tamaño mediano, con valores de 30-50 pF de capacitancia lineal. La estimación de la capacitancia se logró empleando los circuitos de cancelación del amplificador. Cuando fue necesario se modificó la composición de las soluciones de

registro, para reducir el gradiente químico de algunas especies iónicas, o limitamos el rango de voltaje empleado para mantener ciertas corrientes lo suficientemente pequeñas o simplemente no permitir su activación. Las variaciones de las resistencias en serie se minimizaron empleando pipetas baja resistencia dentro del rango de 0.8 a 1.2 MΩ y mediante la cobertura de las pipetas con Sylgard.

Tabla 1. Composición de cada una de las soluciones de registro para lograr el asilamiento de las corrientes de Ca²⁺, Na⁺, K⁺ y capacitivas no lineales.

	Ringer	I _{Ca}	I _K	I _{Na}	I _{Capacitivas}
Solución Externa (mM)					
NaCl,				63	
KCl	160		160		
TEACl	3	163	3	100	163
Ca ₂ Cl					
Glucosa,	2	8	2	10	8
HEPES,	8	10	8	10	10
EGTA	10		10		
Mg ₂ Cl,	0.1	1		1	2
Ba ₂ Cl	1	2	1		1
CsCl					1
TTX		0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
Nifedipina,		0.005	0.005	0.005	0.005
Cd ₂ Cl			0.1	0.1	0.1
La ₃ Cl			0.1	0.1	0.1
pH		7.4 TEAOH	7.4 KOH	7.4 TEAOH	7.4 TEAOH

Tabla 2. Composición de cada una de las soluciones de pipeta empleadas para lograr el aislamiento de las corrientes de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y capacitivas no lineales.

Solución Interna	I_{Ca}	I_{K}	I_{Na}	$I_{\text{Capacitivas}}$
KCl		140		
CsCl,	140		140	140
HEPES,	10	10	10	10
EGTA,	11	11	11	11
Mg_2Cl ,	5	5	5	5
Na_2ATP	5	5	5	5
Na_2GTP ,	0.3	0.3	0.3	0.3
Leupeptina,	0.1	0.1	0.1	0.1
pH	7.4 CsOH	7.4KOH	7.4 CsOH	7.4 (CsOH

Diseño de las soluciones

En este trabajo empleamos distintas soluciones (ver Tabla 1) para lograr el registro estable y el aislamiento de corrientes iónicas macroscópicas de calcio, potasio y sodio, así como para el registro de corrientes capacitivas no lineales. Donde se hace notar, el GTP de la solución interna fue substituido con 0.3 mM de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ o 2 mM de $\text{GDP}\beta\text{S}$.

Intercambio entre la pipeta y el interior celular.

Los registros de fijación de voltaje en la configuración de célula completa permiten una manipulación relativa de la composición del medio intracelular. Sin embargo es importante recordar que la diálisis de la célula en estudio, no es instantánea; la constante de tiempo del equilibrio de la

concentración de una molécula determinada, entre la pipeta de registro y el interior celular, depende entre otras cosas, de sus propiedades físico-químicas, del peso molecular de la misma, la resistencia de acceso entre la pipeta y la membrana y el volumen de la célula. Por ejemplo en las neuronas del GCS, se ha estimado la constante de tiempo de equilibrio para el Fura-2 (Beech et al., 1991).

Tomando en cuenta la capacitancia (como una estimación del volumen celular) y la resistencia de acceso, el valor de la constante de tiempo de equilibrio para el fura-2, fue ~ 399 seg.

La constante de equilibrio para cualquier otra molécula, en esta misma población de neuronas puede estimarse gruesamente a partir de:

$$\tau_x = \tau_f (M_x / M_f)^{1/3} \quad \text{Eqn. (3)}$$

donde τ_x es la constante de equilibrio de la molécula desconocida; M_x , es su peso molecular; τ_f y M_f representan la constante de equilibrio y peso molecular del Fura-2, respectivamente.

Adquisición y Amplificación.

Las corrientes de membrana fueron amplificadas utilizando un amplificador List-EPC-7 y pipetas con resistencias en el rango de 0.8 a 1.2 M Ω , a temperatura ambiente (20-25 ° C). Después del establecimiento de la configuración de célula completa, las neuronas fueron mantenidas a -60 mV.

La capacitancia y resistencias en serie fueron canceladas y compensadas (70-80%), respectivamente. Se vigilo a lo largo del experimento su estabilidad y cuando fue necesario se reajustaron. Para evitar la saturación del amplificador, solo se usaron neuronas con capacidad de membrana dentro del rango de los 30 y 50 pF.

Se emplearon protocolos de voltaje y las respuestas de corriente fueron digitalizadas y almacenadas para su posterior análisis usando el programa BASIC-FASTLAB (Indec Systems). Los pulsos comando se aplicaron a intervalos de 10 s, a los valores de voltaje y duración tal como se indica en cada figura, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV.

Para la obtención de las corrientes capacitivas no lineales, las corrientes de fuga y las corrientes capacitivas lineales fueron restadas en línea, mediante el empleo de un protocolo de la forma $p/5$ desde un subpotencial de mantenimiento de -120 mV. Las corrientes capacitivas no lineales fueron filtradas a 3 KHz. y digitalizadas a una frecuencia de 10 KHz.

Las corrientes iónicas fueron filtradas a 3 KHz y adquiridas cada 10 y 50 KHz (corrientes de escalón y de cola, respectivamente). En algunos casos a las corrientes iónicas no se les resto los componentes lineales. Donde fue estadísticamente apropiado, los datos fueron expresados en términos de promedios y se calculo la desviación estándar.

Es importante mencionar que los estudios realizados acerca de corrientes de compuerta, se han centrado, la gran mayoría a canales de calcio tipo L y se han hecho principalmente en músculo esquelético y cardiaco, y solo pocos trabajos se han realizado en neuronas. Nuestro modelo celular posee algunas características que lo hacen pertinente para nuestro estudio. Se sabe que la mayor parte (~ 90 %) de la corriente total de calcio fluye a través de canales de calcio tipo-N. Además, en estas células, estos canales son blanco común de modulación por transmisores que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G y que emplean vías de señalización que producen patrones de inhibición tanto voltaje-dependientes (directa) como voltaje-independientes (indirecta).

Estudio de corrientes capacitivas no lineales

Cuando una población de canales iónicos dependientes del voltaje se abre, la corriente iónica que fluye puede ser detectada en condiciones de registro electrofisiológico intracelular en el modo fijación del voltaje. Estas corrientes son denominadas corrientes iónicas macroscópicas. Si el canal tuviera solo dos estados funcionales abierto/cerrado, la información obtenida del registro de corrientes macroscópicas podría ser suficiente para inferir la dependencia de voltaje en dichos estados y sus transiciones. Sin embargo los canales iónicos muestran múltiples estados físicos

intermedios, muchos de los cuales se encuentran algunos pasos lejos del estado abierto. En estos casos la información obtenida del registro de corrientes macroscópicas y aun de corrientes unitarias puede ser incompleta y el inferir las propiedades de las transiciones entre los diferentes estados cerrados hacia el estado abierto resulta difícil (Bezanilla y Stefani, 1998).

Para obtener registros de corrientes capacitivas no lineales es un pre-requisito eliminar las corrientes iónicas (Fig. 17B, trazo marcado como corriente (I) iónica) mediante el empleo de fármacos que bloquean dichas corrientes. Este procedimiento deja las corrientes capacitivas lineales, corrientes de fuga y a las corrientes capacitivas no lineales. Para poder eliminar los componentes lineales tanto resistivos como capacitivos es necesario hacer uso de protocolos de resta. Esto se logra aplicando alguno de los varios protocolos de resta, descritos para este propósito (Bezanilla y Stefani, 1998). El protocolo electrofisiológico clásicamente utilizado es el denominado P/n. Por ejemplo el de la forma P/-5 consiste en la aplicación de cinco pulsos, en rangos de potencial de membrana diferente del cual se activan los canales de interés, por ejemplo valores de voltaje muy hiperpolarizantes (Fig. 17A, protocolo de voltaje, P/-5). Tales pulsos son múltiplos de un pulso de prueba P. Posteriormente se escalan las corrientes obtenidas y se restan al pulso de prueba. Como consecuencia se obtiene la porción de corriente capacitiva no lineal, dentro de la cual se encuentra la corriente denominada de compuerta, que esta asociada a la activación de canales iónicos dependientes de voltaje.

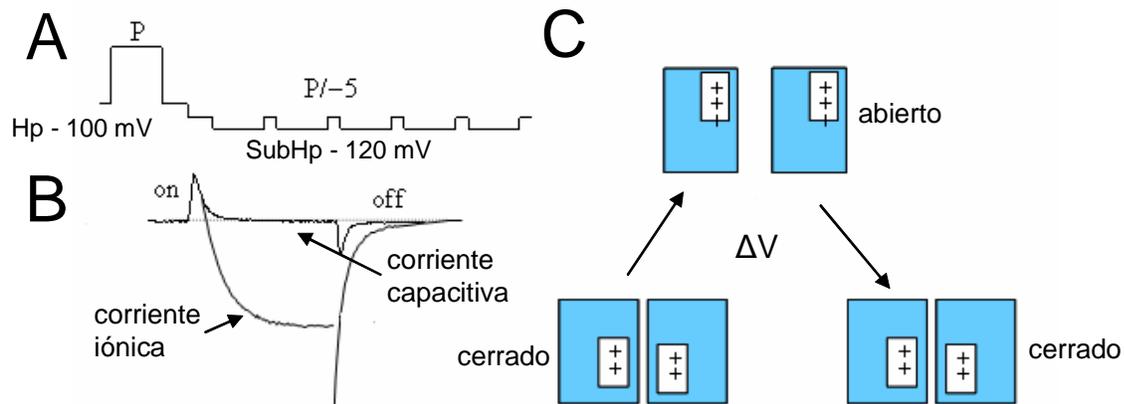


Figura 17. Características de la corriente capacitiva no lineal. (A) Protocolo de voltaje P/-5, utilizado para la substracción de los componentes capacitivos lineales y de fuga (Bezanilla y Stefani, 1998). (B) Características y curso temporal de la corriente capacitiva no lineal y de una corriente iónica entrante. (C) Modelo básico de dos estados (cerrado/abierto) para la activación de un canal regulado por potencial eléctrico. En el reposo el canal se encuentra predominantemente en el estado cerrado. Una variación en el voltaje transmembranal conduce al movimiento del “sensor del voltaje” (rectángulo con cargas) el cual detecta los cambios en el voltaje y transmite esta energía al poro del canal para controlar su actividad (Bezanilla, 2000).

Posterior a la aplicación de un pulso de prueba y la subsecuente resta de los componentes lineales utilizando el protocolo P/n, la corriente capacitiva no lineal obtenida es una corriente de naturaleza transitoria, saliente y breve (ON). Al final del pulso de prueba, se produce una corriente entrante transitoria (OFF), de igual magnitud, pero de signo opuesto al de la corriente ON (ver Fig. 17B, trazo marcado como corriente capacitiva no lineal). Debido a que cada partícula solo puede estar en una de sus dos posiciones estables, la transición de una a otra es instantánea, y produce un disparo infinito de corriente (ver Fig. 17C, modelo básico de dos estados, cerrado-abierto). La integral de esta corriente es la carga total movida a un voltaje determinado.

Las corrientes capacitivas no lineales, incluyen la contribución directa de las cargas removidas (movimiento de carga) que median las transiciones de los diferentes estados físicos de los canales y su caracterización ayuda a entender las transiciones del canal que lo llevan de un determinado modo operativo a otro (Fig. 17C). De manera que el estudio de las corrientes capacitivas no lineales es necesario si se desea obtener una caracterización más completa del proceso que ocurre en canales regulados por voltaje y que se denomina proceso de dependencia de voltaje (Bezanilla y Stefani, 1998).

Análisis de ruido en condiciones no estacionarias.

Grupos de trazos de corriente fueron generados mediante el uso de series de pulsos de voltaje idénticos en amplitud y en duración (desde -90 mV a -10 mV) aplicados cada 4 sec. Los trazos de corriente fueron adquiridos a una frecuencia de 50 KHz, filtrados a 3 KHz (filtro 3-polos, Bessel).

La estimación de la varianza, σ^2 , se realizó en 2-6 grupos, donde cada grupo representaba 80-200 trazos de corriente evocadas por pulsos despolarizantes idénticos. La varianza originada del aparataje, identificada como aquella que ocurría durante el potencial de mantenimiento, se restó de la varianza calculada durante el pulso de prueba. A las curvas de la varianza de la corriente en función de la corriente promedio se les ajustó una función (ver Sigworth, 1980) de la forma:

$$\sigma^2 = i(I) - (I)^2/N \quad (\text{Eqn. 4})$$

donde I es la corriente promedio, N es el número de canales, y i es la amplitud de la corriente unitaria. A la primera raíz de la parábola, la pendiente es igual a i . Las curvas de varianza-corriente promedio fueron construidas a partir de datos donde el análisis de datos comenzó 2 ms después del inicio del escalón de voltaje y se extendió hasta el valor máximo de la corriente. Para estos experimentos, una vez establecida la configuración de célula completa, la neurona bajo evaluación

fue levantada de la superficie de la caja de petri, y el perfusor fue colocado $\sim 100 \mu\text{m}$ frente a la célula.

Inyección intranuclear

En algunos experimentos, 4 hr después del sembrado de la células, tiempo suficiente para permitir la adhesión de las células al substrato, realizamos inyecciones intranucleares utilizando una pico bomba (sistema de microinyección Eppendorf 5242) acoplado al un micromanipulador motorizado (modelo Eppendorf 5171), como se describió en García et al., 1998). La solución de inyección contenía un vector de codifica una variante del GFP, una proteína fluorescente unida a la secuencia de las subunidades $G\beta 1$. La solución de inyección también contenía otro vector que codificaba para la subunidad $G\gamma 4$ ($100\text{ng}/\mu\text{l}$), así como fluoresceína-Dextran, un fluoroforo de alto peso molecular 1 mg/ml , usado en este estudio para monitorear la inyección. El empleo de esta subunidad $G\beta$ marcada con GFP ($G\beta$ -GFP) permitió la identificación posterior e inequívoca de las neuronas con sobre-expresión de subunidades $G\beta$. Típicamente se emplearon presiones de inyección en el rango de $10\text{-}20 \text{ KPa}$ durante $0.5\text{-}0.8 \text{ s}$. El uso de este protocolo de inyección no provoco cambios en el volumen celular así como daños evidentes.

Análisis de datos

El análisis de los registros eléctricos obtenidos se realizará por métodos electrofisiológicos y estadísticos. La amplitud de las corrientes iónicas será normalizada con la capacitancia lineal y expresada en términos de densidad de corriente. Para cada uno de los componentes iónicos se describirán sus propiedades electrofisiológicas generales (relaciones corriente-voltaje, para determinar: voltajes de activación, inactivación; estudio de cinéticas de activación e inactivación, etc.). La estimación de carga móvil se llevo a cabo mediante el cálculo de la integral del área bajo la

curva del curso temporal de los trazos de corrientes capacitivas no-lineales, usando el software de análisis Origin versión 7.5. El análisis cuantitativo de la amplitud y dependencia de voltaje de la carga total removida la inicio (Q ON) y al final (Q OFF) del pulso de prueba, obtenido en distintas condiciones, se llevara a cabo mediante el ajuste de las curvas Q-V a una función de Boltzmann simple. Como medidas de resumen utilizaremos el promedio, el error y desviación estándar.

Con el propósito de estudiar el efecto de vías de señalización que dependen de la activación de receptores acoplados a proteínas G sobre el movimiento de carga no lineal y conductancias dependientes de voltaje organizaremos nuestros experimentos dirigiendo nuestra atención a dos puntos principales: el primero lo comprende la caracterización de corrientes capacitivas no lineales, en neuronas simpáticas disociadas y mantenidas en cultivo; el segundo punto lo comprenden las maniobras mediante las cuales se producirán los efectos de vías moduladoras y consiste en inducir la activación de las proteínas G, ya sea por procedimientos específicos e inespecíficos (ver apartado de activación de proteínas G).

RESULTADOS

Corrientes de membrana en las neuronas del ganglio cervical superior (GCS)

La membrana somática de una neurona principal del ganglio cervical superior alberga al menos cinco tipos de corrientes iónicas operadas por despolarizaciones de membrana: (1) corrientes de sodio; (2) corrientes de potasio del tipo rectificadora tardía; (3) corrientes de potasio tipo-A; (4) corrientes de calcio y (5) corrientes de potasio activadas por voltaje y calcio (Schofield e Ikeda, 1988 y 1989; Plummer et al., 1989; Marrion, 1997; Sacchi et al., 1998). Para aislar los distintos componentes de las corrientes de membrana presentes en las neuronas del GCS, empleamos la sustitución de iones permeables por iones impermeables, así como agentes farmacológicos que actúan como bloqueadores de canales iónicos (para detalles acerca de la composición de las soluciones y condiciones de registro vea la sección de métodos). El trazo de la izquierda en la Fig. 18A ilustra el curso temporal de la corriente macroscópica de sodio evocada por una despolarización de membrana a -20 mV y de 4 ms de duración. La magnitud de la corriente incrementa rápidamente y luego decrece durante la despolarización, una propiedad conocida como inactivación. La adición a la solución externa de 1 μ M de tetrodotoxina (TTX), un péptido que de manera específica se une y bloquea canales de sodio, produce un bloqueo completo de la corriente, indicando que la corriente de sodio en estas neuronas esta compuesta de una población que en la literatura se denomina como TTX-sensible (Fig. 27E). El trazo de la derecha en la Fig. 18A, ilustra el curso temporal de la corriente de calcio evocado por una despolarización a -20 mV y de 10 ms de duración. En estas neuronas ~90% de la corriente de calcio fluye a través de canales tipo-N (Plummer et al., 1989; Mintz et al., 1992; García-Ferreiro et al., 2001). El trazo de corriente en la Fig. 18B (trazo marcado como trazo a) ilustra las propiedades de la corriente de potasio. El trazo de corriente fue

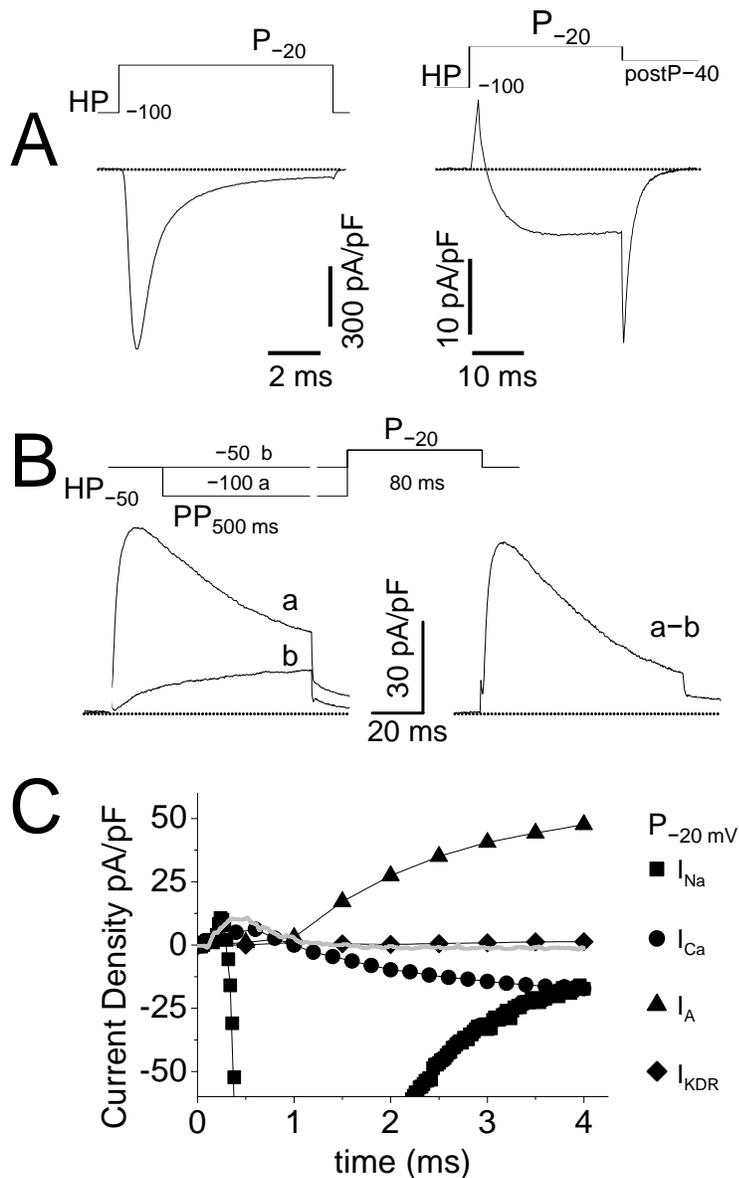


Figura 18. Corrientes iónicas activadas por despolarizaciones de membrana en las neuronas del GCS de la rata. (A) Corrientes macroscópicas de sodio (I_{Na}) y de calcio (I_{Ca}) evocadas por pulsos despolarizantes a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. (B) Corrientes macroscópicas de potasio evocadas por pulsos despolarizantes a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, previo o posterior a la aplicación de un prepulso (PP) condicionante de 500 ms de duración a los valores de voltaje indicados en la figura. Se ilustra el aislamiento de la corriente de potasio tipo A (I_A) logrado mediante sustracción digital de los trazos a y b (a - b). (C). Comparación del curso temporal de la corriente de sodio, corriente de calcio, corriente de potasio tipo A, de la corriente de potasio del tipo rectificadora tardía y de la corriente capacitiva no lineal (trazo gris), que resulta del bloqueo de las corrientes iónicas.

evocado por una despolarización a -20 mV y una duración de 80 ms posterior a la aplicación de un prepulso condicionante (PP) a -100 mV y de 500 ms de duración.

Usando esta protocolo, se observo el desarrollo de una corriente saliente de tipo transitoria seguido por un componente sostenido. La Fig. 18B (trazo marcado como b) ilustra un trazo representativo de la corriente de potasio evocada por una despolarización a -20 mV y una duración de 80 ms posterior a la aplicación de un prepulso condicionante (PP) a -50 mV y de 500 ms de duración. El empleo de un PP despolarizante (-50 mV) elimino el componente de transitorio de la corriente de potasio. La Fig. 18B (trazo marcado como c), ilustra como el componente transitorio puede ser aislado mediante substracción digital. Este trazo el cual muestra a la corriente de potasio transitoria de tipo-A indica que la corriente de potasio se alcanza un máximo durante los primeros 10 ms y luego inactiva durante el curso del pulso despolarizante. La Fig. 18C ilustra corrientes entrantes y salientes que se activan durante los primeros 4 ms de un pulso despolarizante a -20 mV. Note que la corrientes de sodio, calcio y la de potasio tipo A alcanzan un valor cercano al valor pico durante los primeros 4 ms del pulso despolarizante, mientras que el componente lento de la corriente saliente de potasio se activa de una manera mínima. La Fig. 18C ilustra el curso temporal de la corriente de membrana evocada por un despolarización a -20 mV durante 4 ms y que resulta del bloqueo de las corrientes iónicas (empleando TTX para bloquear canales de sodio; TEACl y CSCe para bloquear canales de potasio, así como CdCl y LaCl, para bloquear canales de calcio) y de la substracción de la corriente capacitiva lineal empleando un protocolo de P/-5. Esta corriente de membrana, de tipo transitoria, exhibe las características de una corriente capacitiva no-lineal, como se mostrara en detalle en la siguiente sección. A juzgar por el curso temporal de esta corriente capacitiva no-lineal, nosotros proponemos que esta corriente podría estar relaciona, al menos en parte, con el movimiento de carga que precede y/o acompaña el proceso de apaertura de canales operados por voltaje.

Registro del movimiento de carga

Como se ilustra en la sección anterior, la corriente capacitiva no-lineal, bajo ciertas condiciones experimentales, puede ser registrada en las neuronas del GCS. La Fig. 19A ilustra que despolarizaciones cercanas a potenciales más positivos que -60 mV evocan corrientes de tipo transitorio al comienzo y al final de un pulso despolarizante. La amplitud de estas corrientes incrementa con la amplitud del pulso de prueba (Fig. 19A).

Como se anticipa de una corriente de esta naturaleza, de tipo capacitivo, la cantidad de carga de membrana, obtenida a partir de la integración de la corriente capacitiva con respecto al tiempo, debería de saturar a despolarizaciones extremas (Schneider y Chandler, 1973; Armstrong y Bezanilla, 1973; Almers 1978).

La Figura 19D ilustra la relación de la cantidad de carga móvil al comienzo (Q_{on}) y final (Q_{off}) del pulso despolarizante con respecto al voltaje de membrana (relación Q vs V). El movimiento de carga muestra una forma sigmoideal con respecto al voltaje, acorde a una función de Boltzmann de dos estados de la forma:

$$Q = Q_{max} / [1 + \exp((-V + V_b) / k)] \quad (\text{Eqn. 5})$$

donde Q_{max} es la carga máxima por unidad de capacitancia lineal, V_b es el valor en el eje del voltaje donde se mueve el 50% de la carga y k , es una medida de la pendiente.

El movimiento de carga depende en el voltaje con valores de los parámetros de la función de Boltzmann siguientes: $Q_{max} = 6.1 \pm 0.6$ nC/ μ F; $V_b = -29.2 \pm 0.5$ mV y $k = 8.4 \pm 0.4$ mV ($n = 14$).

La cantidad de carga móvil tanto al comienzo (Q_{on}) como al final (Q_{off}) del escalón de voltaje alcanzó la saturación a un potencial de + 40 mV. En general, los valores de Q_{on} y Q_{off} fueron muy similares a valores de voltaje medianamente despolarizantes, a excepción de los valores de carga de

Q_{off} fueron menores que aquellos de Q_{on} para despolarizaciones mas positivas que -20 mV (Fig. 19D).

La razón de Q_{on} con respecto a Q_{off} (razón $Q_{\text{on}}/Q_{\text{off}}$) a +80 mV fue de 1.19 ± 0.07 ($n = 14$; Fig. 19C). Sin embargo en experimentos en donde la duración del pulso de prueba fue reducido a 1 ms, los valores de la razón $Q_{\text{on}}/Q_{\text{off}}$ fue cercano a la unidad ($Q_{\text{on}}/Q_{\text{off}} = 1.05 \pm 0.02$), mientras que en experimentos donde la duración del pulso de prueba fue aumentado a 10 ms la razón $Q_{\text{on}}/Q_{\text{off}}$ incremento la desigualdad de cargas (datos no mostrados). Por lo tanto, en la mayoría de los experimentos y resultados que se mostraran a continuación solo la carga Q_{on} (aquella que ocurre al comienzo y durante los primeros 2 ms del pulso de prueba) fue analizada.

Dada las propiedades temporales y la dependencia de voltaje de las corrientes capacitivas no lineales así como la saturación de la carga a despolarizaciones extremas y la razón $Q_{\text{on}}/Q_{\text{off}}$ (Fig. 19 A, C y D), es posible anticipar y proponer que una parte considerable del movimiento de carga que nosotros registramos en la membrana somática de la neuronas del GCS, representa y se origina del movimiento de los sensores de voltaje y esta asociado a cambios conformacionales que preceden y/o acompañan la apertura de canales operados por voltaje (Almers 1978; Armstrong 1981; Bezanilla 2000).

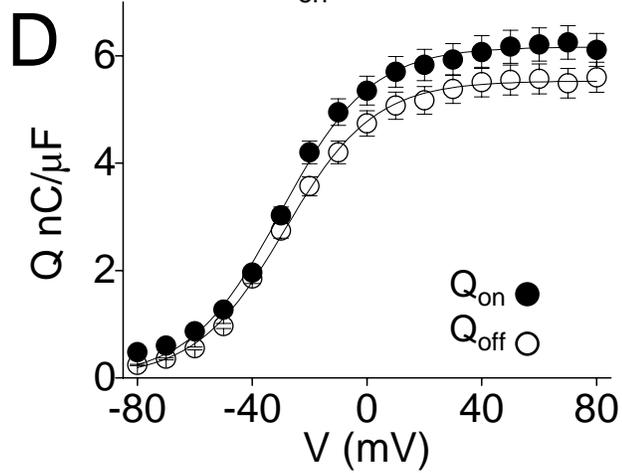
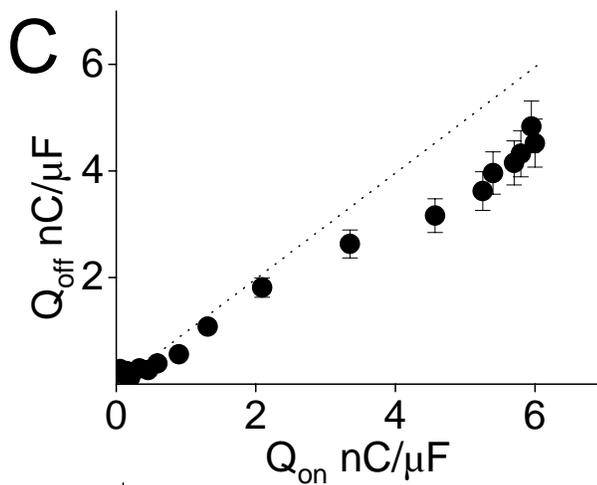
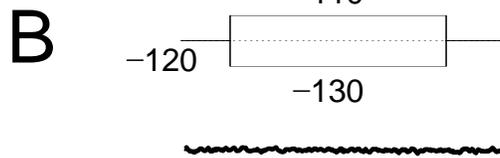
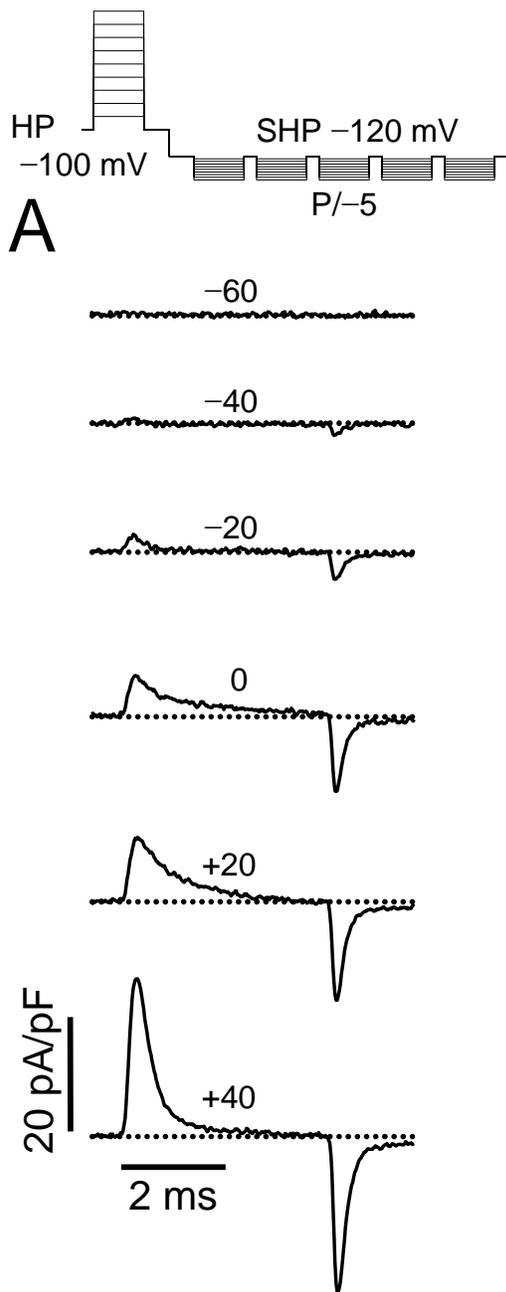


Figura 19. Corrientes capacitivas no lineales y movimiento de carga evocado por despolarizaciones de membrana en neuronas simpáticas de la rata. (A) Corrientes capacitivas no lineales evocadas por pulsos despolarizantes de 4 ms de duración desde un potencial de mantenimiento (Hp) de -100 mV a valores de voltaje indicados en cada trazo. El protocolo para el registro de las corrientes capacitivas no lineales y la substracción de los componentes lineales se muestra en la parte alta de la Figura. (B) Trazo de cero corriente en respuesta a la adición algebraica de dos registros evocados por despolarización de polaridad opuesta, indicando la linealidad de las propiedades de membrana en el rango de voltaje empleado para obtener los templetas de substracción. (C) Relación de la carga al on (Q_{on}) en función de la carga al off (Q_{off}) indicando conservación de la carga. (D) Relación Q vs V para Q_{on} (círculos cerrados) y Q_{off} (círculos abiertos). La línea continúa a través de los símbolos en panel representan el mejor ajuste a la Eqn., 5.

De hecho a juzgar por el curso temporal del movimiento de carga el cual es relativamente rápido, proponemos que este movimiento de carga podría estar asociado con la carga de compuerta originada de canales con cinéticas de activación rápidas (p. e. canales de Na^+ , Ca^{2+} y de K^+ tipo-A).

¿Que canales operados por voltaje contribuyen al movimiento de carga intramembranal que estamos registrando?

A diferencia de las corrientes iónicas (las cuales pueden aislarse e identificarse mediante el uso de drogas y/o toxinas, que actúan ya sea bloqueando o aumentando la corriente de la población de canales que uno desea eliminar o acentuar, respectivamente) en el caso del registro de corrientes capacitivas no-lineales el repertorio de agentes farmacológicos es muy limitado, y no existe la posibilidad de aislar o separar corrientes de compuerta que se origina de una población en particular.

Esta situación es evidente en sistemas nativos, donde al menos una docena de canales pueden estar presentes en el mismo tipo de celular. A este punto uno podría elegir, en lugar de un sistema nativo, un sistema de expresión heterólogo o también conocido como sistemas modelo. En los sistemas modelo y en condiciones ideales, una debería de ser capaz de 'sobre-expresar' y hacer

mas prominente la presencia de una población de canales de un tipo particular. Incluso en adición a la población de canales bajo estudio, uno podría añadir algún sistema de señalización (por ejemplo mediante la co-expresión de algún receptor de membrana, etc.). Sin embargo, a pesar de las ventajas que las preparaciones modelo ofrecen, y tomando en cuenta nuestras limitaciones (p.e., para cuando iniciamos este trabajo, nuestro laboratorio no contaba con la infraestructura adecuada ni con los recursos y mucho menos los elementos necesarios para usar un sistema de expresión) y las desventajas de los mismos, así como las desventajas y limitaciones de nuestro sistema, nosotros elegimos seguir adelante con nuestro sistema nativo, las neuronas del GCS. Sin embargo esto requirió establecer modos alternativos para poder saber que población(es) están actualmente contribuyendo al movimiento de carga que nosotros estamos registrando. 1) El uso de protocolos de inmovilización de carga y de inactivación de estado estable. 2) protocolos de registro para el análisis de fluctuaciones en condiciones no-estacionarias para obtener una estimación del número de canales de sodio y calcio, poblaciones cuya carga podría contribuir en mayor grado al movimiento de carga total que estamos registrando.

Inmovilización de la carga y su correlación con la inactivación de poblaciones de canales operados por voltaje.

Si la carga de canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ tipo-A contribuye al movimiento de carga total que hemos registrado, distintos componentes cinéticos (rápido y lentos) y dependientes de voltaje deberían de observarse. Sin embargo, como se puede apreciar en la Fig. 19A, las corrientes capacitivas no lineales no exhiben distintos componentes cinéticos apreciables. Una situación muy probable, podría ser que las resistencias en serie no estén completamente compensadas, por lo tanto las corrientes capacitivas no lineales podrían estar siendo filtradas. Cualquiera que sea la razón, esta situación limita la posibilidad de establecer una separación cinética de los distintos componentes del

movimiento de carga. Por lo tanto en un intento alternativo de separar dichos componentes y obtener una estimación de cuales poblaciones de canales contribuyen al movimiento de carga nosotros usamos protocolos de voltaje para la evaluación de la inmovilización de la carga así como de la inactivación dependiente de voltaje. La desigualdad de las cargas (Fig. 19C y D) podría deberse a un proceso de inmovilización de carga asociado a la inactivación rápida dependiente de voltaje.

Con el objetivo de probar esta posibilidad nosotros evaluamos la inmovilización de la carga y luego la inactivación de canales operados por voltaje. Para esto usamos protocolos de voltaje caracterizados por dos pulsos: el primero, llamado prepulso condicionante (PP), es una despolarización sostenida de 500 ms, seguido por el segundo pulso, llamado pulso de prueba (P) de 4 ms de duración.

La Figura 20A, ilustra las características temporales de corrientes capacitivas no lineales evocadas inmediatamente después del PP condicionante. El incrementar la amplitud del PP resulto en una reducción del movimiento de carga (Q_{on}) evocado por un pulso de prueba a +20 mV. In varias neuronas, el valor promedio de la reducción de Q_{on} fue cercano al $64\% \pm 3\%$, cuando las corrientes capacitivas fueron precedidas por un PP a -40 mV (Fig. 20A, trazo marcado como c).

La curva de inmovilización se muestra como la relación de Q_{on} vs el voltaje del PP en la Fig. 20E, círculos negros. Nótese, que Q_{on} comienza a disminuir a valores de voltaje PP cercanos a -90 mV y fue parcialmente inmovilizada, alcanzando un plateau, por un PP cercano a 0 mV.

Esto, permitió plantear la posibilidad de que un componente (o varios) del movimiento de carga de estas neuronas, el cual disminuye en amplitud después de un PP a 0 mV, podría originarse de canales dependientes de voltaje que exhiben inactivación rápida y dependiente de voltaje (p. e., canales de sodio y canales de potasio tipo A). Como se menciono párrafos arriba estas neuronas expresan corrientes de ambos tipos de canales. Evaluamos esta posibilidad mediante la comparación de la dependencia de voltaje del proceso de inmovilización de la carga con la dependencia de voltaje

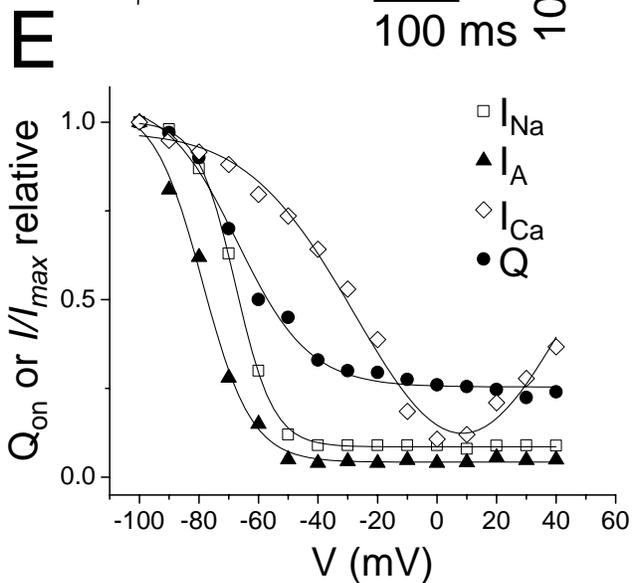
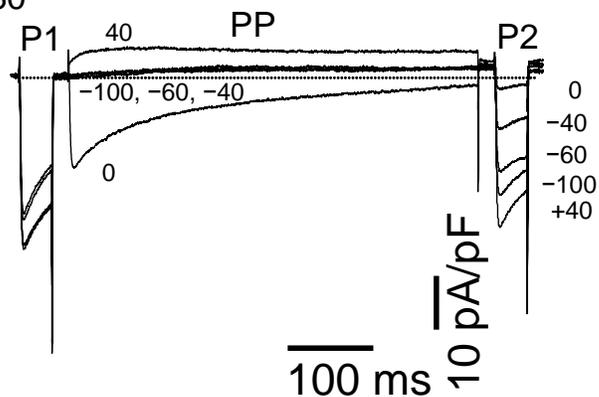
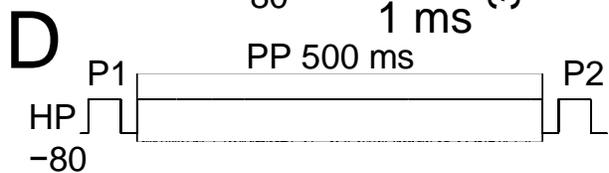
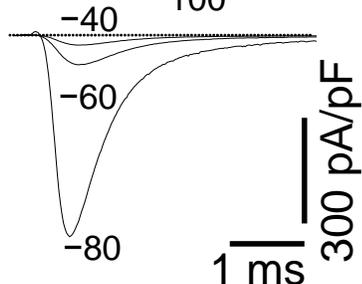
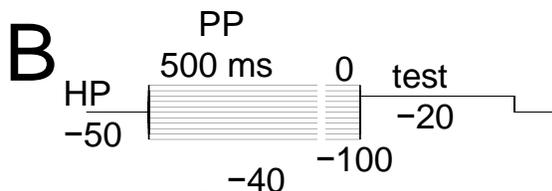
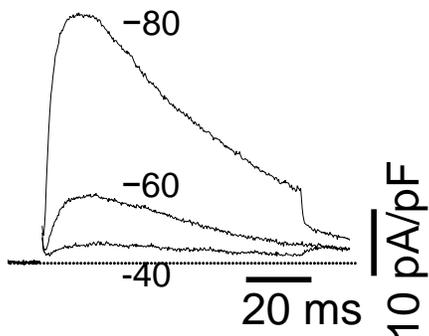
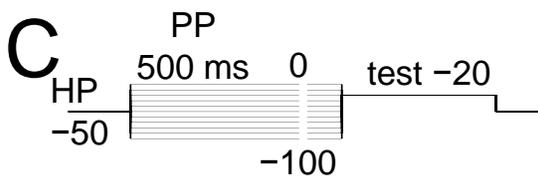
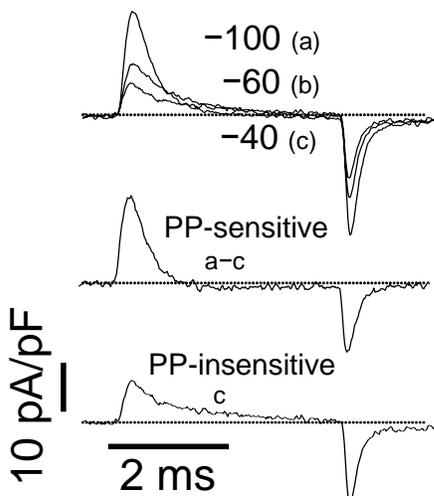
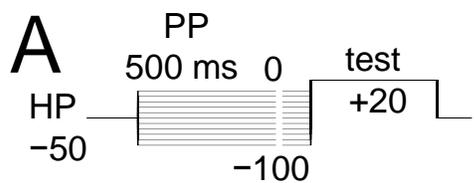


Figura 20. Inmovilización de la carga e inactivación de canales activados por voltaje. (A) Parte superior. Trazos representativos que muestran el curso temporal de corrientes capacitivas no lineales evocadas por una despolarización de 4 ms de duración a +20 mV posterior a la aplicación de un prepulso (PP) condicionante de 500 ms de duración desde -100 hasta 0 mV. Parte inferior. El trazo de corriente capacitiva no lineal marcado como a - c muestra el componente sensible a PP aislado mediante la substracción digital de a y c. El trazo marcado como c muestra el componente de las corrientes capacitivas insensible a PP. (B) Trazos representativos de la corriente de sodio evocadas por una despolarización de 4 ms de duración a -20 mV posterior a la aplicación de un prepulso (PP) condicionante de 500 ms de duración desde -100 hasta 0 mV. (C) Trazos representativos de la corriente de potasio tipo A (IA) evocadas por una despolarización de 80 ms de duración a -20 mV posterior a la aplicación de un prepulso (PP) condicionante de 500 ms de duración desde -100 hasta 0 mV. (D) Trazos representativos de la corriente de bario evocadas por un protocolo de tres pulsos ilustrado en la parte superior del panel D. P1 y P2 representan despolarizaciones de 40 ms de duración a 0 mV antes y después de la aplicación de un PP de 500 ms de duración desde -100 hasta +40 mV. (E) Q_{on} , I_{Na} , I_A e I_{Ba} en función del voltaje de PP. La línea continua para I_A y I_{Na} representan el mejor ajuste a la Eqn., 6.

de la inactivación de estado estable de los canales de sodio y potasio tipo A. La Fig. 20B y C, muestran experimentos en los cuales la dependencia del voltaje de la inactivación de canales de sodio y potasio tipo A fue evaluada usando un protocolo similar al utilizado para evaluar la inmovilización de la carga, la diferencia radica en la amplitud y duración del pulso de prueba (ver protocolo en la parte superior de cada panel).

La corriente de sodio y la de potasio tipo A evocadas por un pulso de prueba a -20 mV posterior a un PP de 500 ms se ilustran en la Figura 20B y C. El incremento en la amplitud del prepulso (PP) resultó en la inactivación de tanto la corriente de sodio como la de potasio (Figs. 20B y C). La curva de inactivación de estado estable para la corriente de sodio se ilustra en la Fig. 20E; cuadrados abiertos). La corriente de sodio comienza a inactivar a potenciales más positivos que -90 mV y se inactiva casi completamente usando un PP cercano a -40 mV. En el caso de la corriente de potasio tipo A, esta se inactiva casi completamente a potenciales cercanos a -60 mV. La curva de

inactivación de estado estable para la corriente de potasio tipo A se ilustra en la Fig. 20E; triángulos cerrados). Las curvas de inactivación de tanto la corriente de sodio así como la de potasio tipo-A fueron descritas por una función de Boltzmann de la forma:

$$A/A_{max} = [1 + \exp((V - V_b)/k)]^{-1} \quad (\text{Eqn. 6})$$

donde A representa el valor pico de la corriente después del PP; A_{max} representa el valor de corriente o carga máximo, V_b es el voltaje medio de inactivación, y k , una medida de la pendiente.

Los parámetros Boltzmann promedio de V_b y k para Q_{on} fueron: -67.2 ± 1.6 mV y 10.6 ± 1.4 mV, respectivamente. Los parámetros Boltzmann promedio de V_b y k para la corriente de sodio fueron: $-67. \pm 0.3$ mV y 6.7 ± 0.3 mV, respectivamente. Los parámetros Boltzmann promedio de V_b y k para la corriente de potasio tipo A fueron: -78.7 ± 1.7 mV y 8.9 ± 1.6 mV, respectivamente.

Como se muestra en la Fig. 20E, la dependencia de voltaje de la disponibilidad de carga (Q_{on}) es muy similar a la dependencia de voltaje de la disponibilidad de corriente de sodio, lo cual sugiere que la fracción del movimiento de carga que se inmoviliza dentro de este rango de voltaje (desde -90 a -40 mV) se origina principalmente de canales de sodio, con quizá una pequeña contribución de canales de potasio.

Por otro lado, una fracción de la inmovilización del movimiento de carga debería de originarse de la inactivación de canales de calcio tipo N, debido a que: 1) estos canales también exhiben inmovilización de carga asociada a inactivación voltaje dependiente y 2) estas neuronas expresan este tipo de canales.

En la Fig. 20D evaluamos la inactivación de la corriente de calcio usando un protocolo de tres pulsos el cual consiste de dos pulsos de prueba de 40 ms de duración a un valor de voltaje que produce la corriente entrante máxima antes (P1) y después (P2) de un prepulso (PP) de 500 ms de duración aplicado a diferentes voltajes.

La relativamente breve duración de los PP de este protocolo permite evaluar la dependencia de voltaje de una de los tres tipos de inactivación que se han descrito para estos canales, la inactivación rápida (aquella que ocurre en una ventana de tiempo de algunas decenas de ms (100-500 ms) y que esta asociada a mecanismos de inmovilización de carga (Jones y Marks 1989; Patil., 1998). Usamos el primer pulso de prueba P1 para corregir (debido a posible 'run-down' de la corriente y la recuperación de un componente de inactivación que ocurre lentamente) la relación entre P2 y el voltaje del PP. Usando este protocolo, la inactivación máxima se observa a voltajes que evocan la corriente entrante máxima, mientras que la amplitud de la inactivación disminuye a voltajes extremos (Fig. 20E, diamantes abiertos). Esto deriva de la inactivación tipo-U, la cual se caracteriza por la forma de esta curva de inactivación y la ausencia de inactivación corriente (calcio dependiente), lo cual se origina de un modo de inactivación que se ha denominado inactivación preferencial de estado cerrado (Jones y Marks, 1989; Patil et al., 1998). El protocolo de voltaje empleado para evaluar la inactivación de los canales tipo N induce una reducción del 40% en el valor de la relación P2/P1 al voltaje del PP en el rango de -80 a -40 mV (Fig. 20E). Nótese que la inactivación de la corriente de calcio es incompleta y alcanza un valor cercano al 80% dentro del rango voltaje de -40 a 0 mV. Estos resultados sugieren que una fracción de la carga total que no se reduce por el PP en el rango de -80 a -40 mV ($\leq 1/3$ del total de la carga) podría originarse de canales de calcio. La separación de dos componentes del movimiento de carga mediante substracción digital se ilustra en la Fig. 20A. El trazo de corriente marcado como $a-c$ muestra el componente de la carga que es sensible al prepulso, probablemente la carga de compuerta que se origina de canales de sodio y canales de potasio tipo A, mientras que el trazo marcado como c muestra el componente de la carga que no es sensible a prepulsos, probablemente la carga que se origina de canales de calcio. Estos experimentos de inmovilización de la carga e inactivación sugieren que, de un gran número de canales presentes en la membrana somática de las neuronas del GCS, principalmente los canales de

sodio y calcio son los que contribuyen en una gran proporción al movimiento de carga total que hemos registrado.

Análisis de ruido en condiciones no estacionarias.

Usamos el análisis de grupos de fluctuaciones para obtener una estimación del número de canales de sodio y calcio presentes en la membrana de las neuronas del GCS.

El análisis de fluctuaciones típicamente requiere de un gran número de mediciones sucesivas

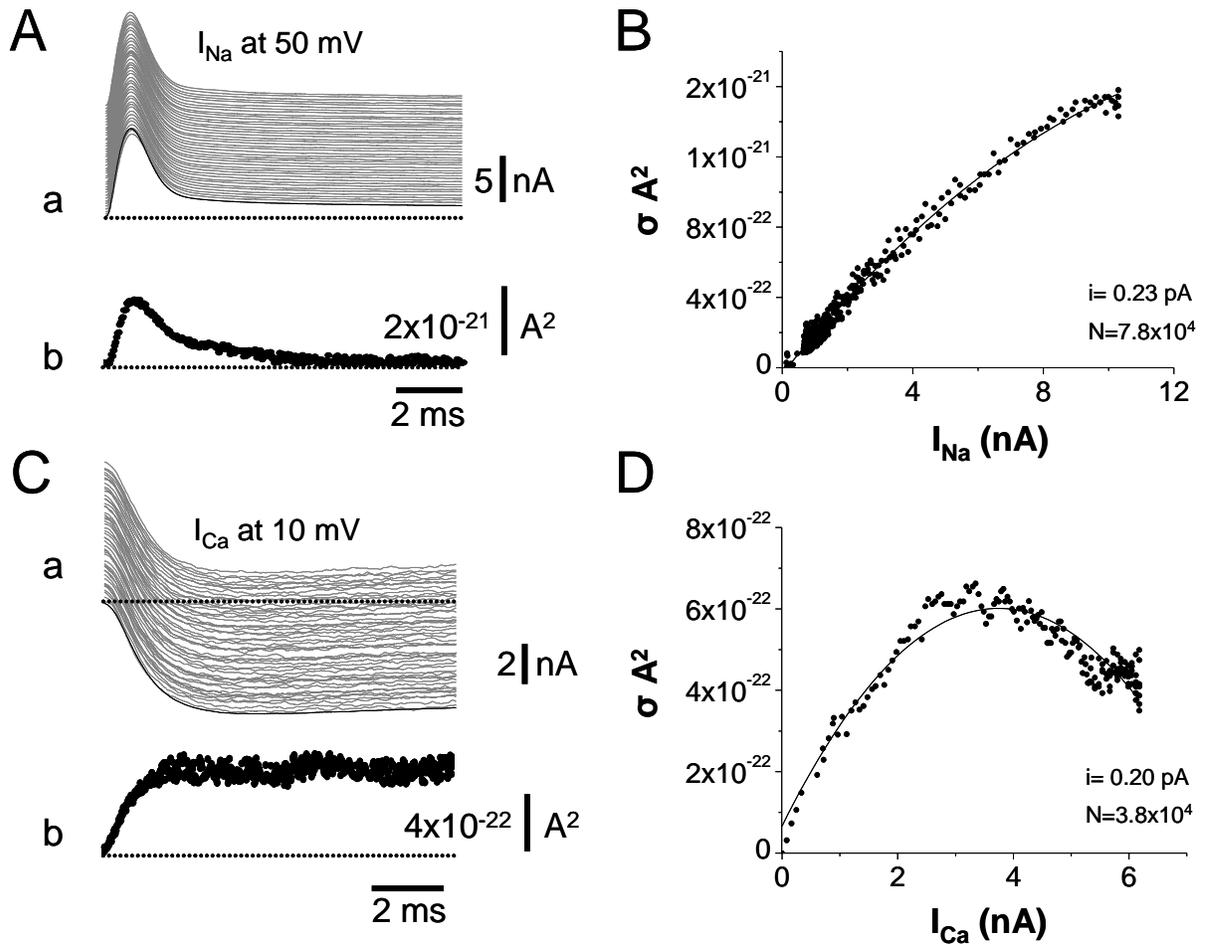


Figura 21. Análisis de ruido en condiciones no estacionarias de las corrientes macroscópicas de sodio y calcio. Grupos de corrientes se generaron en series de 80 a 200 trazos mediante la repetición de pulsos de voltaje desde -100 mV a los valores de voltaje indicados en cada panel y aplicados cada 4 s. Los datos fueron adquiridos a 50 KHz y filtrados a 3 KHz, la varianza para cada valor de la corriente se estimó en grupos de 40 trazos y promediados en el total de las series (200 trazos). La varianza de fondo (aquella que se origina del aparataje y de fenómenos de ruido de membrana no asociados a la activación de los canales) y considerada como aquella registrada durante el potencial de mantenimiento previo a la aplicación del pulso de prueba se restó de la varianza (σ^2). Curso temporal de una familia de corrientes macroscópicas de sodio y de calcio (A y C, respectivamente; trazos en gris). El promedio de la corriente de sodio y de calcio se ilustra en ambos casos (línea gruesa). (Ab y Cb) Curso temporal de la varianza de la corriente de sodio y calcio, respectivamente. (B y D) Relación varianza *vs* corriente promedio de los datos mostrados en A y C, respectivamente. Las líneas a través de los símbolos representan el mejor ajuste a la Eqn., 4 (ver Sigworth, 1980). Para la corriente de sodio (I_{Na}): $i = 0.23$ pA, $N = 7.8 \times 10^4$; y para la corriente de calcio (I_{Ca}): $i = 0.20$ pA, $N = 3.8 \times 10^4$.

en respuesta a un estímulo fijo, en este caso una despolarización. La teoría requiere de tres suposiciones: 1) La población de canales es homogénea, 2) esta compuesta por un número finito de canales que operan de manera independiente y 3) los canales pueden operar en dos posibles estados, uno conductor y otro no conductor (Sigworth, 1980; Alvarez et al., 2002). Cuando la probabilidad de estar en el estado conductor es máxima, la teoría predice una relación parabólica entre la varianza de la corriente (σ^2) y la corriente promedio (I), la cual puede usarse para estimar el número de canales (N) y la amplitud de la corriente unitaria (i).

La Fig. 21A y C, muestran 50 registros representativos de corrientes macroscópicas de la corriente de sodio (I_{Na}) y de la corriente de calcio (I_{Ca}), trazos en gris, así como el curso temporal de la corriente promedio (trazo en línea gruesa). En la misma (Fig. 21A y C), los paneles indicados como b, muestran el curso temporal de la varianza (σ^2) de tanto la I_{Na} y la I_{Ca} , estimada al voltaje indicado en cada panel. La relación de la varianza *vs* corriente promedio para la corriente de sodio y la corriente de calcio se muestran en la Fig. 21B y D, respectivamente. Las líneas continuas en los

paneles B y D, muestran el ajuste de la Eqn., 4 (ver métodos), permitiendo la estimación de la amplitud de la corriente unitaria y del número de canales, indicados en cada panel. Estos resultados muestran el número de canales de Na^+ ($7.8 \times 10^4 \pm 0.39 \times 10^4$, $n = 7$) y Ca^{2+} ($3.8 \times 10^4 \pm 0.27 \times 10^4$, $n = 5$) en la membrana somática de una neurona del GCS cultivada por 24 hrs.

La activación de proteínas G produce inhibición del movimiento de carga intramembranal

Una estrategia general para establecer la participación de proteínas G en la modulación de canales iónicos, requiere del uso vía la pipeta de patch de análogos de nucleótidos de guanina que no se hidrolizan (Andrade, 1994). La Fig. 22A muestra el efecto de la diálisis del $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($300 \mu\text{M}$; un análogo no hidrolizable del GTP, que induce una activación no selectiva y tónica de las proteínas G). Este procedimiento resulta en un decremento en la amplitud de las corrientes capacitiva no lineales y del movimiento de carga (Fig. 22B) cuando se comparan con el control (Fig. 22A, $n = 9$). La magnitud de la inhibición inducida por $\text{GTP}\gamma\text{S}$ depende de la magnitud del pulso de prueba. Una inhibición máxima $\sim 60\%$ se observa cercana a los -30 mV , mientras que solo un $\sim 37\%$ de inhibición se observa se a despolarizaciones extrema (Fig. 22B; triángulos sólidos invertidos).

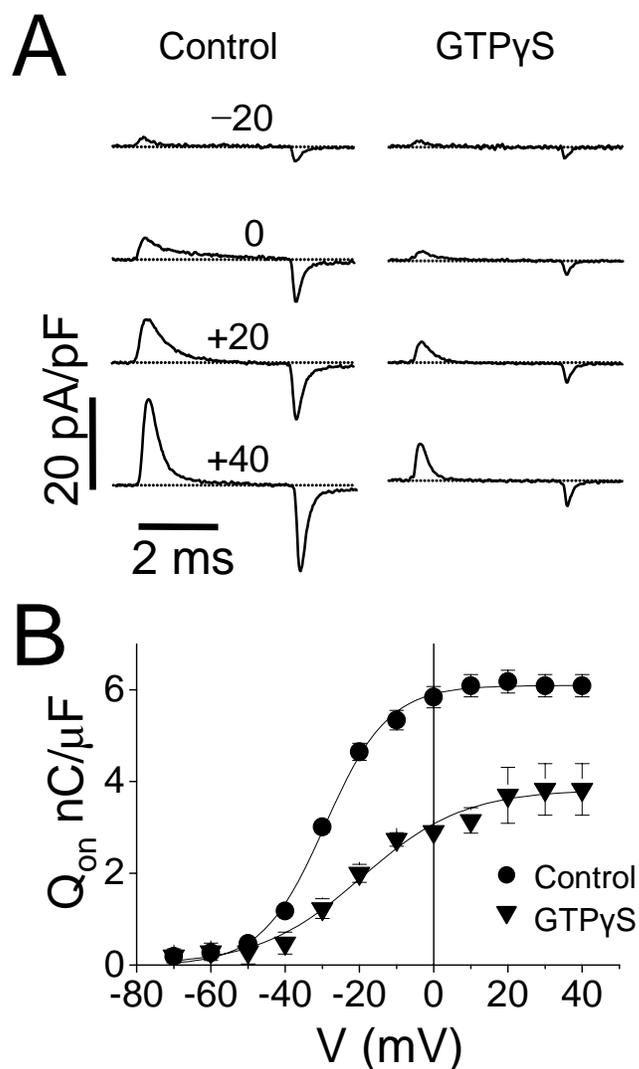


Figura 22. La activación de las proteínas G inducida por GTP γ S modula el movimiento de carga. (A) Corrientes capacitivas no lineales evocadas por pulsos despolarizantes de 4 ms de duración a voltajes indicados en cada trazo. Los trazos de corriente representan el promedio de registros representativos para neuronas control ($n = 14$) y neuronas dializadas con GTP γ S ($n = 9$). (B) Curvas Q_{on} vs V para neuronas control (círculos cerrados) y neuronas dializadas con GTP γ S (triángulos cerrados invertidos). Para cada condición la línea continua a través de los símbolos representa el mejor ajuste a la Eqn., 5 (ver Tabla 3).

Esta forma de dependencia del voltaje de la inhibición del movimiento de carga no lineal se manifiesta en su curva de activación con un desplazamiento hacia valores positivos en el eje del voltaje. La Fig. 22B recapitula datos experimentales para las curvas de de Q vs V para neuronas en

condiciones control y aquellas dializadas con GTP γ S, evaluadas mediante el ajuste de una función de Boltzmann (Eqn., 5). Tres efectos son evidentes en neuronas dializadas con GTP γ S: 1) un decremento de $\sim 34\%$ en Q_{max} ; 2) Un desplazamiento positivo del parámetro V_b de ~ 10 mV y 3) un incremento de $\sim 63\%$ en k ($n = 9$; ver tabla 1). Lo anterior podría implicar que la activación no-selectiva de proteínas G inducida por GTP γ S modifica la dependencia del voltaje y/o el número de canales disponibles de una o más de las poblaciones de canales activados por voltaje presentes en la membrana somática de las neuronas del GCS.

Inhibición del movimiento de carga por noradrenalina y subunidades G β 1 γ 4

El movimiento de carga es inhibido por la activación de receptores acoplados a proteínas G y por la sobre-expresión heteróloga de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (G $\beta\gamma$). Los efectos de la noradrenalina (NA; 10 μ M) y el de las subunidades G β 1 γ 4, se parece a aquel inducido por la activación directa de proteínas G usando GTP γ S. La Fig. 23 muestra que las corrientes capacitivas registradas con despolarizaciones moderadas de la membrana plasmática se inhiben de una manera considerable por noradrenalina (NA; 10 μ M) con respecto a aquellas registradas a despolarizaciones extremas. Una inhibición máxima inducida por NA $\sim 25\%$ se observa cercana a los -20 mV, mientras que solo un $\sim 3\%$ de inhibición se observa se a $+40$ mV (Fig. 23B; triángulos sólidos).

Las subunidades G β 1 γ 4 mimetizan parte del efecto de la NA. La sobre-expresión de las subunidades G β 1 γ 4 inhibe el movimiento de carga $\sim 41\%$ a -20 mV, mientras que solo un 14% de la inhibición se observa a -40 mV (Fig. 23B; diamantes sólidos). Un efecto adicional en la fase de caída de las corrientes capacitivas al ON, también se observa especialmente con NA; sin embargo no exploramos este efecto en detalle.

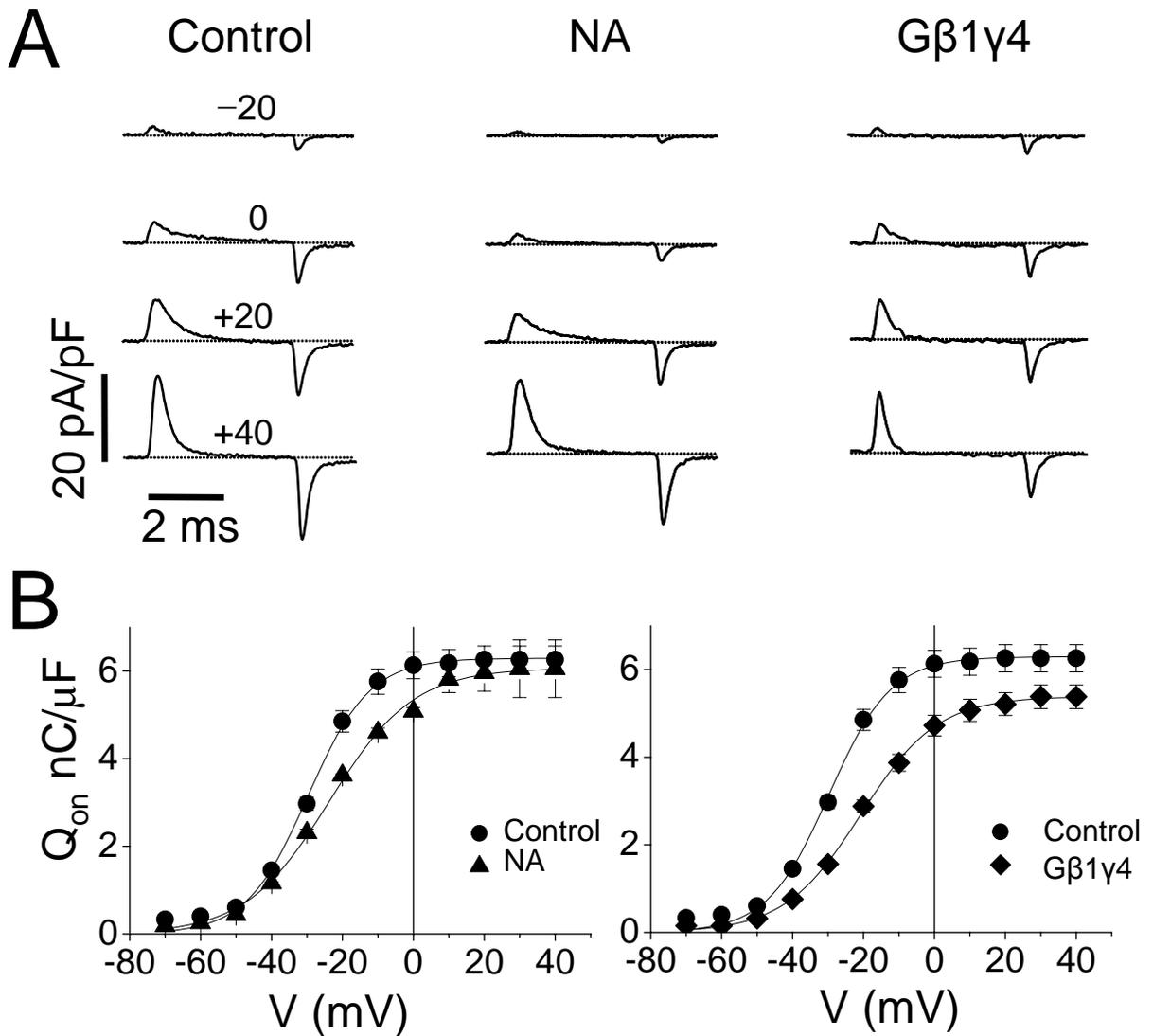


Figura 23. La NA y las subunidades $\beta 1\gamma 4$ de las proteínas G modulan el movimiento de carga. (A) Corrientes capacitivas no lineales evocadas por pulsos despolarizantes de 4 ms de duración a voltajes indicados en cada trazo. Los trazos de corriente representan el promedio de registros representativos para neuronas control ($n = 14$), neuronas expuestas a NA ($100 \mu\text{M}$; $n = 14$) y neuronas con sobre-expresión de subunidades $G\beta 1\gamma 4$ ($n = 5$). Las barras de calibración aplican a todos los trazos. (B) Curvas Q_{on} vs V para neuronas control (círculos cerrados), neuronas expuestas a NA (triángulos cerrados) y neuronas con sobre-expresión de subunidades $G\beta 1\gamma 4$ (diamantes cerrados). Para cada condición la línea continua a través de los símbolos representa el mejor ajuste a la Eqn., 5 (ver Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros del ajuste a la Eqn., 5, para los datos mostrados en las Figs. 21 y 22.

	Q_{max} (nC/ μ F)	V_h (mV)	k (mV)
Control (14)	6.1 ± 0.6	-29.2 ± 0.5	8.4 ± 0.4
NA (14)	6.0 ± 0.7	$-23.6 \pm 0.6^*$	$11.8 \pm 0.5^*$
Gβ1γ4 (5)	$5.3 \pm 0.4^*$	$-20.7 \pm 0.3^*$	$10.8 \pm 0.2^*$
GTPγS (9)	$3.8 \pm 0.1^*$	$-19.4 \pm 1.8^*$	$13.7 \pm 1.4^*$
GDPβS (4)	6.2 ± 0.6	-29.7 ± 0.5	8.6 ± 0.4

Por otro lado, en neuronas dializadas con GDP β S, un análogo no hidrolizable del GDP, que minimiza la activación de proteínas G, previene las acciones de la NA (datos no mostrados). Por lo tanto los efectos de la NA se pueden describir como dependientes de proteínas G. Esto es importante, pues recientemente se han descrito acciones de agonistas de una manera independiente de la activación de proteínas G. Es importante mencionar que en otro grupo de neuronas las cuales fueron dializadas con GDP β S, este procedimiento tuvo efectos no significativos, cuando se compararon con neuronas del grupo control, dializadas con GTP (ver Tabla 3). El ajuste de la función de Boltzmann (Eqn., 5) a las relaciones Q_{on} -V de las Figs. 23B (línea continua), reveló que uno de los efectos de NA ($n = 14$) y de las subunidades G β 1 γ 4 ($n = 5$) consistió en un desplazamiento de 6 mV y 9 mV, respectivamente, en V_h ($P < 0.05$ ver Tabla 3). En neuronas expuestas a la NA observamos un decremento significativo en k , una medida de la sensibilidad al voltaje, mientras que Q_{max} fue poco afectada (Tabla 3). Sin embargo, es importante destacar que en neuronas en las cuales se sobre-expresaron las subunidades G β 1 γ 4, Q_{max} disminuyó ~13% con respecto a neuronas control, lo cual podría ser una indicación de que las subunidades G β 1 γ 4 inducen dos efectos, uno voltaje dependiente y que es similar a aquel inducido por la NA, y el otro voltaje independiente, similar a aquel inducido sobre Q_{max} por GTP γ S.

Las siguientes observaciones anticipan que parte de los efectos de la inhibición del movimiento de carga inducido por la activación de proteínas G podrían estar relacionados a la inhibición de de la población de canales de calcio tipo N. 1) En estas células, ~80% de la corriente de calcio fluye a través de canales tipo-N (plumier et al., 1989; Mintz et al., 1992; Garcia-Ferreiro et al., 2001); 2) Los canales de calcio tipo-N son modulados directamente e indirectamente modulados por proteínas G (p. e., interacción directa de los canales tipo N con por proteínas G o por vías de señalización celular iniciadas por la activación de receptores acoplados a proteínas G (Jones y Elmslie, 1997; Ikeda y Dunlap , 1999; Elmslie 2003); 3) La inhibición de los canales iniciada o mediada por proteínas G altera las propiedades biofísicas de de los canales de una manera similar a como ocurre a nivel del movimiento de carga (p. e., mecanismos voltaje-dependientes e independientes; ver Jones y Elmlie 1997; Ikeda y Dunlap 1999; Elmslie 2003; Jones, 2003) y 4) Parte de la inhibición voltaje dependiente de la corriente tipo N iniciada por GTP γ S, tiene un correlato a nivel de la inhibición de corrientes de compuerta de canales tipo N expresados en un sistema heterólogo (Jones et al., 1997).

Inhibición de las corrientes de calcio por activación de proteínas G

En concordancia con observaciones previas (Elmslie et al., 1990), la Fig. 24A muestra que la activación no selectiva de proteínas G con GTP γ S, inhibe las corrientes de bario (I_{Ba}) que fluyen a través de canales de calcio tipo-N. De manera análoga a la inhibición del moviendo de carga que se observo en neuronas dializadas con GTP γ S, la inhibición de las I_{Ba} es parcialmente voltaje dependiente. La inhibición máxima de las corrientes de cierre, también conocidas como corrientes de cola, ~63% ocurre a valores de voltaje ~ -10 mV y alcanzan un valor de ~36% a despolarizaciones extremas (+40 mV; Fig. 24B; triángulos cerrados invertidos).

En todas las neuronas evaluadas la curva de activación de la corriente de calcio fue asimétrica en todas las condiciones evaluadas. Este tipo de respuesta ha sido descrita apropiadamente por una

función de Boltzmann doble (Ikeda, 1991; García-Ferreiro et al., 2001), una característica que ha sido interpretada como el resultado de la existencia de dos poblaciones funcionales de canales, el modelo ‘willing-reluctant’ (una población de canales que no esta modulada y otra que representa la población de canales modulada por proteínas G, ver Bean 1989; Elmslie et al., 1990; Jones y Elmslie 1997; Ikeda y Dunlap, 1999; Elmslie 2003). Sin embargo, nosotros usamos una función de Boltzmann simple, para ajustar las curvas de activación de la corriente de bario en función del voltaje (I_{Ba} vs V) y poder hacer una comparación directa con las curvas de activación del movimiento de carga (Q_{on} vs V), de acuerdo a la siguiente función:

$$I = I_{max} / [1 + \exp((-V + V_b) / k)] \quad (\text{Eqn. 7})$$

donde, I_{max} representa la amplitud máxima de la corriente a despolarizaciones extremas por unidad de capacitancia lineal, V_b es el valor de voltaje donde el 50% de I_{max} ocurre y k es una medida de la pendiente. La Fig. 24B resume los datos experimentales para las curvas de activación de I_{Ba} vs V para condiciones control (círculos cerrados), y para neuronas dializadas con GTP γ S (triángulos cerrados invertidos). Tres efectos son evidentes en neuronas dializadas con GTP γ S: 1) un decremento de ~33% en I_{max} ; 2) un desplazamiento positivo del parámetro V_b de ~10 mV y 3) un incremento ~74% en k (n = 9; ver Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros del ajuste a la Eqn., 7, para los datos mostrados en las Figs. 23 y 24.

	I_{max} (pA/ μ F)	V_b (mV)	k (mV)
Control (15)	57.4 \pm 1.0	-11.0 \pm 1.1	8.1 \pm 0.9
NA (16)	54.7 \pm 2.2	6.2 \pm 2.7*	17.6 \pm 2.2*
Gβ1γ4 (5)	47.3 \pm 1.6*	3.5 \pm 2.3*	16.5 \pm 1.9*
GTPγS (9)	38.4 \pm 0.6*	2.5 \pm 1.0*	14.1 \pm 0.8*
GDPβS (6)	67.8 \pm 0.5*	-13.4 \pm 0.4*	6.5 \pm 0.4*

La participación selectiva de de diferentes vías de señalización inhibitorias que modulan canales de calcio tipo-N, se demuestra mediante el uso específico un agonista y mediante la sobre-expresión de subunidades G β 1 γ 4. La Fig. 25A, muestra que una dosis saturante de NA (100 μ M; ver Zhou et al., 1997) inhibe parcialmente I_{Ba} en estas neuronas. De acuerdo con reportes previos (Beech et al., 1992) una parte de la inhibición de la I_{Ba} inducido por la NA no se es evidente a despolarizaciones de membrana que alcanzan valores extremos (p. e., ~45% de la inhibición de I_{Ba} se observa a -10 mV, mientras que solo un ~6% se observa a +40mV), y por esta característica la inhibición de la corriente de calcio inducida por NA se ha descrito como ser principalmente voltaje-dependiente (Bean, 1989; Beech et al., 1992; Elmslie 2003). Consecuentemente, el efecto de la inhibición inducida por NA se puede adscribir al significativo desplazamiento de ~+17 mV en V_b y al incremento de ~9 mV en k observado en la curva de activación, con poco o ningún efecto en I_{max} (n = 16; P < 0.05; ver Tabla 4). Reportes previos han aportado fuertes evidencias en favor de la idea que la inhibición voltaje dependiente que es inducida por NA resulta de una interacción directa entre la subunidad que conforma el poro del canal de calcio y el complejo G β y de las proteínas G (Herlitz et al., 1996; Ikeda 1996; De Ward et al., 1997; García et al., 1998). La Fig. 25A y B muestra el efecto de las subunidades G β 1 γ 4 sobre la corriente de calcio.

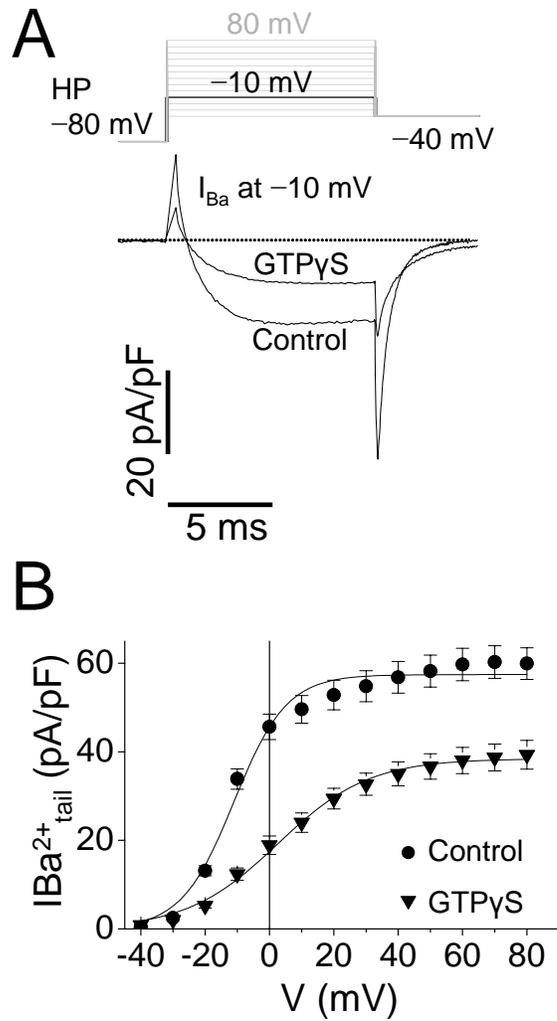


Figura 24. La diálisis intracelular con GTP γ S inhibe las corrientes de calcio. (A) Las corrientes de bario (I_{Ba}) fueron evocadas usando el protocolo mostrado en la parte alta de la Figura. Trazos representativos y superimpuestos de la I_{Ba} de neuronas control ($n = 15$) y de neuronas dializadas con GTP γ S ($n = 9$). (B) Promedios de la relación de las corrientes de cierre de I_{Ba} ($I_{Ba^{2+}}^{tail}$) vs V para neuronas control (círculos cerrados) y neuronas dializadas con GTP γ S (triángulos cerrados invertidos) de los datos mostrados en el panel A. La densidad de la $I_{Ba^{2+}}^{tail}$ fue medida durante una repolarización parcial a -40 mV como el promedio de la corriente durante un periodo de $100 \mu s$ posterior a $400 \mu s$ del final del pulso de prueba. Para cada condición la línea continua a través de los símbolos representa el mejor ajuste a la Eqn., 7 (ver Tabla 4).

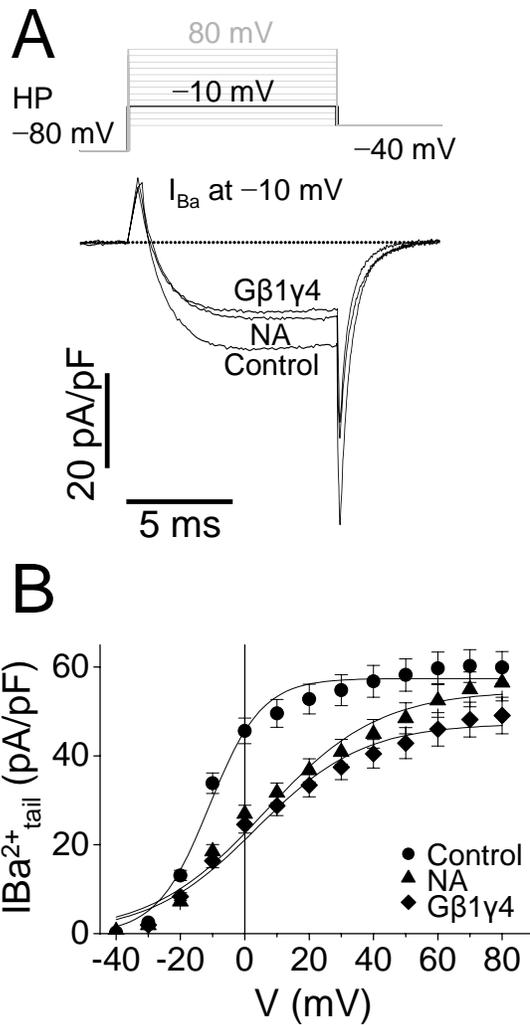


Figura 25. La NA y la subunidades $\beta 1\gamma 4$ de las proteínas G inhiben las corrientes de calcio. (A) Las corrientes de bario (I_{Ba}) fueron evocadas usando el protocolo mostrado en la parte alta de la Figura. Trazos representativos y superimpuestos de la I_{Ba} de neuronas control ($n = 15$), neuronas expuestas a NA ($100 \mu M$; $n = 16$), y neuronas con sobre expresión de subunidades $G\beta 1\gamma 4$ ($n = 5$). (B) Promedios de la relación de las corrientes de cierre de I_{Ba} ($I_{Ba_{tail}}$) vs V para neuronas control (círculos cerrados), neuronas expuestas a NA (triángulos cerrados) y neuronas con sobre expresión de subunidades $G\beta 1\gamma 4$ (diamantes cerrados) mostradas en el panel A. La densidad de la $I_{Ba_{tail}}$ fue medida durante una repolarización parcial a -40 mV como el promedio de la corriente durante un periodo de $100 \mu s$ posterior a $400 \mu s$ del final del pulso de prueba. Para cada condición la línea continua a través de los símbolos representa el mejor ajuste a la Eqn., 7 (ver Tabla 4).

La sobre-expresión del las subunidades $G\beta 1\gamma 4$ reproduce los efectos que la NA induce en la corriente de I_{Ba} (Fig. 25A y B; $n = 5$; $P < 0.05$, ver Tabla 4). Se ha reportado que la sobre-expresión de la subunidad $G\beta$ con o sin el cDNA que codifica para las subunidad $G\gamma$ inhibe las corrientes de calcio de una manera voltaje dependiente, incrementa el índice de facilitación y parcialmente ocluye los efectos de la NA (Herlitz et al., 1996; García et al., 1998).

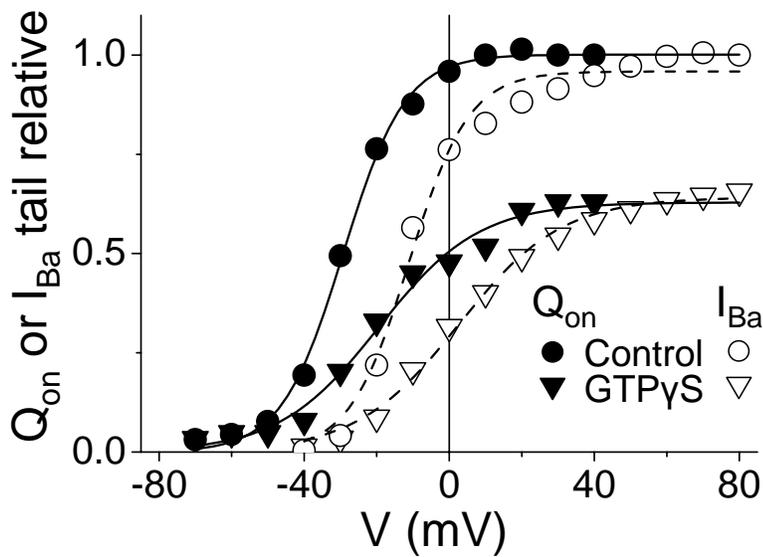


Figura 26. Comparación entre las curvas de activación del movimiento de carga y la corriente de calcio en condiciones de modulación por proteínas G. Valores promedio de las relaciones Q_{on} vs V y $I_{Ba_{tail}}$ vs V provenientes de la figura 22B y 24B, respectivamente y normalizada al valor máximo de la condición control. Q_{on} (símbolos abiertos), $I_{Ba_{tail}}$ (símbolos cerrados) de neuronas control (círculos) y neuronas dializadas con GTP γ S (triángulos invertidos).

Sin embargo es importante resaltar que en el presente trabajo encontramos que neuronas en donde se sobre-expreso el complejo $G\beta 1\gamma 4$ el parámetro $I_{Ba_{max}}$ se redujo de manera considerable ($\sim 17\%$; comparar con la inhibición observada en neuronas expuestas a NA, de 6%). Este efecto podría

indicar que la sobre-expresión de las subunidades $G\beta 1\gamma 4$ induce una inhibición mixta de la I_{Ba} , caracterizada por efectos voltaje-dependientes y voltaje-independientes.

A manera de recapitular, a partir del presente estudio y tomando en cuenta previas observaciones podemos concluir que la activación no selectiva de proteínas G mediante el uso de GTP γ S induce dos patrones de inhibición en la corriente de calcio. Uno de estos patrones es voltaje dependiente, el otro voltaje independiente. A partir de esta observación se puede concluir diferentes combinaciones de proteínas G inducen diferentes combinaciones de efectos tanto voltaje dependientes como voltaje independientes.

Como puede apreciarse en las Figs. 22, 23, 24, 25 y 26, existe una correlación cualitativa entre las acciones del GTP γ S, NA y la subunidades $G\beta 1\gamma 4$ tanto en el movimiento de carga y las corrientes de calcio tipo-N. Por un lado, GTP γ S y NA inducen una inhibición voltaje dependiente sobre el movimiento de carga así como en las corrientes de calcio tipo-N. Lo anterior se deriva del corrimiento positivo en el parámetro V_b que se observa en las curvas de activación de tanto el movimiento de carga (Q_{on} vs V) como en aquella de la corriente de calcio ($I_{Ba_{tail}}$ vs V). La Fig. 23B muestra una recuperación completa de Q_{on} a valores de voltaje cercanos +40 mV, pero una inhibición considerable de la corriente de calcio se observa al mismo valor de voltaje (Fig. 25B). Una posibilidad para explicar el hecho de que la NA aun inhibe los canales de calcio a +40 mV, pudiera ser que a ese valor del potencial de membrana las proteínas G inhiben a los canales de calcio tipo-N en los estados cercanos al estado abierto, en transiciones donde poco movimiento de carga ocurre (Bezanilla, 2000). Sin embargo, estos estados, cercanos al estado abierto, pudieran ser fuertemente afectados y el acople excitación-conducción podría ser menos eficiente (Jones et al., 1997).

Por otro lado, nótese que tanto el GTP γ S y las subunidades $G\beta 1\gamma 4$ también inhiben la corriente de calcio y el movimiento de carga de una manera tónica a despolarizaciones extremas

además de alterar la dependencia de voltaje de las curvas de activación (Fig. 23B y 25B). Por lo tanto basado en las comparaciones anteriores, en este trabajo proponemos que parte de los efectos a nivel del movimiento de carga inducidos por la activación de proteínas G se originan de la inhibición de la carga de activación de los canales tipo-N. En un estudio previo, del laboratorio de David Yue (Jones et al., 1997), donde se evaluó el efecto de la activación de proteínas mediante el uso de GTP γ S en canales de calcio tipo-N expresados en sistema modelo, se propuso que las proteínas G afectan tanto el movimiento del sensor de voltaje así como la el acople excitación-apertura de los canales tipo-N. Nuestros resultados, usando un sistema nativo, son consistentes con esta hipótesis.

Inhibición de la corriente de sodio

Algunas observaciones sugieren que: 1) no toda la modulación que se observa a nivel del movimiento de carga, y que resulta de la activación de proteínas G, se puede adscribir solamente a la inhibición de los canales tipo N y 2) uno o más poblaciones de canales operados por voltaje podrían estar involucradas en los efectos observados. Para empezar, el efecto cualitativo del GTP γ S es similar en tanto la corriente de calcio y el movimiento de carga, pero cuantitativamente diferente. Por ejemplo, en ambos casos GTP γ S inhibe $I_{Ba_{tail}}$ y Q_{max} . Sin embargo GTPS inhibe $I_{Ba_{tail}} \sim 60\%$ mientras que Q_{max} se inhibe $\sim 50\%$. Si asumimos que si toda la inhibición inducida por GTP γ S se debe únicamente a la inhibición de canales de calcio, esto implicaría que la carga que se origina de movimiento de los sensores de voltaje de canales de calcio contribuyen con $\sim 50\%$ del total de del movimiento de carga total que hemos registrado, una situación muy poco probable (ver discusión).

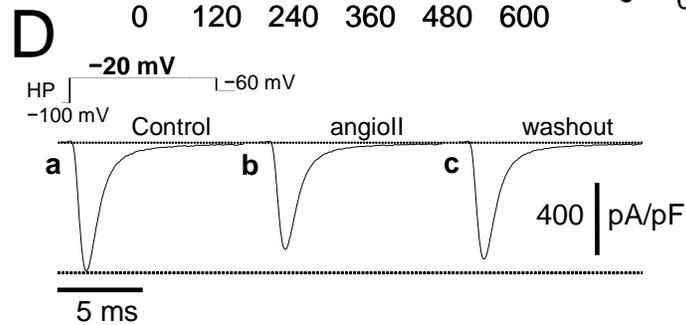
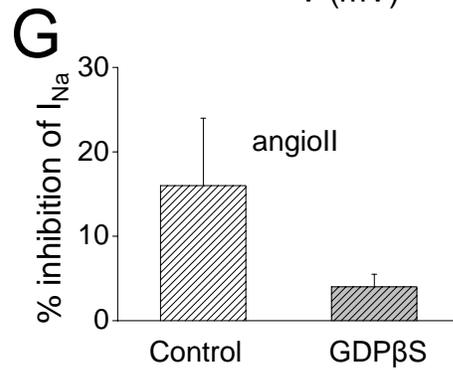
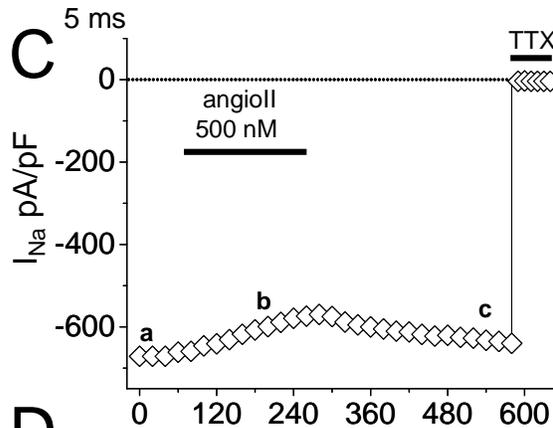
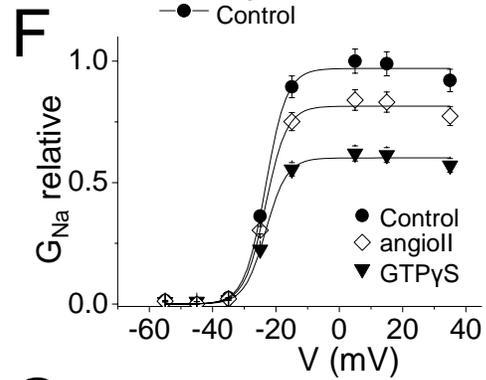
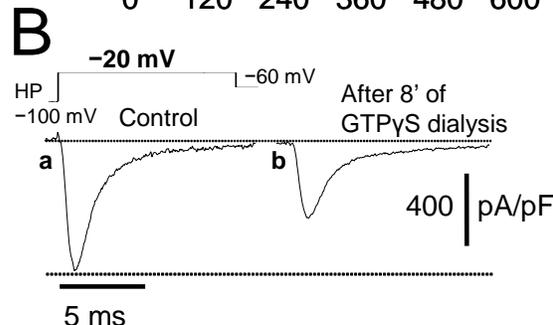
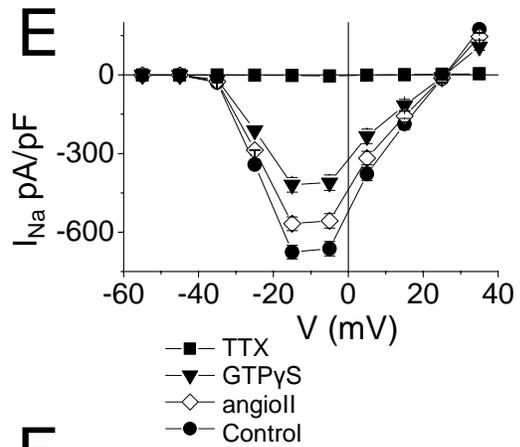
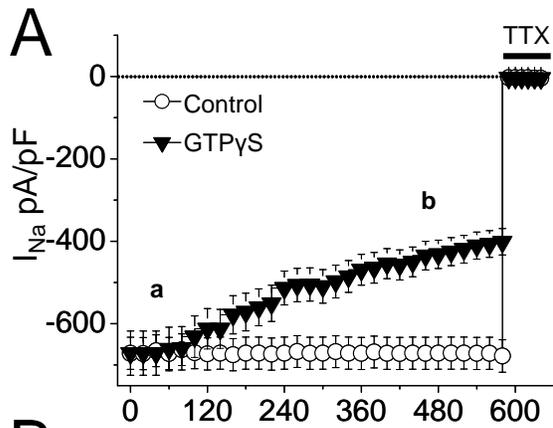


Figura 27. La diálisis intracelular de GTP γ S y angiotensina II inhiben las corrientes de sodio. (A) La corriente de sodio fue evocada mediante despolarizaciones de 10 ms de duración a -20 mV repetidas cada 10 s desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. El valor pico de la corriente de sodio fue medido y evaluado durante un periodo de 10 minutos. Neuronas control (círculos abiertos; $n = 6$) y neuronas dializadas con GTP γ S (triángulos cerrados invertidos; $n = 7$). La tetrodotoxina (TTX; 100 nM) fue aplicada durante el tiempo indicado por la barra en la parte superior del panel A. (B) La corriente de sodio fue evocada mediante despolarizaciones de 10 ms de duración a -20 mV repetidas cada 10 s desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Trazos representativos de neuronas control ($n = 12$) y neuronas dializadas con GTP γ S ($n = 7$). (C) El valor pico de la corriente de sodio fue medido y evaluado durante un periodo de 10 minutos. La corriente de sodio fue evocada mediante despolarizaciones de 10 ms de duración a -20 mV repetidas cada 10 s desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, previo, durante y posterior a la aplicación de angioII (500 nM; la duración de la aplicación de la angioII esta indicada por la barra). (D) Trazos representativos de la corriente de sodio previo, durante y posterior a la aplicación de angioII. (E) Relación de la corriente de sodio en función del voltaje (I_{Na} vs V) de neuronas control ($n = 6$; círculos cerrados), neuronas dializadas con GTP γ S ($n = 7$; triángulos cerrados invertidos), neuronas expuestas a angioII ($n = 12$; diamantes abiertos) y neuronas a TTX ($n = 3$; cuadros cerrados). (F) Relación conductancia de la conductancia de sodio en función del voltaje (G_{Na} vs V) en neuronas control, neuronas dializadas con GTP γ S y neuronas expuestas a angioII, datos a partir del panel E. La línea continua a través de los símbolos representa el mejor ajuste a la Eqn., 9. (F) Promedio de la inhibición inducida por angioII en neuronas dializadas con GTP ($n = 12$) y en neuronas dializadas con GDP β S ($n = 8$).

Dos observaciones nos condujeron a sospechar que la modulación de la población de canales de sodio podría contribuir a los efectos observados en el movimiento de carga. De hecho los experimentos descritos usando protocolo de inmovilización de carga así como los de inactivación, sugieren que esta población contribuye al movimiento de carga total. Al menos 2/3 del movimiento de carga se inmovilizan mediante el uso de un PP (Fig. 20A y E), y el mismo protocolo produce una inactivación completa de los canales de sodio (Fig. 20B y E).

Algunos estudios han mostrado que los canales de sodio operados por voltaje en neuronas centrales y sensoriales son blanco de modulación inhibitoria mediados por vías de señalización que dependen

de la activación de proteínas G (Cantrell y Catterall, 2001). Estas observaciones y hallazgos nos motivaron a buscar por evidencias electrofisiológicas de modulación de canales de sodio por activación de proteínas G en neuronas simpáticas.

La Fig. 27B (trazo marcado como control) muestra una corriente de sodio evocada por una despolarización a -20 mV y de 10 ms de duración. La aplicación de la tetrodotoxina (TTX) bloqueó por completo la corriente de sodio a todos los voltajes evaluados (Fig. 27E; cuadros cerrados). La relación de corriente vs voltaje (I-V; Fig. 27E) muestra que la corriente de sodio se activa a potenciales cercanos a -50 mV alcanzando la amplitud máxima cercana a -20 mV e invirtiendo a $+20$ mV. La curva de activación de los canales de sodio graficada como la conductancia normalizada en función del voltaje para neuronas control se ilustra en la Fig. 27F (círculos cerrados) la conductancia fue calculada a partir del valor pico de la corriente de sodio y obtenida a partir de la relación I-V (Fig. 27E) y usando la siguiente función:

$$G_{Na} = I_{Na} / (V - V_{Na}) \quad (\text{Eqn. 8})$$

donde V es el potencial de membrana y V_{Na} es el potencial de Nerst para el sodio. La línea a través de la curva de activación de la figura 27F (círculos cerrados) representa el mejor ajuste a los datos de una función de Boltzmann modificada:

$$G/G_{max} = [1 + \exp((V_b - V)/k)]^{-1} \quad (\text{Eqn. 9})$$

donde G_{max} es la conductancia máxima, V_b es el punto medio de activación y k una media de la pendiente. Los valores promedio de V_b y k analizados de esta manera fueron -23.1 ± 0.5 mV y 4.3 ± 0.4 mV, respectivamente.

El siguiente paso fue evaluar la estabilidad de la amplitud de la corriente de sodio con el propósito de buscar la presencia de “run-down”. En la figura 27A se ilustra el curso temporal de la amplitud de la corriente de sodio evaluada mediante el registro de 200 trazos sucesivos empleando un pulso de prueba a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV y aplicado cada

10s. La amplitud de la corriente de sodio registrada de esta manera fue poco afectada durante un curso temporal de 10 min (se observó un decremento $< \sim 5\%$ en la amplitud del trazo número 200 con respecto a la amplitud de la corriente al tiempo 0).

En un estudio previo (Song et al., 1989) se reportó que la corriente de sodio de las neuronas del GCS era insensible a los efectos de noradrenalina y acetilcolina. Sin embargo nosotros encontramos que la diálisis de $GTP\gamma S$ resultó en la inhibición de la corriente de sodio. La Fig. 27A y B muestran un trazo representativo de un experimento en donde se observó una inhibición $\sim 38\% \pm 3\%$, $n = 7$; $P < 0.05$ comparado al control). La Fig. 27F muestra que la inhibición afecta el valor de la conductancia máxima pero no altera su dependencia de voltaje. Por lo tanto, a juzgar por la ausencia de efectos del $GTP\gamma S$ en la cinética de la corriente y la dependencia de voltaje se puede concluir que la inhibición mediada por la activación no selectiva de proteínas G se caracteriza por ser voltaje independiente.

La aplicación extracelular de angiotensina II (angioII; 500 nM) reduce la amplitud de la corriente de sodio la figura 27C muestra un experimento representativo con una inhibición $\sim 16\%$ de la corriente de sodio inducida por angioII; de manera consistente el efecto inducido por angioII se revirtió de manera parcial y lenta tras el lavado de la angioII. AngioII no provocó ningún cambio aparente ni en la cinética de activación ni en la dependencia de voltaje de la corriente de sodio (Fig. 27D y F; diamantes abiertos) la velocidad del efecto de angioII sobre la corriente de sodio fue variable. En el experimento ilustrado en la Fig. 27C, se observó un intervalo de $\sim 100s$ a partir del comienzo en el cambio de la amplitud de la corriente (esto representa una estimación del momento en el que angioII ha activado a sus receptores) hasta el momento en que la inhibición se aproximó al punto medio del valor máximo. La velocidad de la acción de la angioII sobre la corriente de sodio es cualitativamente parecida a aquella observada en canales de calcio tipo-N y de potasio tipo M y

que también es iniciada por angioII (Beech et al., 1992; Shapiro et al., 1994) pero mucho mas lenta cuando se compara con aquella que se observa en los canales de calcio y que es mediada por

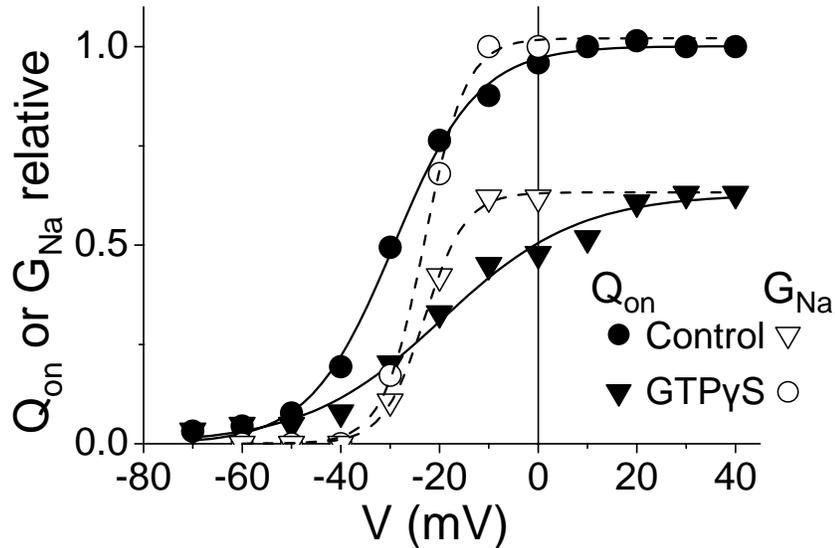


Figura 28. Comparación entre las curvas de activación del movimiento de carga y la corriente de sodio en condiciones de modulación por proteínas G. Valores promedio de las relaciones Q_{on} vs V y I_{Na} vs V provenientes de la figura 22B y 27D, respectivamente y normalizada al valor máximo de la condición control. Q_{on} (símbolos abiertos), I_{Na} (símbolos cerrados) de neuronas control (círculos) y neuronas dializadas con GTP γ S (triángulos invertidos).

noradrenalina (Zhou et al., 1997). Para determinar si la modulación de la corriente de sodio inducida por angioII dependía de la participación de proteínas G comparamos los efectos de la angioII en dos grupos de neuronas. Uno de ellos, el grupo control, dializado con GTP y el otro, dializado con GDP β S (un análogo no hidrolizable del GDP que minimiza la activación de proteínas G). Antes de empezar el registro de las corrientes se permitió un periodo cercano a 5 min para favorecer la diálisis del interior de la célula usando pipetas de baja resistencia (1- 1.2 M Ω). En neuronas dializadas con GDP β S la aplicación extracelular de angioII tuvo un efecto mínimo sobre la amplitud de la corriente de sodio. AngioII inhibió $\sim 16 \% \pm 6 \%$ la amplitud de las corrientes de sodio en

neuronas dializadas con GTP, mientras que la angioII inhibió $\sim 4 \% \pm 2 \%$ la amplitud de las corrientes de sodio en neuronas dializadas con GDP β S (Fig. 27G). Por lo tanto se concluye que los efectos inducidos por angioII involucran la activación de proteínas G.

La inhibición de la corriente de sodio mediada por angioII y GTP γ S es cualitativamente similar a la inhibición del movimiento de carga que se observa en condiciones de activación de proteínas G. Como puede apreciarse en la Fig. 28, existe una correlación de las acciones del GTP γ S tanto a nivel de las corrientes de sodio y así como a nivel del movimiento de carga. La diálisis de GTP γ S produjo un decremento neto de Q_{max} y GNa_{max} en las relaciones Q_{on} vs V, y G_{Na} vs V (Fig. 28). Con base en estas comparaciones, nosotros proponemos que parte de los efectos observados a nivel del movimiento de carga en condiciones de activación de proteínas G con GTP γ S podrían originarse de la inhibición de la carga de activación de los canales de sodio.

Tomando en cuenta las observaciones descritas en los párrafos anteriores se podría concluir que los efectos de la activación de proteínas G sobre el movimiento de carga derivan de una mezcla de patrones de inhibición que afectan a los canales de sodio y calcio tipo N.

DISCUSION

El movimiento de carga no lineal fue postulado por Hodgkin y Huxley (30) y posteriormente se registro por primera vez en preparaciones nativas (fibras de músculo esquelético, en axones, fibras de músculo cardiaco y en neuronas; Schneider y Chandler, 1973; Armstrong y Bezanilla, 1973; Keynes y Rojas 1974; Nonner et al., 1975; Adams y Gage, 1976; Kostyuk et al., 1977; Bean y Rios, 1989; Josephson y Sperelakis 1992; Chameau et al., 1995; Melliti et al., 1996). La modulación del movimiento de carga se ha reportado tanto en sistemas nativos como en modelos celulares (Augustine y Bezanilla, Jones et al., 1997).

En este trabajo nosotros reportamos que el movimiento de carga es modulado por vías que dependen de la activación de proteínas G; esta conclusión se sustenta por los patrones de inhibición, uno voltaje dependiente y el otro voltaje independiente que el GTP γ S, la NA y las subunidades G β 1 γ 4

Una gran proporción del movimiento de carga deriva del movimiento de los sensores de voltaje de canales de sodio y calcio

Múltiples tipos de canales activados por voltaje contribuyen al movimiento de carga que nosotros hemos registrado. Nosotros utilizamos protocolos de inmovilización de la carga y de inactivación así como el análisis de ruido en condiciones no estacionarias para obtener una aproximación de la contribución relativa de poblaciones particulares de canales al movimiento de carga total. Los resultados que se muestran en la Figs. 19, 20 y 21, sugieren que una gran proporción del movimiento de carga deriva del movimiento de los sensores de los canales de sodio y calcio, y quizás una modesta contribución de canales de potasio tipo A. Los canales de potasio del tipo rectificador tardío aparentemente no contribuyen de manera significativa al movimiento de carga que hemos registrado. Estos canales se activan y desactivan lentamente con constantes de tiempo del orden de

decenas de milisegundos (51). Si el movimiento de carga que se deriva de estos canales exhibe una cinética similar a aquella de la corriente iónica, sus corrientes capacitivas serían tan lentas que serían indistinguibles de la línea basal, a menos que la densidad de los canales sea extremadamente alta, una situación que al parecer no ocurre en estas células.

Inhibición voltaje dependiente y voltaje independiente de los canales de calcio.

En nuestras condiciones experimentales solo los canales de calcio tipo N son sensibles a la inhibición de NA. En las neuronas del GCS la población de canales de sodio y potasio tipo-A son insensibles a la inhibición por NA (Song et al., 1989). Por lo tanto uno podría proponer que todos los efectos de la NA que observamos a nivel del movimiento de carga resultan de la inhibición de los canales de calcio tipo-N. Nuestras observaciones están en concordancia con un estudio previo realizado en un sistema modelo en el que se demostró inhibición voltaje dependiente de las corrientes de compuerta de canales tipo N en condiciones de activación de proteínas G mediante el uso de GTP γ S (Jones et al., 1997). En este trabajo la demostración de una observación similar mediante el uso de NA, y asumiendo que esta afecta únicamente el sensor de voltaje de canales tipo N, podría implicar que uno de los mecanismos de acción de la NA para inducir la inhibición de los canales tipo-N es el de afectar el movimiento del sensor de voltaje o/y el acople excitación-conducción.

La magnitud de la inhibición del movimiento de carga y de la corriente de calcio mediada por NA se correlaciona con la contribución relativa de estos canales al movimiento de carga total. Asumiendo que la carga de los canales de calcio representa 1/3 del total del movimiento de carga la inhibición del 13 % inducida por NA y que se observa a 0 mV se correlaciona con la inhibición del 40 % de la corriente de calcio y que ocurre al mismo potencial. El valor de Q_{max} en neuronas dializadas con GDP β S (una condición que representaría el estado no modulado) es ~ 6.2 nC/ μ F

(Tabla 3). Asumiendo una capacitancia específica de la membrana es $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, Q_{max} en términos de superficie de membrana es $\sim 6.2 \text{ nC}/\text{cm}^2$; expresado en cargas elementales (e^0), sería del orden de $390 e^0/\mu\text{m}^2$. Considerando que en los canales operados por voltaje la carga de compuerta por canal es $\sim 12e^0$ (Bezanilla, 2000; Hirschberg et al., 1995; Noceti et al., 1996; Schoppa et al., 1992), la densidad de canales operados por voltaje en la membrana de las SCG es $\sim 32 \text{ canales}/\mu\text{m}^2$. Una neurona con una capacitancia lineal de 40 pF y con área de membrana de $\sim 4000 \mu\text{m}^2$ tendría $\sim 12.8 \times 10^4$ canales. El análisis de ruido en condiciones no estacionarias de la corriente de calcio sugiere que hay $\sim 3.8 \times 10^4$ canales en una neurona típica ($50\text{-}70 \text{ pF}$) del GCS. Este valor está en acuerdo con el número de canales de calcio reportado por McDonough (McDonough et al., 2002) en las neuronas del GCS. Lo anterior sugiere que la carga de activación que deriva de los canales tipo-N representa $\leq 1/3$ del movimiento de carga total.

El mecanismo de inhibición voltaje dependiente de los canales de calcio tipo N y que es inducido por NA resulta de una interacción directa entre la segunda asa intracelular localizada entre el dominio I y II de la subunidad α y el complejo $G\beta\gamma$ (Herlitze et al., 1996; De Waard et al., 1997; García et al., 1998; Elmslie 2003). Nuestros resultados fortalecen esta conclusión a nivel del movimiento de carga. La sobre-expresión de subunidades $G\beta\gamma$ reproduce las características principales de la inhibición que NA induce sobre los canales de calcio tipo N. En particular las subunidades $G\beta\gamma$ disminuyen la pendiente de las curvas de activación de tanto el movimiento de carga y aquella de los canales de calcio. Esto sugiere que la asociación canal- $G\beta\gamma$ modifica la sensibilidad de los canales de calcio al potencial de membrana. Una situación en la cual los canales requieren de despolarizaciones de membrana más positivas para igualar la magnitud de una corriente de calcio que en condiciones no moduladas es evocada por una despolarización de menor magnitud. Sin embargo algunas observaciones sugieren que las subunidades $G\beta 1\gamma 4$ no inducen solamente un patrón de inhibición puramente voltaje dependiente en los canales de calcio tipo N. En un estudio

previo demostramos que la subunidad $G\beta_1$ era capaz de reproducir los efectos de la NA en la inhibición de los canales de calcio (García et al., 1998). En este trabajo usamos la sobre expresión de las subunidades $G\beta_1\gamma_4$ con el objetivo de producir una inhibición voltaje dependiente en los canales de calcio, sin embargo de manera inesperada este procedimiento indujo una inhibición mixta con características de la inhibición voltaje dependiente pero también voltaje independiente. Estas observaciones fueron evidentes tanto en la corriente de calcio como en el movimiento de carga.

La inhibición voltaje independiente de los canales de calcio puede contribuir a la inhibición voltaje independiente del movimiento de carga. Nuestros resultados muestran que la activación de las proteínas G mediante $GTP\gamma S$ induce una reducción en la amplitud de Q_{max} que persiste a despolarizaciones extremas. Existen dos posibilidades para dar cuenta de estas observaciones: 1) En los canales modulados de una manera voltaje independiente el mecanismo de regulación ocurre en conformaciones del canal muy alejadas del estado abierto, estados conformacionales donde una buena proporción de la carga de activación se mueve (Bezanilla, 2000). Lo anterior esta en acuerdo con las observaciones hechas por Carabelli (Carabelli et al., 1996) y Lee y Elmslie (Lee y Elmslie, 2000), quienes registraron la actividad de canales unitarios, y reportaron un incremento en el numero de “null-sweeps” (trazos en los cuales no hay actividad de los canales) en canales de calcio tipo N expuestos a neurotransmisores. 2) En un estudio reciente, Tomblor (Tomblor et al., 2006) reportaron un novedoso mecanismo de modulación de canales tipo N mediada por receptores acoplados a proteínas G que involucra la desestabilización y la subsecuente remoción de los canales de calcio de la membrana plasmática. Estas observaciones y nuestros resultados soportan la hipótesis inicialmente propuesta por Dunlap y Fishbach (Dunlap y Fishbach, 1981), quienes fueron los primeros en sugerir que la inhibición de los canales de calcio mediada por neurotransmisores era el resultado de una disminución en el número de canales funcionales.

La inhibición voltaje independiente de los canales tipo N es casi tan compleja como la inhibición voltaje dependiente (Elmslie, 2003). Existen múltiples formas de inhibición voltaje independiente que involucran distintos efectores (PIP₂, probablemente subunidades G α , G $\beta\gamma$, variaciones en concentración intracelular de Ca²⁺, etc.) y que muestran distintos patrones temporales. Al menos dos formas de inhibición voltaje independiente, una rápida y una lenta, han sido descritas en las neuronas del GCS, las cuales pueden ser distinguidas entre sí por la velocidad de la inhibición así como por el efector(s) final (Elmslie, 2003). Se ha propuesto que la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) mediada por la activación de receptores acoplados a proteínas G y que resulta en inhibición voltaje independiente de canales de calcio tipo-N podría ser el mecanismo responsable para dar cuenta de una forma lenta de inhibición (Gamper et al., 2004; Wu et al., 2002). El efector final de la otra forma de inhibición, la vía rápida y voltaje independiente de los canales de calcio tipo N no ha sido elucidado (Elmslie, 2003). Sin embargo nuestros datos en la Fig. 25 añaden una pieza de evidencia a favor de las subunidades G $\beta\gamma$ como uno de los efectores de esta forma de inhibición. Se requieren de experimentos adicionales para poder establecer si la hidrólisis del PIP₂ o la unión del complejo G $\beta\gamma$ al canal de calcio tipo-N resultan en la inhibición de las corrientes de compuerta de estos canales.

Modulación de canales de sodio por vías que dependen de la activación de proteínas G

Varias piezas de evidencia sugieren que los canales de calcio tipo N no representan el único blanco de modulación voltaje independiente iniciada por proteínas G. Por ejemplo, asumiendo que los canales de calcio contribuyen $\leq 1/3$ al movimiento de carga total, la inhibición de las corrientes capacitivas debería de ser 67 % menor que la inhibición de la corriente de calcio tipo N. Sin embargo en neuronas dializadas con GTP γ S se observó una inhibición del 50 % del movimiento de carga así como de la corriente de calcio (ver Figs. 22 y 24). Por lo tanto una conclusión inmediata es

que las proteínas G no solamente inhiben el movimiento de carga que se deriva de los canales de calcio.

Estudios pioneros de la modulación de los canales activados por voltaje llevados a cabo en neuronas simpáticas, sensoriales y centrales condujeron a la idea de que los canales de sodio no eran sujeto de modulación por vías que dependen de la activación de receptores acoplados a proteínas G (Dunlap y Fishbach, 1981; Song et al., 1989). En este trabajo nosotros hemos reportado que los canales de sodio, al igual que los canales de calcio, son modulados por vías que dependen de la activación de proteínas G. Existen dos observaciones que soportan esta conclusión: 1) La diálisis intracelular con GTP γ S, un activador no selectivo de las proteínas G, así como la angioII produjeron una reducción en la amplitud de la corriente de sodio, y 2) La diálisis intracelular con GDP β S, un análogo del GDP que minimiza la activación de proteínas G, previno los efectos de la angioII. Dadas las propiedades de los efectos del GTP γ S y angioII sobre la corriente de sodio, la modulación que estos agentes producen en la corriente de sodio puede clasificarse como voltaje independiente. Nuestros resultados son análogos a aquellos observados en neuronas centrales en donde se observo una inhibición de la corriente de sodio del tipo voltaje independiente y ligada a vías de señalización iniciadas por receptores acoplados a proteínas G y la subsecuente activación de PKC y PKA (Maurice et al., 2001). Sin embargo se requiere de más trabajo para explorar los detalles a cerca del efector final así como del mecanismo(s) responsable de la inhibición voltaje independiente de los canales de sodio que nosotros observamos en las neuronas del GCS.

Finalmente no podemos concluir que la inhibición del movimiento de carga que hemos observado resulta únicamente de la modulación de canales de calcio y sodio. En particular hay evidencias de que en neuronas centrales la corriente de potasio tipo A es modulada por vías que dependen de la activación de receptores acoplados a proteínas G (Holmqvist et al., 2001 y Keros y McBain, 1997). Desconocemos si la modulación de la corriente de potasio tipo A se manifiesta a

nivel del movimiento de carga. Si este fuera el caso, esto podría explicar parte de los efectos que nosotros estamos reportando.

CONCLUSIONES

El presente estudio revela que el movimiento de carga total en las neuronas simpáticas es modulado fuertemente y de manera diferencial tras la activación de proteínas G.

Esta modulación del movimiento de carga ocurre de una manera similar a la bien documentada modulación de los canales de calcio tipo N y a la no tan bien caracterizada modulación de los canales de sodio.

Nosotros proponemos que el impedimento parcial o completo del movimiento del sensor de voltaje precede o acompaña a distintas formas de modulación y/o endocitosis de los canales iónicos operados por voltaje.

Al parecer este proceso de regulación de los sensores de voltaje podría representar un mecanismo común en las distintas vías de señalización intracelular que involucran la activación de vías de señalización iniciadas por receptores acoplados a proteínas G y que en última instancia modulan la actividad de los canales operados por voltaje.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams D, Gage P (1976). Gating currents associated with sodium and calcium currents in an *Aplysia* neuron. *Science* 192, 783-784.
- Almers W (1978). Gating currents and charge movement in excitable membranes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 82, 96-190.
- Alvarez O, Gonzalez C, Latorre R (2002). Counting channels: a tutorial guide on ion channel fluctuation analysis. *Adv Physiol Educ* 26(1-4): 327-41.
- Andrade R (1994). Infusion of guanine nucleotides through recording electrodes for studies on G-protein regulation of ion currents and channels. *Methods Enzymol* 238, 348-356.
- Armstrong C (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiological Reviews* 61, 644-683.
- Armstrong C, Bezanilla F (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242, 459-461.
- Armstrong C, Bezanilla F (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70(5), 567-90.
- Armstrong CM, Hille B (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*. 20(3):371-80.
- Augustine CK, Bezanilla F (1990). Phosphorylation modulates potassium conductance and gating current of perfused giant axons of squid. *J Gen Physiol* 95(2), 245-71.
- Ballanyi K, Grafe P, ten Bruggencate G (1983). Intracellular free sodium and potassium, post-carbachol hyperpolarization, and extracellular potassium-undershoot in rat sympathetic neurones. *Neurosci Lett* 38(3), 275-9.
- Banker G, Goslin K (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature*. 336(6195):185-6.

- Bean BP (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153-156.
- Bean BP, Rios E (1989). Non-linear charge movement in mammalian cardiac ventricular cells. Components from Na and Ca channel gating. *J Gen Physiol* 94, 65-93.
- Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Hille B (1991). Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(2):652-6.
- Beech DJ, Bernheim L, Hille B (1992). Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron* 8(1), 97-106.
- Bezanilla F (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80, 555-592.
- Bezanilla F, Stefani E (1998). Gating currents. *Methods Enzymol.* 293:331-52.
- Breitwieser GE (1996). Mechanisms of K⁺ channel regulation. *J Membr Biol.* 152(1):1-11.
- Brown DA, Scholfield CN (1974). Changes of intracellular sodium and potassium ion concentrations in isolated rat superior cervical ganglia induced by depolarizing agents. *J Physiol* 242(2), 307-19.
- Cantrell AR, Catterall WA (2001). Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2(6), 397-407.
- Carabelli V, Lovallo M, Magnelli V, Zucker H, Carbone E (1996). Voltage-dependent modulation of single N-type Ca²⁺ channel kinetics by receptor agonists in IMR32 cells. *Biophys J* 70, 2144-2154.
- Castiglioni AJ, Raingo J, Lipscombe D (2006). Alternative splicing in the C-terminus of CaV2.2 controls expression and gating of N-type calcium channels. *J Physiol.* 576(Pt 1):119-34.

- Castrén E, Kurihara M, Gutkind JS, Saavedra JM (1987). Specific angiotensin II binding sites in the rat stellate and superior cervical ganglia. *Brain Res* 422(2), 347-51.
- Catterall WA (1997). Modulation of sodium and calcium channels by protein phosphorylation and G proteins. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31, 159-81.
- Catterall WA (2000a). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-55.
- Catterall WA (2000b). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26(1), 13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005a). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):397-409.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):411-25.
- Chameau P, Bournaud R, Shimahara T (1995). Asymmetric intramembrane charge movement in mouse hippocampal pyramidal cells. *Neurosci Lett* 201, 159-162.
- Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, Bezanilla F (2005). Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436(7052): 852-6.
- Chandler, WK and Meves H. (1965) Voltage clamp experiments on internally perfused giant axons. *J. Physiol.* 180, 788-820.
- Clapham DE (1994). Direct G protein activation of ion channels? *Annu Rev Neurosci.* 17:441-64.

- Clapham DE, Neer EJ (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:167-203.
- Cukierman S (1996). Regulation of voltage-dependent sodium channels. *J Membr Biol.* 151(3):203-14.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP (1997). Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature.* 385 (6615):446-50.
- Delcour AH, Tsien RW (1993). Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science.* 259(5097):980-4.
- Delmas P, Brown DA (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci.* 6(11):850-62.
- Dunlap K, Fischbach GD (1981). Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317: 519–535.
- Dubel SJ, Starr TV, Hell J, Ahlijanian MK, Enyeart JJ, Catterall WA, Snutch TP (1992). Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(11):5058-62.
- Elmslie KS, Zhou W, Jones SW (1990). LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 5(1), 75-80.
- Elmslie KS (2003). Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Bioenerg Biomembr.* 35(6): 477-89.
- Eranko O (1972). Light and electron microscopic histochemical evidence of granular and non-granular storage of catecholamines in the sympathetic ganglion of the rat. *Histochem J.* 4(3):213-24.

- Freschi JE (1983). Membrane currents of cultured rat sympathetic neurons under voltage clamp. *J Neurophysiol.* 50(6):1460-78.
- Galvan M, Dorge A, Beck F, Rick R (1984). Intracellular electrolyte concentrations in rat sympathetic neurones measured with an electron microprobe. *Pflugers Arch* 400(3), 274-9.
- Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS (2004). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 24(48): 10980-92.
- Gandhi, C.S., and E.Y. Isacoff (2002). Molecular models of voltage sensing. *J. Gen. Physiol.* 120:455–463.
- García DE, Li B, García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall W, Mackie K, Hille B (1998). G-protein β -subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 18(22), 9163-9170.
- García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, García DE (2000). PMA selectively prevents voltage-dependent inhibition of N-type calcium currents induced by G-protein activation. *Biophys J* 78, 105.
- García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, García DE (2001). Modulation of N-type Ca²⁺ channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflügers Arch* 442, 848-858.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):473-508.
- Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85-100.

- Harrison RG (1915). Experiments on the Development of the Limbs in Amphibia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1(11):539-44.
- Harrison RG (1917). Transplantation of Limbs. Proc Natl Acad Sci U S A. 3(4):245-51.
- Herlitze S, García D, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall W (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. Nature 380, 258-262.
- Hernández-Ochoa EO, García-Ferreiro RE, García DE (2001). G-protein activation modulates intramembrane charge movement in rat sympathetic neurons. Biophys J 80, 209.
- Hille B (1977). Ionic channels of nerve: questions for theoretical chemists. Biosys. 8(4):195-9.
- Hille B (1992). G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. Neuron. 9(2):187-95.
- Hille B (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. Trends Neurosci 17, 531-536.
- Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA, Sinauer.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J (1995). Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. J Gen Physiol 106(6), 1053-68.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J Physiol 117, 500-544.
- Holmqvist MH, Cao J, Knoppers MH, Jurmann ME, Distefano PS, Rhodes KJ, Xie Y, An F (2001). Kinetic modulation of Kv4-mediated A-current by arachidonic acid is dependent on potassium channels interacting proteins. J Neurosci 21(12), 4154-4161.
- Horn JP, McAfee DA (1980). Alpha-drenergic inhibition of calcium-dependent potentials in rat sympathetic neurones. J Physiol. 301:191-204.
- Horn R (2002). Coupled movements in voltage-gated ion channels. J Gen Physiol. 120(4):449-53.

- Ikeda S, Dunlap K (1999). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33, 131-151.
- Ikeda SR (1991). Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 439, 181-214.
- Ikeda SR (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 380, 255-258.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait B, MacKinnon R (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33-41.
- Jones L, Patil P, Snutch T, Yue D (1997). G-protein modulation of N-type calcium channel gating current in human embryonic kidney cells (HEK 293). *J Physiol* 498, 601-610.
- Jones SW (2003). Calcium channels: unanswered questions. *J Bioenerg Biomembr* 35(6): 461-75.
- Jones SW, Elmslie K (1997). Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Membr Biol* 155, 1-10.
- Jones SW, Marks TN (1989). Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. II. Inactivation. *J Gen Physiol*. 94(1):169-82.
- Josephson IR, Sperelakis N (1992). Kinetic and steady-state properties of Na⁺ channel and Ca²⁺ channel charge movements in ventricular myocytes of embryonic chick heart. *J Gen Physiol*. 100(2):195-216.
- Kaczmarek L and Levitan I (1987). *Neuromodulation: the biochemical control of neural excitability*. New York, NY, Oxford University Press.
- Keros S, McBain CJ (1997). Arachidonic acid inhibits transient potassium currents and broadens action potentials during electrographic seizures in hippocampal pyramidal and inhibitory interneurons. *J Neurosci* 17(10), 3476-3487.

- Keynes RD, Rojas E (1974). Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J Physiol.* 239(2):393-434.
- Klimaschewski L, Kummer W, Heym C (1996). Localization, regulation and functions of neurotransmitters and neuromodulators in cervical sympathetic ganglia. *Microsc Res Tech.* 35(1):44-68.
- Kostyuk P, Krishtal O, Pidoplichko V (1977). Asymmetrical displacement currents in nerve cells membrane and effect of internal fluoride. *Nature* 267, 70-72.
- Larsson HP (2002). The search is on for the voltage sensor-to-gate coupling. *J Gen Physiol.* 120(4):475-81.
- Lee H, Elmslie K (2000). Reluctant gating of single N-type calcium channels neurotransmitter-induced inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci* 20(9), 3115-3128.
- Lin Z, Lin Y, Schorge S, Pan JQ, Beierlein M, Lipscombe D (1999). Alternative splicing of a short cassette exon in alpha1B generates functionally distinct N-type calcium channels in central and peripheral neurons. *J Neurosci.* 19(13):5322-31.
- Marrion N (1997). Control of the M-current. *Ann Rev Physiol* 59, 483-504.
- Mathie A, Bernheim L, Hille B (1992). Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons. *Neuron.* 8(5):907-14.
- Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ (2001). D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* 21(7), 2268-77.
- McDonough SI, Boland LM, Mintz IM, Bean BP (2002). Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J Gen Physiol* 119(4), 313-28.
- Melliti K, Bournaud R, Bastide B, Shimahara T (1996). Nifedipine sensitive intramembrane charge movement in Purkinje cells from mouse cerebellum. *J Physiol* 490, 363-372.

- Miller RJ (1990). Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release. *FASEB J.* 4(15):3291-9.
- Mintz IM, Adams ME, Bean BP (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9(1), 85-95.
- Noceti F, Baldelli P, Wei X, Qin N, Toro L, Birnbaumer L, Stefani E (1996). Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* 108(3), 143-55.
- Nonner W, Rojas E, Stampfli H (1975). Displacement currents in the node of Ranvier. Voltage and time dependence. *Pflugers Arch.* 354(1):1-18.
- Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT (1996). Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J.* 71(5):2509-21.
- Patil PG, Brody DL, Yue DT (1998). Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20: 1027-38.
- Plummer MR, Logothetis DE, Hess P (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2(5), 1453-63.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997). Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(16):8866-71.
- Raino J, Castiglioni AJ, Lipscombe D (2007). Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci.* 10(3):285-92.
- Ramon y Cajal S (1906). The structure and connexions of neurons Nobel Lecture. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-lecture.pdf.

- Ramon y Cajal S (1995). *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates (History of Neuroscience, No 6)*. Traducccion de Swanson N y Swanson L. Oxford University Press. New York, NY.
- Sacchi O, Belluzzi O, Canella R, Fesce R (1998). A model of signal processing at a mammalian sympathetic neurone. *J Neurosci Methods* 80(2), 171-180.
- Schneider M, Chandler W (1973). Voltage-dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation contraction coupling. *Nature* 242, 244-246.
- Schofield G, Ikeda S (1988). Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflügers Arch* 411, 481-490.
- Schofield G, Ikeda S (1989). Potassium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Brain Res* 485, 205-214.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ (1992). The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 255(5052), 1712-5.
- Shapiro MS, Hille B (1993). Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron*. 10(1):11-20.
- Shapiro M, Wollmuth L, Hille B (1994). Angiotensin II inhibits Calcium and M current channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 12, 1319-1329.
- Sigworth FJ (1980). The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J Physiol* 307: 97-129.
- Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM (1991). Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron*. 7(1):45-57.

- Song SY, Saito K, Noguchi K, Konishi S (1989). Different GTP-binding proteins mediate regulation of calcium channels by acetylcholine and noradrenaline in rat sympathetic neurons. *Brain Res* 494: 383-386.
- Stea A, Dubel SJ, Snutch TP (1999). α 1B N-type calcium channel isoforms with distinct biophysical properties. *Ann N Y Acad Sci.* 868:118-30.
- Suh BC, Hille B (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron.* 35(3):507-20.
- Sumners C, Gelband CH (1998). Neuronal ion channel signalling pathways: modulation by angiotensin II. *Cell Signal* 10(5), 303-311.
- Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST (1992). Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10178-10182.
- Thaler C, Gray AC, Lipscombe D (2004). Cumulative inactivation of N-type CaV2.2 calcium channels modified by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(15):5675-9.
- Toledo-Aral JJ, Moss BL, He ZJ, Koszowski AG, Whisenand T, Levinson SR, Wolf JJ, Silos-Santiago I, Halegoua S, Mandel G (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(4):1527-32.
- Tomblor E, Cabanilla NJ, Carman P, Permaul N, Hall JJ, Richman RW, Lee J, Rodriguez J, Felsenfeld DP, Hennigan RF, Diverse-Pierluissi MA (2006). G protein-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem* 281: 1827-39.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):463-72.

- Wickman K, Clapham DE (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 75(4), 865-85.
- Wilson GF (2001). Cellular Neuromodulation. *Encyclopedia of life sciences*.
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0000264/current/abstract?hd=All,Wilson&hd=All,GF>
- Winks JS, Hughes S, Filippov AK, Tatulian L, Abogadie FC, Brown DA, Marsh SJ (2005). Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci*. 25(13):3400-13.
- Witkowski JA (1980) W.T. Astbury and R.G. Harrison: the search for the molecular determination of form in the developing embryo. *Notes and Records of the Royal Society* 35: 195–219).
- Wu L, Bauer CS, Zhen X, Xie C, Yang J (2002). Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature* 419, 947-952.
- Ypey DL y DeFelice L (1995). The basics of patch clamp-clamping explained with simple electrical equivalent circuits.
https://medschool.mc.vanderbilt.edu/channels.transporters2005/text/Erice05IntroDemoLect_13347A.pdf
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Logothetis DE (2003). PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*. 37(6):963-75.
- Zhou J, Shapiro M, Hille B (1997). Speed of Ca²⁺ channel modulation by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 77, 2040-2048.

G protein activation inhibits gating charge movement in rat sympathetic neurons

Erick O. Hernández-Ochoa,^{1,2} Rafael E. García-Ferreiro,^{1,†} and David E. García¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México; and ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland

Submitted 20 October 2006; accepted in final form 12 February 2007

Hernández-Ochoa EO, García-Ferreiro RE, García DE. G protein activation inhibits gating charge movement in rat sympathetic neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C2226–C2238, 2007. First published February 21, 2007; doi:10.1152/ajpcell.00540.2006.—G protein-coupled receptors (GPCRs) control neuronal functions via ion channel modulation. For voltage-gated ion channels, gating charge movement precedes and underlies channel opening. Therefore, we sought to investigate the effects of G protein activation on gating charge movement. Nonlinear capacitive currents were recorded using the whole cell patch-clamp technique in cultured rat sympathetic neurons. Our results show that gating charge movement depends on voltage with average Boltzmann parameters: maximum charge per unit of linear capacitance (Q_{max}) = 6.1 ± 0.6 nC/ μ F, midpoint (V_h) = -29.2 ± 0.5 mV, and measure of steepness (k) = 8.4 ± 0.4 mV. Intracellular dialysis with GTP γ S produces a nonreversible \sim 34% decrease in Q_{max} , a \sim 10 mV shift in V_h , and a \sim 63% increase in k with respect to the control. Norepinephrine induces a \sim 7 mV shift in V_h and \sim 40% increase in k . Overexpression of G protein $\beta_1\gamma_4$ subunits produces a \sim 13% decrease in Q_{max} , a \sim 9 mV shift in V_h , and a \sim 28% increase in k . We correlate charge movement modulation with the modulated behavior of voltage-gated channels. Concurrently, G protein activation by transmitters and GTP γ S also inhibit both Na⁺ and N-type Ca²⁺ channels. These results reveal an inhibition of gating charge movement by G protein activation that parallels the inhibition of both Na⁺ and N-type Ca²⁺ currents. We propose that gating charge movement decrement may precede or accompany some forms of GPCR-mediated channel current inhibition or downregulation. This may be a common step in the GPCR-mediated inhibition of distinct populations of voltage-gated ion channels.

ion channel modulation; G protein-coupled receptors; charge movement

IN VOLTAGE-GATED ION CHANNELS, the probability of opening is modified by the membrane potential. This is achieved through voltage sensors that detect the voltage and transfer energy to the pore to control gate (12, 13, 35). Membrane depolarization elicits the movement of voltage sensors located within the channels; their movement constitutes the “gating charge movement” (12, 20, 30).

The activity of almost all types of voltage-gated ion channels is modulated by at least one kind of extra- or intracellular signaling process. A broad array of neuromodulators—monoamines, peptides, glutamate, and acetylcholine—have been shown to alter the function of voltage-gated channels in neurons. The modulation of voltage-gated ion channels by signaling

pathways activated by G protein-coupled receptors (GPCRs) constitutes a widespread mechanism for regulating neuronal excitability, neurotransmitter release, and plasticity (15, 18). The mechanisms that underlie the ion channel modulation mediated by GPCR-dependent signaling pathways alter channel function by modifying their opening probability, kinetics, and voltage dependence without altering, however, ionic selectivity and unitary conductance (15, 17, 23, 32, 37, 39). In almost all cases, this has been established by solely examining the properties of ionic current flowing through ion channels. Only in a few cases has voltage-gated ion channel modulation been examined at the level of gating charge movement (7, 36). This study was undertaken to investigate whether G protein-dependent signaling pathways modulate gating charge movement in a native neuronal system. We analyzed total gating charge movement in rat superior cervical ganglion (SCG) neurons. Our results reveal that G protein activation induces a mixed pattern of inhibitory modulation on gating charge movement. Part of the inhibitory pattern is voltage dependent, whereas the other is voltage independent. We establish a correlation between gating charge movement modulation and the modulated behavior of two populations of voltage-gated ion channels present in these neurons. We report that TTX-sensitive Na⁺, similar to N-type Ca²⁺-channel currents, is inhibited by GPCR-dependent signaling pathways. Our results show an inhibition of gating charge movement by G protein activation in a manner that closely parallels the inhibition of Na⁺ and N-type Ca²⁺ channels. We propose that gating charge movement trapping or its decrement may precede or accompany some forms of ion channel inhibition and/or ion channel downregulation. This process might be a common step in the GPCR-mediated modulation of distinct voltage-gated ion channels.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. SCG neurons were enzymatically dissociated from 5-wk-old male Wistar rats as described previously (26). Rats were placed in a container and exposed to CO₂ in a rising concentration and were then euthanized by rapid decapitation, performed according to authorized procedures of our institution. Animals were used in accordance with the procedures approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Maryland. After dissection, ganglia were desheathed, cut into eight to ten small nearly identical pieces, and transferred to a modified Hank's solution containing 20 U/ml papain. After 20 min at 37°C, the papain solution was replaced with a solution containing 1 mg/ml collagenase type I and 10 mg/ml dispase. Ganglia were incubated for 40 min in this solution and

[†] Deceased 11 April 2005.

Address for reprint requests and other correspondence: D. E. García, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C. P. 04510, A. P. 70250, D. F., México (e-mail: erasmo@servidor.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Rafael E. García-Ferreiro
Erick O. Hernández-Ochoa · David E. García

Modulation of N-type Ca²⁺ channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons

Received: 30 November 2000 / Accepted: 11 May 2001 / Published online: 6 July 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract The protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) has been used extensively in studies of G protein modulation of Ca²⁺ channels. PMA has been shown to be a powerful tool for inducing phosphorylation and interrupting G-protein-mediated signaling pathways. Here we re-examine the effects of PMA on whole-cell N-type Ca²⁺-channel currents in rat sympathetic neurons. We found that, along with an increase in the current amplitude previously reported by others, PMA pretreatment leads to alterations in current activation and inactivation kinetics. These alterations in current kinetics are voltage-dependent and are not reproduced by internal dialysis with the G protein inhibitor GDPβS. Alterations in current kinetics by PMA may therefore indicate the existence of a modulated state, presumably phosphorylated, of N-type Ca²⁺ channels. We propose that the increase in current amplitude is due primarily to alterations in current kinetics rather than to removal of tonic inhibition.

Keywords Ca channel modulation · GDPβS · G protein · N-type Ca channel · Protein kinase C (PKC) · Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) · Rat sympathetic neurons · Superior cervical ganglion (SCG)

Introduction

N-type Ca²⁺ channels have long been proposed to play a critical role in Ca²⁺ entry into presynaptic nerve terminals [13]. Ca²⁺ currents conducted by N-type channels have been consistently shown to increase as a result of stimulation of protein kinase C (PKC) by phorbol esters in sympathetic neurons [28, 30, 31]. Furthermore, PKC activation can disrupt Ca²⁺ channel inhibition by G-protein-coupled receptors [26, 28, 31], and by direct activation of G proteins by GTPγS [2, 28, 31]. G-protein-mediated signal-

ing is present in sympathetic neurons even in the absence of any exogenously applied neurotransmitters, producing a tonic inhibition of Ca²⁺ channels [15, 28, 30, 31]. For these reasons, it has been suggested that the PKC-induced enhancement of basal Ca²⁺ channel current may result from removal of this tonic inhibition [28, 31]. A recent report has extended this interpretation to propose that tonic inhibition removal is the sole effect induced by PKC activation on N-type Ca²⁺ channels [2]. If this were true, the effects induced by phorbol esters should be indistinguishable from those induced by a G protein inhibitor. Our intent was to clarify this situation through a detailed analysis of the effects induced by the two treatments on whole-cell N-type Ca²⁺ channel currents recorded in primary cultures of superior cervical ganglion (SCG) neurons. Our experiments therefore compared the effects induced by the PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) with those induced by the non-hydrolysable GDP analogue GDPβS. Our results show that the treatments do not produce identical effects. Though the effects of GDPβS are comparable to those induced by a conditioning prepulse in control neurons, PMA pretreatment induces voltage-dependent changes in current kinetics and in voltage-dependent inactivation, which cannot be explained by the removal of tonic inhibition.

A preliminary account of some of these results has been presented [9].

Materials and methods

Cell culture

SCG neurons were enzymatically dissociated from 5-week-old male Wistar rats. After dissection, ganglia were desheathed, cut into eight to ten small, nearly identical pieces, and transferred to a modified Hank's solution containing 20 U/ml papain. After 20 min at 37°C, papain solution was replaced with a solution containing 1 mg/ml collagenase type I and 10 mg/ml dispase. Ganglia were incubated for 40 min in this solution and mechanically triturated every 20 min. The preparation was then centrifuged and resuspended twice in Leibovitz's L-15 medium and once in Dulbecco's modified Eagle's medium, both supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin.

R.E. García-Ferreiro (✉) · E.O. Hernández-Ochoa · D.E. García
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM,
Apdo. Post. 70250, C.P. 04510, Mexico, D.F., Mexico
e-mail: erasmo@servidor.unam.mx
Tel.: +52-5-6232391, Fax: +52-5-6232241

G-Protein β -Subunit Specificity in the Fast Membrane-Delimited Inhibition of Ca^{2+} Channels

David E. García,^{1,5} Bin Li,³ Rafael E. García-Ferreiro,⁵ Erick O. Hernández-Ochoa,⁵ Kang Yan,⁴ Narasimhan Gautam,⁴ William A. Catterall,³ Ken Mackie,^{1,2} and Bertil Hille¹

Departments of ¹Physiology and Biophysics, ²Anesthesiology, and ³Pharmacology, University of Washington, Seattle, Washington 98195, ⁴Department of Anesthesiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110, and ⁵Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70250, C.P. 04510, México, Distrito Federal México

We investigated which subtypes of G-protein β subunits participate in voltage-dependent modulation of N-type calcium channels. Calcium currents were recorded from cultured rat superior cervical ganglion neurons injected intranuclearly with DNA encoding five different G-protein β subunits. $G\beta_1$ and $G\beta_2$ strongly mimicked the fast voltage-dependent inhibition of calcium channels produced by many G-protein-coupled receptors. The $G\beta_5$ subunit produced much weaker effects than $G\beta_1$ and $G\beta_2$, whereas $G\beta_3$ and $G\beta_4$ were nearly inactive in these electrophysiological studies. The specificity implied by these results was confirmed and extended using the yeast two-hybrid system to test for protein–protein interactions. Here, $G\beta_1$ or

$G\beta_2$ coupled to the GAL4-activation domain interacted strongly with a channel sequence corresponding to the intracellular loop connecting domains I and II of a α_1 subunit of the class B calcium channel fused to the GAL4 DNA-binding domain. In this assay, the $G\beta_5$ subunit interacted weakly, and $G\beta_3$ and $G\beta_4$ failed to interact. Together, these results suggest that $G\beta_1$ and/or $G\beta_2$ subunits account for most of the voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels and that the linker between domains I and II of the calcium channel α_1 subunit is a principal receptor for this inhibition.

Key words: G-proteins; calcium channel; norepinephrine; yeast 2-hybrid; sympathetic neurons; ion channel modulation

Inhibition of neuronal calcium currents by G-protein-coupled receptors probably occurs in every type of neuron. It is a ubiquitous mode of modulation of electrical activity and synaptic function by neighboring neurons. A common form uses a signaling pathway whose components appear to be restricted to the cell membrane (membrane-delimited), develops in <1 sec, and is voltage-dependent, i.e., the inhibition can be partially relieved by a strong depolarizing pulse (for review, see Hille, 1994). A well studied example is the inhibition of N-type calcium channels by norepinephrine (NE) acting on α_2 adrenergic receptors in superior cervical ganglion (SCG) neurons. This type of inhibition is mediated by $\beta\gamma$ -subunits of G-proteins, apparently acting directly on the channel (Herlitz et al., 1996; Ikeda, 1996).

The specificity for $G\beta$ and $G\gamma$ subunits has not been investigated, and the target site for the interaction of G-protein $\beta\gamma$ subunits with calcium channels is the subject of some debate. By analogy with other $G\beta\gamma$ -effector proteins, several investigators have proposed that the target site on voltage-gated calcium channels includes a QXXER motif in the intracellular loop connecting domains I and II (L_{1-II}) of the α_1 subunits of classes A, B, and E (the P/Q-, N-, and R-type) calcium channels (De Waard et al.,

1997; Herlitz et al., 1997; Page et al., 1997; Zamponi et al., 1997). This QXXER sequence overlaps with the region required for interaction with the calcium channel β subunit. In contrast, some investigators argue that an interaction of $G\beta\gamma$ subunits with the C terminus of calcium channel α_1 subunit is the functionally important one (Zhang et al., 1996a; Qin et al., 1997). Here, we inject DNA for various G-protein β subunits into the nucleus of adult rat SCG neurons and find that only certain $G\beta$ subunits will induce inhibition of the endogenous N-type Ca^{2+} currents. Then, we used the yeast two-hybrid assay to look for interactions between $G\beta$ subunits and a domain of the channel. We find that exactly the same $G\beta$ subunits that inhibit current also interact well with the linker between domains I and II of the α_1 subunit of the class B (N-type) calcium channel. Together, these results identify the $G\beta$ subunits that can mediate fast, membrane-delimited, and voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels, and they identify a target domain of the channel that has the appropriate binding specificity.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and intranuclear microinjection. Single SCG neurons were enzymatically dissociated from 5-week-old male rats (Sprague Dawley rats were used for the experiments in Figs. 1–3 in Seattle, and Wistar rats were used in the experiments in Figs. 4 and 5 in Mexico) as described previously (Beech et al., 1991; Bernheim et al., 1991). After a 4 hr wait for attachment to the substrate, the neurons were intranuclearly microinjected using an Eppendorf 5242 pressure microinjector and 5171 micromanipulator system (Eppendorf, Madison, WI). The injection solution contained varying amounts of G-protein expression plasmids mixed with two injection markers, 1 mg/ml 10,000 kDa dextran–fluorescein (Molecular Probes, Eugene, OR), and green-fluorescent protein (GFP) plasmid as an expression reporter. Injection at pressures of 10–20 kPa for

Received July 1, 1998; revised Aug. 26, 1998; accepted Aug. 27, 1998.

This work was supported by the W. M. Keck Foundation, an Alexander von Humboldt Stiftung Fellowship, DGAPA Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, and National Institutes of Health Grants NS01588, DA08934, DA00286, NS08174, NS22625, and GM46963. N.G. is an Established Investigator of the American Heart Association. We thank D. Anderson, S. Brown, and L. Miller for technical help.

Correspondence should be addressed to Dr. Bertil Hille, Department of Physiology and Biophysics, Box 357290, University of Washington, Seattle, WA 98195-7290.

Drs. Li, García-Ferreiro, and Hernández-Ochoa contributed equally to this work. Copyright © 1998 Society for Neuroscience 0270-6474/98/189163-08\$05.00/0