



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“LA FOSFORILACIÓN INDUCIDA POR PMA Y LA ACTIVACIÓN  
DE PROTEÍNAS G REGULAN ANTAGÓNICAMENTE LOS  
CANALES DE CALCIO  $Ca_v2.2$  EN NEURONAS SIMPÁTICAS DE  
RATA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. ALFONSO FELIPE DÍAZ CÁRDENAS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2009**

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ABSTRACT	6
RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	8
<i>La regulación de los niveles del calcio intracelular</i>	8
<i>Canales de calcio</i>	14
<i>Clasificación de los canales de calcio</i>	15
<i>Mecanismos reguladores de los canales de calcio</i>	18
<i>Las proteínas G</i>	19
<i>Los receptores acoplados a proteínas G</i>	22
<i>Los receptores <math>\alpha_2</math>-adrenérgicos</i>	24
II. ANTECEDENTES	26
<i>Regulación de los canales de calcio tipo N (Cav2.2) a través de receptores acoplados a proteínas G</i>	26
<i>Regulación inhibitoria de los canales Cav2.2 por acción directa de las subunidades G<math>\beta\gamma</math></i>	32
<i>Regulación de los canales de calcio Cav2.2 por la activación de la proteína cinasa C</i>	36
<i>Interacción fisiológica entre la inhibición por proteínas G y la fosforilación de los canales de calcio Cav2.2</i>	39
<i>Planteamiento del problema e identificación del problema central</i>	40
<i>Hipótesis</i>	41
<i>Objetivo general</i>	41
<i>Objetivos particulares</i>	41
III. MÉTODOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS	42
<i>Cultivo celular</i>	42
<i>Preparación de cultivos primarios de SCG</i>	42

<b><i>Microinyección de los plásmidos para la expresión de las subunidades <math>G\beta_1\gamma_4</math></i></b>	43
<b><i>Electrofisiología y análisis de los datos</i></b>	45
<b>IV. RESULTADOS</b>	50
<b><i>Características de las corrientes iónicas a través de los canales <math>Ca_v2.2</math></i></b>	51
<b><i>Efectos de la sobreexpresión de las subunidades <math>G\beta_1\gamma_4</math></i></b>	52
<b><i>Efectos diferenciales entre la acción del <math>GDP\beta_S</math> y el tratamiento con PMA</i></b>	53
<b><i>Densidad de corriente y conductancia en células dializadas con <math>GDP\beta_S</math> y aquellas tratadas con PMA</i></b>	54
<b><i>Efectos del <math>GDP\beta_S</math> y el tratamiento con PMA en las colas de corriente</i></b>	54
<b><i>Interacción y reversibilidad de la inhibición por proteínas G y la fosforilación de los canales de calcio <math>Ca_v2.2</math></i></b>	57
<b>V. DISCUSIÓN</b>	63
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	65
<b><i>Relevancia y perspectivas del trabajo</i></b>	66
<b>VII. REFERENCIAS</b>	67
<b>VIII. TRABAJO PUBLICADO</b>	77

## ***AGRADECIMIENTOS***

El trabajo aquí presentado fue realizado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz, dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Gracias al apoyo de la Facultad de Psicología de la Universidad Autónoma de Puebla (UAP), del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).

A mis hijos quienes son mi felicidad y lo más importante en mi vida:

Alfonsito, Héctor y Alonso; Ana

Juan Carlos, Esthela y Orlando

A mi mamá, que tanto luchó por mí, y a mi papá, que se sentía orgulloso de cualquier pequeño logro mío, a dónde estén, si es que están en algún lugar además de mi corazón. A mis hermanas que siempre me han apoyado con mucho cariño Elizabeth, Ángeles y Rocío.

Agradezco particularmente al Dr. David García por su inapreciable amistad y por el apoyo así como el consejo que me ha brindado siempre. Tutor y amigo, sin él no hubiera terminado. Siempre me decía que no me desanimara y creo que no llegué al desánimo pero sí de alguna manera disminuyó mi entusiasmo y aunque jamás desistí algo faltaba en mi trabajo. He recibido de él, de múltiples formas, muestras de su amistad.

A la Bióloga Isabel Arenas Reyes, sin su apoyo y su participación en la realización de las tareas experimentales el presente trabajo no sería una realidad.

Con afecto a Martha Romano que no dejó que me rindiera en el proyecto de hacer un doctorado.

A Carolina y Silvia que me brindaron su amistad y me apoyaron siempre en varios de los proyectos de investigación, ellas me enseñaron muchas cosas del trabajo cotidiano en el laboratorio, como el cultivo celular y diversas técnicas experimentales.

A quienes considero amigos y que a la vez fueron participantes de alguna manera en el programa de doctorado.

A Enrique Soto por su apoyo y comprensión pero al mismo tiempo su exigencia en la revisión de mi trabajo.

A Marcia Hiriart que me acompañó durante el proceso como parte de mi comité tutorial. Su amistad no le permitió tolerar varias deficiencias que me ayudó a identificar y que si no las superé totalmente fue por mi indisciplina.

A David, Enrique y Marcia les agradezco la exigencia en la redacción del proyecto, reportes, avances y tesis. Porque a veces yo doy mucha importancia a los detalles de la lengua pero en lo general soy terriblemente mal redactor.

A Rayo Sankey que ha sido siempre una amiga sincera y que me ayudó a revisar varias partes de la redacción.

A Gonzalo Flores que me brindo de manera incondicional facilidades para la realización de varios cursos. Al finalizar esta tesis me atormenta un compromiso con él aún no cumplido.

A Agustín Guerrero buen amigo e invaluable apoyo crítico en mi examen de candidatura. Al igual que Marco Tulio que también vive en el corazón de los que le conocimos.

A Vilja Woodcock por su amistad y su apoyo constante en mi desarrollo académico.

Al Dr. Dieter Mascher siempre amable aún en sus comentarios críticos.

Al Dr. José Bargas que desempeño un papel realmente fundamental para que no me desanimara y continuara en este proyecto. Sus comentarios fueron sumamente alentadores para mí.

Al Dr. Froylán Gómez que igualmente, como parte de mi comité tutorial, me hizo constantemente observaciones críticas.

A la Dra. Elvira Galarraga por sus importantes observaciones sobre mi trabajo. A ella así como a los Drs. Jesús García Colunga y León Islas mi agradecimiento por revisar con gran seriedad mi trabajo de tesis y sugerirme modificaciones que espero haya yo podido realizar de manera que el documento resultante sirva para quien se tome la molestia de leer mi tesis.

A mis amigos el Dr. Mario Vázquez y el Dr. José María Farías Sánchez que me han brindado apoyo de diversas maneras.

Al Dr. Lorenzo Díaz Cruz quien me aceptó en un curso como parte de mi programa de doctorado y quien me permitió acercarme al ámbito de la teoría cuántica de campos.

## ***ABSTRACT***

Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation and G protein-mediated inhibition of  $\text{Ca}_v2.2$  N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels counteract exerting opposing modulatory responses at the channel level. At present, the most striking question remaining is whether prominent enhancement of the  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}}$ ) observed under PKC activation arises from relief of G-protein tonic inhibition. Here, by using patch-clamp methods in superior cervical ganglion (SCG) neurons of rat, we show the following: First, that PKC activation by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) not only counteracts mutually with noradrenaline (NA) and GTP $\gamma$ S-induced  $I_{\text{Ca}}$  inhibition, but also reverses current inhibition by  $\text{G}\beta\gamma$  subunits over-expression. Second, that PMA increases  $I_{\text{Ca}}$  beyond the enhancement expected by sole removal of the G protein-mediated tonic inhibition. Accordingly, PMA increases conductance through N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, unlike the G protein inhibitor  $\text{GDP}\beta\text{S}$ . Together, our results support that PMA-induced phosphorylation produces changes in  $I_{\text{Ca}}$  that cannot be accounted for by prevention of G protein inhibition. They may have important implications in reinterpretation of existing data with PMA. Furthermore, counteracting modulation of ion channels and reversibility within a short time frame are better support for a dynamic system with short-term adaptive responses.

## **RESUMEN**

El incremento en la corriente iónica a través de los canales de calcio tipo N ( $Ca_v2.2$ ) debido a la fosforilación inducida por la proteína cinasa C (PKC) y la inhibición de los mismos mediada por las proteínas G ejercen un tipo de modulación antagónica sobre esos canales de calcio. En la actualidad, la interrogante no resuelta aún es si el aumento notorio de la corriente de calcio observada con la aplicación de la PKC surge exclusivamente como consecuencia de una liberación de la inhibición tónica. Se denomina inhibición tónica a la inhibición de los canales de calcio debido a la activación de las proteínas G. Mediante la utilización de métodos de pinzamiento zonal de membrana para la fijación del voltaje en células del ganglio cervical superior (SCG) de rata se encontró lo siguiente: En primer lugar, la activación de la PKC por el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) no sólo contrarresta la inhibición debida a la aplicación de noradrenalina (NA) y  $GTP\gamma S$ , sino que, igualmente lo hace con la inhibición debida a una sobre-expresión de las subunidades  $G\beta\gamma$ . En segundo lugar, el PMA incrementa la corriente de calcio más allá de lo que se esperaría solamente de la liberación de la inhibición tónica mediada por proteínas G. En consecuencia, el PMA aumenta la conductancia a través de los canales de calcio tipo N a diferencia de la acción del  $GDP\beta S$ , un análogo no hidrolizable del GDP e inhibidor de las proteínas G. En conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el PMA mediante la fosforilación del canal  $Ca_v2.2$  induce cambios en el mismo que no pueden ser atribuidos meramente a una acción de prevención de la inhibición debida a las proteínas G. Estos resultados pueden tener importantes implicaciones en una nueva reinterpretación de los datos ya existentes acerca de los efectos del PMA. Por otra parte, la modulación resultante de esos procesos antagónicos sobre esos canales iónicos ( $Ca_v2.2$ ) y la reversibilidad de sus efectos en un corto plazo son el mejor soporte para considerar que participan en un sistema dinámico que permite ejercer en periodos breves las respuestas adaptativas necesarias.



## ***I. INTRODUCCIÓN***

[Zong](#) y Lux (1994) al estudiar la regulación de los canales de calcio Cav2.2 o tipo N por la acción de las proteínas G observaron dos componentes reguladores. Un proceso de regulación inhibitorio que ocurría casi inmediatamente que eran activadas las proteínas G y un segundo proceso que incrementaba la corriente iónica de esos canales, el cual podía observarse, en promedio, a los diez minutos posteriores a la activación de las proteínas G. [Zong](#) y Lux evaluaron la posibilidad de que este mecanismo regulador estuviera vinculado a la activación de la proteína cinasa C (recurso aquí a la forma española utilizada en la versión española de [Kandel](#) *et al.* (2001) y en otros textos españoles, aunque considero que la forma *quinasa* es una forma aceptable en español y es la que se utiliza entre otros libros en el de [Mathews](#) *et al.* (2002)). La caracterización electrofisiológica de la actividad de los canales de calcio tipo N bajo la acción simultánea de esos dos procesos constituye el objetivo central de este trabajo.

A manera de introducción, en este capítulo, se presenta una revisión general de:

- la importancia de la regulación de los niveles del calcio intracelular;
- las características y el papel fisiológico de los canales de calcio, en particular, de los canales Cav2.2;
- las proteínas G y su actividad regulatoria, así como
- las características de los receptores acoplados a las proteínas G.

### ***La regulación de los niveles del calcio intracelular***

En los procesos de señalización intracelular e intercelular, la concentración de calcio en el interior de la célula ejerce funciones reguladoras que resultan en un ajuste fisiológico acorde con las señales y circunstancias temporales y espaciales que crean el contexto celular. El calcio no solamente sirve como portador de carga en las corrientes que se mueven a través de canales iónicos, como lo hacen el sodio o el potasio, sino que también funciona como un segundo mensajero intracelular, al igual que el fosfato de inositol o el AMP-cíclico. Procesos celulares como la contracción muscular o la liberación del neurotransmisor son dependientes de los niveles de calcio intracelular ([Berridge](#) *et al.*, 2003; [Berridge](#) *et al.*, 2000; [Bootman](#) *et al.*, 2002; [Bootman](#) *et al.*,

2001) Asimismo, algunos procesos citotóxicos son dependientes del calcio libre intracelular ([Luetjens et al.](#), 2000; [Nicholls](#), 2004; [Won et al.](#) 2002).

La concentración intracelular de calcio en la célula muscular y neuronal en reposo se encuentra en el orden de  $10^{-7}$  M, mientras que en el exterior alcanza niveles de  $10^{-3}$  M. Esto genera una gran fuerza impulsora para el desarrollo de las corrientes de calcio. Varios mecanismos intervienen para la regulación de los niveles de calcio intracelular necesarios para las diversas funciones celulares:

La entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio sensibles al voltaje o de canales regulados por ligandos (usamos aquí los términos más frecuentes en la traducción española de [Kandel et al.](#) (2001), al respecto véase la nota en la pag. 107 de ese texto).

La liberación de calcio del retículo sarcoplásmico vía la estimulación de receptores a  $\text{InsP}_3$  o de la mitocondria a través del intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ .

La extracción del calcio intracelular a través de la ATPasa de calcio o del intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática.

La unión de calcio libre a proteínas intracelulares.

El secuestro de calcio al interior del retículo a través de la ATPasa de calcio o al interior de la mitocondria mediante mecanismos electroforéticos.

[Katz](#) y Miledi (1967) en un trabajo sobre la participación del calcio en los procesos neuronales propusieron que el calcio podría tener una doble función en el bulbo terminal axónico o terminal sináptico. Por un lado, mostraron que el calcio contribuye a la despolarización de la membrana y, por el otro, expusieron el papel del calcio como un mensajero intracelular para la regulación de la liberación de los neurotransmisores. [Llinas](#), Steinberg, y Walton (1976) aportaron resultados que muestran una corriente de calcio a través de canales sensibles al voltaje en el bulbo terminal del calamar relacionada con la liberación del neurotransmisor.

Además de la regulación de la liberación de neurotransmisores en el terminal sináptico, los canales de calcio desempeñan un papel esencial en varias funciones celulares. Incrementos en la concentración del calcio intracelular activan diversas vías de señalización que llevan a la expresión de genes esenciales para el desarrollo dendrítico, la supervivencia neuronal o la plasticidad sináptica. El influjo de calcio a través de canales tipo L es particularmente eficiente en la activación de factores de

transcripción como CREB (por sus siglas en inglés: *cyclic adenosine monophosphate response element binding protein*) que puede resultar en la expresión de genes como el que codifica el BDNF (por sus siglas en inglés: *brain-derived neurotrophic factor*) ([Dolmetsch et al., 2001](#); [Li et al., 1998](#)). Asimismo, un aumento en los niveles de calcio intranuclear resulta en una depresión transcripcional mediada por DREAM (por sus siglas en inglés: *downstream regulatory element modulator*) ([Ledo et al., 2002](#), [Savignac et al., 2007](#)). El influjo de calcio a través de canales participa, además, en la regulación de la fertilización, la proliferación celular, los procesos del desarrollo celular, el aprendizaje y la memoria, la contracción muscular o la secreción ([Calin-Jageman y Lee, 2008](#); [Reid et al. 2004](#); [Saunders et al., 2002](#)).

Los canales de calcio no solamente afectan directamente el potencial de la membrana sino que además, pueden hacerlo indirectamente al influenciar a otras poblaciones de canales. Los canales participan de manera importante en los incrementos transitorios de calcio intracelular que regulan diferencialmente la actividad de los canales de potasio activados por calcio ([Wisgirda y Dryer, 1994](#)). Entre éstos está el canal BK [por sus siglas en inglés: *big K<sup>+</sup>* ([Blatz y Magleby, 1987](#))] que es el canal de potasio activado por calcio de alta conductancia. Se distribuye principalmente en el músculo liso, en las células ciliadas de la cóclea y en las neuronas en general. Otro canal activado por calcio de relevancia fisiológica es el canal de potasio activado por calcio de baja conductancia (SK, por sus siglas en inglés: *small K<sup>+</sup>*). Tanto los canales BK como SK se encuentran co-localizados con los canales de calcio L, N y P/Q, de manera que su interacción tiene consecuencias fisiológicas importantes ([Vergara et al., 1998](#)), como en el caso bien estudiado de las neuronas del estriado ([Galaraga et al., 2007](#)).

A pesar de la gama de procesos que pueden ser regulados por cambios en la concentración del calcio intracelular, estas variaciones no deben exceder cierto límite a partir del cual pueden desencadenarse procesos que resultan finalmente citotóxicos ([Berridge, Lipp, y Bootman, 2000](#); [Luetjens et al., 2000](#); [Nicholls, 2004](#); [Won et al. 2002](#)). Un incremento excesivo de calcio intracelular puede desencadenar una serie de reacciones que conducen a la apoptosis (muerte celular programada). Una sobrecarga de calcio libre intracelular puede estar en el centro de una serie de procesos que afectan los mecanismos ya señalados para la regulación de los niveles del calcio intracelular, alterándolos desde la entrada de calcio extracelular hasta los mecanismos de extracción y secuestro del calcio intracelular.

Por ejemplo, en la condición conocida como excitotoxicidad debida a la activación sostenida de receptores ionotrópicos de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato) –denominados ionotrópicos porque al ser activados directamente por el ligando permiten el movimiento de iones– una entrada importante de calcio a través de esos receptores produce una sobrecarga en el calcio intracelular. El incremento en el calcio citoplasmático resulta en un incremento en el calcio mitocondrial que, a su vez, afecta la fosforilación oxidativa lo que lleva a una disminución en la síntesis de ATP. Esto influencia el funcionamiento de la ATPasa de calcio y contribuye al incremento del calcio intracelular. Así mismo, la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumenta y permite el movimiento de sustancias citotóxicas como el citocromo c. En la fase que se ha llamado des-regulación tardía del calcio (DCD, por sus siglas en inglés: *delayed Ca<sup>2+</sup> deregulation*) la liberación de citocromo c dependiente de calcio ocurre ya sea por la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT pores, por sus siglas en inglés: *mitochondrial permeability transition pores*) o por otras vías independientes de poros ([Luetjens et al., 2000](#); [Nicholls, 2004](#); [Won et al. 2002](#))

Adicionalmente, el incremento de la concentración de calcio intracelular activa una serie de enzimas que tienen efectos citotóxicos. A saber:

las calpaínas que son proteasas de cisteína dependientes de calcio que afectan a otras proteínas vitales como la espectrina, la fodrina, la ATPasa de calcio, la proteína cinasa C o el factor nuclear kapa B,

las endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  como la ADNasa II que produce rupturas en una región del vínculo entre nucleosomas del ADN lo que produce fragmentos internucleosómicos de ADN con un número de pares de bases en múltiplos de doscientos,

las cinasas de proteínas dependientes de calcio,

la fosfolipasa citosólica A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) que activada por una sobrecarga de calcio produce metabolitos tales como prostaglandinas, leucotrienos, o especies de oxígeno reactivas como el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>). Estas últimas especies moleculares de oxígeno parcialmente reducidas son muy citotóxicas. El radical hidroxilo, en particular reactivo, daña a varias moléculas biológicas. Por ejemplo, perjudica a las membranas biológicas al iniciar la oxidación de los ácidos grasos en los lípidos membranales mediante la peroxidación lipídica. Daña, igualmente, a los ácidos nucleicos mediante la ruptura de la cadena de polinucleótidos ([Mathews, van Holde y Ahern, 2002](#)).

Los radicales libres desempeñan una función esencial en el equilibrio fisiológico

general. En condiciones normales las neuronas están expuestas a niveles bajos de los mismos ya que son extremadamente vulnerables a daños mediados por radicales libres en diversas moléculas biológicas (para una revisión véanse [Juránek](#) y. Bezek, 2005; y [Won](#), Kim y Gwag, 2002).

Es muy importante considerar que la concentración intracelular de calcio se eleva sólo por breves lapsos y en dominios espacialmente restringidos, es decir, las señales de calcio son altamente específicas tanto en el tiempo como en el espacio. Los blancos sobre los cuales actúa el calcio en el interior de la célula se encuentran muy próximos a la fuente de entrada o incremento de la concentración de calcio. Se ha propuesto una clasificación de los dominios locales de señalización del calcio (FIG. [1.1](#)) basado en el sistema de amortiguación (Mathews *et al.*, 2002) BAPTA-EGTA y que permite distinguir entre:

Nanodominios de calcio, en los cuales se encuentran procesos sensibles al calcio que son eficientemente bloqueados por BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacetato, FIG. [3.2](#)) pero no por EGTA (etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter) N,N'tetraacetato). Estos procesos se hallan localizados alrededor de 20 a 50 nm de la fuente de calcio. Los niveles que alcanza la concentración de calcio libre en estos nanodominios es del orden de 100 μM. El tiempo que requiere el aumento y el decaimiento de la señal de calcio es apenas del rango de microsegundos. Un caso típico de nanodominios es el complejo bimolecular que constituyen los canales de Ca<sub>v</sub> y los canales BK en cuyo caso la distancia máxima para su activación es menor a los diez nm en la cual la concentración llega a los niveles de 10 μM, que es el mínimo requerido para una sólida respuesta de los canales BK.

Microdominios de calcio, en los que se producen procesos sensibles al aumento de calcio intracelular y que se sitúan más allá de los 50 nm, pero no más lejos de unos pocos cientos de nanómetros, de la fuente de calcio. La concentración de calcio en estos microdominios apenas se eleva diez veces menos que en los nanodominios (uno a cinco micromolar). La elevación y el decaimiento de las señales de calcio en los microdominios emplean tiempos del orden de milisegundos ([Fakler](#) y Adelman, 2008; [Neher](#), 1998; y [Augustine](#) *et al.*, 2003). Los canales SK se encuentran en estos microdominios de calcio, ya que la concentración mínima para que den una sólida respuesta es de 1μM que se

alcanza aún a distancias mayores a los 70 nm de los canales  $Ca_V$  (Fakler y Adelman, 2008). La acumulación mitocondrial de calcio cuando su concentración intracelular se eleva es difícil de explicar si tomamos en cuenta la baja afinidad del sistema uniporte [se aplica aquí la forma española que se utiliza en Mathews *et al.* (2002) para las palabras simporte y antiporte] de alta velocidad que es el primer mecanismo de captura de calcio mitocondrial. Se ha propuesto que la mitocondria se localiza en estrecha proximidad a los sitios de liberación o entrada de calcio en lo que se consideran microdominios de calcio (Bootman *et al.*, 2001).

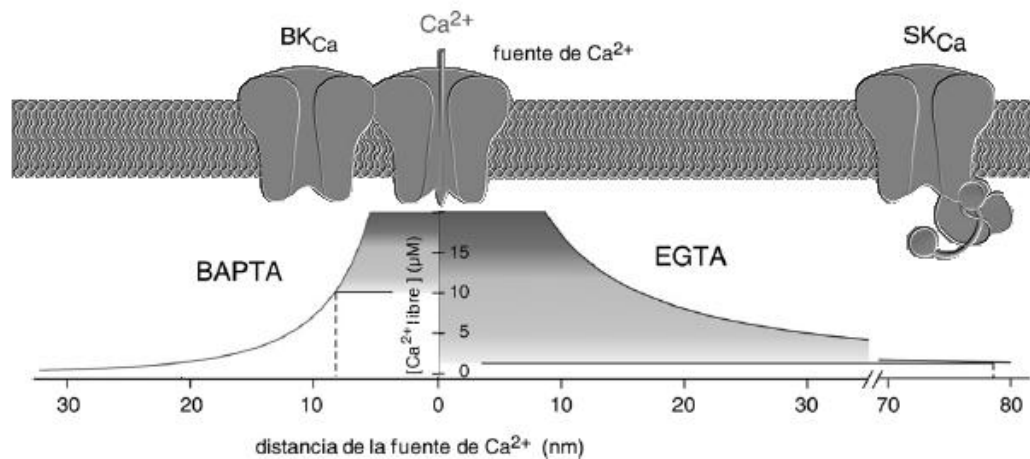


FIGURA 1.1 Restricciones espaciales para la activación de los canales de potasio activados por calcio BK y SK. En la figura se observa la localización de los canales BK y SK en la distancia máxima para la acción eficaz del calcio. El canal BK (lado izquierdo) debe encontrarse en el nanodominio, mientras que el canal SK (lado derecho) debe estar ubicado en el microdominio (adaptada y modificada de Fakler y Adelman, 2008).

Así pues, la concentración de calcio intracelular es un elemento clave en la regulación de una amplia gama de procesos fisiológicos al igual que en muchos casos de patología celular. Por ello ha sido indispensable la evolución de diversos mecanismos para una regulación cada vez más compleja y, al mismo tiempo, más fina y precisa de los niveles de calcio intracelular. De particular importancia en nuestro trabajo es la regulación de la entrada de calcio a través de los canales iónicos de la membrana.

### Canales de calcio

Los canales de calcio regulados por voltaje son grandes proteínas heteroméricas constituidas por varias subunidades (FIG. 1.2):  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\gamma$ . Los genes que codifican los canales de calcio pertenecen a la superfamilia de genes homólogos para las proteínas transmembranales que incluye a los canales de sodio y potasio (Hille, 2001). En términos biológicos se consideran estructuras homólogas aquellas que derivan de una estructura ancestral común, es decir, la inclusión de proteínas en una superfamilia de genes homólogos no está en función de la semejanza o el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Hille, 2001).

Al igual que los canales de sodio, los canales de calcio están formados por una subunidad ( $\alpha_1$ ) muy grande que desempeña un papel central en la estructura y el funcionamiento del canal (FIG. 1.2). La subunidad  $\alpha_1$  consta de cuatro dominios homólogos (I, II, III, IV) con dos regiones terminales citoplasmáticas C- y N-, y con tres asas (*loops*) citoplasmáticas (I-II, II-III, III-IV). Estas asas ( $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ) han sido señaladas como los lugares de acción de segundos mensajeros y de proteínas reguladoras. Cada dominio contiene seis hélices proteínicas transmembranales denominadas  $S_1$  hasta  $S_6$ . Se ha propuesto que la unión de la  $S_5$  y la  $S_6$  (región P) que se encuentra en la cara extracelular de la membrana es una estructura que forma parte del filtro de selectividad del canal y un cambio de sólo tres aminoácidos en esa región cambia la selectividad del canal de calcio al sodio (Dolphin, 2006; Tedford y Zamponi, 2006).

La mayor parte de los tipos de canales de calcio contienen una subunidad  $\beta$  intracelular y un complejo formado por las subunidades  $\alpha_2\delta$  (FIG. 1.2). Cuatro isoformas de la subunidad  $\beta$  han sido ya clonadas ( $\beta_{1-4}$ ). Con respecto al complejo  $\alpha_2\delta$  se ha determinado que es codificada por un solo gen cuyo producto polipeptídico es segmentado en dos partes (moieties), las subunidades  $\alpha_2$  y  $\delta$ . También se han podido clonar cuatro genes para el complejo  $\alpha_2\delta$ .

Mientras que las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2\delta$  forman parte de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  al parecer las subunidades  $\gamma$  sólo han sido encontradas con certeza en los canales de calcio del músculo esquelético (tipo L o  $Ca_v1.1$ ). En la figura 1.2 se representa la estructura de los canales de calcio de la familia  $Ca_v2$  (véase *infra* “La clasificación de los canales de calcio”).



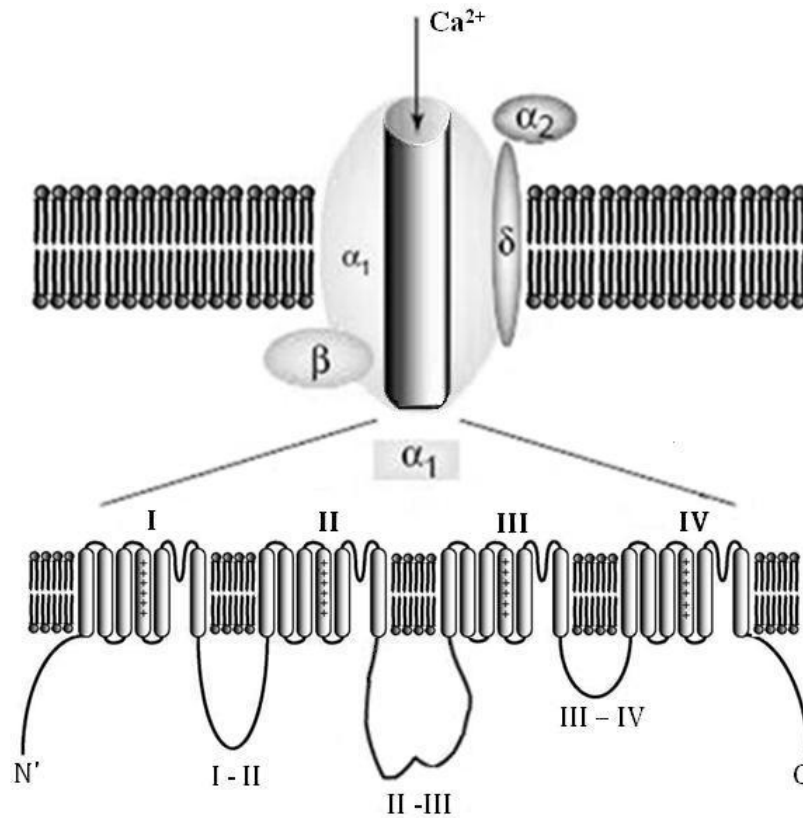


FIGURA 1.2 Estructura del canal de calcio sensible al voltaje. En la parte superior de la figura se puede observar la estructura cuaternaria del canal, la cual está constituida por una subunidad  $\alpha_1$  (que forma el poro del canal) y dos subunidades auxiliares ( $\beta$  y  $\alpha_2\delta$ ). En la parte inferior de la figura se muestra en forma desplegada la subunidad  $\alpha_1$ . Cuatro dominios homólogos (numerados I a IV) componen esta subunidad y cinco segmentos se proyectan intracelularmente [adaptada y modificada de [Tedford](#) y [Zamponi](#), 2006 y [Dascal](#), 2001].

### Clasificación de los canales de calcio

[Carbone](#) y [Lux](#) (1984) inicialmente clasificaron a los canales de calcio regulados por voltaje en dos grandes grupos: LVA (*low voltage-activated*) y HVA (*high voltage-activated*), activados por bajos y altos voltajes, respectivamente. Esta clasificación basada principalmente en los umbrales de activación no es precisa ya que no toma en cuenta que esos umbrales son susceptibles de modificaciones por diversos factores. En la actualidad se ha elegido una clasificación que se basa en la estructura molecular de la subunidad  $\alpha_1$  de la cual se han identificado y caracterizado funcionalmente diez formas ya clonadas (tabla [1.1](#)). Estas variantes han sido agrupadas en tres familias homólogas



denominadas  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$ , y  $Ca_v3$  (véase: [Catterall et al.](#), 2003; [Dolphin](#), 2006; y [Tedford](#) y Zamponi, 2006).

Tipo de canal Carbone y Lux	Familia génica	Gen $\alpha_1$	Tipo de canal Nowycky et al.	Bloqueadores principales	Distribución principal
HVA	$Ca_v1$	$Ca_v1.1$	Tipo-L	Dihidropiridinas	Músculo esquelético
		$Ca_v1.2$			Tejidos: cardíaco, neural, endocrino
		$Ca_v1.3$			
		$Ca_v1.4$			Retinal de los fotorreceptores
	$Ca_v2$	$Ca_v2.1$	Tipo-P/Q	$\omega$ -agatoxina-IVA	Neuronas
		$Ca_v2.2$	Tipo-N	$\omega$ -conotoxina-GVIA	Neuronas
		$Ca_v2.3$	Tipo R	SNX-482	Neuronas
LVA	$Ca_v3$	$Ca_v3.1$	Tipo-T	Kurtoxina	Ampliamente expresadas
		$Ca_v3.2$		Kurtosina, níquel	Ampliamente expresadas
		$Ca_v3.3$		Kurtoxina	Tejido neuronal

TABLA 1.1 Clasificación de los canales de calcio que incluye las categorías propuestas por Carbone y Lux (1984) y por Nowycky et al. (1985).

La familia  $Ca_v1$  tiene cuatro variantes que expresan los canales tipo L, denominados así por [Nowycky et al.](#) (1985) por su corriente prolongada (*long lasting, large  $Ba^{2+}$  conductance*), y clasificados como canales HVA por [Carbone](#) y Lux (1984). Estos canales fueron identificados farmacológicamente por su sensibilidad a las dihidropiridinas como la nifedipina y por el uso del compuesto BayK8644 que incrementa su actividad. Las cuatro variantes de este grupo son las siguientes ([Calin-Jageman](#), 2008, [Dolphin](#), 2006; [Catterall](#), 2000):

$Ca_v1.1$  es la isoforma molecular del canal de calcio del músculo esquelético, el sensor de voltaje del acoplamiento excitación-contracción.

$Ca_v1.2$  es la forma más representativa del músculo cardíaco. Igualmente constituye alrededor del ochenta por ciento de la población de canales  $Ca_v1$  en el cerebro. Se encuentra en la membrana somato dendrítica de muchas neuronas.

Ca<sub>v</sub>1.3 es una forma que se activa a voltajes muy bajos (sub-umbrales) y se encuentra preferentemente en páncreas, cerebro y corazón. Representan el canal Ca<sub>v</sub> primario en las células ciliadas del oído interno. Al igual que el Ca<sub>v</sub>1.2 se localiza en la membrana somato dendrítica ([Vergara et al., 2003](#)). Se ha mostrado que en neuronas del estriado estos canales (Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>1.3) y los receptores NMDA son capaces de producir una biestabilidad de la membrana en la relación corriente-voltaje lo que origina mesetas despolarizantes y oscilaciones de voltaje ([Vergara et al., 2003](#)).

Ca<sub>v</sub>1.4 al igual que el anterior se activa a umbrales más bajos de voltaje y se ha observado que funcionalmente está relacionado con el proceso de fototransducción ya que media la liberación de glutamato en la oscuridad.

La familia Ca<sub>v</sub>2 es la más ampliamente expresada en las células neuronales, además de que parece ser la única clase de canales de calcio que puede ser inhibida por vías sensibles al voltaje ([Elmslie, 2003](#)). Esta familia tiene tres expresiones génicas:

Ca<sub>v</sub>2.1 es la contraparte molecular de los canales de calcio tipo P/Q (P por haber sido descrito inicialmente en células de Purkinje; y Q porque al principio se pensó que constituía otro tipo de canal de calcio). Estos canales son sensibles a un componente del veneno de la araña norteamericana *Agelenopsis aperta*, el péptido ω-agatoxin IVA. La corriente de los canales de calcio tipo Q fue identificada en células granulares cerebelares y muestra una inactivación más rápida y menor afinidad por la ω-agatoxin IVA que los canales tipo P.

Ca<sub>v</sub>2.2 corresponde al gen que codifica la subunidad α<sub>1</sub> de los canales de calcio tipo N, denominados así por [Nowycky et al. \(1985\)](#) por neuronal y por ser canales HVA pero no tipo L (non-L). Se identifican farmacológicamente porque son bloqueados por una fracción de las toxinas del molusco *Conus geographus*, denominada ω-conotoxina GVIA, un péptido de veintisiete aminoácidos ([McCleskey et al., 1987](#)). Estos canales son particularmente prevalentes en los terminales sinápticos.

Ca<sub>v</sub>2.3 expresa los canales de calcio tipo R (resistente o residual), definidos así por ser canales HVA resistentes a las dihidropiridinas y a la ω-conotoxina GVIA, además de ser resistentes a la ω-agatoxin IVA. Un bloqueador potente y semiselectivo de estos canales es el péptido SNX-482 aislado de las toxinas de algunas especies de tarántulas gigantes.

Finalmente, la familia Ca<sub>v</sub>3 que codifica las tres diferentes isoformas de los canales de calcio tipo T (llamados así por su conductancia transitoria [*transient*] o tenue [*tiny*]). Los canales de calcio activados a bajos voltajes fueron los últimos en ser clonados, el análisis de homología muestra que son característicamente diferentes de los

canales HVA. Esta familia incluye ([Catterall](#), 2000; [Dolphin](#), 2006; [Tedford](#) y Zamponi, 2006).

Ca<sub>v</sub>3.1 es una isoforma que se expresa en diversos tejidos, en las neuronas se encuentra principalmente en el cuerpo celular y las dendritas, en donde pueden participar en la regulación de la excitabilidad neuronal. Varios fármacos antiepilépticos bloquean los canales de calcio tipo T. Un bloqueador de estos canales es la kurtoxina.

Ca<sub>v</sub>3.2 también expresa un tipo canal de calcio que se encuentra en varios tejidos. De interés particular son los que se expresan en la red tálamo-cortical y cuyas mutaciones, se ha reportado, podrían participar en la epilepsia infantil de ausencia, un subtipo de epilepsia generalizada ideopática ([Peloquin](#), 2006).

Ca<sub>v</sub>3.3 es la contraparte molecular de canales de calcio tipo T que se encuentran casi exclusivamente en células neuronales.

### *Mecanismos reguladores de los canales de calcio*

Como he señalado, la necesidad de mantener las concentraciones de calcio dentro de límites fisiológicos ha llevado a la evolución de mecanismos de regulación cada vez más complejos y flexibles de los niveles de calcio libre en el interior de la célula. Los canales de calcio son el blanco fundamental de procesos celulares que dan como resultado una entrada regulada de calcio a través de ellos. Por ello, las señales químicas externas o internas que modifican la actividad de dichos canales juegan un papel fundamental en la regulación del funcionamiento neuronal.

La actividad de los canales de calcio, en particular los canales de Ca<sub>v</sub>2.2, puede ser facilitada o regulada hacia arriba (*upregulated*) o bien inhibida o regulada hacia abajo (*downregulated*) por diversos mecanismos. La interacción de estos procesos antagónicos da como resultado una modulación precisa de la actividad de estos canales.

Aunque los neurotransmisores pueden modular la actividad de los canales de calcio tipo N a través de diversos mecanismos la vía más común de regulación involucra la activación de proteínas G heterotriméricas. Por una parte, se ha mostrado que las subunidades βγ de esas proteínas G regulan directamente los canales de calcio tipo N por un mecanismo sensible al voltaje delimitado a la membrana celular y sensible a la toxina de *pertussis* ([Hille](#), 1994; [Herlitze et al.](#), 1996; [Ikeda](#), 1996). Y por la otra, la subunidad α activada por el intercambio de GDP por GTP y su consecuente separación de

las subunidades  $\beta\gamma$ , a través de segundos mensajeros, promueve la activación de varias enzimas, entre ellas la proteína cinasa C (PKC). Esta enzima es capaz de fosforilar a los canales de calcio tipo N, lo que produce un tipo de regulación distinta a la descrita para las subunidades  $\beta\gamma$ .

### *Las proteínas G*

Las proteínas G, denominadas así por su capacidad para unir nucleótidos de guanina, constituyen una superfamilia de hidrolasas de GTP (trifosfato de guanosina, FIG. 1.3), es decir, enzimas que catalizan rupturas hidrolíticas del GTP, lo que da como resultado GDP (difosfato de guanosina, FIG. 1.3). Las proteínas G forman complejos relativamente estables con su substrato GTP y su producto GDP (Sprang, 1997). En lo subsiguiente nos referiremos a las proteínas G heterotriméricas simplemente como proteínas G ya que nuestro estudio se centra en la acción de este tipo de moléculas y no se hará referencia a la actividad de otro tipo de proteínas G, como las proteínas Ras.

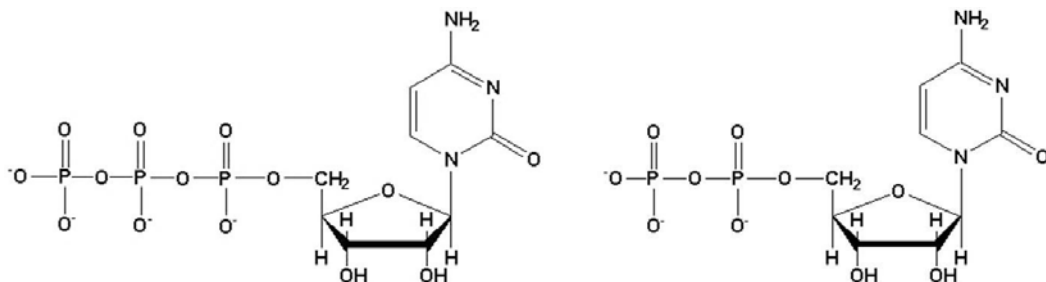


FIGURA 1.3 Estructura química del trifosfato de guanosina (izquierda) y del difosfato de guanosina (derecha).

El estudio de la estructura y función de las proteínas G en los últimos quince años ha crecido de manera exponencial, pues podemos encontrar más de diez mil trabajos publicados sobre este tema. La participación de las proteínas G en la regulación de procesos fisiológicos importantes ha sido bien establecida en estos años de investigación. Un conjunto importante de las proteínas G están constituidas por tres subunidades diferentes ( $G\alpha$ ,  $G\beta$ ,  $G\gamma$ ) por lo que se han descrito como sustancias heterotriméricas, palabra formada por la combinación de los vocablos griegos  $\epsilon\tau\epsilon\rho\omicron\varsigma$ , distinto,  $\tau\rho\epsilon\iota\varsigma$ , tres, y  $\mu\epsilon\rho\omicron\varsigma$ , miembro o parte. El número de variantes de cada

subunidad de estas proteínas G que se ha identificado en el genoma humano incluye 27 diferentes subunidades  $G\alpha$ , 5  $G\beta$ , y 14  $G\gamma$ , lo que produce un número de 1890 ( $27 \times 5 \times 14$ ) combinaciones posibles de heterotrómeros ([Albert](#) y Robillard, 2002).

Las proteínas G se clasifican con base en la subunidad  $G\alpha$ . Se han descrito cuatro grandes familias:  $G_s\alpha$  (s por estimulante),  $G_{i/o}\alpha$  (i por inhibidor y o por otro),  $G_{q/11}\alpha$ , y  $G_{12/13}\alpha$ . Farmacológicamente, las diversas formas de la subunidad  $G\alpha$  pueden clasificarse en tres grandes familias, en función de si son o no sustratos para la ADP-ribosilación catalizada ya sea por la toxina elaborada por *Vibrio cholerae*, o bien por la toxina elaborada por *Bordetella pertussis* o por ninguna de las dos (FIG. 1.4). Esas toxinas, ribosiltransferasas de ADP, son capaces de romper el  $NAD^+$  y transferir su parte ADP-ribosa a un lugar específico de la subunidad  $G\alpha$  y se han utilizado ampliamente en la identificación de la participación de las proteínas G en procesos de señalización celular ( $NAD^+ + G\alpha \rightarrow$  nicotinamida + ADP-ribosil- $G\alpha$ ).

La toxina de *cholerae* cataliza la ADP-ribosilación de residuos de arginina en la subunidad  $G\alpha$ , lo que produce una inhibición de su actividad GTPasa y previene su unión con las subunidades  $G\beta\gamma$  (FIG. 1.4). Las proteínas  $G_s$  y  $G_t$  son especialmente afectadas por esta toxina aún cuando el residuo de arginina se conserva en otras subunidades  $G\alpha$  que al parecer tienen ese residuo inaccesible para su ribosilación.

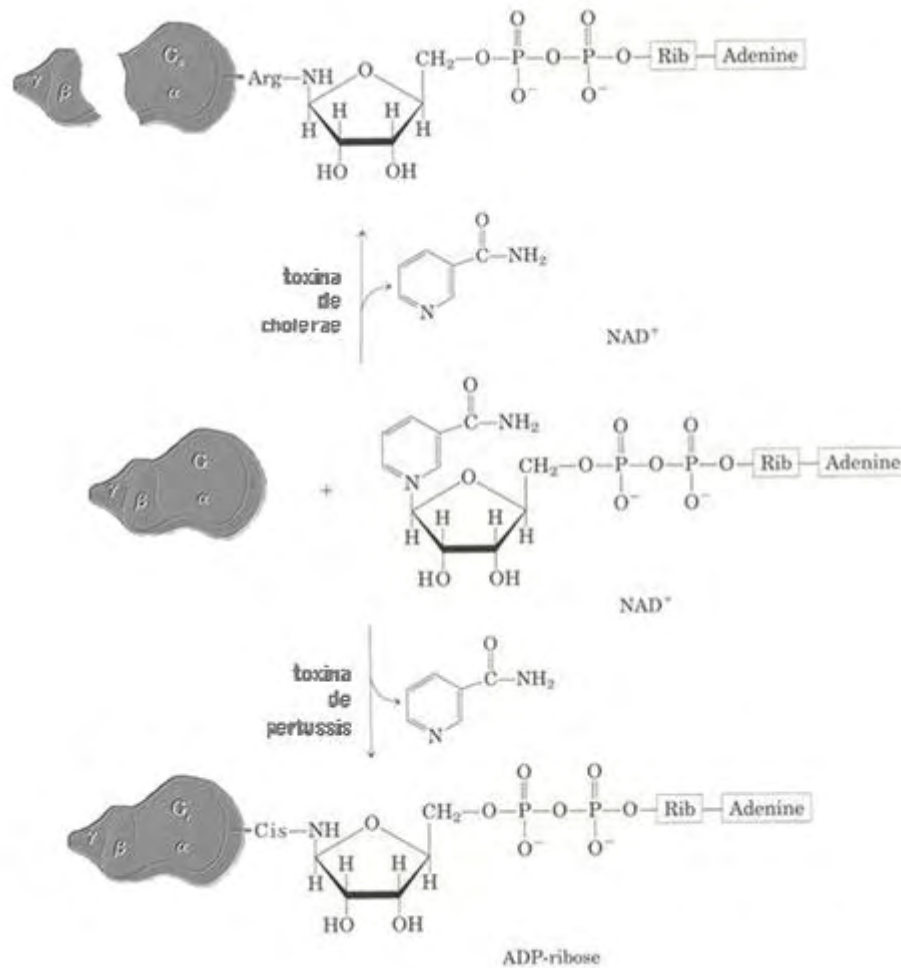


FIGURA 1.4 ADP-ribosilación producida por la toxina de *Vibrio cholerae* (parte superior de la figura) y por la toxina de *Bordetella pertussis* (parte inferior).

La toxina de *pertussis*, a su vez, cataliza la ADP-ribosilación de un residuo de cisteína en la subunidad G<sub>α</sub> que impide el intercambio de GDP por GTP (FIG. 1.4), lo que previene el paso a la forma activa de la proteína G y estabiliza la forma inactiva de G<sub>α</sub> (West *et al.*, 1985). Inicialmente el uso de esta toxina se limitó a permitir diferenciar la inhibición de la adenilato ciclasa a través de G<sub>i</sub> que es sensible a la acción de esa toxina, de la estimulación de la adenilato ciclasa a través de G<sub>s</sub> que es resistente a su acción. En las neuronas la vía de señalización regulatoria predominante se caracteriza por su sensibilidad a la toxina de *pertussis*, lo que significa que las proteínas G involucradas pertenecen a la familia denominada G<sub>i</sub>.

Las proteínas G<sub>q</sub>, G<sub>12</sub> y G<sub>z</sub>, esta última perteneciente a la subfamilia G<sub>i</sub>, carecen del residuo de cisteína que sufre la ADP-ribosilación y por ello son denominadas

proteínas G resistentes a la toxina de *pertussis* ([Fields](#) y Casey, 1997).

Las proteínas G son proteínas de membrana debido a que la mayor parte de ellas en su subunidad  $G\gamma$  está prenilada (contiene una porción isoprenoide  $C_{20}$  unida covalentemente a la cisteína C-terminal que ancla la proteína en la membrana). En su estado inactivo las proteínas G se unen al difosfato de guanosina (GDP) y la unión de un agonista (sustancia que promueve la activación de otra a la que se une) y el receptor al que se encuentra acoplada la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés: *G protein coupled receptors*) produce un cambio conformacional que resulta en el intercambio del GDP por GTP. Esto induce la activación de la proteína G que puede actuar ya sea a través de la subunidad  $G\alpha$  unida a GTP o vía las subunidades  $G\beta\gamma$ . La actividad GTPasa de la subunidad  $G\alpha$  rompe lentamente el GTP en GDP, y lleva al estado inactivo a la proteína G con la concurrente reasociación de la subunidad  $G\alpha$  con el complejo  $G\beta\gamma$ .

### ***Los receptores acoplados a proteínas G***

El *Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* de la *International Union of Pharmacology* (NC-IUPHAR) define a un receptor como una proteína, o un complejo de proteínas, que reconoce o se une a ligandos (*ligands*) fisiológicamente relevantes capaces de regular la proteína misma para mediar en el desarrollo de eventos celulares ([Spedding et al.](#), 2002).

De la gran familia de receptores de membrana, los receptores transmembranales heptaméricos (7TM), denominados también receptores acoplados a proteínas G, constituyen los receptores más versátiles y ubicuos. Participan en un gran número de procesos fisiológicos y en el genoma humano se encuentran alrededor de mil genes que los codifican ([Lefkowitz](#), 2004). Son, además, el blanco de un gran número de fármacos.

Las sustancias que pueden interaccionar con esos receptores incluyen a hormonas, una variedad de péptidos, lípidos bioactivos, aminoácidos, moléculas como la acetilcolina y la sacarosa, iones de calcio, incluso fotones, así como varios metabolitos de aminoácidos aromáticos como las catecolaminas que derivan de la tirosina (dopamina, adrenalina, noradrenalina). Estas últimas desempeñan un papel central en la regulación de la actividad de los canales iónicos en las neuronas y otras células excitables.

La adrenalina y la noradrenalina (NA) regulan diversas funciones celulares al interactuar con un tipo de receptores acoplados a proteínas G denominados receptores adrenérgicos. En 1948, [Ahlquist](#) propuso clasificar a estos receptores en dos grandes grupos, alfa y beta, y consideraba que la acción sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos mediaban efectos excitatorios sobre las células de músculo liso mientras que los  $\beta$ -adrenérgicos producían efectos inhibitorios (véanse las revisiones sobre los adrenorreceptores de [Starke](#) (2001) y de [Hein](#) (2006)). Actualmente se distinguen tres grupos de adrenorreceptores, cada uno de ellos actúa a través de diferentes tipos de proteínas G. Se categorizan actualmente los receptores adrenérgicos en:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ . Dentro de cada grupo de receptores adrenérgicos se han descrito tres diferentes subtipos:

$\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ;

$\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ;

$\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ .

Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos interactúan con proteínas  $G_{\alpha_{q/11}}$ , a través de vías que incrementan el inositoltrisfosfato intracelular ( $IP_3$ ) y las concentraciones intracelulares de calcio.

Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos principalmente actúan a través de proteínas G pertenecientes a la familia  $G_{\alpha_{i/o}}$ . Estos receptores activan vías de señalización tanto a través de  $G_{\alpha}$  como del complejo  $G\beta\gamma$ . La activación de la subunidad  $G_{\alpha_i}$  por la acción sobre receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos produce una inhibición de la adenilato ciclasa, lo que produce un decremento de los niveles de cAMP. Mientras que las subunidades  $G\beta\gamma$  liberadas por la activación de proteínas  $G_{\alpha_{i/o}}$  participan en la regulación de la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  y de los canales GIRK de  $K^+$  (por sus siglas en inglés: *G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels*) con lo cual desempeñan un papel muy importante en la regulación del funcionamiento celular y neuronal.

Las vías de acción que disparan los receptores  $\beta$ -adrenérgicos juegan un papel fundamental en la regulación de la función cardíaca al modular la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción, la tasa de relajación y la automaticidad ([Post et al.](#), 1999).



## Los receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos

Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos pertenecen al grupo conocido como “autorreceptores” presinápticos, denominados así por ser receptores sensibles al neurotransmisor liberado por la célula misma en la que se localizan (FIG. 1.5). Estos receptores que se encuentran en neuronas noradrenérgicas inhiben la liberación del neurotransmisor a través de la regulación inhibitoria de la actividad de los canales de calcio (Starke, 2001).

Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G y la mayor parte de la inhibición que producen sobre los canales iónicos es sensible a la toxina de *pertussis* aunque, también, se ha observado una inhibición no sensible a esa toxina (Schwartz, 1997). Boehm y Huck (1996) mostraron, en cultivos de neuronas de pollo, que el blanco principal de la acción a través de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos es el canal de calcio  $Ca_v2.2$ .

La acción de la noradrenalina a través de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos promueve la activación de la proteína  $G\alpha_i$  que produce una inhibición de la adenilato ciclasa. Concurrentemente, como ya se ha mencionado, el complejo  $G\beta\gamma$  liberado de las proteínas  $G_{i/o}$  activadas regula directamente al canal de calcio  $Ca_v2.2$  y al canal de potasio rectificador entrante activado por proteínas G (GIRK) (Hein, 2006).

Con base en estudios de genética molecular se han caracterizado tres genes distintos para los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Starke, 2001; Hein, 2006):

Los receptores  $\alpha_{2A/D}$ -adrenérgicos constituyen el principal regulador presináptico de la liberación de la noradrenalina en las neuronas simpáticas. La activación de estos receptores inhibe la liberación de noradrenalina principalmente cuando la actividad nerviosa simpática es elevada. Los agonistas de estos receptores median la inhibición de la nocicepción. Participan igualmente en la regulación de la actividad cardiaca ya que están involucrados en la larga fase de hipotensión que se observa en la respuesta bifásica de la presión sanguínea que se produce tras la aplicación intravenosa de agonistas de los receptores  $\alpha_{2A/D}$ -adrenérgicos. (en la figura 1.5 a este tipo de adrenerreceptores se los designa simplemente como  $\alpha_{2A}$ ).

Los receptores  $\alpha_{2B}$ -adrenérgicos participan en el control de la actividad en el terminal nervioso simpático. Estos receptores, además, desempeñan un importante papel en la vía antinociceptiva del óxido nítrico. En ratones que carecen de estos receptores no se produce el efecto analgésico del óxido nítrico. La acción sobre los receptores  $\alpha_{2B}$ -adrenérgicos es la responsable de la fase transitoria inicial hipertensiva de la respuesta bifásica, mencionada previamente.

Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos contribuyen, también, al control presináptico en el terminal de la neurona simpática en tejidos aislados. Esta regulación ocurre primordialmente en niveles bajos de actividad neuronal. En vivo, estos receptores regulan la liberación de adrenalina de la glándula adrenal. En los ganglios basales participan en la inhibición de la liberación de dopamina.

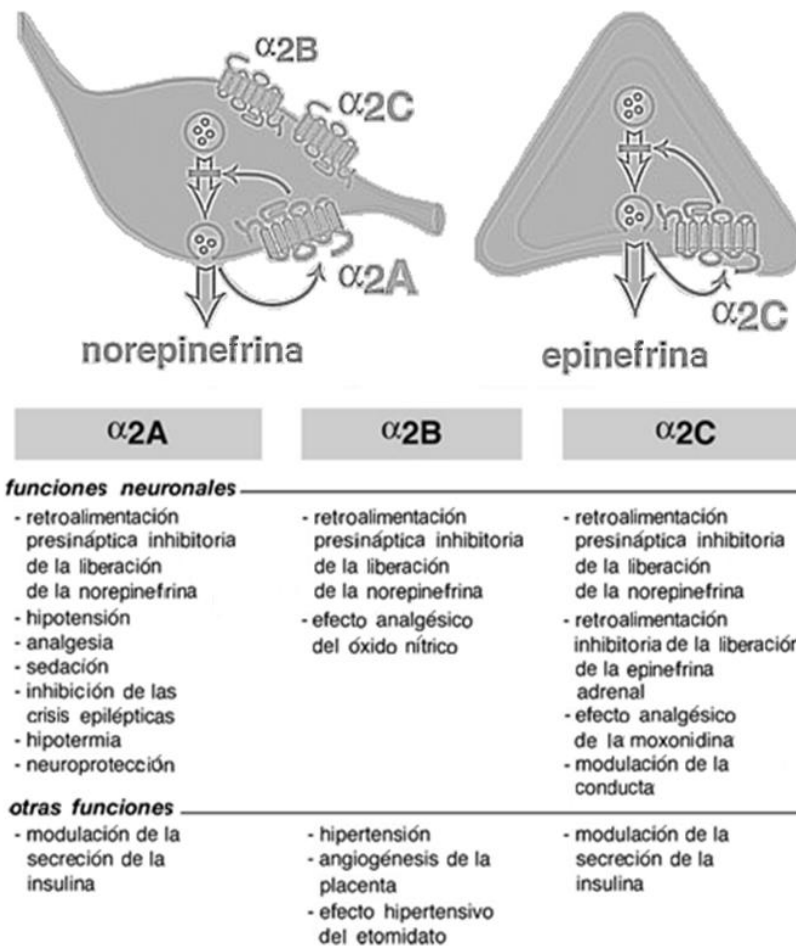


FIGURA 1.5 Sumario de las funciones específicas, por subtipo, de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (tomada, adaptada y traducida de [Hein, 2006](#))

## ***II. ANTECEDENTES***

La investigación de los mecanismos de regulación de la entrada de calcio a través de los canales de  $Ca_v2.2$  es fundamental para dilucidar los procesos fisiológicos en la que los niveles de calcio intracelular juegan un papel importante. Como se explicará en este capítulo se ha caracterizado una vía de regulación inhibitoria del  $Ca_v2.2$ , delimitada a la membrana, sensible al voltaje y a la toxina de *pertussis*. Esta inhibición es resultado de la interacción directa de las subunidades  $G\beta\gamma$  con el canal de calcio. Adicionalmente a esa vía regulatoria se ha descrito un proceso de regulación positiva o facilitadora (*upregulation*) relacionado con la activación de la proteína cinasa C producida por la subunidad  $G\alpha$  activada. El proceso de regulación por fosforilación del canal será igualmente revisado en este capítulo. Una regulación fina de la actividad de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  puede ser debida a la interacción de esos dos procesos fisiológicamente antagónicos. La caracterización de la actividad de los canales de calcio tipo N bajo la acción simultánea de esos dos procesos constituye el objetivo central de este trabajo.

### ***Regulación de los canales de calcio tipo N ( $Ca_v2.2$ ) a través de receptores acoplados a proteínas G***

La modulación de la actividad de los canales iónicos por proteínas G puede ser: indirecta, a través de segundos mensajeros y de enzimas como las cinasas; o de manera directa, mediante interacciones físicas entre las subunidades  $G\beta\gamma$  y las proteínas del canal ([Tedford](#) y [Zamponi](#), 2006; [Elmslie](#), 2003; [Dascal](#), 2001; [Hille](#), 1994)

Desde los trabajos de [Dunlap](#) y [Fischbach](#) (1978, 1981) se ha establecido que la acción de neurotransmisores como la noradrenalina en los terminales sinápticos puede modular de manera reversible la actividad sináptica al regular la corriente de los canales de calcio de la membrana presináptica. Sus trabajos con neuronas embrionarias en cultivo obtenidas de los ganglios de la raíz dorsal de pollos orientaron la investigación que permitiría determinar los mecanismos de la regulación de los canales de calcio a través de receptores acoplados a proteínas G. Un avance importante en este sentido fue el estudio de [Marchetti](#), [Carbone](#) y [Lux](#) (1986) que logró determinar que la dopamina y la noradrenalina inhibían la corriente de calcio a través de canales HVA pero no tenían ningún efecto sobre los canales LVA. Estos investigadores notaron, además, que la

cinética de activación de la corriente inhibida era más lenta que la de las células control (como puede observarse en la FIG. 2.1) por lo que propusieron que ese proceso inhibitorio es sensible al voltaje. Se pudo establecer, además, que este efecto inhibitorio involucraba la activación de proteínas G sensibles a la toxina de *pertussis* (Holz *et al.*, 1986; Scott y Dolphin, 1986).

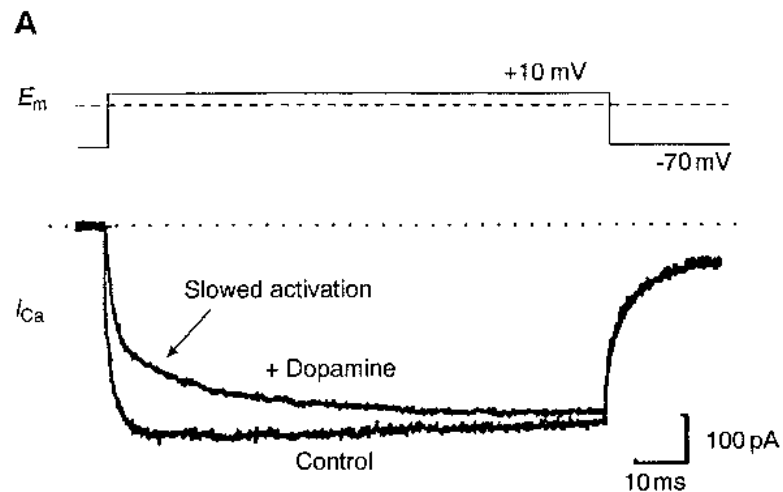


FIGURA 2.1 Registros obtenidos con neuronas simpáticas de embriones de pollo. Las neuronas son estimuladas con un pulso que lleva el potencial de membrana a +10 mV en presencia o ausencia de dopamina. Se observa una depresión y una lentificación de la corriente de calcio por la acción de la dopamina, a través de una vía sensible a la toxina de *pertussis* (Marcheti, Carbone y Lux, 1986).

En 1989, Bruce P. Bean publicó datos que mostraban que la inhibición de los canales de calcio producida por neurotransmisores como la noradrenalina se debía a un cambio en la dependencia del voltaje con la que se abrían esos canales. Este cambio y no una reducción en el número de canales de calcio funcionales que habían propuesto Dunlap y Fishbach (1981) constituye el efecto principal de la acción inhibitoria de los neurotransmisores. Bean propuso que una fracción de los canales de calcio sufría un cambio en su dependencia del voltaje. De tal manera que ahora esos canales requerían de despolarizaciones mayores para su apertura. De acuerdo con ello los canales de calcio podrían estar en al menos dos estados distintos. En el estado o modo facilitado el canal de calcio se abre con despolarizaciones leves o moderadas (punto medio de -15 mV, de acuerdo con los datos de ese estudio), mientras que en el modo reluctante el canal de calcio requiere para abrirse de despolarizaciones mucho mayores (punto medio

en +62 mV). En ausencia del neurotransmisor el estado facilitado es mayoritario en la población de canales de calcio (94%). En presencia de NA la fracción de los canales en el modo reluctantante aumenta considerablemente. La mayor parte de la corriente registrada es sensible a la  $\omega$ -conotoxina pero no a la nifedipina lo que sugiere que principalmente son canales de calcio  $Ca_v2.2$  los que participan en el fenómeno observado.

En la figura [2.2](#) puede compararse la cola de la corriente, en función del voltaje de prueba, en presencia o ausencia de NA. Los puntos de la cola de la corriente fueron obtenidos al promediar la corriente registrada en un intervalo de 160  $\mu$ s tomado a partir del tiempo de 160  $\mu$ s contados a partir de la terminación del pulso de prueba. Las corrientes en presencia de NA fueron obtenidas 40 a 80 ms después de la aplicación de NA. Los que están etiquetados como lavado fueron registrados 80 a 120 segundos después de haber lavado las células de la solución con NA. Esto fue realizado con la finalidad de comparar sólo los efectos reversibles de la noradrenalina. En presencia de NA pueden observarse dos componentes en la curva claramente bifásica. Aparece, en el rango de -50 a +30 mV, un componente similar al que se observa en la mayor parte de los puntos correspondientes al control. Sin embargo, la aplicación de NA produce que la corriente registrada, correspondiente a ese primer componente, sea alrededor de sesenta por ciento más pequeña que la observada en las controles. Después de +30 mV, y a diferencia de las células controles, en aquellas tratadas con NA se observa un segundo componente más lento, el cual satura alrededor de +100 mV. Finalmente, ese estudio mostró que la inhibición de la corriente de calcio disminuía al aumentar la despolarización. Esta observación es acorde con la idea de una inhibición sensible al voltaje.

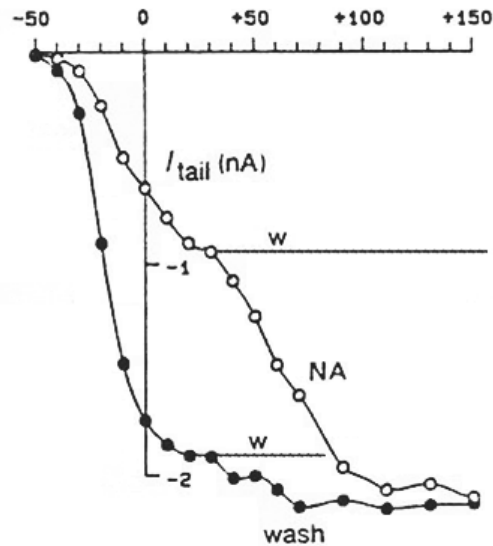


FIGURA 2.2 Cola de la corriente de calcio en función del voltaje. Los valores fueron calculados como el promedio de la corriente registrada en un intervalo de 160 microsegundos que fue tomado 160  $\mu$ s después de terminado el pulso de prueba. Se aprecian claramente dos componentes, uno más rápido (w), y un componente lento que es más pronunciado en presencia de noradrenalina (NA). El control fue registrado ochenta a ciento veinte segundos después de lavar la noradrenalina. (tomada y adaptada de [Bean, 1989](#))

La relación entre la acción sobre receptores acoplados a proteínas G y una inhibición sensible al voltaje de los canales de calcio fue establecida con mayor claridad a partir de los trabajos de [Grassi](#) y Lux (1989) y [Elmslie et al.](#), (1990). Estos investigadores mostraron que una breve pero fuerte despolarización removía temporal y reversiblemente una gran parte de la inhibición de la actividad del canal de calcio. El protocolo desarrollado en esos trabajos ha sido ampliamente utilizado desde entonces para estudiar la inhibición sensible al voltaje del canal de calcio por la acción de las proteínas G. De acuerdo con ese protocolo, un pulso despolarizante, que lleva a la célula a +80 mV, se aplica a la célula entre dos pulsos de prueba; un primer pulso en el que se registra la corriente de los canales de calcio tipo N en diferentes condiciones experimentales y un segundo pulso de prueba en el que la inhibición sensible al voltaje presente en cada una de esas condiciones ha sido removida (FIG. [2.3](#)).

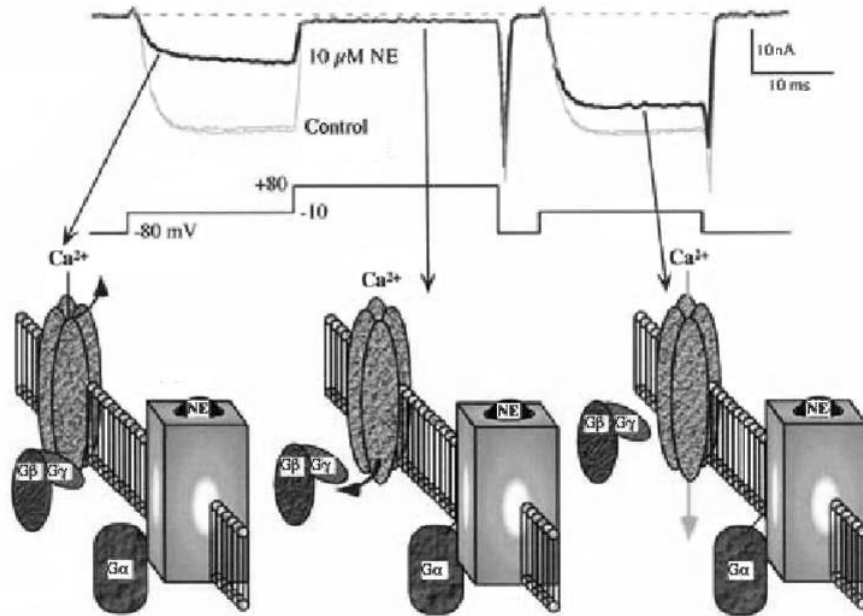


FIGURA 2.3 Una fuerte despolarización (+80 mV) libera parcialmente la inhibición inducida por la noradrenalina (NE) al disociar las subunidades  $G\beta\gamma$  del canal de calcio. Así que, mientras que durante el primer pulso de prueba la corriente de calcio es pequeña en relación al control, el segundo pulso de prueba en presencia de noradrenalina promueve una corriente de calcio (trazo en negro) que activa normalmente aunque alcanza una corriente máxima levemente menor que la observada en las neuronas control (trazo en gris). En estas últimas la corriente registrada es ligeramente mayor durante el segundo pulso de prueba que la que se obtiene con el primero (tomada y adaptada de [Elmslie, 2003](#)).

Como puede verse representado en la figura [2.4](#) este protocolo permite separar varios componentes.

En primer lugar, en el registro de la corriente del canal de calcio  $Cav2.2$  ( $I_{Ba}$ ) en la condición control, en ausencia de cualquier neurotransmisor, al comparar la corriente producida en el pulso dos con la registrada durante el pulso uno se puede observar un aumento de la corriente producido por la liberación de la inhibición tónica, basal, sensible al voltaje.

En segundo lugar, la diferencia entre la corriente registrada en presencia del neurotransmisor y la corriente control muestra dos componentes adicionales. El pulso despolarizante remueve la inhibición sensible al voltaje y se observa un incremento en la corriente en el pulso dos contrastada con la obtenida en el pulso uno. Sin embargo, ese aumento no logra producir la corriente obtenida en el control durante el pulso dos. Esa diferencia hace patente el segmento de la inhibición que no es sensible al voltaje (zona sombreada en la FIG. [2.4](#)), porción que no es liberada por la fuerte despolarización previa al pulso dos.

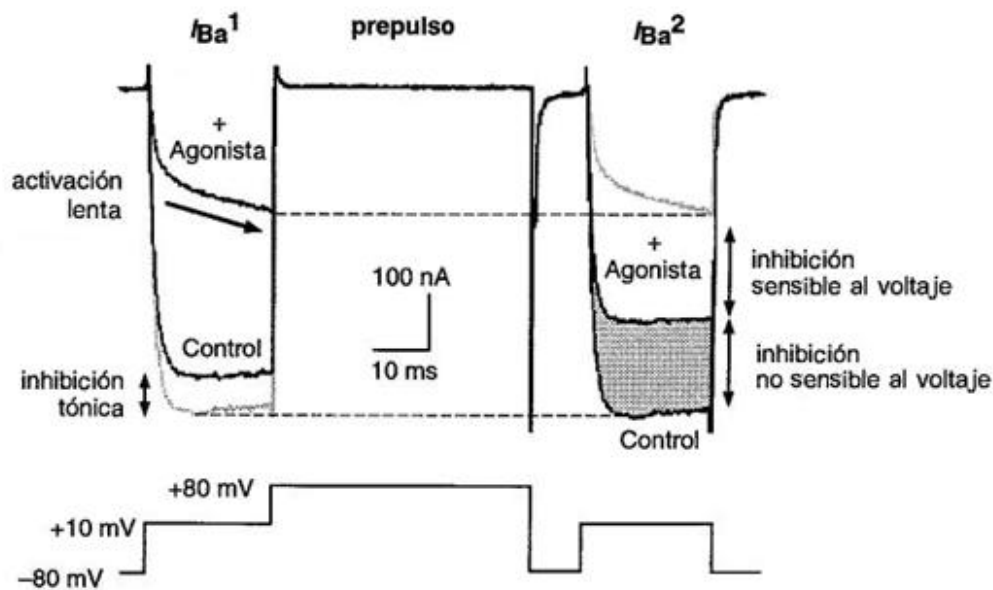


FIGURA 2.4 El segundo pulso de prueba libera a los canales de calcio de la inhibición tónica basal en las células control. Esta zona de inhibición tónica puede verse como la diferencia entre la amplitud de la corriente alcanzada entre los dos pulsos de prueba. La acción de un agonista de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos produce una lentificación de la corriente y una disminución en su amplitud. La diferencia entre la corriente control inducida por el segundo pulso de prueba y la registrada en el primero en presencia del agonista revela dos componentes de la inhibición por proteínas G. Uno de ellos es liberado por el pulso despolarizante y corresponde a la inhibición sensible al voltaje. El segundo no es afectado por ese pulso y se relaciona con una inhibición por proteínas G no sensible al voltaje. (Figura tomada y adaptada de [Kaneko, Akaike, y Satoh, 1999](#)).

En resumen, la aplicación de un pulso fuertemente despolarizante a la célula libera físicamente, y de manera temporal, al canal de calcio  $Ca_v2.2$  de las subunidades  $G\beta\gamma$  (FIG. 2.3). Esto remueve la inhibición sensible al voltaje producida por las proteínas G. A partir de los datos obtenidos es posible calcular un índice o tasa de facilitación al calcular el porcentaje de incremento o decremento, según sea el caso, de la corriente durante el pulso de prueba dos en comparación con el registrado en el pulso uno.

[Herlitze](#), Zhong, Scheuer y Caterall (2001) propusieron que los estados funcionales facilitado y reluctante son propiedades intrínsecas del canal y plantearon que la acción de las proteínas G modula el equilibrio entre esos dos estados del canal de calcio.

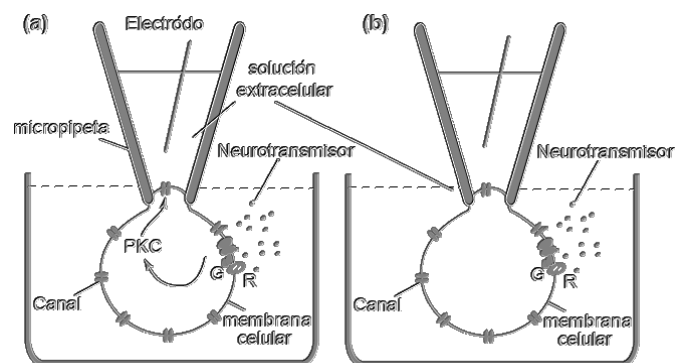
*Regulación inhibitoria de los canales  $Ca_v2.2$  por acción directa de las*



### *subunidades Gβγ*

Una fracción importante de la regulación de los canales de calcio, en respuesta a la acción de neurotransmisores sobre receptores acoplados a proteínas G, no requiere de la participación de segundos mensajeros intracelulares. [Dascal](#) (2001) enumera una serie de criterios experimentales que deberían ser cubiertos para asumir la acción directa de las subunidades Gβγ sobre los canales iónicos. De tales criterios, en relación con el canal de calcio Ca<sub>v</sub>2.2, se ha podido establecer lo siguiente:

1) La acción de la proteína G sobre el canal de calcio Ca<sub>v</sub>2.2 es delimitada a la membrana y no es debida a segundos mensajeros. La regulación de los canales iónicos por la acción sobre receptores acoplados a proteínas G (**R**), a través de segundos mensajeros intracelulares, puede ser activada por el neurotransmisor puesto en la solución extracelular en la que están bañadas las células (FIG. [2.5a](#)). En la configuración de la fijación del voltaje de registro de zona (*cell attached*) se puede evaluar la actividad de los canales en una región determinada de la célula. En la figura [2.5a](#) se representa la activación de la proteína cinasa C y la acción de ésta sobre los canales de la zona registrada en respuesta a la activación de proteínas G (**G**). En contraste, en el caso de acciones no mediadas por segundos mensajeros, la activación de receptores en otras regiones de la membrana celular no tiene consecuencias inmediatas sobre los canales iónicos de la membrana que se encuentra en la región del sello (FIG. [2.5b](#)).



*FIGURA 2.5 Representación esquemática del registro electrofisiológico de zona que muestra: (a) Un agonista colocado en la solución extracelular que produce un efecto en los canales de la zona de registro mediado por segundos mensajeros (PKC); (b) El resultado de la estimulación de receptores de membrana por un agonista que no produce una señal conducida por segundos mensajeros y, por lo tanto, en la que no se observa ningún efecto en los canales de la zona de registro.*

2) Los efectos producidos en los canales Ca<sub>v</sub>2.2 por la activación de proteínas G acopladas a receptores adrenérgicos son observados al introducir

experimentalmente GTP $\gamma$ S [guanosa-5'-O-(3-tio)trifosfato] en las células. El GTP $\gamma$ S (FIG. 2.6) es un análogo no hidrolizable del GTP por lo que mantiene a las proteínas G en su estado activado. Este compuesto no sirve como sustrato para la acción GTPasa de la subunidad G $\alpha$  lo que previene el intercambio de GTP por GDP. La activación de las proteínas G inducida por GTP $\gamma$ S produce varias acciones derivadas de la activación general de las proteínas G y no resulta fácil asignar efectos específicos en la célula. El GTP $\gamma$ S produce resultados sobre las corrientes iónicas similares a los que se observan por la acción de agonistas que activan la acción de las proteínas G (FIG. 2.7).

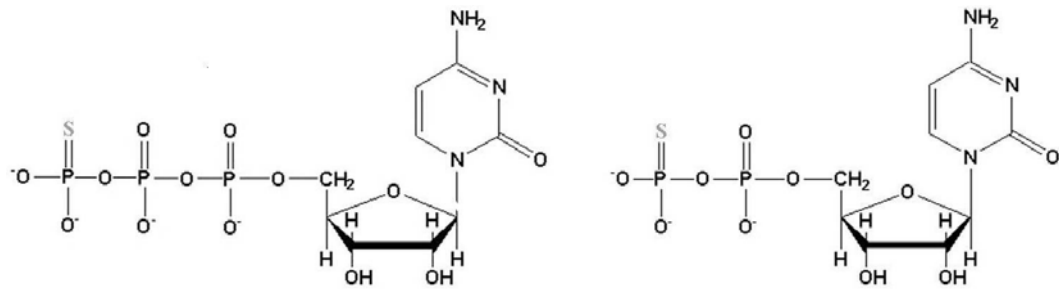


FIGURA 2.6 Estructura química del GTP $\gamma$ S (izquierda) y del GDP $\beta$ S (derecha).

En esta situación experimental el compuesto GTP $\gamma$ S es colocado en el interior de la pipeta de registro (FIG. 2.8a), y como resultado se observa una activación generalizada de las proteínas G. Esto produce consecuencias tanto de la actividad de la subunidad G $\alpha$  como del complejo formado por las subunidades G $\beta\gamma$ .

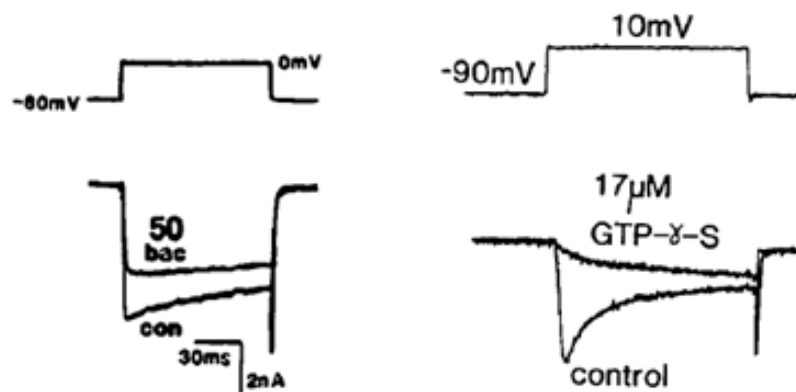


FIGURA 2.7 El GTP $\gamma$ S mimetiza la acción inducida por baclofen (50  $\mu$ M), un agonista de los receptores GABA-B (Scott y Dolphin, 1986).

3) La inhibición sensible al voltaje de la corriente de calcio a través de los canales Ca $v$ 2.2 se produce por la sobreexpresión de las subunidades G $\beta\gamma$  (FIG.

2.8b). Los trabajos de [Ikeda](#) (1996; FIG. 2.9) y [Herlitz et al.](#) (1996) mostraron que la transfección con plásmidos que codifican las subunidades  $G\beta_1\gamma_2$  o  $G\beta_2\gamma_3$  produce una inhibición tónica de la corriente iónica a través de los canales  $Ca_v2.2$ . Este efecto puede ser revertido por un prepulso despolarizante. En los trabajos mencionados se reporta que la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta\gamma$ , pero no de la subunidad  $G\alpha$ , produce efectos similares a los de la acción de la norepinefrina. La sobreexpresión de la subunidad  $G\alpha$  atenúa la inhibición mediada por la norepinefrina, lo cual es consistente con la proposición de que amortigua al complejo libre  $G\beta\gamma$  presente en las neuronas. Asimismo, observaron que la sobreexpresión de las unidades  $G\beta\gamma$  ocluye la acción de ese agonista (FIG. 2.8b). La sobreexpresión de las subunidades  $G\beta\gamma$  permite estudiar la acción específica de las subunidades  $G\beta\gamma$  sobre los canales  $Ca_v2.2$ .

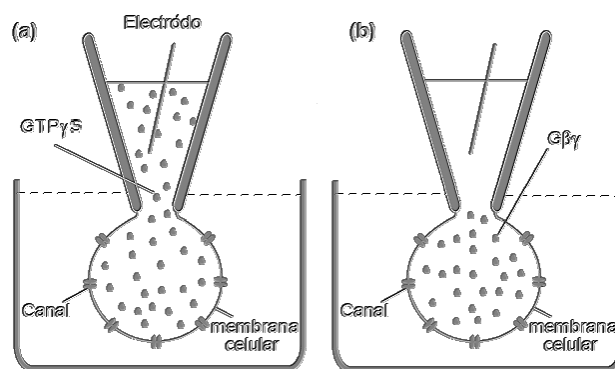


FIGURA 2.8 Representación esquemática del procedimiento de fijación de voltaje por pinzamiento zonal de membrana en configuración de célula completa. (a) El  $GTP\gamma S$  colocado en el interior de la micropipeta de registro se distribuye en el interior celular y produce una activación generalizada de las proteínas G. (b) Las subunidades  $G\beta\gamma$  han sido sobreexpresadas y producen respuestas específicas en los canales iónicos de la membrana.

En investigaciones previas en nuestro laboratorio se mostró que la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\beta_2$  reproduce con eficiencia la inhibición de la corriente de calcio a través de los canales  $Ca_v2.2$  mediada por la acción de la norepinefrina ([García et al.](#), 1998). [Ruiz-Velasco](#) e Ikeda (2000) encontraron que para obtener una respuesta robusta de inhibición tónica sensible al voltaje de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  se requiere la coexpresión de las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  y señalaron que, aunque estas subunidades son transcritas por genes separados, las proteínas expresadas, muy probablemente, se ensamblan para constituir un complejo funcional  $G\beta\gamma$ . En nuestro proyecto el estudio de la inhibición de las corrientes iónicas a través de los canales  $Ca_v2.2$  producida por la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta\gamma$  y su interacción con la activación de la proteína cinasa C constituye un aspecto central. La sobreexpresión produce un efecto específico sobre el canal  $Ca_v2.2$ .

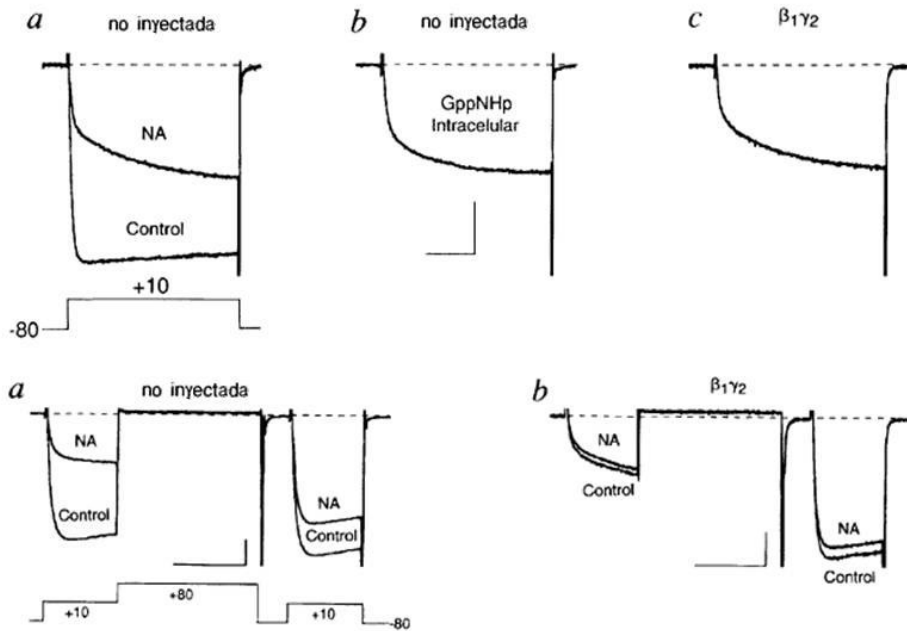


FIGURA 2.9 En la parte superior se observa la lentificación y disminución de la corriente de calcio en comparación con el registro control: a) en presencia de noradrenalina (NA); b) en células dializadas con el análogo no hidrolizable del GTP ( $GppNHp$ ), y; c) en neuronas inyectadas con plásmidos para la expresión de las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$ . En la parte inferior comparación de los registros de la corriente de calcio en neuronas control y en presencia de noradrenalina en neuronas inyectadas con plásmidos para la expresión de  $G\beta_1\gamma_2$  (b) y en células no inyectadas (a) (tomada de Ikeda, 1996)

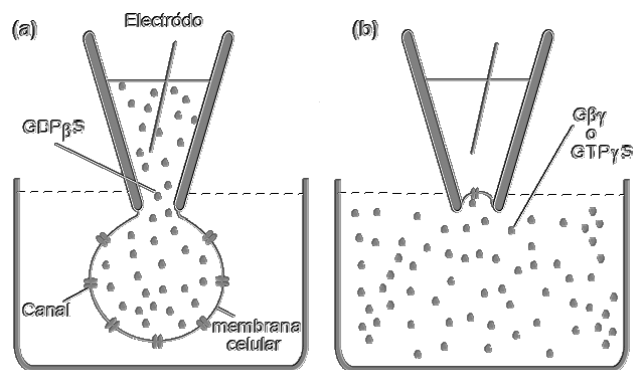


FIGURA 2.10 (a) Representación esquemática del pinzamiento zonal de membrana en configuración de célula completa. El  $GDP\beta S$  colocado en el interior de la micropipeta de registro se diluye en el interior celular y produce una inhibición de las proteínas G; (b) Esquema del registro de zona en configuración de interior de membrana expuesto (inside-out). En el medio que rodea a la preparación es disuelto ya sea el  $GTP\gamma S$  o el complejo  $G\beta\gamma$ . Los efectos sobre los canales expuestos pueden ser registrados.

4) Los efectos de la activación de las proteínas G pueden ser bloqueados con el uso de un análogo no hidrolizable del GDP; el GDPβs [guanosina-5'-O-(2-tio)difosfato] (FIG. 2.6). De esta forma, la proteína G se mantiene en su estado inactivo y como resultado no se observa ningún efecto sobre la corriente de calcio a través de los canales Cav2.2 (FIG. 2.10) y, como veremos más adelante, el GDPβs puede revertir la inhibición tónica sensible al voltaje producida por las proteínas G (García-Ferreiro *et al.*, 2001).

### *Regulación de los canales de calcio Cav2.2 por la activación de la proteína cinasa C*

Zong y Lux (1994) encontraron que las corrientes iónicas a través de los canales Cav2.2 aumentaban por la activación persistente de proteínas G (con GTPγS), después de un período de inhibición inicial, una observación de fundamental importancia para el presente trabajo. Zong y Lux propusieron que podría ser una acción más lenta, también, por la activación de las proteínas G y la activación de segundos mensajeros. En la parte superior del panel A de la figura 2.11 se grafica la amplitud normalizada de la corriente de bario a través de canales de calcio HVA (como ya se ha mencionado, esta clase incluye a los subtipos: L, N, P/Q) en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de embriones de pollo de diez a doce días. En la parte inferior del mismo panel A se pueden ver registros obtenidos a diferentes tiempos (min) indicados sobre cada registro. Se observa una respuesta bifásica en presencia de 250 μM GTPγS. En tiempos cortos se ve la inhibición de la corriente descrita ya como resultado de la activación de las proteínas G y como un fenómeno delimitado a la membrana y sensible al voltaje. Sin embargo, a tiempos mayores, que van desde los ocho minutos aproximadamente, se detecta un incremento en la amplitud de la corriente. Zong y Lux consideraron la posibilidad de una participación de segundos mensajeros intracelulares para explicar el aumento de la corriente. Para probar esta hipótesis utilizaron el péptido inhibitorio PKC-19-36, un pseudosustrato para PKC (los residuos 19-36 cerca del amino terminal del dominio regulador de la actividad de la enzima constituyen un pseudosustrato para PKC; Makowske y Rosen, 1989). La infusión intracelular del inhibidor de PKC previno el efecto tardío de incremento de la corriente (FIG. 2.11 panel B) pero no la inhibición inicial producidos por la activación de las proteínas G por lo que dicho aumento de la corriente podría deberse a un proceso de fosforilación del canal de calcio. Desde entonces, esta observación ha permanecido inexplorada, ya que el foco de atención se centró durante casi una década, exclusivamente sobre la marcada inhibición que aparece

en los primeros minutos.

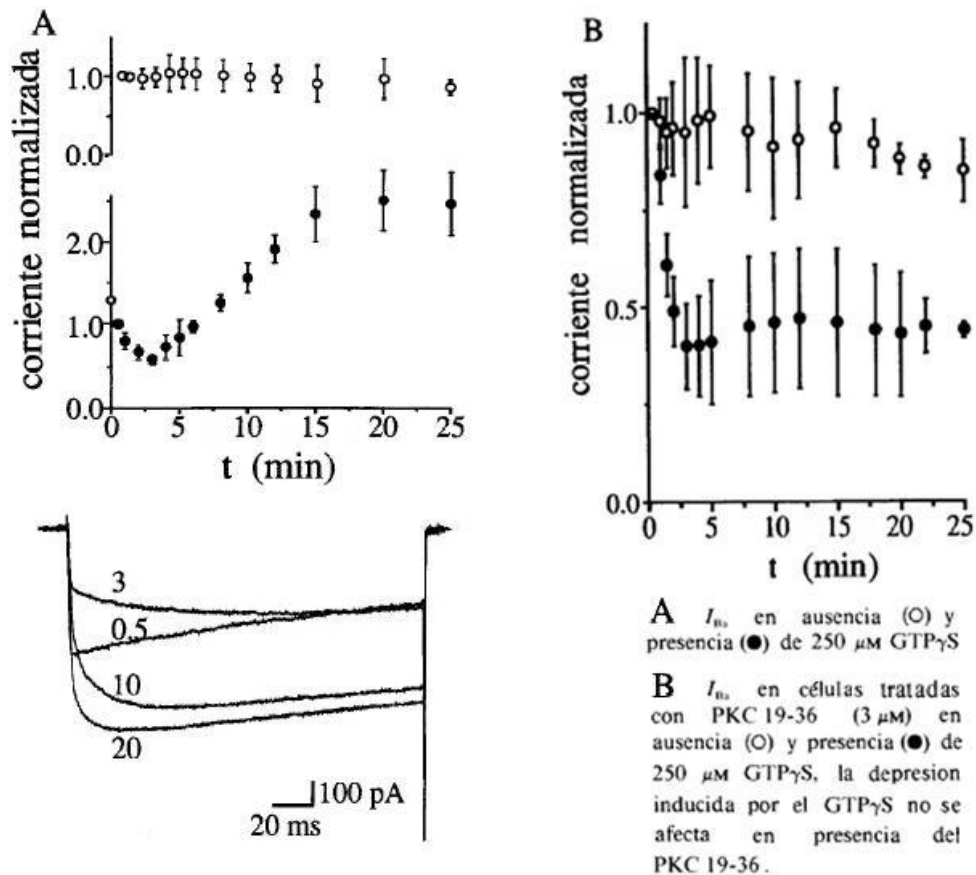


FIGURA 2.11 A) Amplitud de la corriente normalizada a través de los canales de calcio en función del voltaje (panel superior) y; registros obtenidos en diferentes tiempos (en minutos) después de iniciado el registro (panel inferior). B) Corriente de bario normalizada registrada en presencia de PKC 19-36 (tomada, traducida y adaptada de Zong y Lux, 1994).

Después de ese trabajo se reportaron resultados de investigaciones que trataban de esclarecer la acción de la fosforilación de los canales de calcio así como la interacción de esta forma de modulación y la acción inhibitoria de las proteínas G. Los hallazgos han sido diversos y en algunos casos contradictorios.

La proteína cinasa C que se encuentra ampliamente distribuida es activada en la célula por el *sn*-1,2-diacilglicerol (DAG) y requiere para su actividad calcio (de ahí su designación de C) y un fosfolípido (la fosfatidilserina). Algunos ésteres de forbol, parte de cuya estructura se parece al *sn*-1,2-diacilglicerol activan la proteína cinasa C de manera independiente al DAG. Estos compuestos se denominan, en general, promotores tumorales ya que, aunque no son carcinógenos de por sí, estimulan la formación de

tumores cuando se aplican conjuntamente con un carcinógeno a animales de experimentación ([Mathews et al.](#), 2002). El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, por sus siglas en inglés: *phorbol-myristate,13-acetate*) ha sido un éster de forbol ampliamente utilizado como activador de la proteína cinasa C (FIG. [2.12](#)) . La activación de PKC por PMA se correlaciona con la translocación de PKC desde el citosol a la membrana o al núcleo.

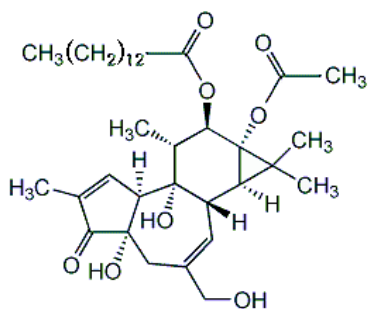


FIGURA 2.12 Estructura química del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)

En estudios previos se ha demostrado que tratamientos con 10 nM hasta 1  $\mu$ M de PMA inducen una marcada translocación de PKC- $\alpha$  del citosol a la fracción de la membrana o el núcleo, luego de cinco a treinta minutos después del tratamiento con PMA ([Hsu et al.](#), 1998). En el estudio de la regulación de canales iónicos por PKC, los investigadores han usado concentraciones que van desde 1nM hasta 1  $\mu$ M de PMA, como ejemplo tenemos:

1nM PMA : [Golard et al.](#) (1993)

30 nM PMA: [Cooper et al.](#) (2000)

100 nM PMA: [Garcia et al.](#) (1998); [Hamid et al.](#) (1999); [Fang et al.](#) (2006)

500 nM PMA: [Swartz](#) (1993); [Zhu e Ikeda](#) (1994); [Shapiro et al.](#) (1996); [Barrett y Rittenhouse](#) (2000); [García-Ferreiro et al.](#) (2001)

1 $\mu$ M PMA: [Chen y Penington](#) (1997; 1996)

La mayor parte del trabajo realizado con SCGs para evaluar la fosforilación de los canales Ca<sub>v</sub>2.2 ha sido realizado con 500 nM PMA como activador de PKC.



El PMA induce un incremento en la corriente de calcio en neuronas del ganglio cervical superior, del hipocampo y neuronas corticales de rata, así como en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de embriones de pollo ([Swartz](#), 1993; [Zong](#) y [Lux](#), 1994; [Zhu](#) e [Ikeda](#), 1994, [García-Ferreiro et al.](#), 2001). El aumento en la corriente de calcio por la acción de la proteína cinasa C es sensible al voltaje y se observan, además, cambios en la cinética de la corriente. [Swartz](#) (1993) concluye que el incremento sensible al voltaje inducido por PMA es un fenómeno complejo. Este investigador reporta que en una neurona SCG, el PMA incrementó  $I_{Ba}$  en un 195% a -30 mV, en 130% a -10mV, y en 50% a +30mV; mientras que en otra, el PMA produjo un incremento en  $I_{Ba}$  en un 33% a -30 mV, en 24% a -10mV, y sólo 1% at +30mV.

### *Interacción fisiológica entre la inhibición por proteínas G y la fosforilación de los canales de calcio Cav2.2*

[Chen](#) y [Penington](#) (1997, 1996) propusieron que el orden de aplicación determina el efecto cuando interaccionan activadores de PKC (esteres de forbol como el PMA) y activadores de las proteínas G (GTP $\gamma$ S). Estos investigadores reportaron que el PMA no era capaz de revertir la acción inhibitoria de las proteínas G. [Barrett](#) y [Rittenhouse](#) (2000) consolidaron esta idea al reportar que la proteína cinasa activada no revierte la inhibición sensible al voltaje producida por las proteínas G sobre los canales Cav2.2. Además, señalan que la fosforilación por PKC no produce otro efecto sobre las corrientes iónicas a través de los canales Cav2.2 que el de prevenir la acción inhibitoria de las proteínas G y concluyen que las acciones de las proteínas G y la fosforilación sobre los canales de calcio, son mutuamente excluyentes..

[Swartz](#) (1993), [Zhu](#) e [Ikeda](#) (1994), y nuestro grupo ([García-Ferreiro et al.](#), 2001) hemos encontrado un claro efecto antagónico a la inhibición sensible al voltaje inducido por las proteínas G como resultado de la acción de la proteína cinasa C sobre los canales Cav2.2. [Zhu](#) e [Ikeda](#) (1994) reportaron que la aplicación de PMA produce un incremento sensible al voltaje en la amplitud de las corrientes de cola.



El aumento de la corriente que observaron [Zong](#) y Lux por la acción sostenida del GTPγS ha quedado sin una explicación clara y definitiva. La pregunta que se debe resolver es cómo interaccionan los procesos antagónicos de modulación de los canales de calcio para producir una regulación fina de la actividad de esos canales. Estos procesos, la inhibición sensible al voltaje por proteínas G y el aumento de la corriente por la acción de PKC, parecen estar relacionados con la activación de las proteínas G.

### ***Planteamiento del problema e identificación del problema central***

El presente trabajo se plantea investigar lo siguiente:

Identificar y caracterizar los efectos sobre las corrientes de bario, a través de los canales Ca<sub>v</sub>2.2, de la interacción de:

- a) la sobreexpresión de las subunidades Gβ<sub>1</sub> y Gγ<sub>4</sub> y;
- b) la activación de PKC inducida por PMA.

Determinar y evaluar el resultado de la interacción entre la aplicación de PMA y la diálisis con GTPγS sobre la actividad de los canales Ca<sub>v</sub>2.2.

Comparar y analizar las consecuencias que, sobre los parámetros que caracterizan a las corrientes iónicas de los canales Ca<sub>v</sub>2.2, tiene tanto el tratamiento con PMA como la aplicación de GDPβS en el interior de la célula.

Esclarecer si las acciones de la proteína cinasa C sobre los canales Ca<sub>v</sub>2.2 se restringen únicamente a prevenir los efectos inhibitorios producidos ya sea por la activación de las proteínas G por norepinefrina o por la acción específica de las subunidades Gβγ sobreexpresadas.

En resumen, el problema fundamental de este trabajo es determinar si el incremento significativo en la corriente de los canales Ca<sub>v</sub>2.2 que resulta de la activación de PKC es debido exclusivamente a la liberación de la inhibición sensible al voltaje producida por la acción de las proteínas G sobre esos canales.

### ***Hipótesis***

La activación de PKC inducida por PMA produce cambios en la corriente de los canales  $Ca_v2.2$  que no pueden explicarse solamente por la interrupción de la inhibición causada por la activación de proteínas G.

***Objetivo general:***

Analizar la interacción de la activación de PKC y de proteínas G sobre la modulación de los canales  $Ca_v2.2$ .

***Objetivos particulares:***

1. Caracterizar los efectos de la coexpresión de las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\gamma_4$  sobre las corrientes de bario a través de los canales  $Ca_v2.2$ .
2. Analizar los efectos de la interacción de la sobreexpresión de esas subunidades con la activación de PKC inducida por PMA.
3. Evaluar el resultado de la interacción entre la aplicación de PMA y la diálisis con  $GTP\gamma S$  sobre la actividad de los canales  $Ca_v2.2$ .
4. Determinar si las acciones de la PKC sobre los canales  $Ca_v2.2$  se restringen únicamente a prevenir los efectos inhibitorios producidos ya sea por la activación de las proteínas G por norepinefrina o por la acción específica de las subunidades  $G\beta\gamma$  sobreexpresadas.
5. Comparar los efectos que, sobre los parámetros que caracterizan a las corrientes iónicas de los canales  $Ca_v2.2$ , tienen tanto el tratamiento con PMA como la aplicación de  $GDP\beta S$  en el interior de la célula.

### **III. MÉTODOS, MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

#### ***Cultivo celular***

Las neuronas simpáticas aisladas del Ganglio Cervical Superior (SCG) constituyen un sistema ampliamente estudiado y bien caracterizado en cuanto a la regulación de los canales iónicos por la acción sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Las principales características que hacen de estas neuronas un sistema adecuado para nuestro estudio son:

Los cultivos de estas neuronas contienen una población bastante homogénea de células con grandes cuerpos neuronales (20 a 30  $\mu$  de diámetro) y un núcleo claramente visible con microscopios de contraste de fase;

Se ha mostrado que estas neuronas expresan los tres tipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ([Vidovic et al., 1994](#)), y que el mRNA transcrito en estas células que se obtiene en experimentos de amplificación de mRNA es el correspondiente a los receptores  $\alpha_{2A}$ ;

Las neuronas del ganglio cervical superior exhiben una respuesta característica que inicia con la activación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos que consiste en la modulación sensible al voltaje de los canales de calcio tipo N ([Ikeda, 1996](#)). Esta modulación es prevenida por un tratamiento con la toxina de *pertussis* por lo se propone que está mediada por proteínas G conteniendo  $G\alpha_{i/o}$ . Además, [Stephens y Mochida \(2005\)](#) encontraron que en las neuronas del ganglio cervical superior, en cultivos primarios, la inhibición pre-sináptica de la transmisión colinérgica producida por la activación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos involucra la liberación de las subunidades  $G\beta\gamma$  de proteínas  $G_{i/o}$  sensibles a la toxina de *pertussis*;

En cuanto a la población de canales de calcio en esta preparación se ha reportado que está constituida por canales de calcio  $Ca_v2.2$  ya que más del ochenta por ciento de la corriente de calcio es afectada por el bloqueador específico  $\omega$ -conotoxina GVIA (10 $\mu$ M) en presencia de 5  $\mu$ M de nifedipina ([García-Ferreiro et al, 2001](#));

Finalmente, en estas células (SCG) se obtienen altos niveles de expresión heteróloga mediante la microinyección de cADN en el núcleo celular.

#### ***Preparación de cultivos primarios de SCG***

Las neuronas del ganglio cervical superior provienen de ratas Wistar de 5 semanas de edad y cada ganglio se compone de aproximadamente 25,000 neuronas. Las ratas son

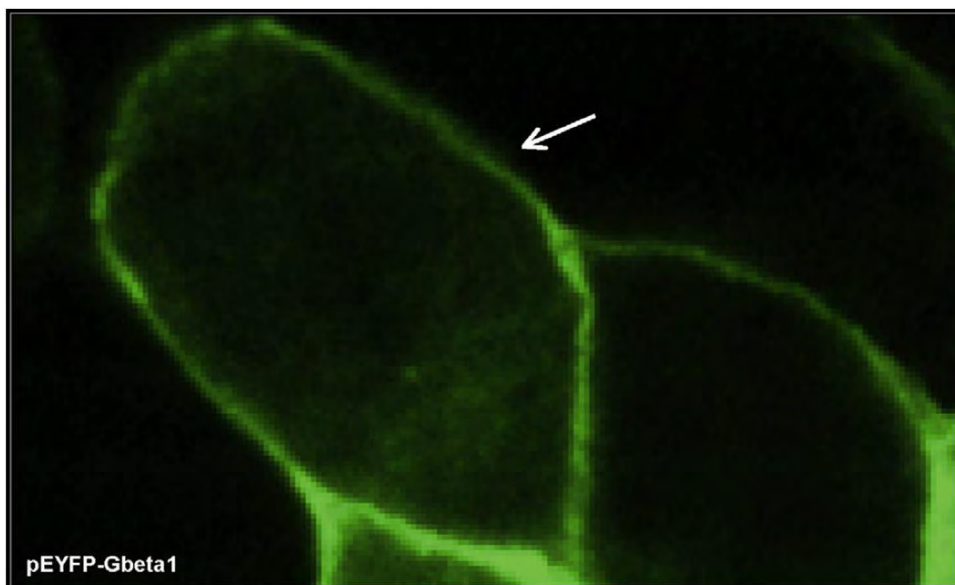
decapitadas con una guillotina, previa anestesia con CO<sub>2</sub>. La cabeza es colocada en una solución desinfectante e inmediatamente puesta en posición ventral en una caja de Petri con solución fría modificada de Hank para su disección. Se hace una incisión media en el cuello que va desde la base de la garganta hasta la barbilla. En la línea media se separan, sucesivamente, la piel y la musculatura del cuello hasta exponer la tráquea. Una vez localizada, ésta es retraída hacia la parte rostral. Así quedan expuestas las glándulas submandibulares, éstas se remueven para exponer la capa de músculo. En este punto son visibles la bifurcación de la arteria carótida y el nervio vago. El ganglio se encuentra incrustado en la bifurcación de la arteria carótida que da origen a las ramas interna y externa de la arteria y se ve como un objeto fusiforme. El complejo ganglio, nervio vago y arteria carótida se extrae como una sola unidad. Ambos ganglios son removidos una vez separados del tejido conectivo al que se adhieren por medio de tijeras utilizadas para iridectomía (McVannas). Una vez extraídos son cortados en ocho a diez trozos para facilitar la acción de las enzimas empleadas. Estos son transferidos a una solución modificada de Hank que contiene 20 Unidades/ml de papaína y es puesto en agitación ligera a 37° C. Después de veinte minutos se reemplaza esta solución por otra que contiene 1 mg/ml de colagenasa tipo I y 10 mg/ml de dispasa. En ella se incuban los ganglios durante cuarenta minutos y se realiza una disgregación mecánica cada veinte minutos durante el proceso de disociación enzimática. Al término de esto la preparación es centrifugada y resuspendida tres veces, en dos ocasiones en un medio L-15 (Leibovitz) y por última vez en un medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM). Ambos medios se suplementan con diez por ciento (volumen a volumen) de suero bovino fetal inactivado por calor y uno por ciento de penicilina-estreptomicina. Finalmente, las neuronas disgregadas son situadas mediante unos anillos en el centro de cajas de cultivo de poliestireno recubiertas con un sustrato de poli-L-lisina. Estas son colocadas en incubadoras con una atmósfera humectante que contiene 5% de CO<sub>2</sub> en una temperatura de 37° C. Los anillos son retirados después de cuarenta minutos.

### ***Microinyección de los plásmidos para la expresión de las subunidades Gβ<sub>1</sub>γ<sub>4</sub>***

Después de un periodo de 4 horas que, en promedio, requieren las células para adherirse al sustrato de la caja de Petri, las neuronas son micro-inyectadas intranuclearmente utilizando un equipo Eppendorf (Madison, WI, USA) que se compone de un sistema microinyector modelo 5242 y un micromanipulador modelo

La microinyección intranuclear permite la expresión confiable de constructos múltiples, por ejemplo, la expresión conjunta de las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\gamma_4$ , además de la expresión de dos marcadores de la inyección: el plásmido para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés: *green fluorescent protein*) y 1 mg/ml de dextran-fluoresceína de 10,000 kDa. Con este procedimiento es posible ajustar la estequiometría de las proteínas expresadas con sólo cambiar la tasa de los plásmidos inyectados y resulta más eficiente que otros procedimientos convencionales de transfección ([Ikeda](#) y Jeong, 2004). La solución de inyección, por lo tanto, está constituida por el cADN que codifica una mutación de GFP fusionada al plásmido para la expresión de la subunidad  $G\beta_1$  ( $G\beta_1$ -GFP; 100 ng/ $\mu$ l) y el plásmido para la expresión de la subunidad  $G\gamma_4$  ( $G\gamma_4$ ; 100 ng/ $\mu$ l).

La solución de ADN a ser inyectada es centrifugada a 10,000 rpm durante 12 minutos para remover cualquier partícula que pudiera obstruir la micropipeta de inyección. De manera similar a la descrita por [Ikeda](#) y Jeong (2004) en cultivos cortos (24 a 48 horas) no se observa una contaminación apreciable por el procedimiento de microinyección que se realiza en condiciones no estériles.



*FIGURA 3.1 Células observadas con microscopia confocal después de 20 horas de transfección con pEYFP- $G\beta_1$ . La flecha indica la distribución final del brillo de GFP en la membrana celular después del tiempo necesario para la expresión. La distribución es acorde con un mecanismo delimitado a la membrana de la acción inhibitoria de las proteínas G sobre los canales de calcio tipo N*

Una vez montada la pipeta de inyección es ajustada la presión en 10 a 20 kPa y el tiempo de inyección se fija entre 0.5 a 0.8 segundos. Un área de inyección es seleccionada y se coloca la punta de la pipeta sobre una neurona. Se baja la pipeta hasta que la punta quede al nivel de la misma y se determina en el manipulador 5171 este nivel como el límite z. Se lleva la punta de la pipeta aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  sobre las células y se van seleccionando neuronas en el área determinada de manera que se vaya inyectando sistemáticamente el conjunto de células. Se coloca la punta de la pipeta sobre el núcleo de la neurona y se inicia la secuencia de inyección. De esta manera se procede a inyectar, en promedio, cincuenta a cien células por caja. La tasa de éxito (evaluada por la expresión de GFP) obtenida fue alrededor de diez a treinta por ciento.

Después de 18 a 24 horas, las neuronas cuya inyección fue exitosa fueron identificadas por su fluorescencia verde-azul característica de la GFP mediante el uso de un microscopio invertido equipado con óptica para fluorescencia y epi-fluorescencia (FIG. [3.1](#)). También se llevaron a cabo experimentos adicionales con plásmidos independientes de  $G\beta_1$  y GFP, obteniéndose resultados equivalentes. En nuestros experimentos el cADN codificante para  $G\beta_1$  fue clonado en pCDM8, y la  $G\gamma_4$  fue clonada en pCIS (ambas de M. Simon, Caltech, Pasadena, CA, USA). La GFP fue clonada en pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Los plásmidos con las codificaciones para las subunidades  $G\beta_1\gamma_4$  fueron acarreados por un promotor de cytomegalovirus. Las preparaciones se realizaron usando conjuntos comerciales específicos de reactivos seriados (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los procedimientos utilizados aquí han sido descritos previamente por [García et al.](#) (1998).

### ***Electrofisiología y análisis de los datos***

La mayor parte de nuestro conocimiento actual sobre los canales iónicos procede del desarrollo de la técnica de fijación del voltaje “*patch-clamp*” (en español se ha sugerido denominarla *pinzamiento zonal de membrana* pero no se ha logrado una aquiescencia general al respecto). Introducida en 1976 por Erwin Neher y Bert Sakmann (lo que les valió a ambos el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1991) esta técnica permite el registro de las corrientes iónicas a través de zonas minúsculas de membranas celulares. La técnica consiste, esencialmente, en presionar la punta de una micropipeta de vidrio contra la superficie de la membrana con ayuda de un microscopio y un micromanipulador, formándose un cierre hermético. Hacia 1982 ya se habían

desarrollado técnicas para sellar el fragmento de membrana contra la punta de una pipeta con resistencias del orden de gigaohmios, lo cual permitía registrar corrientes tan pequeñas como 0.1 pA. Este elevadísimo grado de sensibilidad permitió detectar las corrientes iónicas debidas a canales iónicos aislados.

Así pues, las corrientes fueron registradas utilizando la técnica del pinzamiento zonal (*patch-clamp*) en configuración de célula completa ([Hamill et al., 1981](#)), a temperatura ambiente (19–22 °C). Las pipetas de vidrio de borosilicato (Kimax 51) se someten a un estiramiento con calor en un estirador horizontal de pipetas modelo Sutter P-87. Las pipetas resultantes tuvieron un diámetro aproximado de entre 0.5 a 1.2  $\mu\text{m}$  y una resistencia de 0.8 a 1.2  $\text{M}\Omega$ , que se obtiene con la solución interna mencionada más abajo.

Se diseñaron protocolos de pulsos de voltaje comandos y los datos fueron digitalizados, guardados y analizados con BASIC FASTLAB (Indec Systems, Capitola, CA, USA). Las corrientes se muestrearon a 10 kHz. Las neuronas recibieron una perfusión continua durante el registro (1 a 2 ml/min) con una solución diseñada para aislar las corrientes de  $\text{Ba}^{2+}$  a través de los canales de calcio  $\text{Ca}_v2.2$  en forma exclusiva. La corriente a través de los canales de calcio tipo N se define como el componente de la corriente sensible a 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de nifedipina ([García et al., 1998](#)). Las dos soluciones básicas para los registros fueron:

La solución salina del baño se prepara con las siguientes concentraciones (en mM): 165 TEA-Cl, 1  $\text{BaCl}_2$ , 10 Hepes, 8 glucosa, 1  $\text{MgCl}_2$ , 0.0001 TTX, y 0.005 nifedipina, y se ajusta a un pH 7.4 con TEA-OH.

En la mayoría de los registros, la solución interna está constituida (en mM) por: 140 CsCl, 20 TEA-Cl, 10 Hepes, 0.1 BAPTA-tetracesio\* [1,2-bis(2-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacetato tetracésico], 5  $\text{MgCl}_2$ , 4  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 0.3  $\text{Na}_2\text{GTP}$ , y 0.1 leupeptina, y se ajusta a un pH 7.2 con CsOH. Cuando así se indique, los 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{GTP}$  se reemplazan con 2 mM  $\text{Li}_3\text{GDP}\beta\text{S}$  o con 0.3 mM  $\text{Li}_4\text{GTP}\gamma\text{S}$ .

[\*Beech *et al.* (1991) sugieren que las soluciones con muy bajas concentraciones de amortiguadores de calcio, como el BAPTA (FIG. [3.2](#)), son las más adecuadas para el estudio de la modulación de canales de calcio y canales de potasio tipo M].

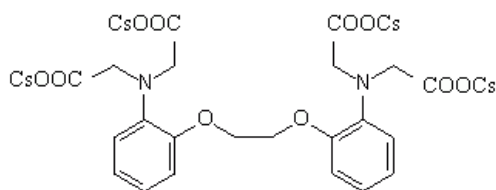


FIGURA 3.2 Estructura química del BAPTA-tetracesio

Las soluciones con el PMA se preparan el día del experimento a partir de una solución madre que contiene 2 mM de PMA en DMSO y se disuelve en una solución de Ringer hasta alcanzar una concentración final de 500 nM y 0.03% (v/v) DMSO ([García-Ferreiro et al.](#), 2001). Para establecer el efecto específico del PMA se llevaron a cabo experimentos mediante el reemplazo del mismo con un análogo inactivo; el 4 $\alpha$ -forbol (500 nM, disuelto en DMSO). Las neuronas se incubaron en las soluciones que contenían PMA o 4 $\alpha$ -forbol (FIG. 3.3) durante 7 min a 37 °C inmediatamente antes del registro. Se quita el PMA o el 4 $\alpha$ -forbol y el DMSO de la solución de registro para minimizar la posibilidad de registrar efectos que pudieran ser resultado de la solución misma sin ninguna especificidad. Las corrientes iónicas a través de los canales Ca<sub>v</sub>2.2 fueron registradas con la técnica de patch-clamp ya señalada y con el protocolo experimental que se describe adelante dentro de los 10 minutos siguientes al término de la incubación con el PMA o el 4 $\alpha$ -forbol. La noradrenalina se perfundió en la solución del baño a una concentración de 10  $\mu$ M. El PMA y el 4 $\alpha$ -forbol fueron obtenidos de Calbiochem (La Jolla, CA, USA), el BAPTA-tetracesio de Molecular Probes (Eugene, OR, USA), y todos los otros reactivos químicos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

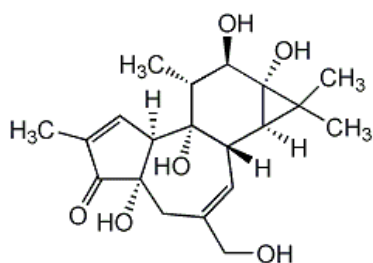


FIGURA 3.3 Estructura química del 4 $\alpha$ -forbol

Se aplicaron dos pulsos de prueba del acuerdo con el protocolo mencionado en el capítulo de antecedentes (FIG. 3.4). Los pulsos de prueba llevan el potencial de la



membrana a voltajes que van desde -40 mV hasta +56 mV. La duración de los pulsos de prueba fue de 90 ms con la finalidad de documentar la disminución en la inactivación tanto por la sobreexpresión de las subunidades G $\beta\gamma$  como por otras vías de activación de las proteínas G. Un pulso despolarizante, que lleva a la célula a +80 mV durante 50 ms, se aplica a la célula entre los dos pulsos de prueba. El segundo pulso de prueba inicia doce milisegundos después de haber aplicado el pulso de +80 mV. Al término del segundo pulso de prueba la célula es repolarizada a -40mV.

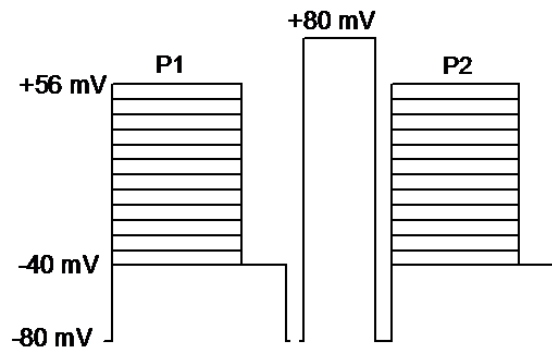


FIGURA 3.4 Protocolo experimental de pulsos. Véase explicación en el texto.

La amplitud de la corriente fue determinada en forma isócrona como el promedio de la corriente registrada en el intervalo que va desde 5 a 6 milisegundos (ms) después del inicio del primer pulso de prueba. La “tasa” o “índice de facilitación” se midió dividiendo el valor de la amplitud de la corriente en el pulso 2 sobre el valor de la amplitud de la corriente en el pulso 1. Ambos métodos han sido previamente descritos ([García et al., 1998](#)). La amplitud de la corriente de cola fue medida también en forma isócrona como el promedio de la corriente que se observa en el intervalo comprendido entre 1 y 2 ms después de la terminación del pulso. La relación corriente voltaje de la corriente de cola fue ajustada a una ecuación de Boltzmann con dos componentes. Este método ha sido utilizado ampliamente ([Bean, 1989](#); [García-Ferreiro et al., 2001](#); [Elmslie, 2003](#)). Para el cálculo de la conductancia se utilizó el procedimiento descrito por [Carter y Mynlieff \(2004\)](#). Brevemente, la curva corriente-voltaje se ajusta con la siguiente ecuación de Boltzman:

$$I = [G_{max} \cdot (V - V_{rev})] / \left\{ 1 + e^{[(V - V_a)/k]} \right\}$$

en donde  $G_{max}$  es la conductancia máxima,  $V$  es el potencial de prueba,  $V_{rev}$  es el potencial de inversión de la corriente de calcio,  $V_a$  es el potencial donde se obtiene la

mitad de la activación máxima, y  $k$  se relaciona con la pendiente de la dependencia del voltaje de la activación. El potencial de inversión ( $V_{rev}$ ) se determinó individualmente para cada célula. Se midió el promedio de la amplitud de la corriente producida por el pulso de prueba 1 en el intervalo 5 a 6 ms después de iniciado el pulso. Con los valores así obtenidos se graficó la corriente en función del voltaje ( $V$ ) y se anotó el voltaje donde invertía la corriente ( $V_{rev}$ ) con el valor de la curva corriente voltaje en la ordenada. Las conductancias así obtenidas pueden ser normalizadas mediante la división por el valor de la conductancia máxima para cada célula.

En general, los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media;  $n$  corresponde al número de observaciones. Para evaluar si los valores obtenidos en las diferentes condiciones experimentales difieren significativamente se utilizó el procedimiento de análisis de varianza de un factor. Con la finalidad de determinar específicamente las diferencias de cada media con cada otra se empleó el método de Tukey de diferencia honestamente significativa. Este procedimiento de comparaciones múltiples *post hoc* o comparaciones *a posteriori* permite controlar la tasa de error al efectuar varios contrastes utilizando las mismas medias. De esta manera, se controla la probabilidad de cometer errores de tipo I, es decir, el rechazar una hipótesis nula que probablemente no debería rechazarse (Pardo Merino y Ruiz Díaz, 2002). En donde se indica, utilizamos simplemente la prueba *t de Student* para muestras no pareadas con la finalidad de estimar la diferencia entre dos grupos experimentales. El nivel de significación considerado en el presente trabajo, en general, es de 0.05, sin embargo, de acuerdo a los criterios actualmente recomendados, se indican los valores obtenidos de  $p$ .

#### IV. RESULTADOS

El análisis de los experimentos realizados permitió determinar las características de las corrientes iónicas a través de los canales  $Ca_v2.2$  en la situación control, es decir, aquella en la que se registra la corriente de calcio tipo N en la mayoría de los estudios sin ningún tratamiento experimental. Asimismo se establecieron los parámetros de las corrientes iónicas de los canales  $Ca_v2.2$  en las distintas condiciones experimentales (los cuales pueden verse en las tablas de este capítulo —amplitud de la corriente en las tablas [4.1](#) y [4.3](#); índice de facilitación en las tablas [4.1](#) y [4.5](#)—).

Tratamiento \ Parámetro	PMA	GDPβS	control	Gβγ4+ PMA	Gβγ4	PMA+GTPγS	GTPγS
Amplitud de la corriente (pA/pF)	21.8 ± 0.4	14.0 ± 0.9	10.7 ± 0.6	9.3 ± 1	6.6 ± 0.7	5.3 ± 0.9	2.8 ± 0.4
Índice de facilitación	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.0	2.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	2.9 ± 0.1

*TABLA 4.1 Valores promedio más/menos el error estándar de la media (SEM) de la amplitud de la corriente de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  y del índice de facilitación calculado para las diversas condiciones experimentales.*

En este capítulo se comparan los datos obtenidos en las células dializadas con GDPβS y aquellas previamente tratados con PMA con la finalidad de establecer si la acción de este último agente tiene una función similar a la del GDPβS en cuanto a prevenir la activación de las proteínas G y, en consecuencia, imposibilitar la inhibición sensible al voltaje de los canales  $Ca_v2.2$ . Se analizan las diferencias con referencia a la conductancia, el índice de facilitación, la densidad de corriente así como las diferencias en la participación de las poblaciones facilitada y reluctante analizadas en las colas de la corriente. De los análisis se establece una zona de inhibición tónica sensible al voltaje y se estudia la acción del PMA en relación con esta zona.

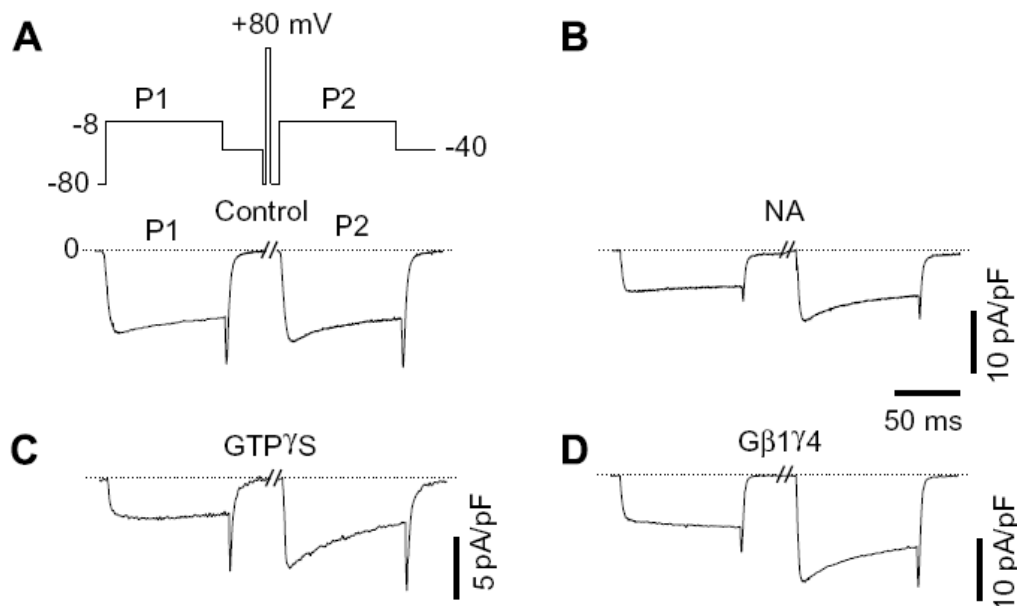
Se analiza, igualmente, el efecto de la sobreexpresión de las subunidades Gβγ y de la diálisis con GTPγS con el objeto de establecer una base de comparación con respecto a los efectos inhibitorios de la acción de las proteínas G sobre los canales  $Ca_v2.2$ .

Al contar con este conjunto de resultados es posible ahora analizar los datos obtenidos en las condiciones en las que los procesos inhibitorios de las proteínas G tienen lugar en presencia de la acción de fosforilación del canal inducidos por PMA. Por un lado, se analiza la respuesta de los canales  $Ca_v2.2$  a un tratamiento con PMA, en neuronas en las

que se promovió la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta\gamma$ . Y, por otra parte, se evalúa el efecto que sobre las corrientes iónicas de los canales  $Ca_v2.2$  tiene la diálisis con  $GTP\gamma S$  en células previamente tratadas con PMA.

### *Características de las corrientes iónicas a través de los canales $Ca_v2.2$*

Con el empleo de las soluciones y los procedimientos de fijación de voltaje descritos en la sección de métodos se logró el registro y el aislamiento de corrientes iónicas macroscópicas a través de canales  $Ca_v2.2$ . En la parte inferior del panel A de la figura 4.1 se observa un ejemplo representativo del registro de la corriente de bario a través de canales de calcio  $Ca_v2.2$  inducida por un par de pulsos de prueba despolarizantes ( $-8$  mV) separados en el tiempo por un segundo y con una duración de 90 ms (panel A, parte superior). La magnitud de la corriente aumenta rápidamente y luego decrece durante el pulso. Este decaimiento se debe al proceso conocido como inactivación.



**FIGURA 4.1** Corrientes de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  en neuronas control (A), y bajo condiciones de inhibición de esos canales por la acción de proteínas G por medio de: (B) la acción de norepinefrina (NA), (C) la presencia de  $GTP\gamma S$  en la pipeta de registro, y (D) la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta\gamma_4$ . Las células se sometieron al protocolo que se muestra en la parte superior del panel A.

## Efectos de la sobreexpresión de las subunidades $G\beta_1\gamma_4$

A fin de entender los efectos de la interacción de la actividad de las proteínas G y la fosforilación de los canales  $Ca_v2.2$  sobre sus corrientes iónicas es fundamental partir de las respuestas observadas ante cada uno de los mecanismos antagónicos a estudiar. En cuanto a la modulación inhibitoria mediada por proteínas G se realizaron registros en tres condiciones experimentales que dieron como resultado lo siguiente:

La aplicación de noradrenalina reduce considerablemente la corriente de bario (tablas [4.1](#), [4.2](#) y [4.3](#)) así como la inactivación y aumenta el índice de facilitación (FIG. [4.1B](#)).

La activación general de las proteínas G producida por la diálisis de las neuronas con GTP $\gamma$ S da como resultado una inhibición sensible al voltaje bastante aguzada (FIG. [4.1C](#)), de tal forma que en esta condición experimental se obtiene la menor amplitud de la corriente de bario (tablas [4.1](#), [4.2](#) y [4.3](#)). La corriente casi no muestra inactivación durante el pulso y el índice de facilitación es el mayor registrado de todas las condiciones experimentales (tablas [4.1](#) y [4.5](#)).

Tratamiento	PMA	GDP $\beta$ S	control	NA	PMA + NA	$G\beta_1\gamma_4$ + PMA	$G\beta_1\gamma_4$	PMA+GTP $\gamma$ S	GTP $\gamma$ S
PMA		7.88*	11.11*	14.96*	11.65*	11.95*	15.21*	16.51*	18.94*
GDP $\beta$ S	(.00)		3.23	7.08*	3.77	4.07*	7.33*	8.63*	11.06*
control	(.00)	(.14)		3.85*	0.55	0.85	4.11*	5.41*	7.83*
NA	(.00)	(.00)	(.01)		3.31	3.01	0.25	1.55	3.97
PMA + NA	(.00)	(.09)	(.99)	(.11)		0.30	3.56	4.86*	7.28*
$G\beta_1\gamma_4$ + PMA	(.00)	(.02)	(.99)	(.09)	(.99)		3.26*	4.56*	6.98*
$G\beta_1\gamma_4$	(.00)	(.00)	(.00)	(.99)	(.06)	(.05)		1.30	3.72
PMA + GTP $\gamma$ S	(.00)	(.00)	(.00)	(.91)	(.01)	(.01)	(.97)		2.42
GTP $\gamma$ S	(.00)	(.00)	(.00)	(.08)	(.00)	(.00)	(.12)	(.74)	

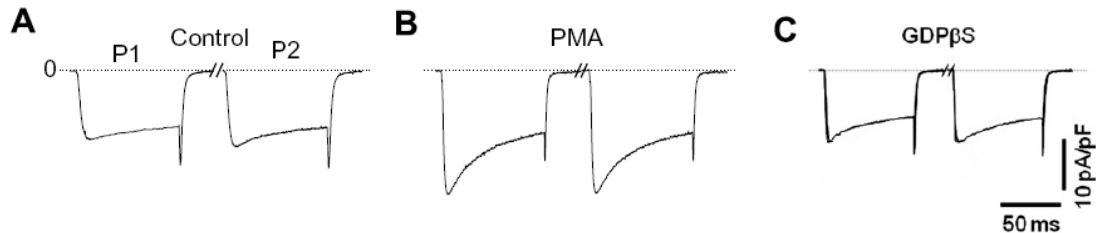
TABLA 4.2 Diferencias de medias (sobre la diagonal) en la densidad de corriente entre las diversas condiciones experimentales. Bajo la diagonal se da el nivel crítico asociado a cada diferencia (significación) calculado con el método post hoc de diferencia honestamente significativa (Tukey). Los grupos contrastados cuyas medias difieren significativamente al nivel establecido de 0.05 están marcados con un asterisco.

Como fue mencionado ya, en la sección de antecedentes, la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta\gamma$  da como resultado una inhibición de la corriente iónica a través de los canales  $Ca_v2.2$  (Herlitz et al., 1996; Ikeda, 1996). Nuestros registros muestran que en neuronas con sobreexpresión de las subunidades  $G\beta_1\gamma_4$  (FIG. [4.1D](#)) la amplitud de la corriente es similar a la registrada bajo la acción de la norepinefrina y a la obtenida en células con GTP $\gamma$ S (tabla [4.1](#) y [4.2](#)). Se observa claramente en el ejemplo del panel D

que la corriente no inactiva. Finalmente, el índice de facilitación es significativamente menor en la condición de sobreexpresión que en las neuronas con GTP $\gamma$ S y mayor que con el tratamiento con norepinefrina (tablas [4.1](#), [4.4](#) y [4.5](#)).

### *Efectos diferenciales entre la acción del GDP $\beta$ S y el tratamiento con PMA*

Una de las cuestiones centrales a dilucidar en este trabajo es determinar el alcance de la actividad de la proteína cinasa C sobre los canales Ca $v$ 2.2. En estudios previos, como ya se ha mencionado, se propuso que la fosforilación de esos canales sólo tiene como resultado la prevención de la acción inhibitoria de las proteínas G ([Barrett](#) y [Rittenhouse](#), 2000; [Chen](#) y [Penington](#), 1997; 1996). Sin embargo, nuestros datos señalan claramente una acción del PMA que va más allá de obstaculizar otro mecanismo regulador. Los resultados del presente trabajo aportan datos que fortalecen la perspectiva esbozada desde los trabajos [Zong](#) y [Lux](#) (1994) que entiende la regulación de los canales Ca $v$ 2.2 como resultado de interacciones combinadas entre los procesos regulatorios debidos a la actividad de las proteínas G y los procesos de fosforilación del canal.



*FIGURA 4.2* Corrientes de bario a través de los canales de calcio Ca $v$ 2.2 en neuronas control (A); después del tratamiento con PMA (B) y; en neuronas con GDP $\beta$ S (C). Todos los registros se obtuvieron con el protocolo que se muestra en la parte superior del panel A de la [FIG. 4.1](#).

El PMA produce un aumento en la densidad de las corrientes ([FIG. 4.2B](#)) al tiempo que aumenta la inactivación de la corriente generada en comparación con los registros control ([FIG. 4.2A](#)). Se observa, además, una facilitación negativa en presencia del PMA, probablemente debida a una inactivación acelerada ([Garcia-Ferreiro et al.](#), 2001). En contraste, las corrientes de bario registradas en las neuronas dializadas con GDP $\beta$ S ([FIG. 4.2C](#)) aunque muestran una corriente mayor que las células control el aumento no alcanza los niveles de la acción del PMA (tablas [4.2](#) y [4.3](#)). Se alcanza un aumento en la corriente que excede la acción del GDP $\beta$ S. La inactivación es más

pronunciada en las células que recibieron el tratamiento con PMA. La tasa de facilitación calculada para las neuronas control y aquellas dializadas con GDPβS o las tratadas con PMA no da diferencias significativas (tablas [4.4](#) y [4.5](#)).

### *Densidad de corriente y conductancia en células dializadas con GDPβS y aquellas tratadas con PMA*

En el panel B de la figura [4.3](#) se puede observar que la corriente máxima se obtiene con el tratamiento con PMA. De manera similar, en el panel C de la misma figura se observa que la conductancia aumenta significativamente en las células pre-tratadas con PMA, mientras que no se detecta una diferencia importante en la conductancia entre las células control y aquellas dializadas con GDPβS.

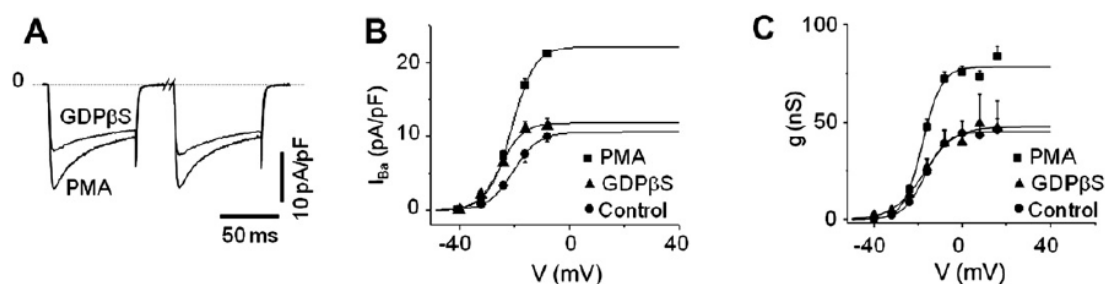


FIGURA 4.3 (A) Superposición de las corrientes de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  en neuronas tratadas con PMA y aquellas con GDPβS. Representación gráfica de la máxima densidad de corriente de bario (B) y de la conductancia (C), ambas, en función del voltaje de los pulsos de prueba.

### *Efectos del GDPβS y el tratamiento con PMA en las colas de corriente*

[Zhu](#) e [Ikeda](#) (1994) previamente habían reportado que el PMA lentifica el proceso de desactivación de los canales  $Ca_v2.2$  en comparación con células control. Como puede observarse en la figura [4.4](#) (paneles A y B) nosotros encontramos que la cola de la corriente de bario por esos canales es más lenta en células tratadas con PMA que en aquellas tratadas con GDPβS. El tratamiento con PMA claramente reduce la tasa de desactivación de la cola de la corriente en mayor medida que el GDPβS con respecto a las neuronas control (FIGS. [4.3](#) y [4.4](#)).

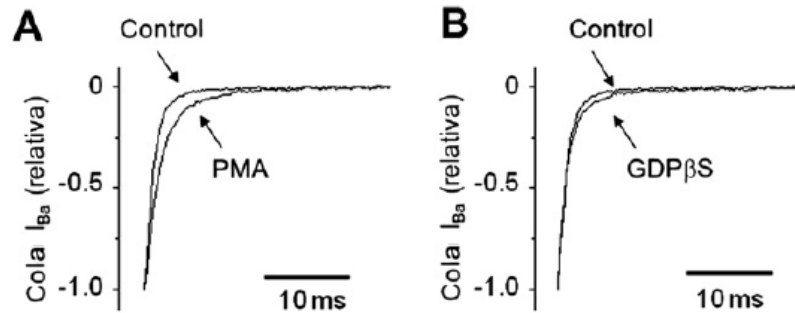


FIGURA 4.4 Cola (relativa) de la corriente de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  en neuronas control, después del tratamiento con PMA (A) y en neuronas con  $GDP\beta S$  (B).

Para examinar el comportamiento de los componentes facilitado (*willing*) y reluctante (*reluctant*) ajustamos a una ecuación de Boltzmann con dos componentes la relación corriente voltaje de la corriente de cola. En la FIG. 4.5 se pueden comparar esos dos componentes para las condiciones control (FIG. 4.5A), el tratamiento con PMA (FIG. 4.5B) y la diálisis con  $GDP\beta S$  (FIG. 4.5C). Mientras que en esta última condición, el componente facilitado (*W*) se ve aumentado en relación con un decremento del componente reluctante (*R*) comparados con el control, en la condición experimental de aplicación de PMA se observa un aumento significativo en el componente reluctante con respecto al control.

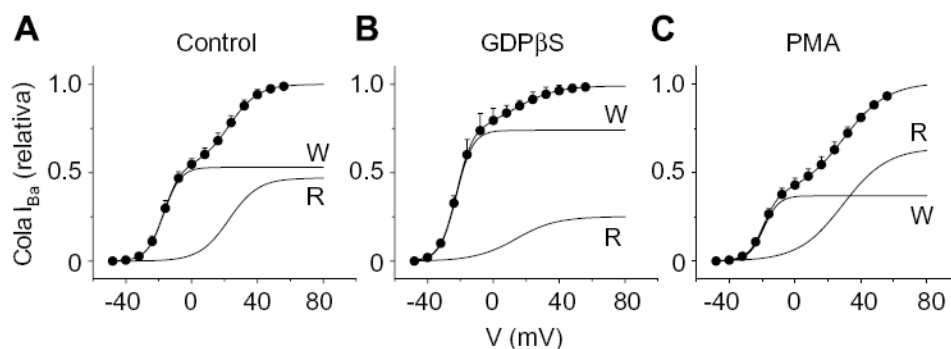


FIGURA 4.5 Relación corriente (relativa) - voltaje de las colas de corriente de bario ( $\bullet$ ) en neuronas control (A); en células dializadas con  $GDP\beta S$  (B) y; en neuronas tratadas con PMA (C). La línea continua a través de los símbolos representa el mejor ajuste a una función doble de Boltzmann. Debajo de esa línea, se grafican las dos componentes que contiene la doble función de Boltzmann como dos líneas continuas: Las poblaciones, facilitada (*W*) y reluctante (*R*), de los canales de calcio tipo N.



Claramente, los tratamientos con el PMA y con el GDPβS producen efectos diferenciados. La diálisis con GDPβS bloquea la activación generalizada de las proteínas G y su efecto, con relación a los canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.2, es el de llevar a cero la inhibición tónica sensible al voltaje (FIG. 4.6). El rango de corriente que va desde cero hasta catorce pA/pF corresponde a la región en la que observamos diferentes niveles de inhibición tónica resultado de la activación de las proteínas G. El máximo grado de inhibición sensible al voltaje por proteínas G se registra en neuronas dializadas con GTPγS, mientras que el mínimo (cero) se obtiene con el GDPβS. La corriente registrada en las neuronas dializadas con GDPβS alcanza un máximo promedio de 14 pA/pF, mientras que en las células pretratadas con PMA la corriente sobrepasa este valor.

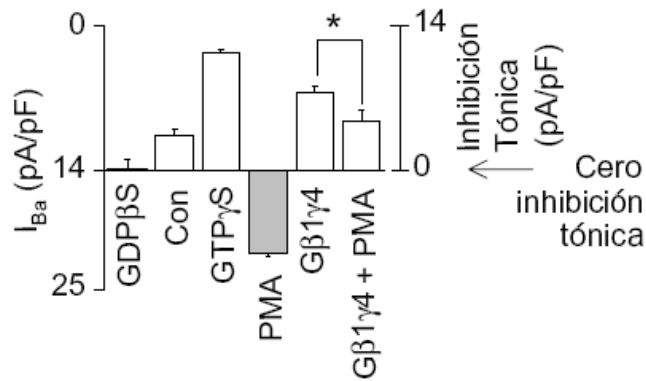


FIGURA 4.6 Sumario de las corrientes de bario (normalizadas) registradas con pulsos de prueba que lleva la célula a  $-8$  mV. El eje representado a la derecha indica la región de inhibición tónica (rango: 0 a 14 pA/pF). Con un cero que corresponde a la abolición de la inhibición tónica producida por la activación de las proteínas G. Esta abolición es consecuencia de la diálisis con GDPβS (2mM). El tratamiento con PMA promueve un aumento en la corriente que va más allá de la región de inhibición tónica señalada.

El orden en que las diferentes condiciones experimentales estudiadas inducen la inhibición por proteínas G sobre las corrientes iónicas a través de los canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.2 es el siguiente: GTPγS > PMA + GTPγS > Gβ1γ4 > NA > Gβ1γ4 + PMA > PMA + NA > control > GDPβS (FIG. 4.6 y 4.7; tablas 4.2 y 4.3). La acción del PMA va más allá de ese rango de corriente. Los efectos observados sobre la actividad de los canales Ca<sub>v</sub>2.2 en las neuronas tratadas previamente con PMA son de una naturaleza diferente a la regulación inhibitoria de los mismos por la activación de las proteínas G. En este sentido, la regulación hacia arriba (*upregulation*) inducida por el PMA no revierte o

impide la acción de las proteínas G sino que es resultado de una acción diferente sobre los canales  $Ca_v2.2$ . Esta acción del PMA puede regular a estos canales en interacción simultánea con los procesos de regulación por proteínas G. Esta interacción produce respuestas que no corresponden a mecanismos mutuamente excluyentes o que se reviertan uno a otro de manera simple.

**densidad de corriente**

HSD de Tukey		Subconjunto para alfa = .05					
condicion	N	1	2	3	4	5	6
PMA	9	-21,7737					
GDPβS	6		-13,8945				
control	9		-10,6666	-10,6666			
PMA + NA	6		-10,1212	-10,1212	-10,1212		
Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub> + PMA	9			-9,8216	-9,8216		
NA	10				-6,8116	-6,8116	
Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub>	10				-6,5603	-6,5603	-6,5603
PMA + GTPγS	6					-5,2606	-5,2606
GTPγS	4						-2,8368
Sig.		1,000	,052	,998	,081	,922	,058

*Tabla 4.3 Promedios de  $I_{Ba}$  (pA/pF). Los grupos cuyas medias no difieren entre sí están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren ( $p < .05$ ) forman parte de subconjuntos diferentes.*

***Interacción y reversibilidad de la inhibición por proteínas G y la fosforilación de los canales de calcio  $Ca_v2.2$ .***

Los efectos descritos por la acción del PMA (FIG. 4.7A) sobre las corrientes iónicas a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  pueden ser revertidos parcialmente por la aplicación de GTPγS a células previamente tratadas con PMA (FIG. 4.7B). La diálisis con GTPγS en este caso no produce la inhibición de la corriente observada con este mismo tratamiento en células control (FIG. 4.7C). La densidad de corriente (tablas 4.2 y 4.3) y el índice de facilitación (tabla 4.4 y 4.5) son significativamente diferentes, en términos estadísticos, entre las células pretratadas con PMA y aquellas dializadas con GTPγS pretratadas con PMA (FIG. 4.8 y 4.11).

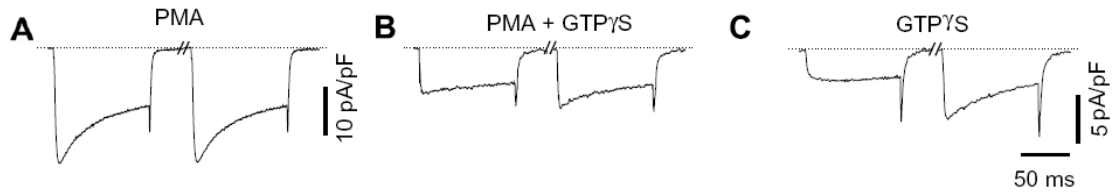


FIGURA 4.7 Corrientes de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$ . En (A) neuronas tratadas con PMA; en (B) aquellas dializadas con  $GTP\gamma S$  después del tratamiento con PMA, y; en (C) neuronas con  $GTP\gamma S$ .

Por otra parte, las células en las que se sobreexpresaron las subunidades  $G\beta\gamma$  producen efectos sobre las corrientes de calcio (FIG. 4.9A) que son revertidas parcialmente por la acción del PMA (FIG. 4.9B). La densidad de corriente aumenta significativamente en esta última condición con respecto a la situación de sobreexpresión exclusivamente (FIG. 4.8 y 4.9; y tablas 4.2 y 4.3). Y el índice de facilitación disminuye en las células que sobreexpresan las subunidades  $G\beta\gamma$  que fueron tratadas con PMA en comparación con aquellas que no recibieron este tratamiento (FIG. 4.11; y tablas 4.4 y 4.5)

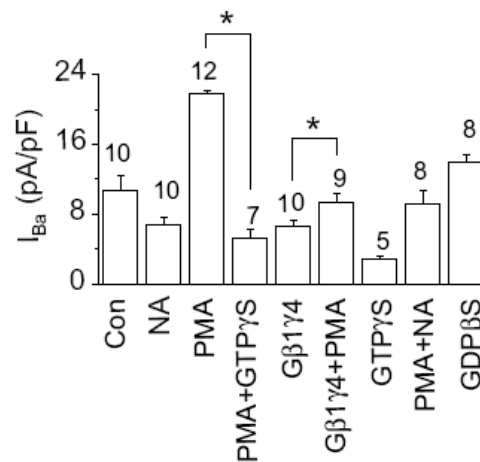


FIGURA 4.8 Media de la corriente máxima (pA/pF) para cada condición experimental. El número sobre cada barra denota el número de células. Los grupos contrastados cuyas medias difieren significativamente al nivel establecido de 0.05 están marcados con un asterisco.

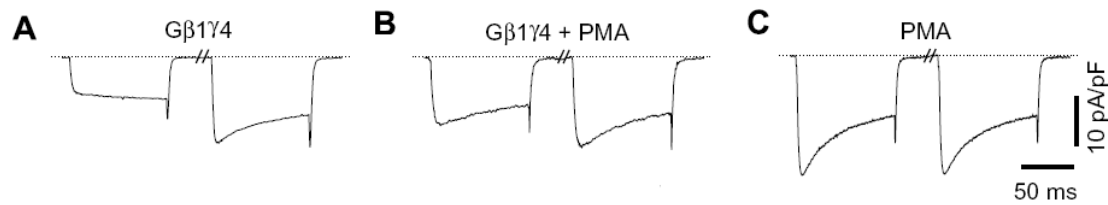


FIGURA 4.9 Corrientes de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$ . En (A) neuronas con sobreexpresión de las subunidades  $G\beta_1\gamma_4$ ; en (B) células que sobreexpresan las subunidades  $G\beta\gamma$  tratadas, previamente al registro, con PMA y; en (C) neuronas pretratadas con PMA.

Finalmente, la acción de un agonista como la noradrenalina (FIG. 4.10C) revierte parcialmente el efecto inducido por el PMA (FIG. 4.10A). De tal manera que la corriente de calcio de los canales  $Ca_v2.2$  registrada en neuronas tratadas previamente con PMA y que son registradas, posteriormente, bajo la acción de NA muestran una respuesta mixta (FIG. 4.10B), cercana a la obtenida en células sometidas a la acción exclusiva de NA.

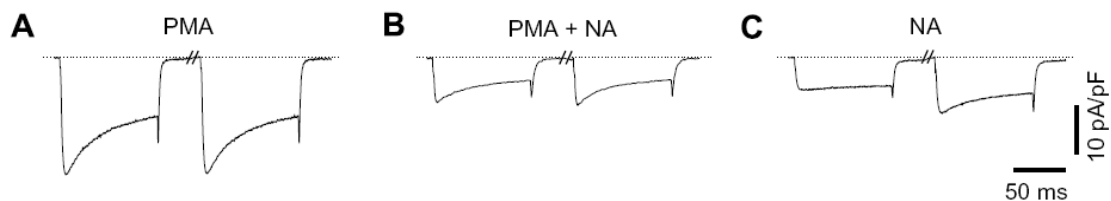


FIGURA 4.10 Corrientes de bario a través de los canales de calcio  $Ca_v2.2$ . En (A) neuronas tratadas, previamente al registro con PMA; en (B) células pretratadas con PMA en presencia de noradrenalina (NA) y; en (C) neuronas registradas bajo la acción de NA.

En resumen, tenemos, por un lado los efectos del GTP $\gamma$ S que, al activar de manera generalizada las proteínas G, producen la mayor disminución en la densidad de la corriente de bario a través de los canales  $Ca_v2.2$  (tablas 4.2 y 4.3) y el mayor índice de facilitación (tablas 4.4 y 4.5) de todas las condiciones experimentales aquí analizadas. En el otro extremo tenemos las consecuencias de la aplicación previa de PMA a las neuronas simpáticas que promueve un incremento en la densidad de corriente, significativamente, en términos estadísticos, mayor a cualquier otra situación experimental (tablas 4.2 y 4.3) y un índice de facilitación ligeramente menor a uno,

aunque no estadísticamente diferente al obtenido en condiciones control, diálisis con GDPβS o en las neuronas con sobreexpresión de subunidades Gβ<sub>1</sub>γ<sub>4</sub> más un tratamiento previo al registro con PMA (tablas 4.4 y 4.5).

Tratamiento	PMA	GDPβS	control	NA	Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub> + PMA	Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub>	PMA+GTPγS	GTPγS
PMA		0.08	0.28	0.96*	0.43	2.16*	0.84*	2.98*
GDPβS	(.99)		0.20	0.88*	0.35*	2.07*	0.76*	2.90*
control	(.46)	(.92)		0.68*	0.15	1.88*	0.56*	2.71*
NA	(.00)	(.00)	(.00)		0.53*	1.19*	0.12	2.02*
Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub> + PMA	(.06)	(.39)	(.96)	(.04)		1.72*	0.41	2.55*
Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub>	(.00)	(.00)	(.00)	(.00)	(.00)		1.31*	0.83*
PMA + GTPγS	(.00)	(.01)	(.05)	(.99)	(.32)	(.00)		2.14*
GTPγS	(.00)	(.00)	(.00)	(.00)	(.00)	(.00)	(.00)	

TABLA 4.4 Diferencias de medias (sobre la diagonal) en el índice de facilitación entre las diversas condiciones experimentales. Bajo la diagonal se da el nivel crítico asociado a cada diferencia (significación) calculado con el método post hoc de diferencia honestamente significativa (Tukey). Los grupos cuyas medias difieren significativamente al nivel de significación establecido de 0.05 están marcados con un asterisco.

Entre esos extremos, tenemos la acción preventiva de la inhibición tónica sensible al voltaje que resulta de la diálisis con GDPβS y que disminuye la densidad de corriente ligeramente con respecto al control (tablas 4.2 y 4.3) aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

#### índice de facilitación

HSD de Tukey

condición	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
PMA	12	,9472			
GDPβS	7	1,0306			
control	12	1,2273			
Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub> +PMA	11	1,3800	1,3800		
PMA+GTPγS	5		1,7918		
NE	7		1,9094		
Gβ <sub>1</sub> γ <sub>4</sub>	8			3,1029	
GTPγS	5				3,9328
Sig.		,214	,061	1,000	1,000

Tabla 4.5 Índice de facilitación promedio. Los grupos cuyas medias no difieren entre sí están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren ( $p < .05$ ) forman parte de subconjuntos diferentes.

En cuanto al índice de facilitación, tampoco, se observan diferencias significativas con relación al control (tablas 4.4 y 4.5). A esto podríamos hacer corresponder la acción de la noradrenalina sobre las corrientes de Barrio a través de los

canales  $Ca_v2.2$ . Este agonista produce una corriente significativamente menor al control y mayor, aunque no estadísticamente significativa, a la registrada en neuronas dializadas con  $GTP\gamma S$  (tablas 4.2 y 4.3). Sin embargo, presentan un índice de facilitación significativamente menor que las células con  $GTP\gamma S$  (tablas 4.4 y 4.5).

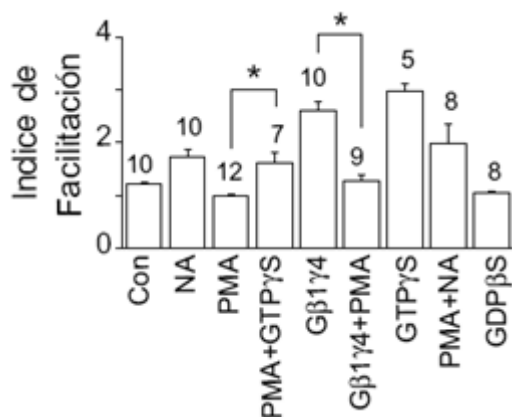


FIGURA 4.11 Histograma que muestra la media del índice de facilitación calculado para cada condición experimental. El número sobre cada barra denota el número de células. Los grupos contrastados cuyas medias difieren significativamente al nivel establecido de 0.05 están marcados con un asterisco.

Un resultado importante, obtenido en este estudio, es la caracterización del efecto que sobre los canales  $Ca_v2.2$  tiene la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta_1\gamma_4$ . Como ya se ha señalado produce una corriente que está entre la registrada en presencia de noradrenalina y aquella obtenida en neuronas dializadas con  $GTP\gamma S$  (tablas 4.2 y 4.3). Con un índice de facilitación, igualmente, significativamente diferente e intermedio entre esas dos condiciones (tablas 4.4 y 4.5).

Los resultados mixtos obtenidos van, en orden descendente con relación a la densidad de corriente, de la siguiente manera: PMA + NA >  $G\beta_1\gamma_4$  + PMA > PMA +  $GTP\gamma S$  (tablas 4.2 y 4.3). Con respecto al índice de facilitación, la sobreexpresión de las subunidades  $G\beta_1\gamma_4$  con un tratamiento con PMA produjo un índice de facilitación mayor y estadísticamente significativo que el pre-tratamiento con PMA más la diálisis con  $GTP\gamma S$  (tablas 4.4 y 4.5).

Por último, las fracciones de la corriente, calculadas en la cola de la misma, correspondientes a las poblaciones, facilitada y reluctante, de los canales de calcio  $Ca_v2.2$ , pueden observarse en la figura 4.12. La acción del agonista adrenalina, la

sobreexpresión de las subunidades  $G\beta_1\gamma_4$  y la diálisis con  $GTP\gamma S$  producen una mayor participación en la corriente de cola de la población reluctante. El  $GDP\beta S$  reduce considerablemente esta fracción y lleva preferentemente al canal al estado facilitado. El PMA por su parte produce un aumento en la fracción reluctante en la cola de la corriente, debido en parte, a la inactivación mayor producida en la población facilitada y, probablemente, por un incremento, concomitante, en la conductancia del canal aún en su estado reluctante.

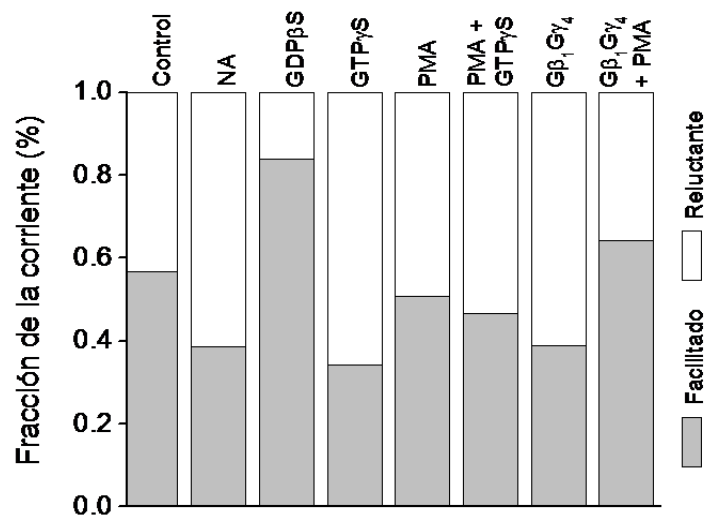


FIGURA 4.12 Histograma de las fracciones facilitada y reluctante de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  calculadas en la cola de la corriente.

## V. DISCUSIÓN

[Boland](#) y Bean (1993) al analizar la cinética de las colas de la corriente encontraron que la acción del neurotransmisor acelera la desactivación de los canales de calcio. Sin embargo, [Schwartz](#) (1993), [Zhu](#) e Ikeda (1994) y nuestro grupo ([García-Ferreiro et al.](#), 2001) hemos observado un efecto opuesto de PKC sobre las colas de la corriente. El presente trabajo aporta datos que fortalecen esto último ya que mostramos que el PMA lentifica la cinética de la corriente a través de los canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.2. Encontramos un claro incremento de la corriente en células pretratadas con PMA y que éste va más allá del rango en que la densidad de corriente es susceptible a la remoción de la inhibición tónica sensible al voltaje (FIG. [4.6](#)).

Como se había reportado en un trabajo anterior de nuestro laboratorio ([García-Ferreiro et al.](#), 2001) el GDPβS no produce un cambio significativo en la corriente en relación con las células control. Sin embargo, el tratamiento con PMA es capaz de producir cambios significativos en las corrientes de calcio en neuronas dializadas con GDPβS.

Las corrientes α<sub>1B</sub> expresadas en ovocitos son modulados hacia arriba (*up-modulated*) por el PMA independientemente de sus efectos sobre la inhibición mediada por proteínas G ([Hammid, J. et al.](#), 1999; [Stea](#), 1995). Igualmente, está bien documentado que la subunidad α del canal Ca<sub>v</sub>2.2 es susceptible de ser fosforilado en sitios específicos ([Fang et al.](#), 2006)

Un punto destacado de los registros es que la inactivación incrementada que se observa durante el pulso despolarizante, en células tratadas con PMA, tiene como consecuencia una reducción en la población de canales abiertos en el estado facilitado en la cola de la corriente. Concomitantemente la fracción de la corriente a través de los canales en el estado reluctante aumenta. (FIG. [4.5](#)).

Por otra parte, mientras que la diálisis con GDPβS no tiene ningún efecto apreciable sobre la conductancia de los canales Ca<sub>v</sub>2.2, el tratamiento con PMA produce un incremento significativo en la conductancia comparada con la de los controles. Este incremento no puede ser explicado como resultado de la remoción de la inhibición tónica debida a la acción de las proteínas G. Los resultados aquí presentados sugieren que cambios sensibles al voltaje en la maquinaria del canal Ca<sub>v</sub>2.2 bajo la acción de las



proteínas G o el PMA pueden ser los responsables de los cambios registrados tanto en la amplitud como en la cinética de las corrientes.

De acuerdo con [Patil et al. \(1996\)](#) la inhibición por proteínas G lleva a los canales  $Ca_v2.2$  a estados cerrados más profundos. Esto explicaría la cinética más lenta en la activación de la corriente y el efecto protector de la inactivación sensible al voltaje. De manera inversa, la activación de la proteína cinasa C promovería un acercamiento de los estados cerrados del canal al estado abierto ([Herlitze et al., 2001](#)), lo cual explicaría la rapidez en la activación y el incremento de la inactivación dependiente del voltaje que se observan en las neuronas tratadas con PMA.

Nuestra hipótesis de trabajo considera una regulación alostérica del canal  $Ca_v2.2$ . En la misma línea vislumbrada ya por [Herlitze et al. \(2001\)](#), al parecer las acciones sobre el sensor de voltaje del canal producen cambios alostéricos, sensibles al voltaje, en la subunidad  $\alpha_{1B}$  del canal, es decir, cambios conformacionales del canal que explicarían los cambios cinéticos que se observan en las corrientes del canal  $Ca_v2.2$ .

Los efectos, observados en nuestros experimentos, en la cinética de las corrientes a través de los canales  $Ca_v2.2$  en las condiciones experimentales en las que simultáneamente se induce la fosforilación del canal y actúan las subunidades  $G\beta\gamma$  hacen sustentable una interacción alostérica sobre el canal  $Ca_v2.2$ .

## **VI. CONCLUSIONES**

Se ha propuesto ([Herlitze et al. 2001](#)) que el canal de calcio  $Ca_v2.2$  presenta dos estados funcionales que son intrínsecos a sí mismo. La acción de las proteínas G, de manera específica las subunidades  $G\beta\gamma$ , llevan preferentemente al canal a su estado reluctantante. El  $GDP\beta S$  previene la acción de las proteínas G y mantiene al canal, primordialmente, en el estado facilitado.

Las neuronas dializadas con  $GDP\beta S$  y aquellas tratadas con PMA difieren significativamente en los efectos que hemos observado en los registros de las corrientes de los canales  $Ca_v2.2$ . Existen marcadas diferencias entre esas dos condiciones experimentales en los siguientes parámetros de tales corrientes: amplitud o densidad; inactivación,  $\tau$ ; conductancia. Asimismo, se diferencian sus correspondientes colas de corriente en cuanto a la proporción de los componentes facilitado y reluctantante. El tratamiento con PMA produce consecuencias que no parecen estar directamente vinculadas con la acción de las proteínas G sobre el canal de calcio tipo N ya que los incrementos observados en las corrientes registradas van más allá de la región de inhibición tónica sensible al voltaje producida por las proteínas G. El tratamiento previo con PMA produce un enlentecimiento cinético del proceso de desactivación del canal  $Ca_v2.2$ .

La interacción entre la acción de las proteínas G sobre el canal  $Ca_v2.2$  y la fosforilación del mismo produce respuestas mixtas en las corrientes iónicas. Esto podría ser explicado por una regulación alostérica del canal. El alosterismo proteico puede ser entendido de manera muy amplia como la unión de un ligando a un sitio de la proteína que da como resultado un cambio en la afinidad o en la eficiencia catalítica en un sitio distante en la misma proteína ([Swain y Gierash, 2006](#); [Gunasekaran, 2004](#); [Mathews et al., 2002](#)). La fosforilación del canal  $Ca_v2.2$  no sólo incrementa la conductancia y la corriente iónica del mismo sino que los efectos de una acción alostérica del PMA sobre el canal de calcio tipo N tienen como resultado un incremento en la corriente iónica del estado reluctantante del canal. La activación de la proteína cinasa C lleva al canal  $Ca_v2.2$  a estados cerrados cercanos cinéticamente a estados de apertura.

Los efectos observados como resultado de la interacción de los procesos de modulación inhibitoria inducidos por la activación de las proteínas G y aquellos

relacionados con la fosforilación del canal permiten vislumbrar interacciones que no dependen estrictamente del orden de aplicación o que se limiten a prevenir la acción del otro mecanismo de regulación del canal. Los resultados mixtos obtenidos plantean mecanismos más finos de regulación del canal de calcio  $Ca_v2.2$ . Una interacción alostérica de los procesos de fosforilación del canal con la regulación por las proteínas G, permitiría modular la actividad neuronal favoreciendo su adaptación a cada condición fisiológica.

De manera general, es sustentable concluir que la mayor parte del incremento de la corriente de los canales  $Ca_v2.2$  que se observa tras el tratamiento con PMA es resultado de alteraciones en la cinética de la corriente que van más allá de la liberación o el bloqueo de la inhibición sensible al voltaje mediada por las proteínas G.

### ***Relevancia y perspectivas del trabajo***

Si consideramos que más del 50% de los fármacos actuales tienen como blanco a receptores unidos a proteínas G, y que nuevos descubrimientos sobre los GPCRs repercuten en el diseño de fármacos más eficaces, puede comenzar a vislumbrarse la relevancia de estudiar los mecanismos precisos de los cuales depende el ajuste de las funciones a cada condición del organismo y a cada momento. Como evidencia de la relevancia de la señalización por proteínas G está el que cientos de receptores de siete segmentos transmembranales que interactúan con proteínas G, ocupan 1-2% del genoma humano. Desde este punto de vista, es fácil advertir su importancia, dada su naturaleza reguladora, y vuelve sólida la concepción actual de que es tan relevante estudiar la función misma como su regulación. Por lo tanto, el abordaje experimental de aquellos efectos que se suceden a pocos instantes de la activación de las proteínas G, de manera aislada, sólo puede pertenecer al pasado. Estratégicamente no puede verse más como un evento serial, sino como el resultado de la interacción de más de una variable, en forma simultánea en el tiempo. Sólo en un modelo flexible de esta naturaleza, puede entenderse la capacidad adaptativa del organismo, lejos de un evento que parecía permanecer encendido sin posibilidad de cambio a corto o mediano plazo. El presente trabajo es un primer intento dentro de las nuevas rutas de abordaje que podrían seguir los próximos estudios, cuyos resultados permitirán revalorar, inclusive, datos ya publicados presentes y pasados.

## **VII. REFERENCIAS**

Ahlquist, R.P. (1948) A study of the adrenotropic receptors. *American Journal of Physiology* **153**: 586 – 600

Albert, P.R., y Robillard, L. (2002) G protein specificity: Traffic direction required. *Cellular Signalling* **14**: 407 - 418

Augustine, G.J., Santamaria, F., y Tanaka, K. (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* **40**: 331 – 346.

Barrett, C.F. y Rittenhouse, A.R. (2000) Modulation of N-type calcium channel activity by G-proteins and protein kinase C. *Journal of General Physiology* **115**: 277 - 286.

Bean, B.P. (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature (London)* **340**: 153 – 156

Beech, D.J., Bernheim, L., Mathie, A. y Hille, B. (1991) Intracellular  $Ca^{2+}$  buffers disrupt muscarinic suppression of  $Ca^{2+}$  current and M current in rat sympathetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 652 - 656

Berridge, M.J., Bootman, M.D. y Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* **4**: 517 – 529

Berridge, M.J., Lipp, P. y Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* **1**: 11 - 21

Blatz A.L. y Magleby K.L. (1987) Calcium-activated potassium channels. *Trends in Neurosciences* **10**: 463 - 467

Boland, L.M. y Bean, B.P. (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *Journal of Neuroscience* **13**: 516 - 533

Boehm, S. y Huck S. (1996) Inhibition of N-type calcium channels: the only

mechanism by which presynaptic  $\alpha_2$ -autoreceptors control sympathetic transmitter release. *European Journal of Neuroscience*. **8**: 1924 - 1931

Bootman, M.D., Berridge, M.J. y Roderick, H.L. (2002) Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Current Biology* **12**: R563 – R565

Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F. y Lipp, P. (2001) Calcium signalling—an overview. *Cell & Developmental Biology*, **12**: 3 – 10

Calin-Jageman, I. y Lee, A. (2008)  $\text{Ca}_v1$  L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel signaling complexes in neurons. *Journal of Neurochemistry* **105**: 573 – 583

Carbone, E. y Lux, H.D. (1984) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophysical Journal* **46**: 413 - 418

Carter, T.J. y Mynlieff, M. (2004)  $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptors facilitate L-type and attenuate N-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in isolated hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* **76**:323–333

Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annual Review of Cell Developmental Biology* **16**: 521 – 555

Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P., y Pérez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: Calcium channels. *Pharmacological Reviews* **55**: 579 – 581

Chen, Y. y Penington, N.J. (1997) Order of application determines the interaction between phorbol esters and GTP- $\gamma$ -S in dorsal raphe neurons: Evidence that the effect of 5-HT is modified upstream of the G protein Ca channel interaction. *Journal of Neurophysiology* **77**: 2697 – 2703

Chen, Y. y Penington, N.J. (1996) Differential effects of protein kinase C activation on 5-HT<sub>1A</sub> receptor coupling to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  currents in rat serotonergic neurones. *Journal of Physiology (London)* **496**: 129 - 137

Cooper, C.B., Arnot, M.I., Feng, Z.P., Jarvis, S.E., Hamid, J. y Zamponi, G.W. (2000) Cross-talk between G-protein and protein kinase C modulation of N-type

calcium channels is dependent on the G-protein  $\beta$  subunit isoform. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 40777 - 40781

Dascal, N. (2001) Ion-channel regulation by G proteins. *Trends In Endocrinology & Metabolism* **12**: 391 - 398

Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., y Greenberg, M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* **294**: 333 – 339.

Dolphin, A.C. (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology* **147**: S56 – S62.

Dunlap, K. y Fischbach, G.D. (1981) Neurotransmitters decrease the Calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurons. *Journal of Physiology (London)* **317**: 519 - 535

Elmslie, K.S. (2003) Neurotransmitter modulation of neuronal Calcium channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**: 477 - 489

Elmslie, K.S., Zhou, W., y Jones, S.W. (1990) LHRH and GTP- $\gamma$ -S modify activation of N-type calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* **5**: 75-80

Exton, J. H (1985) Mechanisms involved in  $\alpha$ -adrenergic phenomena. *American Journal of Physiology* **248**: E633 - E647

Fang, H., Patanavanich, S., Rajagopal, S., Yi, X., Gill, M.S., Sando, J.J. y Kamatchi, G.L. (2006) Inhibitory role of Ser-425 of the  $\alpha_1$  2.2 subunit in the enhancement of  $Ca_v2.2$  currents by phorbol-12-miristate,13-acetate. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 20011 - 20017

Fakler, B. y Adelman, J.P. (2008) Control of  $K_{Ca}$  channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* **59**: 873 - 881

Fields, T.A. y Casey, P.J. (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochemical Journal* **321**: 561 - 571

Fredholm, B.B., Hökfelt, T. y Milligan, G. (2007) G-protein-coupled receptors:

an update. *Acta Physiologica* **190**: 3 – 7

Galarraga, E., Vilchis, C., Tkatch, T., Salgado, H., Tecuapetla, F., Perez-Rosello, T., Perez-Garci, E., Hernandez-Echeagaray, E., Surmeier, D.J. y Bargas, J. (2007) Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* **146**: 537 – 554

García, D.E., Li, B., García-Ferreiro, R.E., Hernández-Ochoa, E.O., Yan, K., Gautam, N., Catterall, W.A., Mackie, K. y Hille, B. (1998) G-protein  $\beta$ -subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *The Journal of Neuroscience*, **18**: 9163 – 9170

García-Ferreiro R.E., Hernández-Ochoa, E.O. y García, D.E. (2001) Modulation of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* **442**: 848 – 858

Golard, A., Role, L. y Siegelbaum, S.A. (1993) Protein kinase C blocks somatostatin-induced modulation of calcium current in chick sympathetic neurons. *The Journal of Neurophysiology* **70**: 1639 - 1643

Gold, M.S., Dastmalchi, S. y Levin, J.D. (1997)  $\alpha_2$ -Adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. *Pain* **69**: 179 – 190

Grassi, F. y Lux, H.D. (1989) Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neuroscience Letters* **105**: 113 – 119

Gunasekaran, K., Ma, B. y Nussinov, R. (2004) Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **57**: 433 - 443

Hamid, J., Nelson, D., Spaetgens, R., Dubel, S.J., Snutch, T.P. y Zamponi, G.W. (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 6195 – 6202.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E Sakmann, B. y Sigworth, E.F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and

cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* **391**: 85 - 100.

Hein, L. (2006) Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell and Tissue Research* **326**: 541 – 551

Herlitze, S., Zhong, H., Scheuer, T. y Catterall (2001) Allosteric modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C, and Ca<sub>v</sub>β subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4699 - 4704

Herlitze, S., García, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., y Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein βγ subunits. *Nature (London)* **380**: 258 - 262

Hille, B. (2001) Ion channels of excitable membranes. 3<sup>rd</sup> ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates

Hille, B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends in Neurosciences* **17**: 531 - 536

Holz, G.G.I., Rane, S.G. y Dunlap, K. (1986). GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage- dependent calcium channels. *Nature (London)* **319**: 670 – 672

Hsu, S.L., Chou, Y.H., Yin, S.C., Liu, J.Y. (1998) Differential effects of phorbol ester on growth and protein kinase C isoenzyme regulation in human hepatoma Hep3B cells. *Biochemical Journal* **333**: 57 - 64

Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein βγ subunits. *Nature (London)* **380**: 255 - 258

Ikeda, S.R. (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *Journal of Physiology (London)* **409**: 181 – 214

Ikeda, S.R. y Jeong, S.-W. (2004) Use of RGS-insensitive G subunits to study endogenous RGS protein action on G-protein modulation of N-type Calcium channels in sympathetic neurons. *Methods in Enzimology* **389**: 170 - 189



Juránek, I. y Bezek, Š. (2005) Controversy of Free Radical Hypothesis: Reactive Oxygen Species – Cause or Consequence of Tissue Injury? *General Physiology and Biophysics* **24**: 263 — 278

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds.) (2001) Principios de Neurociencia. 4ª Ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana

Kaneko, S., Akaike, A., y Satoh, M. (1999) Receptor-mediated modulation of voltaje-dependence  $Ca^{2+}$  channels via heterotrimeric G-proteins in neurons. *Japanese Journal of Pharmacology* **81**: 324 - 331

Katz, B., y Miledi, R. (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *Journal of Physiology (London)* **192**: 407 – 436

Knaus, A.E., Muthig, V., Schickinger, S., Moura, E., Beetz, N., Gilsbach, R. y Hein, L. (2007)  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes—Unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochemistry International* **51**: 277–281

Ledo, F., Kremer, L., Mellström B. y Naranjo, J.R. (2002)  $Ca^{2+}$ -dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **21**: 4583 - 4592

Lefkowitz, R.J. (2004) Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**: 413 - 422

Li, W., Liopis, J., Whitney, M., Xlokarnik, G. y Tsien, R.Y. (1998) Cell-permeant caged  $InsP_3$  ester shows that  $Ca^{2+}$  spike frequency can optimize gene expression. *Nature* **392**: 936 – 941.

Llinas, R., y Nicholson, C. (1975) Calcium role in depolarization-secretion coupling: An aequorin study in squid giant synapse *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 187 - 190

Llinas, R., Steinberg, I.Z., y Walton, K. (1976) Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: Voltage clamp study in squid giant synapse and

theoretical model for the calcium gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 2918 - 2922

Llinás, R.R. (1977) Depolarization-release coupling systems in neurons. *Neurosciences Research Program Bulletin* **15**: 655 – 687

Luetjens, C. M., Bui, N. T., Sengpiel, B., Munstermann, G., Poppe, M., Krohn, A. J., Bauerbach, E., Krieglstein, J. y Prehn, J. H. (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *Journal of Neuroscience* **20**: 5715 - 5723

Makowske, M. y Rosen, O.M. (1989) Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 16155 - 16159

Marchetti, C., Carbone, E. y Lux, H.D. (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* **406**: 104 - 111

Mathews, C.K., van Holde, K.E. y Ahern, K.G. (2002) Bioquímica. 3ª ed. Madrid: Pearson Educación, S.A.

McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W. y Yoshikami, D. (1987)  $\omega$ -Conotoxin: Direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 4327 - 4331

Neher, E. (1998) Vesicle pools and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**: 389 – 399

Nicholls, D.G. (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current Molecular Medicine* **4**: 149 - 177

Nowycky, M.C., Fox, A.P. y Tsien, R.W. (1985) Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 2178 - 2182

Pardo Merino, A. y Ruíz Díaz, M.A. (2002) SPSS 11. Guía para el análisis de datos. México: McGraw-Hill/Interamericana de España

Patil, P.G., de Leon, M., Reed, R.R., Dubel, S., Snutch, T.P., Yue, D.T. (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophysical Journal*. **71**: 2509 - 2521.

Peloquin, J.B., Khosravani, H., Barr, W., Bladen, C. Evans, R. Mezeyova, J., Parker, D., Snutch, T.P., McRory, J.E. y Zamponi, G.W. (2006) Functional analysis of Cav3.2 T-type calcium channel mutations linked to childhood absence epilepsy. *Epilepsia*, **47**: 655 – 658

Post, S.R., Hammond, H.K., e Insel, P.A. (1999)  $\beta$ -adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**: 343 – 360

Reid, C.A., Dixon, D.B., Takahashi, M., Bliss, T.V., y Fine, A. (2004) Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses. *Journal of Neuroscience* **24**: 3618 – 3626

Ruiz-Velasco, V. e Ikeda, S.R. (2000) Multiple G-protein  $\beta\gamma$  combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience* **20**: 2183 - 2191

Saunders, C.M. *et al.* (2002) PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**: 3533 – 3544

Savignac, M., Mellström, B. y Naranjo, J.R. (2007) Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* **454**: 523 – 533

Schwartz, D.D. (1997) Activation of alpha-2 adrenergic receptors inhibits norepinephrine release by a pertussis toxin-insensitive pathway independent of changes in cytosolic calcium in cultured rat sympathetic neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **282**, 248 - 255

Scott, R.H. y Dolphin, A.C. (1986). Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-baclofen-mediated inhibition. *Neuroscience Letters* **69**: 59 – 64.

Shapiro, M.S., Zhou, J., Hille, B. (1996) Selective disruption by protein kinases of G-protein mediated Ca<sup>2+</sup> channel modulation. *Journal of Neurophysiology* **76**: 311 - 320

Smith, C.U.M. (2002) Elements of molecular neurobiology. John Wiley & Sons, Ltd.

Spedding, M., Bonner, T.I. y Watson, S.P. (2002) International Union of Pharmacology. XXXI. Recommendations for the nomenclature of multimeric G protein-coupled receptors. *Pharmacological Reviews* **54**: 231 – 232

Sprang, S.R. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 639 – 678

Starke, K. (2001) Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Journal of Neurochemistry* **78**: 685 – 693

Stea, A., Soong, T.W. y Snutch, T.P. (1995) Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* **15**: 929 – 940.

Stephens, G.J. y Mochida, S. (2005) G protein  $\beta\gamma$  subunits mediate presynaptic inhibition of transmitter release from rat superior cervical ganglion neurones in culture. *Journal of Physiology (London)* **563**: 765 – 776

Swain, J.F. y Gierash, L.M. (2006) The changing landscape of protein allostery. *Current Opinion in Structural Biology* **16**: 102 - 108

Swartz, K.J. (1993) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: Disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* **11**: 305 - 320

Tedford, H.W. y Zamponi, G.W. (2006) Direct G protein modulation of Ca<sub>v</sub>2 Calcium channels. *Pharmacological Reviews* **58**: 837 – 862

Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V. y Adelman, J.P. (1998) Calcium-activated potassium channels. *Current Opinion in Neurobiology* **8**: 321 - 329

Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, J.A., Guzman, J.N., Galarraga, E., Surmeier, D.J. and Bargas, J. (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *Journal of Physiology* **553**: 169 – 182

Vidovic, M., Cohen, D. y Hill, C.E. (1994) Identification of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor gene expression in sympathetic neurons using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Brain Research, Molecular Brain Research* **22**, 49 - 56.

West, R.E., Jr., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T., y Liu, T.Y. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP- ribosylation of transducin. *The Journal of Biological Chemistry* **260**: 14428 - 14430

Wisgirda, M.E. y Dryer, S.E. (1994) Functional dependence of  $\text{Ca}^{2+}$ - activated  $\text{K}^+$  current on L- and N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: differences between chicken sympathetic and parasympathetic neurons suggest different regulatory mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 2858 – 2862

Won, S. J., Kim, D.Y., y Gwag, B.J. (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 67-86

Zhu, Y. e Ikeda, S.R. (1994) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons. *Journal of Neurophysiology* **72**: 1549 - 1560

Zong, X. y Lux, H.D. (1994) Augmentation of Calcium channel currents in response to G protein activation by  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  in chick sensory neurons. *The Journal of Neuroscience* **14**: 4847 - 4853

## VIII. TRABAJO PUBLICADO

Los resultados de investigación de esta tesis se encuentran en:

Díaz-Cárdenas, A.F., Arenas, I. y García, D.E. (2008) PMA counteracts G protein actions on Ca<sub>v</sub>2.2 channels in rat sympathetic neurons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**: 1 – 7

El documento está disponible en la internet y para acceder a él vaya a la siguiente dirección:

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.030>

Al resumen se puede acceder en:

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WB5-4RX0754-1&\\_user=10&\\_coverDate=05%2F01%2F2008&\\_alid=907631182&\\_rdoc=4&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_cdi=6701&\\_sort=d&\\_docanchor=&\\_view=c&\\_ct=27&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&\\_md5=11358c753ec1201205363281840f468e](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WB5-4RX0754-1&_user=10&_coverDate=05%2F01%2F2008&_alid=907631182&_rdoc=4&_fmt=high&_orig=search&_cdi=6701&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_ct=27&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&_md5=11358c753ec1201205363281840f468e)