



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“COMPORTAMIENTO POBLACIONAL
DEPENDIENTE DEL TIEMPO DE LOS CANALES DE
CALCIO $Ca_v2.2$ MODULADOS POR PROTEÍNAS G
EN NEURONAS SIMPÁTICAS DE RATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ARTURO REYES VACA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ**

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de dato del jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno: Reyes Apellido materno: Vaca Nombre: Arturo Teléfono: 56-23-22-66 Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad: Ciencias Carrera: Biología No. de cuenta: 405028432</p>
<p>2. Datos del tutor Grado: Doctor Nombres: David Erasmo Apellido paterno: García Apellido materno: Díaz</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado: Doctor Nombres: Juan Carlos Apellido paterno: Gómora Apellido materno: Martínez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado: Maestra en Investigación Biomédica Básica Nombres: Alette Apellido paterno: Ortega Apellido materno: Gómez</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado: Bióloga Nombres: María Isabel Apellido paterno: Arenas Apellido materno: Reyes</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado: Bióloga Nombres: Erika Apellido paterno: Puente Apellido materno: Guzmán</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Título: Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio Cav2.2 modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata No. de páginas: 67 p. Año: 2010</p>

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. Por tal motivo, deseo expresarle mis más sinceros agradecimientos por su apoyo y disposición en la realización del mismo.

A la bióloga Isabel Arenas Reyes, por su apoyo y colaboración en el desarrollo de los experimentos practicados para poder sustentar el presente trabajo.

Quisiera también agradecer a mis sinodales de tesis, Biól. Erika Puente Guzmán, nuevamente a la Biól. Isabel Arenas Reyes, IBB. Alette Ortega Gómez y al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez. Muchas gracias por sus comentarios y sugerencias.

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).

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIA

A mis padres:

Francisco y María de Jesús. Quienes forjaron en mí el valor más grande que puede existir, el amor.

A mis hermanos:

Roberto, Francisco, Miguel, Mario, Soledad, Guadalupe y Andrea. Porque día con día salgamos adelante, apoyándonos unos a otros.

Porque esto, apenas empieza.

A mis tíos:

Roberto, Chenta, Alicia, Lupe, María, Paula, Rey y Chava. Por su apoyo incondicional que me han brindado día con día.

A mis amigos:

Amelia, Yessica, Alma, Alejandro, Pato, Cris, Ale, Humberto, Vilma, Moisés, Erika, Liz e Isabel.

Muchísimas gracias a todos, por estar tanto en los momentos buenos como malos.

"All religions, arts and sciences are directed toward
ennobling man's life, lifting it from the sphere of mere
physical existence and leading the individual toward
freedom."

Albert Einstein

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIA.....	3
I. RESUMEN.....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	8
III. ANTECEDENTES.....	16
3.1. Modulación por proteínas G.....	16
3.2. El modelo dispuesto-reluctante y estudios sobre la conversión entre ambos modos funcionales.....	24
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
V. PROBLEMA CENTRAL.....	33
VI. HIPÓTESIS.....	34
VII. OBJETIVOS.....	35
7.1. Objetivo general.....	35
7.2. Objetivos particulares.....	35
VIII. METODOLOGÍA.....	36
8.1. Cultivo celular.....	36
8.2. Registro electrofisiológico.....	38
8.3. Soluciones de registro.....	39
8.3.1. Solución externa.....	39
8.3.2 Solución interna.....	40
8.3.3. Solución de sello.....	40
8.4. Análisis de los datos.....	41

**Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio Ca_v2.2
modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata**

IX. RESULTADOS.....	43
9.1 Efecto del GTPγS sobre la corriente de los canales CaV2.2 en neuronas del ganglio cervical superior.....	43
9.2. Separación de las poblaciones dispuesta y reluctante mediante curvas de activación en neuronas simpáticas de rata.....	48
9.3. Curvas de conductancia de la población dispuesta y reluctante en el tiempo.....	55
X. DISCUSIÓN.....	56
10.1. La activación de las proteínas G preserva la apertura de los canales CaV2.2 en modo reluctante.....	56
10.2. La activación de las proteínas G preservan la conductancia de los CaV2.2 en estado activo.....	59
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXO.....	67

I. RESUMEN

Se ha propuesto que las proteínas G modulan a los canales $Ca_v2.2$, desplazando la población de un modo dispuesto a un modo relucante. A pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado con respecto a la modulación, poco se sabe acerca del comportamiento poblacional, en el tiempo, del modo relucante. En el presente trabajo se investigó si la población relucante es la causante de preservar la magnitud de la I_{Ba} en los trazos registrados de las neuronas dializadas con GTP γ S.

Por medio de curvas de activación ajustadas a una función de Boltzmann doble, se separaron las poblaciones dispuesta y relucante, presentes en la I_{Ba} de las neuronas simpáticas de rata; estudiando y comparando los parámetros biofísicos en el tiempo. Por otra parte, se determinó el cambio en la conductancia, tanto en neuronas dializadas con GTP γ S, como en neuronas control.

Los resultados muestran que en la población dispuesta disminuyó la corriente y la conductancia, mientras que en la población relucante el valor de la pendiente decreció en el tiempo.

De lo anterior, se concluye que las propiedades biofísicas en cada una de las poblaciones son distintas, ya que en el tiempo la población relucante se mantiene activa, mientras que la población dispuesta disminuye.

II. INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática es una barrera física que diferencia el medio intracelular del extracelular. Ésta barrera es una bicapa que está formada principalmente por fosfolípidos, con el grupo fosfato orientado hacia la cara externa de la bicapa (medio hidrofílico) y con las colas orientadas hacia la parte interna de la membrana (medio hidrofóbico). En la membrana plasmática se encuentran embebidas las moléculas que pertenecen a dos de los mecanismos básicos de transporte iónico, denominados transportadores y canales iónicos. Los transportadores consumen energía metabólica para transportar iones en contra del gradiente electroquímico (transporte activo), mientras que los canales iónicos son proteínas que forman poros en la membrana, transportando iones a favor de este gradiente (transporte pasivo) (Alberts *et al.*, 2000; Hille, 2001).

La apertura de los canales iónicos puede favorecerse tanto por la unión de un ligando directo al canal o por cambios en el voltaje de la membrana, con base en esto se clasifican como canales activados por ligando y canales sensibles a voltaje, respectivamente. Dentro de los canales sensibles a voltajes se encuentra la familia de los canales de calcio sensible a voltaje. Estos canales son el medio principal de entrada de calcio. El calcio participa en varios procesos celulares ya sea como segundo mensajero o bien despolarizando la membrana (Lacinova, 2005).

Con base en estudios electrofisiológicos, los canales de calcio sensibles a voltaje han sido clasificados en dos grandes grupos: los canales de alto umbral de

activación (HVA) y los canales de bajo umbral de activación (LVA). A su vez, los canales de calcio activados por alto umbral se dividen en dos grandes familias, que han sido diferenciados farmacológicamente con base en su sensibilidad a las dihidropiridinas (DHPs) correspondientes a la familia Ca_v1 (canales de calcio tipo L), mientras que aquellos que no son sensibles a este fármaco son clasificados dentro de la familia Ca_v2 (canales de calcio tipo $Ca_v2.2$, P/Q y R). Los canales de calcio activados a bajo umbral pertenecen a la familia Ca_v3 (canales de calcio tipo T) (Elmslie, 2003), Figura 1.

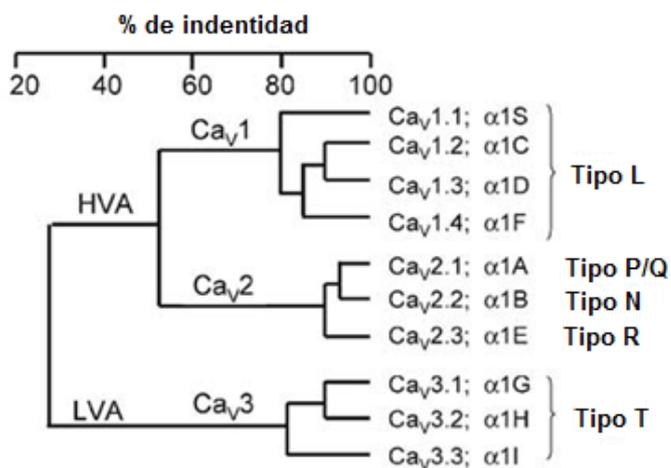


Fig. 1. Clasificación de los canales de calcio sensibles a voltaje

En el dendrograma se muestra el índice de similitud entre las dos grandes familias de canales sensibles a voltaje, los canales de alto umbral de activación (HVA) y los canales de bajo umbral de activación (LVA). En la familia de los HVA se agrupan los canales tipo L, P/Q, N y R, mientras que en la familia de los LVA solo se encuentran los canales tipo T (Dolphin, 2006).

Los canales de calcio sensibles a voltaje son regulados por neurotransmisores y hormonas, alterando la apertura y el cierre del poro y por ende las funciones celulares. Hasta hoy sabemos que, de las tres grandes familias de canales de calcio sensibles a voltaje sólo la familia Ca_v2 es inhibida por neurotransmisores y algunos tipos de hormonas. Dentro de esta familia se han destacado los canales de $Ca_v2.2$ por presentar el mayor grado de regulación (Elmslie, 2003).

Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio $Ca_v2.2$ modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata

Los canales de calcio sensibles a voltaje tipo N, también conocido como $Ca_v2.2$, se expresan en diferentes tipos de neuronas, entre éstas las neuronas simpáticas, ubicándose principalmente en las terminales sinápticas donde modulan la liberación de neurotransmisores. Estos canales son bloqueados por la ω -conotóxina GVIA (extraída del caracol *Conus geographus*) y son resistentes a las DHPs, se activan a un voltaje de -40 mV y presentan una corriente máxima a -10 mV de -20 pA/pF en 2 mM de Ba^{2+} (García-Ferreiro *et al.*, 2001) y una conductancia de 50 nS (Díaz-Cárdenas *et al.*, 2008) en neuronas simpáticas de rata.

Los $Ca_v2.2$ están constituidos molecularmente por tres subunidades, las subunidades α , β y $\alpha_2\delta$. La subunidad α de los canales $Ca_v2.2$ es la formadora de poro, siendo la subunidad más grande y por la cual cruzan los iones de calcio la membrana plasmática, ésta consta de cuatro dominios homólogos unidos mediante asas citoplasmáticas enumerados del I al IV, cada dominio a la vez se forma de seis segmentos transmembranales los cuales se enumeran del S1 al S6, siendo el S4 uno de los segmentos más importantes pues es donde se ubica el sensor de voltaje. La subunidad β es citoplasmática mientras que la subunidad $\alpha_2\delta$ es casi extracelular. Pues la subunidad δ está anclada a la membrana plasmática, unida a ésta se encuentra la subunidad α_2 que es extracelular, Figura 2 (Dolphin, 2006).

En la célula existen diversos mecanismos de modulación sensibles a voltaje, uno de los más importantes y presente en varios tipos de neuronas es la inhibición sensible a voltaje por proteínas G. Este tipo de modulación predomina en la

inhibición de la corriente de Ca^{2+} que se observa en las terminales sinápticas (Hille, 1994) y está presente en neuronas simpáticas de rata (García-Ferreiro *et al.*, 2001).

Las proteínas G son proteínas heterotrómicas, compuestas de tres subunidades alfa (G_α), beta (G_β) y gamma (G_γ), unidas a receptores de membrana de siete segmentos transmembranales, los cuales son conocidos como receptores de proteínas G (Alberts *et al.*, 2000). Si las subunidades de la proteína G permanecen unidas a un receptor (no activado por algún agonista) entonces la subunidad G_α de la proteína G tiene unida una molécula de GDP; a este estado de la proteína G se le denomina inactivo. En caso contrario, cuando un agonista activa al receptor se produce un cambio conformacional, originando que la proteína G se disocie en dos partes, la subunidad alfa (G_α) y el dímero beta-gamma ($G_{\beta\gamma}$); a la subunidad G_α se le une una molécula de GTP, a este estado se le denomina forma activa, Figura 2 (Tedford *et al.*, 2006).

El dímero $G_{\beta\gamma}$ está unido a la membrana y posiblemente es capaz de unirse directamente a la subunidad alfa de los canales de calcio $\text{Ca}_v2.2$, mimetizando la clásica modulación sensible a voltaje llevada a cabo por proteínas G por medio de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Herlitz *et al.*, 1996).

Al modo funcional del canal $\text{Ca}_v2.2$ que se produce por la unión del dímero $G_{\beta\gamma}$ se le denomina modo reluctante, mientras que en ausencia de este se denomina modo dispuesto. En modo dispuesto los canales se abren con pulsos despolarizantes débiles o moderados, mientras que en modo reluctante abren a pulsos fuertemente despolarizantes (Bean, 1989).

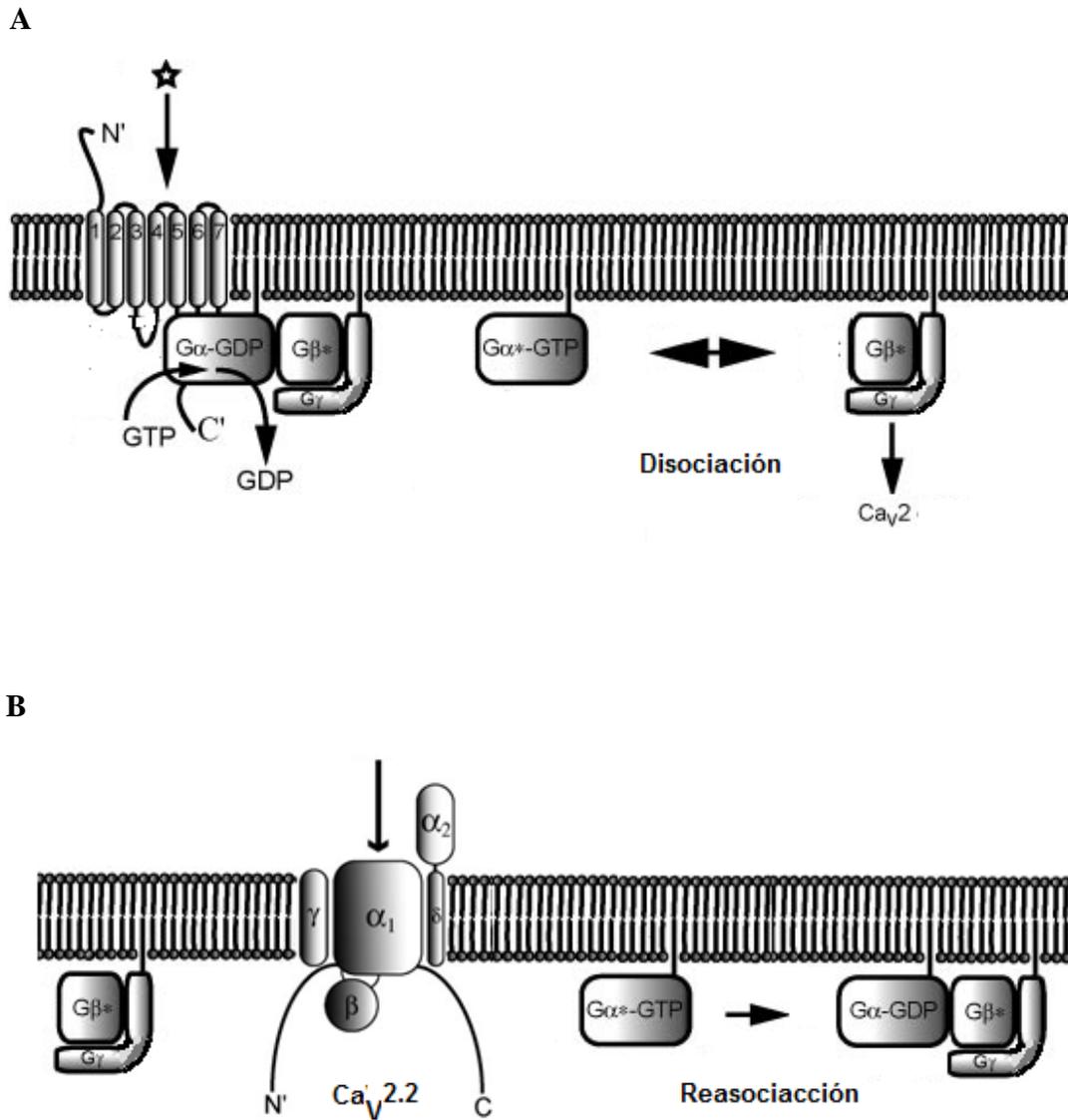


Fig. 2. Modulación de la subfamilia Ca_v2 por proteínas G

En A se esquematiza la activación del receptor unido a la proteína G. El agonista (estrella) provoca un cambio conformacional en el receptor, que disocia a la proteína G en la subunidad G_α (intercambiando la molécula de GDP por GTP) y el dímero $G_{\beta\gamma}$. En B, el dímero $G_{\beta\gamma}$ modula a la subunidad α de los canales de $Ca_v2.2$, posteriormente se observa la inactivación de la proteína, la cual se lleva a cabo por hidrólisis de la molécula de GTP a GDP, debido a la propiedad de GTPasa de la subunidad G_α , lo cual ocasiona una reasociación de la subunidad G_α y el dímero $G_{\beta\gamma}$ (Figura modificada a partir de Tedford *et al.*, 2006 y Dolphin, 2006).

La modulación sensible a voltaje llevada a cabo por proteínas G, presenta tres características fundamentales:

- 1) La corriente disminuye en la presencia de un agonista, tales como neurotransmisores, hormonas, algunos péptidos y otro tipo de moléculas como el GTPγS. Bajo este efecto, se observa una activación más lenta de la corriente conocido como enlentecimiento cinético, Figura 3.

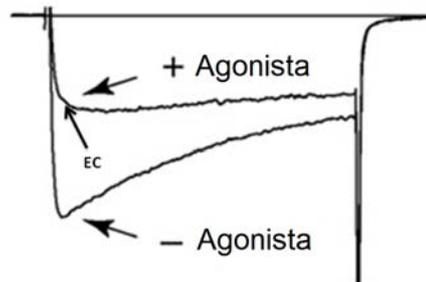


Fig. 3. Efecto del agonista sobre la corriente de calcio de los canales $Ca_v2.2$

En presencia del agonista se observan dos de las características clásicas de la modulación sensible a voltaje por proteínas G. Por un lado, la disminución en la amplitud de la corriente y por el otro, una lenta activación conocida como enlentecimiento cinético (EC). Asimismo, en ausencia del agonista se observa una rápida activación y un decaimiento de la corriente en el tiempo (Tedford *et al.*, 2006)

- 2) El efecto de la inhibición es temporalmente revertido mediante un prepulso fuertemente despolarizante que puede ir desde un rango de +70 hasta +125 mV, Figura 4 (Elmslie *et al.*, 1990), Díaz-Cárdenas *et al.*, 2008)
- 3) Hay un desplazamiento de las curvas de activación hacia voltajes más despolarizantes, sin cambio en el número de canales funcionales (Bean, 1889), Figura 5.

Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio $Ca_v2.2$ modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata

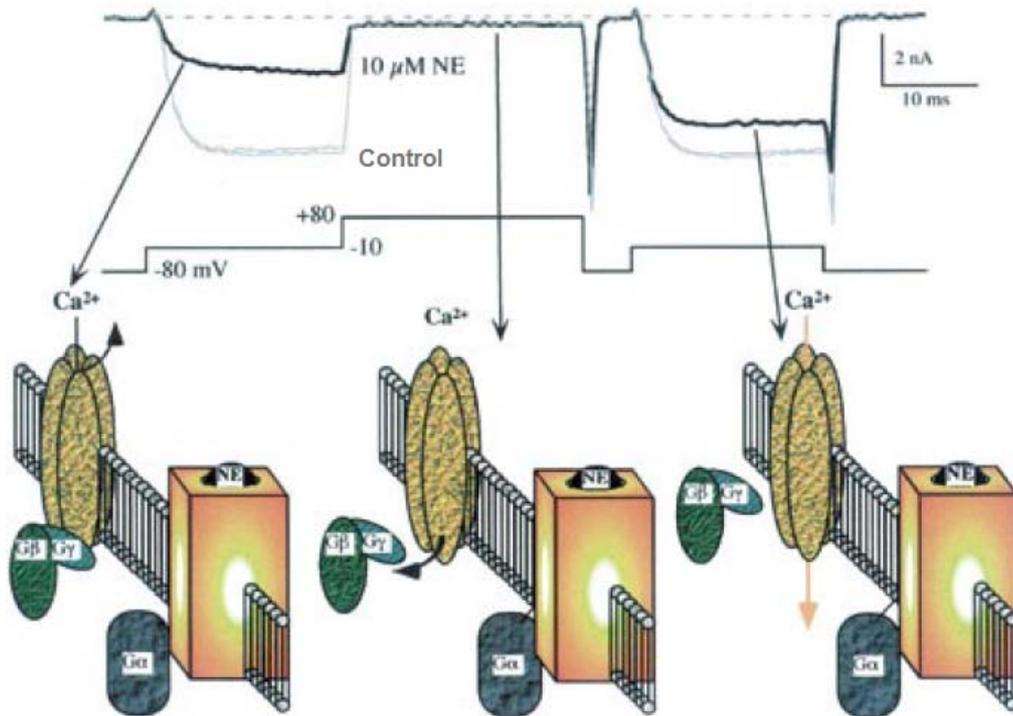


Fig. 4. Grado de inhibición de las proteínas G

El esquema representa los sucesos moleculares entre la subunidad $G_{\beta\gamma}$ y el canal $Ca_v2.2$ (parte inferior de la Figura) en relación con la corriente generada a partir del protocolo de doble pulso (parte superior de la Figura). En el trazo de color negro se observa la corriente registrada en presencia de Norepinefrina (NE), mientras que en el trazo gris se representa la corriente sin NE. La corriente es menor en el prepulso debido a la modulación por proteínas G y esta aumenta en el postpulso debido a la liberación de las mismas por un pulso fuertemente despolarizante (+80 mV) (Elmslie, 2003).

Una descripción cuantitativa de la modulación sensible a voltaje por proteínas G, lo constituye el modelo dispuesto-reluctante.

La importancia de estudiar los canales $Ca_v2.2$ sensibles a voltaje es debido a que están en todo el sistema nervioso. Son la entrada principal de calcio en varios tipos neuronales, sobre todo participan en la liberación de neurotransmisores pues predominan en las terminales sinápticas, son modulados por varios tipos de neurotransmisores y otros ligandos entre ellos opiodes y cannabinoides.

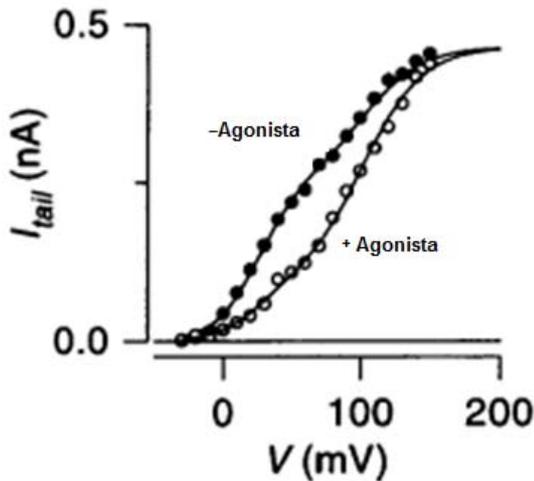


Fig. 5. Desplazamiento de la curva de activación

En presencia de un agonista la curva de activación se desplaza hacia voltajes más despolarizantes con respecto a la curva sin agonista (Figura modificada de Patil *et al.*, 1996).

El mecanismo de modulación que opera sobre los canales $Ca_v2.2$ posiblemente se extiende a otro tipo de canales de calcio y potasio, como los canales de potasio sensible a muscarina. De esta forma, los estudios de la estructura-función de los canales iónicos, en conjunción con los estudios biofísicos, constituyen una herramienta de investigación capaz de generar información relevante en la elucidación de mecanismos fundamentales y en el diseño de nuevos fármacos de nuevos agentes de alta selectividad (Aglar *et al.*, 2003). Por ello, entender el mecanismo de modulación por proteínas G sobre este tipo de canales es fundamental para comprender la comunicación neuronal y la participación en los eventos celulares, así como también los mecanismos bajo los cuales operan estos dos modos poblacionales.

III. ANTECEDENTES

3.1. Modulación por proteínas G

Dunlap *et al.* (1978) publicaron la primera evidencia de la modulación sensible al voltaje por neurotransmisores de los canales de calcio. En este trabajo se determinó que algunos neurotransmisores decremantan el componente de calcio durante el potencial de acción (PA). Posteriormente, ellos mismos reportaron que dichos neurotransmisores (norepinefrina (NE), ácido γ -aminobutírico (GABA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y algunos otros péptidos) decremantan la corriente entrante de los canales de calcio sensibles a voltaje en cultivos de neuronas sensoriales de pollo (Dunlap *et al.*, 1981), Figura 6.

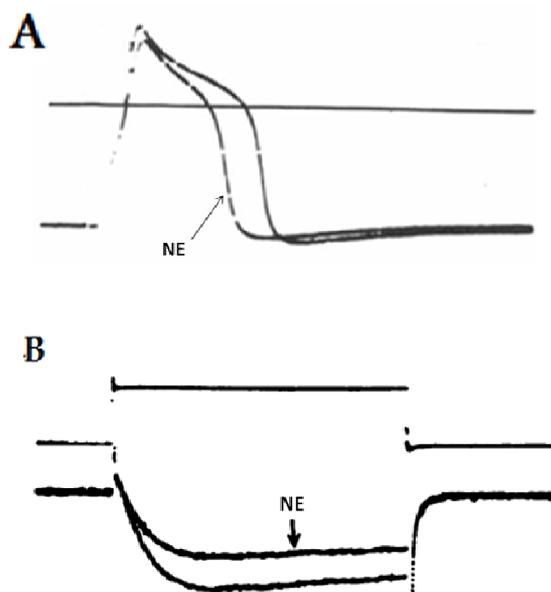


Fig. 6. Primera evidencia sobre la modulación de los canales de calcio sensibles a voltaje por neurotransmisores

En A se observa que la NE (100 μ M) decremantan la duración del PA durante 10 s. En B se muestra una reducción de la corriente de calcio en presencia de NE registrada a +10 mV durante 50 ms por medio de la técnica de parche de membrana (Dunlap *et al.*, 1981).

En este mismo año, McAfee *et al.*, (1981) demostraron mediante la técnica de microelectrodos intracelulares que la NE alteraba los potenciales de acción, disminuyendo la conductancia de los canales de calcio sensibles a voltaje en neuronas simpáticas de rata. Esta investigación permitió un nuevo modelo experimental que posteriormente generaría aportaciones de gran interés sobre la modulación por proteínas G en canales de calcio sensibles a voltaje.

Más tarde, en estudios realizados en neuronas sensoriales de pollo, se identificaron tres nuevos tipos de canales de calcio, denominados tipo N, L y T (Nowycky *et al.*, 1985). Con base en las propiedades electrofisiológicas Marchetti *et al.* (1986) clasificaron a éstos canales en dos grandes grupos: HVA y LVA. Los canales tipo HVA estaban conformados por los canales tipo N y L, mientras que los canales tipo LVA, solo presentaban a los tipo T. Esto le permitió en estudios posteriores investigar sobre el efecto de la dopamina (DA) y NE en ambos grupos de canales. En dichos estudios demostraron que había un decremento en la corriente de calcio (I_{Ca}) entrante en presencia de los neurotransmisores en neuronas del ganglio simpático de pollo. Este decremento de la corriente solo afectaba la conductancia de la membrana durante los primeros 10 ms, modulando la permeabilidad de los canales de calcio sensibles a voltaje. De esta forma delimitaron la modulación solo a los canales de calcio tipo HVA en neuronas simpáticas, y por primera vez se reportó un decaimiento enlentecido en la activación de la I_{Ca} , Figura 7.

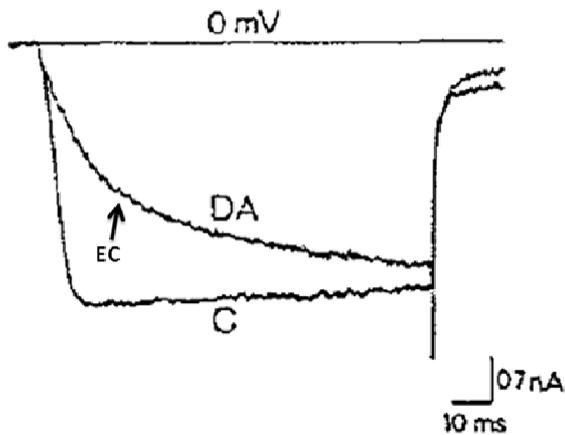


Fig. 7. Inhibición y decaimiento enlentecido en la activación de la corriente de calcio (I_{Ca})

Efecto de la DA (10 μ M) sobre la I_{Ca} registrada a 0 mV. C representa el trazo de la I_{Ca} de la célula control y DA el trazo de la I_{Ca} perfundida con dicho neurotransmisor. La diferencia entre C y DA, radica en que en esta última se presenta un enlentecimiento cinético (EC) y una disminución en la amplitud de la I_{Ca} (Marchetti *et al.*, 1986).

Las modulación por proteínas G empezó a ser una cuestión de gran importancia para muchos investigadores, debido a que estaba involucrada en varios procesos celulares dependientes de calcio, tal como la exocitosis. Hasta ese entonces se sabía que había ciertos neurotransmisores que al actuar sobre receptores específicos, reducían el componente del potencial de acción dependiente de los canales de calcio sensible a voltaje.

Holz *et al.* (1986) demostraron por primera vez en neuronas simpáticas de pollo, con la ayuda de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa, que las proteínas G estaban involucradas directamente en el decremento de la corriente de los canales de calcio sensibles a voltaje por neurotransmisores.

Aunque en estudios previos ya se declaraba la existencia de los canales $Ca_v2.2$, la separación de esta población de los demás canales de calcio todavía era controversial, puesto que no se conocía un agonista específico que separara a

éstos. Esto fue posible con la utilización de las omegas conotóxicas (ω -conotóxicas). Con ello se estableció una relación entre los canales $Ca_v2.2$ sensibles a voltaje, y la modulación sensible a voltaje causada por proteínas G (Jones *et al.*, 1989).

Uno de los trabajos más importantes sobre la modulación sensible a voltaje de los canales de calcio por proteínas G fue el trabajo de Bean (1989). En éste, se registró la corriente de los canales $Ca_v2.2$ en neuronas del ganglio dorsal de rana toro, estableciendo que este tipo de inhibición estaba caracterizado por cambios en la activación sensible a voltaje inducida por los neurotransmisores; una ruta sensible a voltaje que modifica la corriente entrante a despolarizaciones moderadas o fuertes. Dicha modulación sensible al voltaje se observó fácilmente en las curvas de activación construidas a partir de las colas de corriente obtenidas con diferentes pulsos despolarizantes. Las curvas de activación mostraron ser bifásicas y se ajustaron a una función de Boltzmann doble. Con base en lo anterior, se estableció que los canales pueden existir en dos modos, los cuales están mutuamente en equilibrio. El modo dispuesto predomina en la ausencia de los neurotransmisores y son canales que pueden abrir a despolarizaciones débiles o moderadas, mientras que el modo reluctante corresponde al modo funcional de los canales en presencia de los neurotransmisores, los cuales abren a despolarizaciones muy fuertes.

Bean (1989) no solo estableció la relación entre la sensibilidad al voltaje provocada por los neurotransmisores en los canales $Ca_v2.2$, sino que también mostró que la reducción de la corriente de estos canales no se debía a una

Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio $Ca_v2.2$ modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata

reducción en el número de canales funcionales, sino a un cambio en la activación de estos.

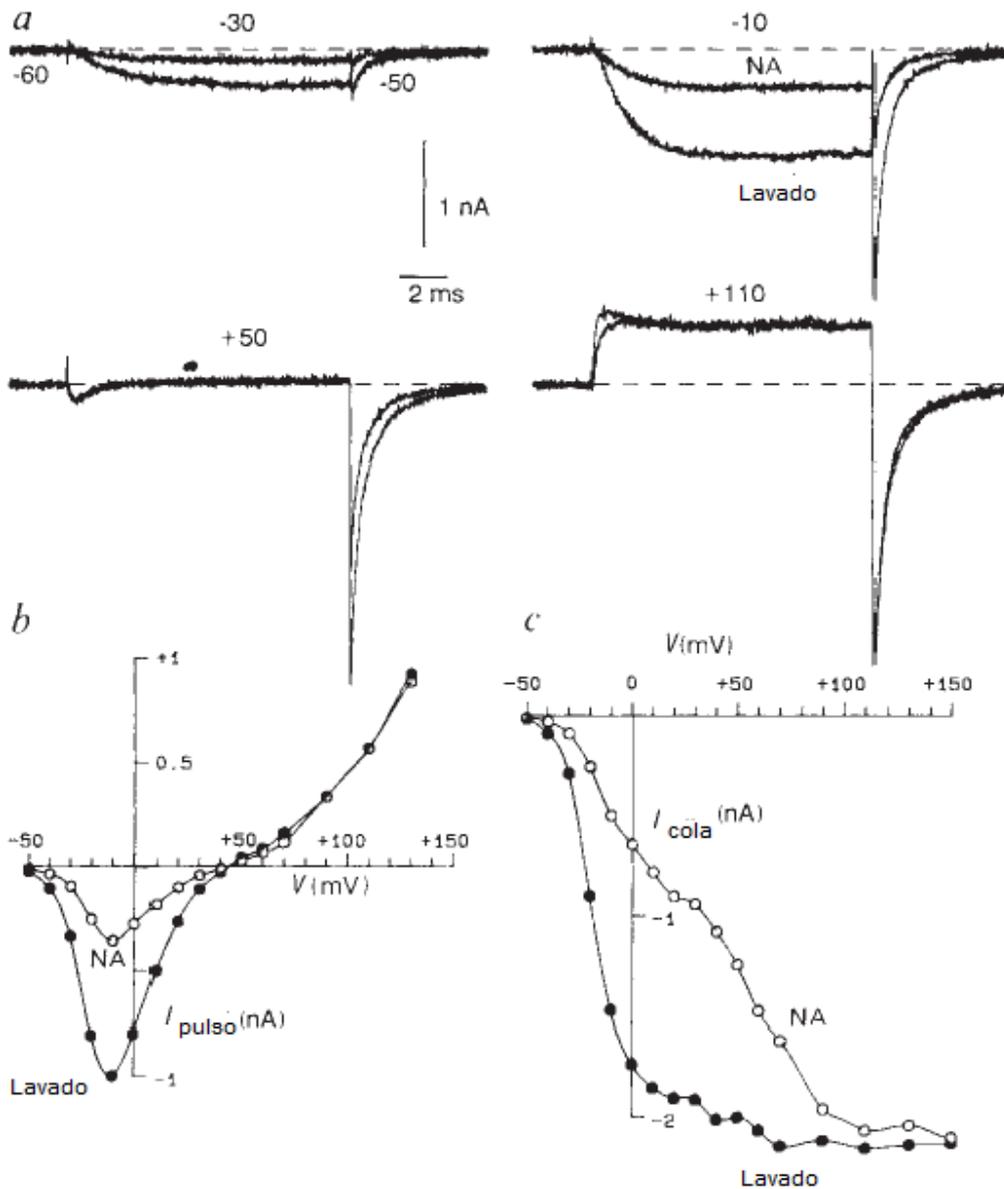


Fig. 8. La NA inhibe la I_{Ca} de los canales $Ca_v2.2$ y desplaza la curva de activación a voltajes más despolarizantes

La inhibición de la I_{Ca} por noradrenalina (NA) ($30 \mu\text{M}$) se puede observar en los incisos a y b. En a se observa la corriente a distintos pulsos de voltaje, mientras que en b se representa como disminuye la amplitud de la curva I-V en presencia de NA. Por otra parte, en el inciso c se muestran las curvas de activación generadas a partir de las colas de corriente con los pulsos de voltaje del inciso a. La curva de activación de la neurona perfundida con NA se desplaza a voltajes más despolarizantes (Bean, 1989).

Una posible explicación sobre la modulación sensible a voltaje por neurotransmisores podría ser que las subunidades de las proteínas G están involucradas directamente con el canal de calcio, uniéndose a la subunidad α del mismo en estado cerrado, ésta pudiera estar interfiriendo con la conformación del canal para alcanzar su nivel de apertura (Bean, 1989).

En este mismo año Lipscombe *et al.* (1989), trabajando en neuronas simpáticas de rana, postularon que el mecanismo sensible a voltaje por proteínas G estaba espacialmente localizado. Con este trabajo se dio la primera noción sobre un mecanismo delimitado a la membrana.

Más tarde Elmslie *et al.* (1990), trabajando con neuronas simpáticas de rana toro, demostraron que el efecto del GTP γ S mimetizaba la modulación sensible a voltaje de los canales Ca_v2.2 por proteínas G y que dicho efecto era revertido temporalmente por un pulso fuertemente despolarizante (+70 mV), el cual sería utilizado más adelante para medir el grado de inhibición sensible a voltaje por proteínas G.

Hasta ese momento se desconocía totalmente el mecanismo molecular por el cual los canales dispuestos se desplazaban al modo reluctante. Elmslie *et al.* (1990) propusieron por primera vez que el modo reluctante correspondía al estado de unión de las proteínas G con el canal y que la facilitación reflejaba la liberación del canal de esta inhibición, Figura 9.

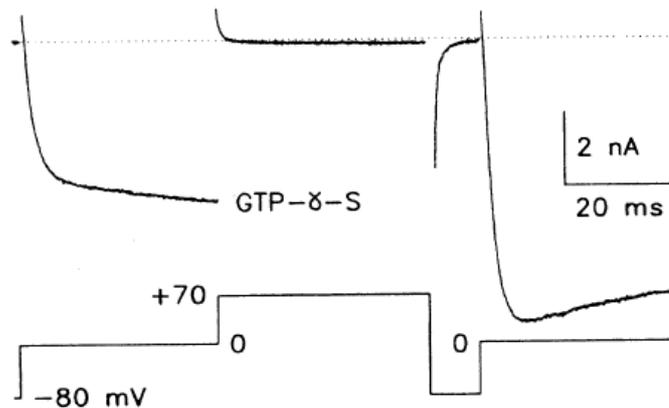


Fig. 9. El GTP γ S mimetiza los efectos de la modulación sensible a voltaje por proteínas G

En la parte inferior de la figura se muestra el protocolo de doble pulso, el cual consiste en tres pulsos de voltaje consecutivos, el prepulso (0 mV), el pulso despolarizante (+70 mV) y el postpulso (0 mV). En la parte superior de la figura se observa el trazo de la I_{Ca} en neuronas dializadas con GTP γ S, la cual se genera a partir de dicho protocolo. Un pulso fuertemente despolarizante a +70 mV libera la modulación de las proteínas G, incrementando la amplitud de la corriente sensible al voltaje en el postpulso (Elmslie *et al.*, 1990).

La unión de las proteínas G con el canal podrían deberse a varios mecanismos de acción directos o indirectos entre el dímero $G_{\beta\gamma}$ y la subunidad G_{α} del canal, de manera que la primera evidencia experimental de la interacción entre éstos se obtuvo con los trabajos realizados por Herlitze *et al.* (1996), mostrando que el dímero $G_{\beta\gamma}$ mimetizaba el efecto sensible a voltaje de la NE, compatible con un mecanismo delimitado a la membrana. Asimismo, mostró que la subunidad G_{α} carecía de dicho efecto.

Por otra parte, los estudios de la corriente unitaria parecían una buena alternativa para poder explicar el cambio entre los modos dispuesto y reluctantante. Patil *et al.* (1996) coexpresaron receptores muscarínicos tipo M2 y el gen de los canales de

calcio que codifica para los canales $Ca_v2.2$ en células HEK293, Figura 10. Mostrando que no había cambios después de la primera apertura, tanto en el cierre como en la apertura del canal durante un pulso despolarizante a +30 mV (Patil *et al.*, 1996), Figura 10.

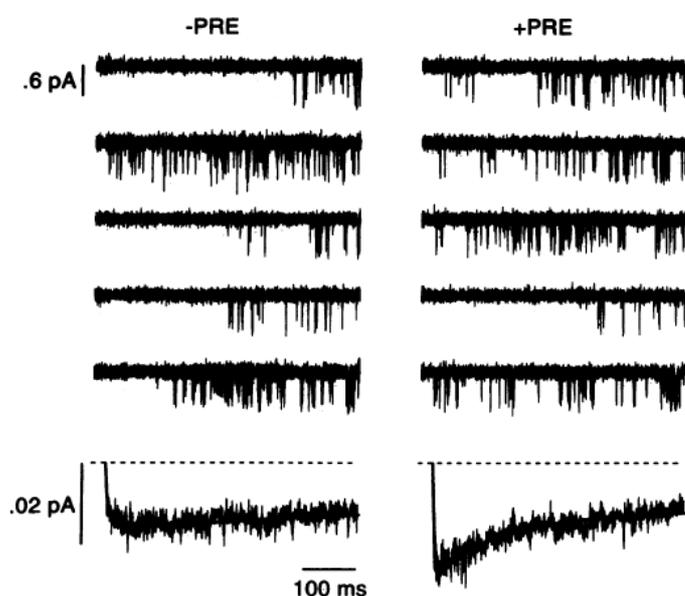


Fig. 10. Cinética de los canales $Ca_v2.2$ en estado abierto

En la parte superior de la figura se observan los registros de los trazos de la I_{Ba} a nivel de canal unitario, en células HEK293 perfundidas con Carbacol (50 μ M); dichos trazos son originados por un protocolo de doble pulso. Mientras que al principio y al final de -PRE no existen cambios en la cinética de los canales, en +PRE si se presentan debido a la aplicación del prepulso. Lo anterior se ve reflejado en la I_{Ba} que se presenta en la parte inferior de la figura, misma que resulta del promedio de la corriente de cada uno de los trazos registrados. (Patil *et al.*, 1996)

Sin embargo, Lee *et al.* (2000) reportaron por primera vez la apertura en modo reluctante de los canales calcio $Ca_v2.2$. Bajo el efecto de la NE en neuronas simpáticas de rana toro, a un pulso despolarizante de 100 ms, observaron dos tipos de cierre y apertura del canal, uno que presenta largos periodos en estado abierto con breves cierres y otro con largos periodos de cierre y aperturas esporádicas. Con base en lo anterior postularon que estos modos correspondían a aperturas en el modo dispuesto y reluctante. A diferencia del trabajo de Patil *et al.*

(1996), en este grupo de investigación observaron que en el tiempo había un cambio del modo reluctantante al modo dispuesto, postulando que los canales podían intercambiarse entre ambos tipos de modos (Lee *et al.*, 2000).

3.2. El modelo dispuesto-reluctante y estudios sobre la conversión entre ambos modos funcionales

Bean (1989), fue el primero en proponer un modelo dispuesto-reluctante para explicar la modulación sensible a voltaje por proteínas G. Este modelo postula la existencia de los canales $Ca_v2.2$ en dos modos, el dispuesto y el reluctantante. La conversión de los canales entre estos dos modos durante pulsos de 10 a 100 ms, explica el curso lento de la activación de la corriente. Este curso lento se debe a una conversión del modo reluctantante al modo dispuesto, en donde la gran mayoría de los canales abren en este último tipo de modo. En éste modelo se postula el intercambio de modos en estados intermedios en la ruta de activación, sin que exista la posibilidad de intercambio entre el estado cerrado en modo dispuesto a reluctantante. Aunque gráficamente no se observa la conversión entre ambos modos en canales abiertos, es una posibilidad a probar experimentalmente, Figura 11.

En estudios realizados más tarde, se consideró a los canales $Ca_v2.2$ como dos poblaciones en equilibrio dinámico. Cada una de éstas con propiedades electrofisiológicas particulares (García-Ferreiro *et al.*, 2001).

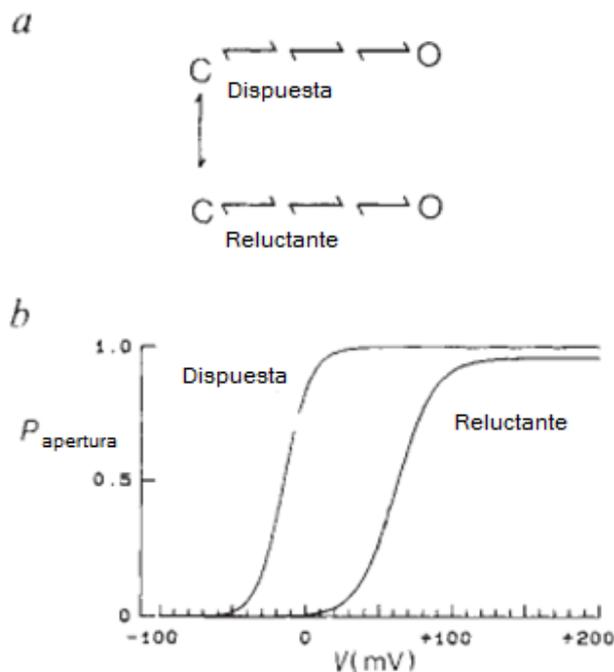


Fig. 11. Modelo propuesto por Bean para explicar la modulación de las proteínas G sensibles a voltaje

En a se muestra el modelo dispuesto-reluctante, el cual establece que los canales pueden existir en dos modos, dispuesto y reluctante. En b se observa que el modo reluctante se activa a despolarizaciones más positivas que el modo dispuesto (Bean, 1989).

Elmslie *et al.* (1990), basándose en el principio de la acción de masas y en los trabajos de Bean (1989), postularon una nueva versión del modelo dispuesto-reluctante. En esta nueva versión se propuso que la unión de las proteínas G convertía al canal de un modo dispuesto a un modo reluctante, y que la conversión entre ambos tipos de modos surgía a partir de la desunión y unión de las proteínas G. En este modelo también se sugiere el intercambio entre el modo dispuesto y reluctante, tanto en estados abiertos como cerrados del canal, proponiendo que los canales en estado reluctante abren lentamente a despolarizaciones fuertes y con un equilibrio que se favorece hacia el estado cerrado reluctante; por ello, los canales reluctantes cierran más rápidamente.

Más tarde Boland *et al.* (1993) basados en el principio de reversibilidad microscópica y la ley de acción de masas, propusieron un modelo alostérico donde

la proteína G se unía entre dos subunidades, asumiendo que esta estabilizaba la conformación entre las dos subunidades, Figura 12.

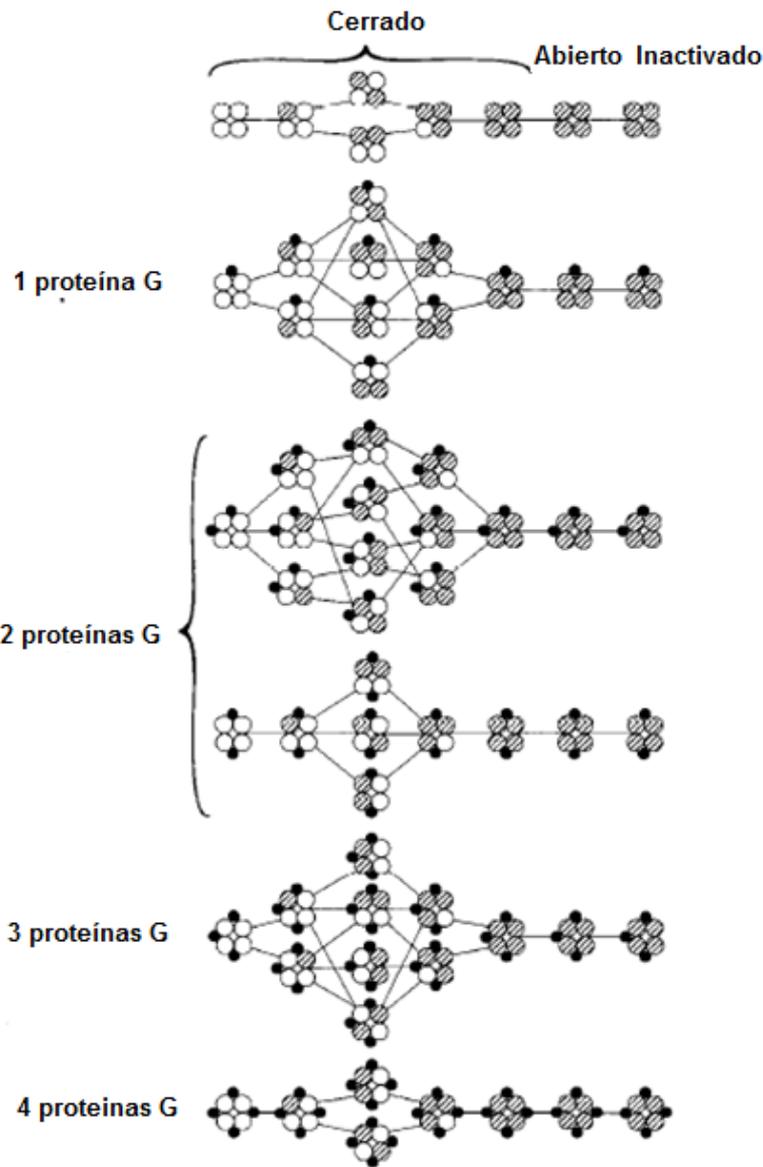


Fig. 12. Modelo alostérico de la modulación sensible a voltaje por proteínas G

Las distintas posibilidades de unión de las proteínas G (círculos negros) al canal de $Ca_v2.2$ para una, dos, tres y cuatro proteínas G son mostradas consecutivamente de arriba hacia abajo en la Figura. La hipótesis sobre la unión de las proteínas G entre las subunidades del canal surge desde estados cerrados profundos e induce cambios conformacionales en dichas subunidades (círculos grises); de tal forma que una vez que las cuatro subunidades son moduladas el canal se abre y posteriormente se inactiva. (Boland *et al.*, 1993).

El principio de reversibilidad microscópica predice que si la unión de las proteínas G induce un desplazamiento en la sensibilidad al voltaje, entonces habría un cambio en la afinidad de la unión de la proteína G, mientras que el principio de la ley de acción de masas predice la unión y desunión de las proteínas G del canal.

En este modelo no solo se puede observar la modulación del canal por proteínas G en distintos subestados en la ruta de activación, sino que también predice la apertura reluctantante y posteriormente su inactivación. Al simular los efectos producidos por la unión de las proteínas G al canal a partir de las colas de corriente observaron que a medida que las proteínas G se unen al canal, las curvas de activación se desplazan hacia voltajes más despolarizantes y la pendiente de la curva se hace más pronunciada (aumenta) (Boland *et al.*, 1993), Figura 13.

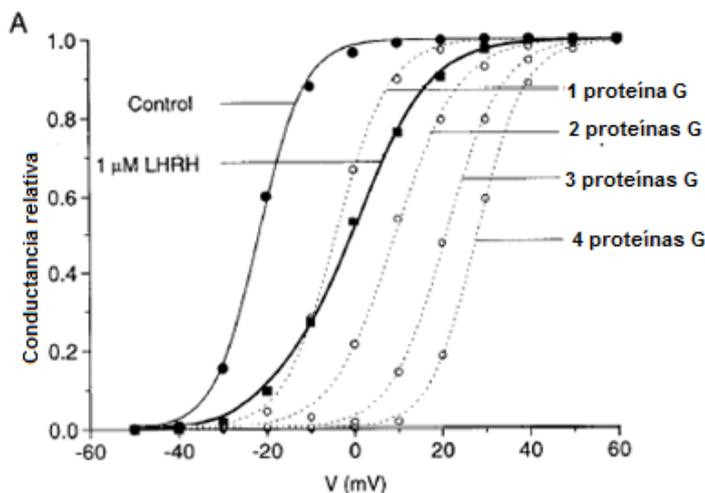


Fig. 13. Simulación de la unión de las proteínas G a los canales Cav2.2

Las curvas de activación fueron construidas a partir de las colas de corrientes generadas a varios pulsos despolarizantes y posteriormente ajustadas a una función de Boltzmann simple. En líneas continuas se representan las curvas de activación registradas tanto en neuronas control como con LHRH, mientras las líneas punteadas representan la simulación de la unión de las proteínas G. En esta última se observa que hay un incremento a voltajes más positivos y una inclinación mayor de la pendiente a medida que se unen las proteínas G (Boland *et al.*, 1993).

Patil *et al.* (1996) clasificaron la modulación de las proteínas G sobre los canales de $Ca_v2.2$ en tres modelos básicos. El primero lo denominó mecanismo de cambio restringido, este modelo predice que los canales empiezan y terminan en el mismo modo durante el pulso de prueba; el segundo como mecanismo de cambio permisivo, este modelo permite una transición entre ambos tipos de modos durante el pulso de prueba y el tercero como de cambio preferencial, este modelo predice un cambio entre ambos tipos de modos y la unión de la proteína G al canal en estados cerrados profundos, después de que el canal ha abierto en un modo reluctantante a dispuesto, la proteína no se puede volver a unir. Este último modelo predice que probablemente la unión de las proteínas G afecta el movimiento de carga del canal, porque las proteínas G atrapan al canal en estados cerrados profundos, quizás el movimiento de carga es atrapado o enlentecido. El modelo de cambio preferencial también predice un comportamiento preferentemente durante despolarizaciones moderadas, mientras que un comportamiento permisivo durante despolarizaciones fuertes. En este modelo también se predice que el estado reluctantante puede inactivar desde estados abiertos.

Otro modelo propuesto recientemente es el de Agler *et al.* (2003). Este modelo supone que la población dispuesta no tiene unida al dímero $G_{\beta\gamma}$ y la apertura de los canales en este modo sucede a despolarizaciones moderadas, a diferencia de la población reluctantante en la cual el dímero $G_{\beta\gamma}$ está unido y la apertura de los canales se da a despolarizaciones fuertes y prolongadas.

La liberación de la inhibición por $G_{\beta\gamma}$ se explica por la afinidad dependiente del estado, donde la $G_{\beta\gamma}$ se asocia fuertemente en estados cerrados profundos,

mientras que la unión es débil o casi no existe en estados abiertos (Agler *et al.*, 2003), Figura 14.

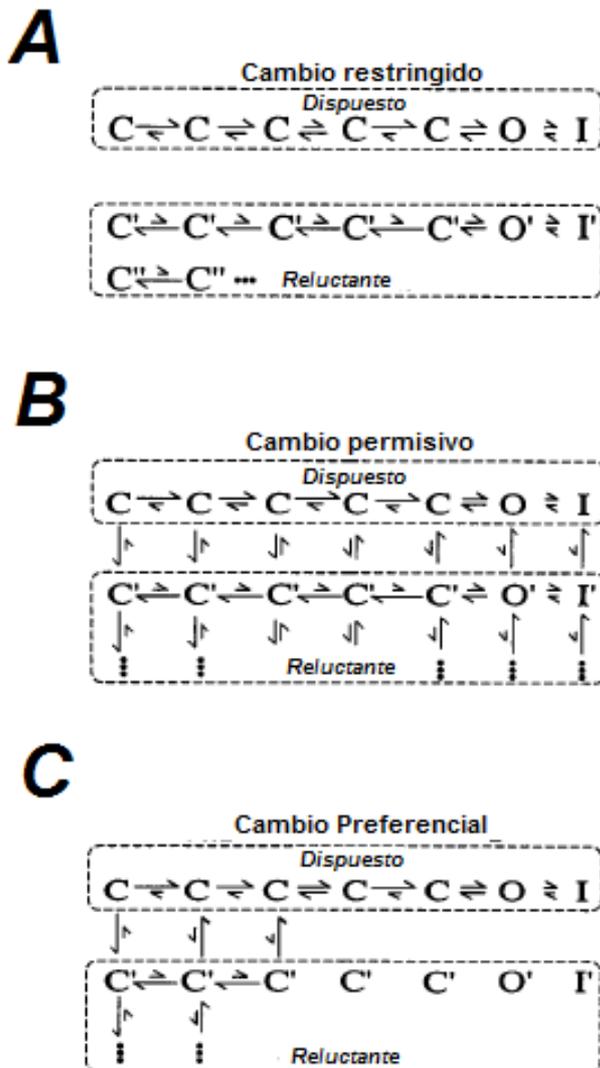


Fig. 14. Modelos sobre el mecanismo de inhibición por proteínas G

En la figura se muestran los tres modelos, restringido (A), permisivo (B) y preferencial (C). Para representar los posibles estados del canal se utilizan las letras C, O e I, las cuales representan estados cerrado, abierto e inactivado, respectivamente. Las flechas horizontales representan transiciones entre los subestados del canal y las flechas verticales cambios entre el modo dispuesto y reluctantante o viceversa. En A, los canales permanecen en el mismo modo desde que abren hasta que cierran; en B, los canales pueden cambiar a distintos modos tanto en estados cerrados como en abiertos; en C, los canales pueden cambiar de modos cerrados a abiertos, pero con un cambio preferencial hacia el modo dispuesto (Patil *et al.*, 1996)

Por otra parte, García-Ferreiro *et al.* (2001) observaron en los registros de la I_{Ba} en neuronas simpáticas de rata pretratadas con PMA, una rápida activación y un decaimiento en la corriente, a diferencia de los registros de la I_{Ba} obtenidos en neuronas dializadas con GTPyS, fenómeno atribuido probablemente a la

modulación de los canales $Ca_v2.2$ distribuidos en dos poblaciones, dispuesta y reluctante.

Recientemente Díaz-Cardenas *et al.* (2008), mediante pulsos despolarizantes en condiciones de fijación de voltaje, obtuvo una serie de colas de corriente y, a través de un ajuste a una función de Boltzmann doble, separó la población dispuesta de la reluctante, y notó además que en las neuronas dializadas con GTP γ S hay ausencia del decaimiento de la corriente, lo cual sugiere una relación causal entre este último fenómeno y la población reluctante.

Con base en los últimos dos trabajos se planteó el siguiente problema, el cual es motivo de estudio en el presente trabajo.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los canales $Ca_v2.2$ son diana de varias rutas de modulación, entre éstas la ruta de modulación por proteínas G acopladas a una variedad de receptores heptahelicales. En trabajos previos realizados por García-Ferreiro *et al.* (1998), observaron que la corriente de los canales $Ca_v2.2$ en neuronas dializadas con GTP γ S se mantenía durante el tiempo de registro, la corriente en este tipo de neuronas es generada principalmente por dos tipos de poblaciones conocidas como dispuesta y reluctante; con un predominio de la población reluctante bajo estas condiciones. Por otra parte, Díaz-Cárdenas *et al.* (2008) observaron que el componente reluctante de los canales $Ca_v2.2$ durante el registro de dichas neuronas aparentemente incrementa en presencia de PMA a diferencia de las neuronas control. El PMA es un activador de la PKC, el cual modula a los canales $Ca_v2.2$ al aumentar el modo dispuesto. Dado que en este modo la corriente presenta un rápido decaimiento, sugerente de un proceso de inactivación de los canales, una posibilidad es que el componente reluctante no aumente sino en forma relativa, dada la disminución del componente dispuesto, y que el componente reluctante se mantenga constante en el tiempo. Dadas estas observaciones en el trazo de corriente de los canales $Ca_v2.2$ y en las curvas de activación de las poblaciones dispuesta y reluctante, una pregunta es la siguiente: ¿es la población reluctante la causante de que la corriente se mantenga estable en el tiempo?

La preservación de la corriente a través de la población reluctante parece factible, sin embargo, esta idea aun no ha sido probada y en la actualidad no existen suficientes estudios experimentales del comportamiento en el tiempo de las poblaciones modales de los canales $Ca_v2.2$. Por otra parte, los modelos teóricos disponibles (dispuesto-reluctante) no explican dicho comportamiento y en ciertos aspectos son contradictorios. Por lo tanto, el propósito de esta tesis fue estudiar el comportamiento en el tiempo de las poblaciones dispuesta y reluctante, a fin de documentar la persistencia de la población reluctante como una posible explicación a la preservación de la corriente en condiciones de GTP γ S.

V. PROBLEMA CENTRAL

¿De qué depende el sostenimiento en el tiempo de la corriente de los canales $Ca_v2.2$ en neuronas dializadas con GTP γ S?

VI. HIPÓTESIS

Si las proteínas G promueven estados regulados de los canales $Ca_v2.2$, desde los cuales se reduce la probabilidad de transitar hacia el modo dispuesto o hacia el estado inactivado, entonces el sostenimiento de la corriente en el tiempo puede explicarse por la persistencia de la población reluctante.

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Mostrar que la población reluctante de los canales $Ca_v2.2$ se mantiene en el tiempo bajo el efecto del GTP γ S.

7.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar en el tiempo la sensibilidad del voltaje de las poblaciones dispuesta y reluctante.
2. Determinar si la conductancia máxima se mantiene en el tiempo en neuronas dializadas con GTP γ S.
3. Proponer un modelo dispuesto-reluctante que explique la persistencia de la corriente en condiciones de unión de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ al canal de calcio $Ca_v2.2$.

VIII. METODOLOGÍA

8.1. Cultivo celular

Las neuronas del ganglio cervical superior de rata son un modelo ampliamente estudiado y caracterizado, debido a que presentan varias ventajas, tales como la expresión exclusiva de canales tipo HVA, pues más del 85% corresponden a canales $Ca_v2.2$. Además se pueden mantener durante largo tiempo en condiciones *in situ*, conservando varias de sus propiedades fisiológicas y una forma cuasiesférica, con un diámetro aproximadamente entre 25 y 40 μm , lo que permite estudiarlas con gran facilidad por el método de fijación de voltaje en parches de membrana ("Patch Clamp"). Estas peculiaridades nos permitieron estudiar a los canales $Ca_v2.2$ bajo el efecto de las proteínas G en neuronas SCG de rata (García-Ferreiro *et al.*, 2001).

Las neuronas fueron extraídas a partir del ganglio cervical superior de ratas macho adulto, cepa Wistar de 5 semanas de edad. La rata fue anestesiada con CO_2 y posteriormente decapitada.

La cabeza de la rata fue sujeta con agujas en posición rostral hacia arriba, para efectuar la disección de los ganglios se hizo un corte medio sagital, separando la piel y la musculatura de cuello de la rata, inmediatamente después se observó la tráquea, la cual fue removida hacia la parte rostral y sujeta con agujas, permitiendo la visualización de las carótidas. El ganglio cervical superior se encuentra en medio de la bifurcación de las carótidas, lugar del que fue extraído.

Se extrajeron los dos ganglios y se colocaron en una caja de Petri de 60 mm de diámetro con solución de Hank's en presencia de hielo y oxigenación constante.

Después de la disección los ganglios fueron limpiados, retirándoles el tejido conectivo que los recubría. A cada ganglio se les hicieron de 7 a 10 cortes transversales, con la finalidad de facilitar la disociación enzimática. Posteriormente fueron incubados durante 20 min a 37 °C, en 3 ml de solución de Hank's más papaína (20 U/ml) y cisteína (4 mg/ml).

Una vez que terminó la incubación se sustituyó la solución anterior por otra solución que contenía colagenasa tipo I (1 mg/ml) y dispasa (10 mg/ml) y se volvieron a incubar por 20 min a 37 °C, con la finalidad de que el tejido se separara.

Después de los 20 minutos se procedió a una dispersión mecánica, con el objetivo de disociar bien el tejido y separar las neuronas. Posteriormente se le añadió medio Leibovitz's L-15 para detener la reacción enzimática y se centrifugaron a 1000 rpm durante 8 minutos, terminando este tiempo, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las neuronas. Se repitió una vez más el procedimiento. Una vez que se terminó con este proceso, se procedió a retirar el sobrenadante y se le adicionó 10 ml del medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), sometiendo una vez más a centrifugación por 8 min a 1000 rpm. Ambos medios de cultivo contenían suero fetal bovino y 1% de Penicilina-Estreptomicina.

Al finalizar el proceso de centrifugado se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µl del sedimento, se resuspendió y se sembraron las neuronas en cuatro cajas de Petri, tratadas 24 hrs antes con poli-L-Lisina y previamente lavadas durante el desarrollo del cultivo celular, las cajas de cultivo

contenían 2 ml del medio DMEM y un anillo de poliestireno para concentrar las neuronas.

Se incubaron por 24 horas en una atmosfera que contenía 95% de aire, y 5% de CO_2 a una temperatura de 37° C, los anillos de poliestireno se removieron dos horas después de la incubación.

8.2. Registro electrofisiológico

Cuando los iones de calcio cruzan a través del poro de los canales de calcio $Ca_v2.2$, se genera una corriente eléctrica, que puede ser medida por medio de la técnica de fijación de membrana en configuración de célula completa. Por lo cual se pueden registrar las corrientes en tiempo real de estos canales, permitiendo estudiar las propiedades electrofisiológicas y registrar neuronas tan pequeñas como las de los vertebrados, en éste caso de rata. Por este motivo se utilizó la técnica de fijación de membrana en configuración de célula completa.

Para el registro de las corrientes se utilizaron capilares de vidrio, los cuales fueron previamente lavados con acido clorhídrico al 0.5 N y posteriormente con alcohol al 70%, finalmente se enjuagaron con agua desionizada y se pusieron a secar. El día del registro se elaboraron micropipetas de vidrio con un estirador horizontal modelo EP-97 (Sutter Instrumental Co), las cuales fueron pulidas mediante choques térmicos. Las resistencia de las micropipetas osciló entre 1.4 y 1.9 M Ω .

Primero se registro la I_{Ba} en las neuronas control, posteriormente se dializaron con $GTP\gamma S$ de 3 a 5 min y finalmente se registraron de nuevo.

Durante el registro se perfundió localmente de forma continua. Las corrientes fueron filtradas a 5 KHz y digitalizadas por medio de una tarjeta A/D de 12 bits lab Master Borard. El voltaje de los respectivos protocolos fue generado utilizando el software PULSE (HEKA).

8.3. Soluciones de registro

Se prepararon tres soluciones para realizar los registros de la corriente de bario en los canales de calcio $Ca_v2.2$, la solución interna, externa y de sello. Las cuales se describen a continuación:

8.3.1. Solución externa

Compuesto	Concentración (mM)
TEACI	165
BaCl ₂	1
HEPES	10
Glucosa	8
MgCl ₂	1
TTX	.2
Nifedipina	.002

La solución fue ajustada a un pH de 7.4 con TEA-OH 1M.

8.3.2 Solución interna

Compuesto	Concentración (mM)
CsCl	140
TEA-Cl	20
HEPES	10
BAPTA-Tetracesio	.1
MgCl ₂	5
Leupeptina	.1
Li ₄ GTPγS	.3
Na ₂ ATP	4

La solución fue ajustada a un pH de 7.4 con TEA-OH 1M.

8.3.3. Solución de sello

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	160
KCl	2.5
HEPES	10
Glucosa	8
CaCl ₂	5
MgCl ₂	1

La solución fue ajustada a un pH de 7.4 con NaOH .1 M.

8.4. Análisis de los datos

Los datos fueron analizados en ORIGIN, EXCEL Y SIGMA PLOT y expresados como el promedio \pm error estándar (SEM). Para verificar si existía diferencia significativa entre cada uno de los resultados se aplicó la prueba la t de student con una $p < 0.05$.

La corriente se expresó en términos de densidad de corriente (pA/pF), substrayendo los componentes lineales y los transientes capacitivos fueron cancelados usando un EPC-9.

La resistencia de los sellos en promedio fue de $3.6 \pm 1.57 \text{ G}\Omega$ y una capacitancia promedio celular de $99.3 \pm 18.03 \text{ pF}$ de un total de 35 neuronas registradas.

Para separar y estudiar las poblaciones dispuesto y reluctantante de los canales de $\text{Ca}_v2.2$ en el tiempo se construyeron curvas de activación. Las curvas de activación se construyeron a partir de la amplitud de las colas de corriente medidas en el 4 ms; generadas por los protocolos que se muestran en la Figura 20. Posteriormente fueron graficadas con respecto al pulso de voltaje y se ajustaron a una función de Boltzmann doble:

$$I(V) = I_1 \{1 + \exp[(V_{h1} - V)/k_1]\}^{-1} + I_2 \{1 + \exp[(V_{h2} - V)/k_2]\}^{-1}$$

Donde $I(V)$ es la densidad de la corriente en función del voltaje, mientras que I , V_h y K son la corriente, el voltaje medio y la pendiente, respectivamente.

El efecto del agotamiento sobre la I_{Ba} se midió a partir de una serie de pulsos de voltaje a -8 mV. Éstos últimos se hicieron variar en el tiempo primero a 0, 925, 2640 ms y posteriormente a 0, 2115 y 3320 ms, tiempos que corresponden a 30,

**Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio Ca_v2.2
modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata**

100 y 200 ms y a 200, 100 y 30 ms respectivamente en los registros de las colas de corriente. Se midió a los 4 ms de la amplitud de la I_{Ba} para cada uno de los tiempos y se realizó una regresión lineal correspondiente a cada una las corridas.

La conductancia máxima se determinó a partir de los trazos de I_{Ba} generados por una serie de pulsos de voltaje, los cuales iniciaron desde -40 hasta +56 con incrementos de 8 mV. Se midió la amplitud de la corriente a 30 y 90 ms después de iniciado el pulso de prueba en cada voltaje. Posteriormente se calculó la conductancia con la siguiente ecuación:

$$g=I_p/(V_m-V_{Ba})$$

Donde V_m es el potencial de membrana, V_{Ba} es el potencial de reversión para la I_{Ba} y I_p es la corriente generada a partir del pulso de prueba. Después se graficaron las conductancias con su respectivo voltaje, y los datos se ajustaron a una función de Boltzmann simple:

$$G_{max}=(1+\exp(V_h-V)/K)-1$$

Donde la G_{max} es la conductancia máxima, V_h es el valor del voltaje medio y K es la pendiente.

IX. RESULTADOS

9.1 Efecto del GTP γ S sobre la corriente de los canales Ca v 2.2 en neuronas del ganglio cervical superior

Con la finalidad de mimetizar la modulación sensible a voltaje por proteínas G sobre los canales Ca v 2.2 se usó 0.3 mM de GTP γ S, un análogo no hidrolizable del GTP, el cual mantiene permanentemente activas a las proteínas G (García-Ferreiro *et al.*, 2001; Elmslie *et al.*, 1990). La disminución en la amplitud de la I $_{Ba}$ y el enlentecimiento cinético son dos de las primeras características básicas de la modulación sensible a voltaje por proteínas G (Elmslie, 2003).

Los trazos de corriente que se muestran en la Figura 15, se obtuvieron mediante un pulso de prueba a -10 mV con una duración de 90 ms. En esta Figura se muestran dos trazos representativos de la I $_{Ba}$ registrada en neuronas control y en neuronas dializadas con GTP γ S. En el trazo control se presenta una corriente típica de los canales Ca v 2.2. Al inicio del pulso la magnitud de la corriente se incrementa rápidamente y a medida que pasa el tiempo la corriente decae, indicando que la corriente se inactiva. Por otra parte, en la corriente de las neuronas dializadas con GTP γ S se observa un decaimiento lento en la activación de la corriente; a este fenómeno se le conoce como enlentecimiento cinético, y una disminución de la corriente con respecto al trazo de corriente de la célula control (Patil *et al.*, 1996; Elmslie *et al.*, 1990; García-Ferreiro *et al.* 2001).

La magnitud de la corriente en las neuronas dializadas con $GTP\gamma S$ no decae en el tiempo, es decir, la amplitud de la corriente se mantiene (García-Ferreiro *et al.*, 2001; Lipscombe *et al.*, 1989). Entonces se puede decir que el sostenimiento de la I_{Ba} en las neuronas dializadas con $GTP\gamma S$ se debe al predominio de la población reluctante a diferencia de las neuronas control en las cuales predomina la población dispuesta (Bean, 1989; García-Ferreiro *et al.*, 2001).

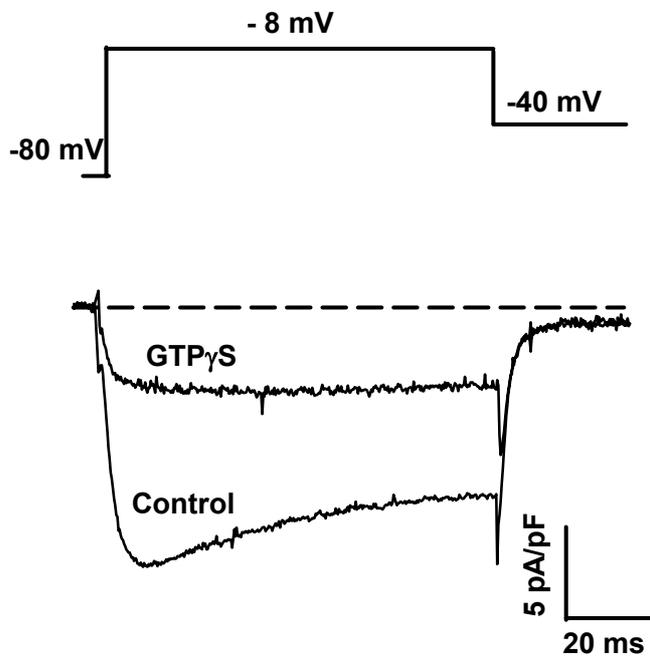


Fig. 15. Enlentecimiento cinético y disminución de la I_{Ba}

La I_{Ba} fue registrada con el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. En la parte inferior se muestran los trazos superpuestos de la I_{Ba} de la neurona control y de la dializada con $GTP\gamma S$ (0.3 mM), en éste último, se observa el enlentecimiento cinético y la disminución de la amplitud de la corriente con respecto al control, dos de las características clásicas de la modulación sensible a voltaje por proteínas G.

Otra característica fundamental en la modulación sensible a voltaje por proteínas G, es el desplazamiento en la curva de activación a potenciales más despolarizantes, consistente con el efecto sensible a voltaje (Bean, 1989).

Las curvas de activación de la Figura 16, fueron construidas a partir de las corrientes de la cola obtenidas mediante el protocolo que se muestra en la Figura 16A. La curva de activación en neuronas dializadas con GTP γ S se activó a voltajes más despolarizantes que la curva de activación en neuronas control, mostrando claramente un desplazamiento a la derecha, Figura 16 D.

Tanto en las neuronas control como en las neuronas dializadas con GTP γ S las curvas de activación son bifásicas. En neuronas dializadas con GTP γ S hay un primer componente en la región de -40 a 0 mV que es similar al control, mientras que el segundo componente aparece hacia voltajes mas despolarizantes; este componente satura a +80 mV, cada uno de estos componentes representa a la población dispuesta y reluctante, respectivamente. Los parámetros del ajuste a una función de Boltzmann doble en la relación de la I_{Ba} de la cola-voltaje tanto de las neuronas control como dializadas con GTP γ S se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros derivados del ajuste de una función de Boltzmann doble de las relaciones de corriente de cola promedio versus voltaje de los datos presentados en la Figura 16D.

Parámetros	Control	Dializadas con GTP γ S
V_1 (mV)	-21.11 \pm 0.90	-20.08 \pm 1.72
K_1 (mV)	4.26 \pm 0.70	5.07 \pm 1.02
I_1 (pA/pF)	0.42 \pm 0.45	0.30 \pm 0.43
V_2 (mV)	13.87 \pm 1.32	34.63 \pm 2.34
K_2 (mV)	13.94 \pm 2.34	13.07 \pm 1.32
I_2 (pA/pF)	0.58 \pm 0.53	0.697 \pm 0.32

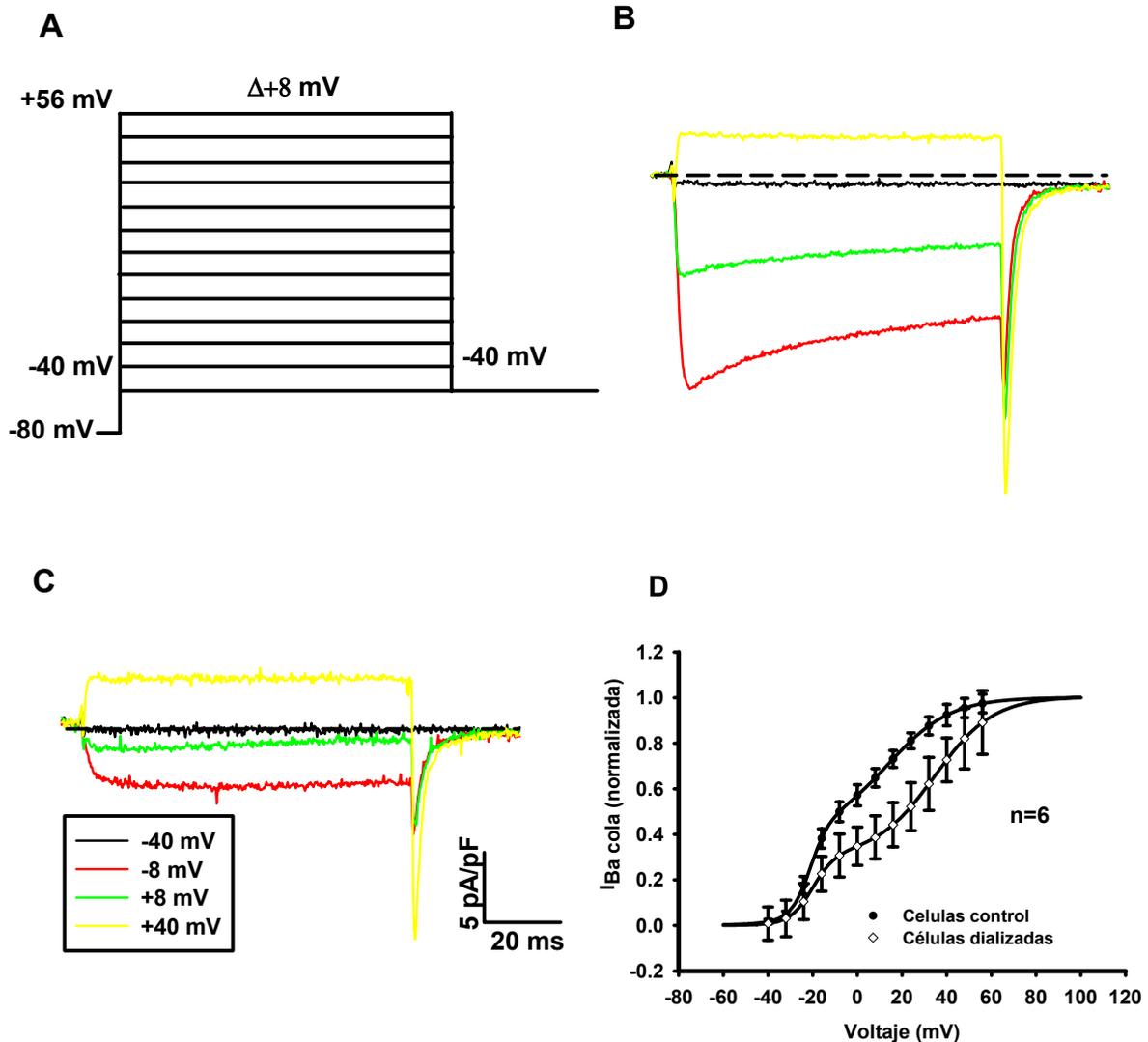


Fig. 16. Curvas de activación en células control y dializadas con GTP γ S

En A, se muestra el protocolo con el cual se obtuvieron los trazos representativos de la I_{Ba} de B (célula control) y C (célula dializada con GTP γ S), generados a -40, -8, +8 y +40 mV. En D, se muestran las curvas de activación en condiciones control (círculos negros, n=6) y dializadas con GTP γ S (círculos vacíos, n=8) ajustadas a una función de Boltzmann doble. En la curva de activación de las neuronas dializadas con GTP γ S se observa el desplazamiento de la curva a voltajes más despolarizantes.

La cuarta característica de la regulación sensible al voltaje se obtiene mediante el protocolo conocido como prepulso de facilitación o de doble pulso. Este protocolo consiste en tres pulsos de voltaje; el prepulso, el pulso condicionante y el postpulso, donde el prepulso y postpulso son idénticos mientras que el pulso

condicionante es un fuerte pulso despolarizante que precede al postpulso. Con este protocolo se obtiene el índice de facilitación, el cual se calcula al dividir la amplitud de I_{Ba} generada en el postpulso entre el prepulso. Este índice indica el grado de inhibición por proteínas G (Elmslie *et al.*, 2003; Díaz-Cárdenas *et al.*, 2008). La I_{Ba} de la Figura 17 se obtuvo con el protocolo antes mencionado. El prepulso y postpulso se dieron a un voltaje de -8 mV durante 90 ms, y el pulso condicionante a +80 mV con una duración de 50 ms. En las neuronas dializadas con GTP γ S la amplitud de la I_{Ba} generada en el prepulso fue de -2.28 ± 1.53 pA/pF $n=6$, mientras que en el postpulso fue de -6.00 ± 0.8 pA/pF $n=6$. Esto dio como resultado un índice de facilitación de 2.64 ± 0.54 $n=6$.

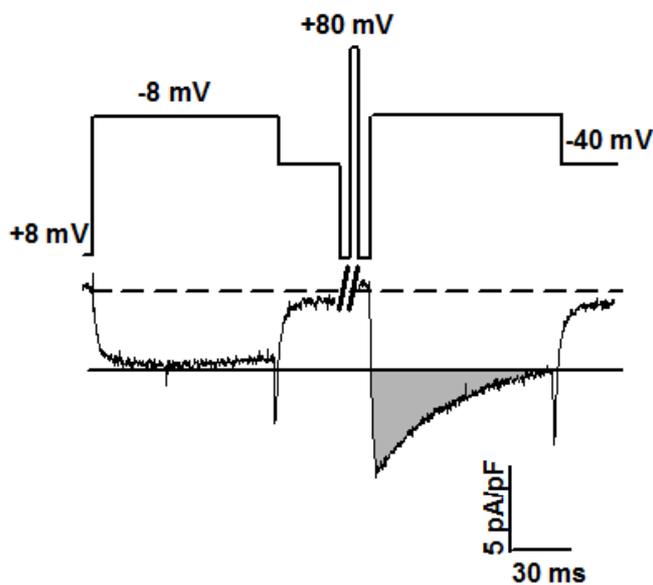


Fig. 17. Grado de inhibición por proteínas G en la corriente de bario de los canales $Ca_v2.2$. En la parte superior se muestra el protocolo de doble pulso, mientras que en la parte inferior de la figura se muestra la I_{Ba} de la célula dializada con GTP γ S. La región sombreada indica el grado de liberación de la corriente sensible a voltaje inhibida por proteínas G.

9.2. Separación de las poblaciones dispuesta y reluctante

mediante curvas de activación en neuronas simpáticas de rata

En los registros anteriores, se observó que en neuronas dializadas con GTPyS la amplitud de la I_{Ba} se preserva en el tiempo durante un pulso de voltaje. Hasta el momento esta observación solo ha sido cualitativa, por lo cual se procedió a realizar mediciones a diferentes tiempos de la magnitud de I_{Ba} en los trazos registrados de las neuronas dializadas con GTPyS y control. Las mediciones se hicieron en un pulso de voltaje de -8 mV, debido a que es el voltaje máximo de corriente en una curva I-V.

En la Figura 18 se muestra la magnitud de la I_{Ba} medida a 15, 30 y 90 ms en el trazo de corriente. En las neuronas control la corriente decae en el tiempo a diferencia de las neuronas dializadas con GTPyS, en las cuales la I_{Ba} se mantiene estable.

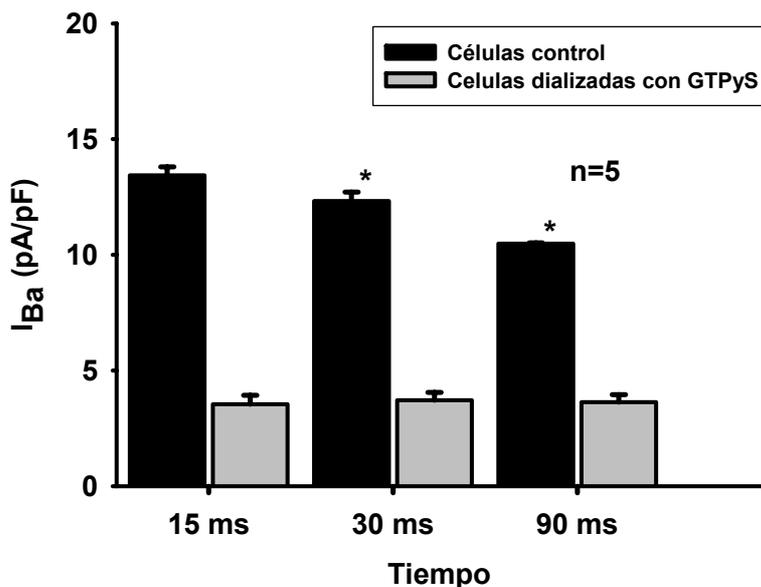


Fig. 18. Magnitud de la I_{Ba} a 15, 30 y 90 ms

Las barras representan la magnitud de la I_{Ba} tanto de las células control (barras negras) como de las células dializadas con GTPyS (barras grises), registros realizados a 15, 30 y 90 ms. En los registros con GTPyS la magnitud de la corriente se mantiene (n=5).

La estabilidad de I_{Ba} en el tiempo en las neuronas dializadas con GTPyS generó la idea de que la población reluctante es posiblemente la causante de que la corriente no decaiga, debido a que en estas condiciones predomina la población reluctante (García-Ferreiro *et al.*, 2001). Esta idea generó la necesidad de mostrar si la población reluctante es la que preserva la activación en el tiempo en las neuronas dializadas por GTPyS.

Ambas poblaciones se pueden estudiar separándolas a partir de las curvas de activación bifásicas generadas de las colas de corriente, por una serie de pulsos despolarizantes. Las curvas de activación se ajustan a una función de Boltzmann doble, la cual representa la suma de dos funciones de Boltzmann simple, una que corresponde a la población dispuesta y la otra a la población reluctante (Patil *et al.*, 1996; Bean, 1989; García-Ferreiro *et al.*, 2001).

En la Figura 19 se muestra la serie de trazos de las I_{Ba} producidas por los protocolos que se muestran en la parte izquierda de la Figura a 30, 100 y 200 ms. El potencial de mantenimiento fue a -80 mV, los pulsos despolarizantes empezaron desde -60 hasta +75 con incrementos de 15 mV y el pulso repolarizante en cada uno de éstos fue a -40 mV. El pulso repolarizante generó una serie de colas de corriente, producto de la fuerza impulsora y el paso de los iones de Ba^{2+} a través de los canales abiertos sensible a voltaje que permanecen abiertos y se desactivaron al momento de cerrar el pulso. Se midió la amplitud de las corrientes de cola en el 4^{to} ms y se graficaron en función del voltaje. Estos últimos se ajustaron a una función de Boltzmann doble, con el objetivo de separar la población dispuesta de la reluctante. El ajuste se hizo de la misma forma que en

las curvas de activación de la Figura 16. Los parámetros del ajuste se pueden ver graficados en las Figuras 21 y 22.

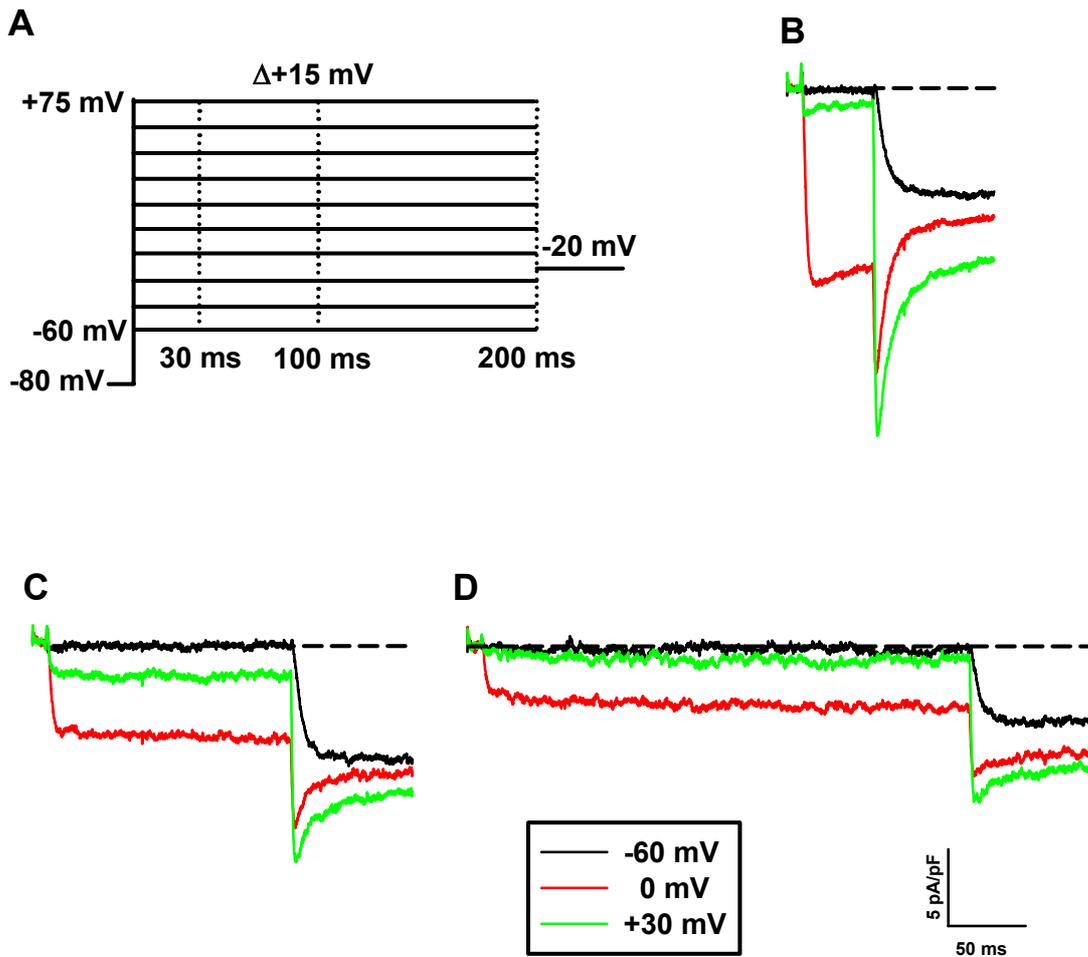


Fig. 19. Trazos representativos de la corriente generada a partir de una serie de pulsos despolarizantes

En la figura A se muestra el protocolo a partir del cual se originaron los registros de las I_{Ba} a 30 (figura B), 100 (Figura C) y 200 ms (figura D). La línea punteada representa el valor cero de la corriente. En los trazos de color negro, rojo y verde se muestran los trazos representativos de la corriente generada a -60, 0 y +15 mV, respectivamente.

En las curvas de activación, Figura 20, se observa que el componente del modo dispuesto se activa a voltajes menos despolarizantes con respecto al componente en modo reluctantante. El espacio entre el componente dispuesto y reluctantante se reduce en el tiempo, lo cual podría sugerir que el componente dispuesto disminuye, mientras que existe la posibilidad de que el componente reluctantante aumente.

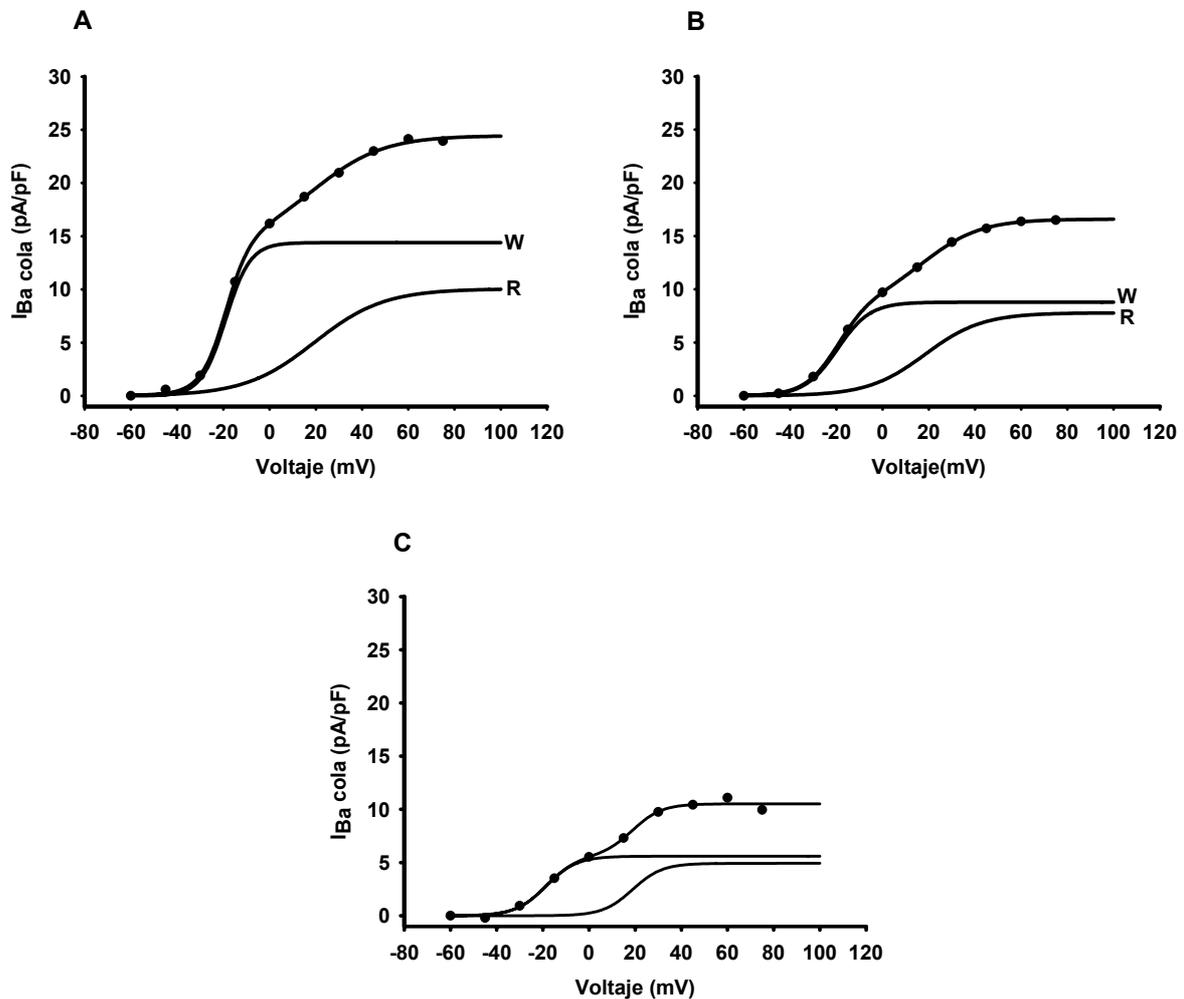


Fig. 20. Curvas de activación en neuronas dializadas con GTP γ S

En las graficas A, B y C se muestran las curvas de activación de las neuronas a 30, 100 y 200 ms, respectivamente. La W es la abreviación de la componente de la población dispuesta mientras que la R es la abreviación de la población reluctantante. El componente W se activa a despolarizaciones más negativas con respecto a R. El espacio entre las dos componentes disminuye.

Comportamiento poblacional dependiente del tiempo de los canales de calcio $Ca_v2.2$ modulados por proteínas G en neuronas simpáticas de rata

Para el caso de los componentes de la población dispuesta no se observaron cambios en la pendiente ni el voltaje, Figura 21.

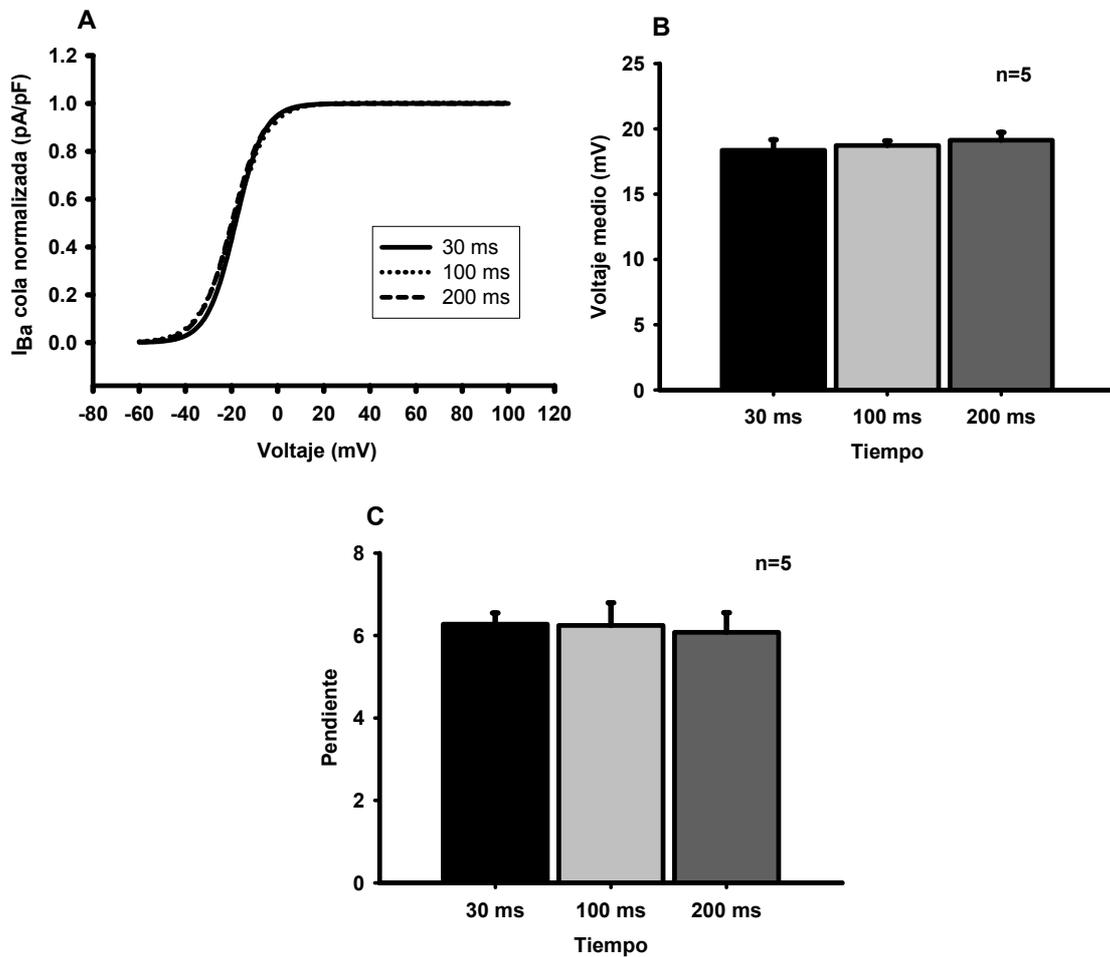


Fig. 21. Parámetros de la población dispuesta

En A, se muestran las curvas de activación de la población dispuesta; en B, la pendiente y en C, el voltaje medio a 30, 100 y 200 ms. En las curvas de activación no se observa cambio alguno de los parámetros, lo cual se puede observar tanto en las figuras B y C.

Con respecto a la población reluctante, el valor de la pendiente disminuyó en el tiempo mientras que en el voltaje medio no hubo cambios.

Durante el registro de la I_{Ba} a diferentes tiempos en las neuronas dializadas con GTP γ S (Figuras 19 y 20) se observó una disminución en la amplitud de la

corriente. Esta pérdida de la corriente posiblemente se debe al fenómeno conocido como agotamiento.

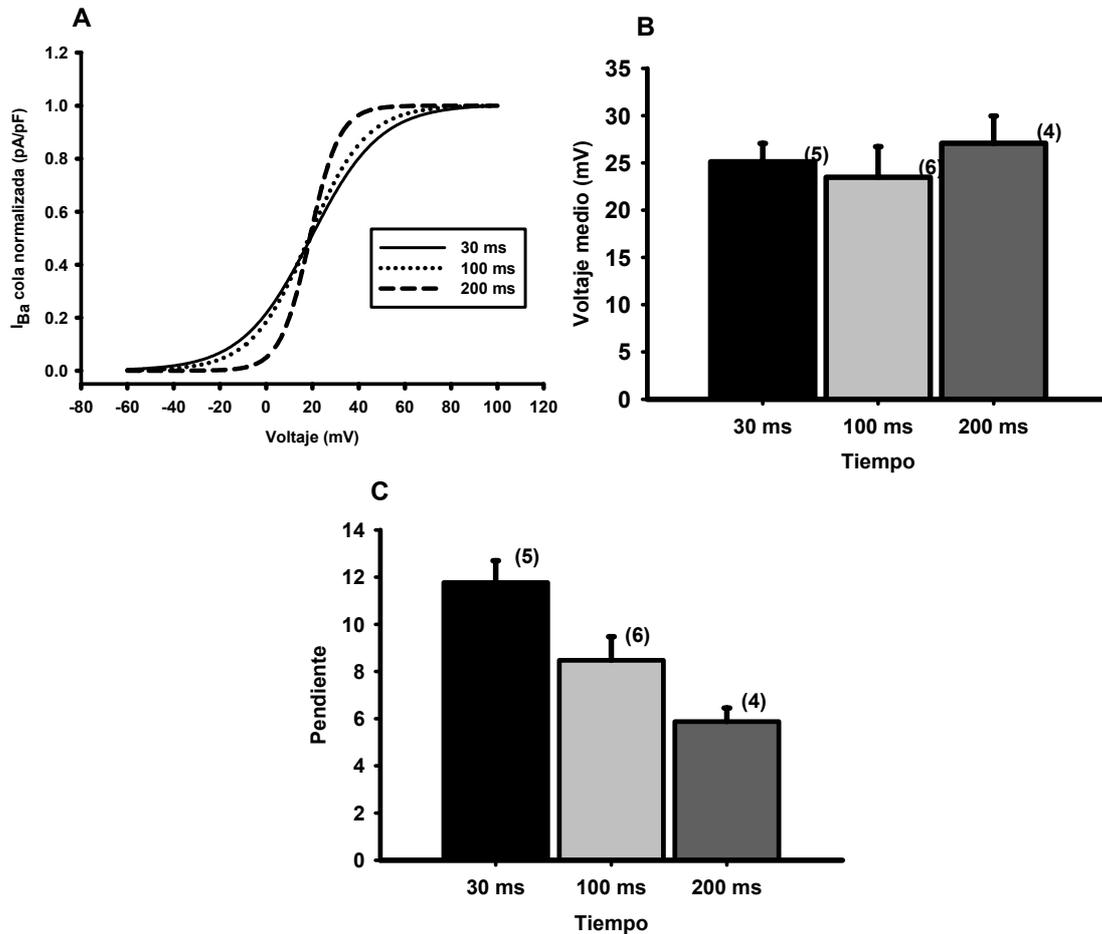


Fig. 22. Parámetros de la población reluctante

En la Figura A se muestran las curvas de activación, en B la pendiente y en C el voltaje a 30, 100 y 200 ms. Solo hubo cambios en la pendiente en el tiempo, pues el voltaje medio permaneció constante en el tiempo.

El efecto del agotamiento es un fenómeno que depende del tiempo. Este fenómeno disminuye la actividad de los canales de calcio sensibles a voltaje y ocurre durante la diálisis celular con la técnica de fijación de membrana en configuración de célula completa (Becq F, 1996).

La pérdida de la corriente podría confundir la interpretación de los datos durante el tiempo de registro. Por ese motivo se calculó si la pérdida de la corriente por efecto del agotamiento era la misma al registrar las neuronas a 200, 100 y 30 ms que al registrarlas a 30, 100 y 200 ms, tal y como se hizo para construir las curvas de activación.

La Figura 23 muestra la corriente pérdida por efecto del agotamiento durante el tiempo en que se registraron las neuronas dializadas con GTP γ S.

Se observó que no hubo diferencias en la corriente, lo cual demuestra que la corriente pérdida por efecto del agotamiento a pesar de que estuvo presente no afecta el análisis de los datos.

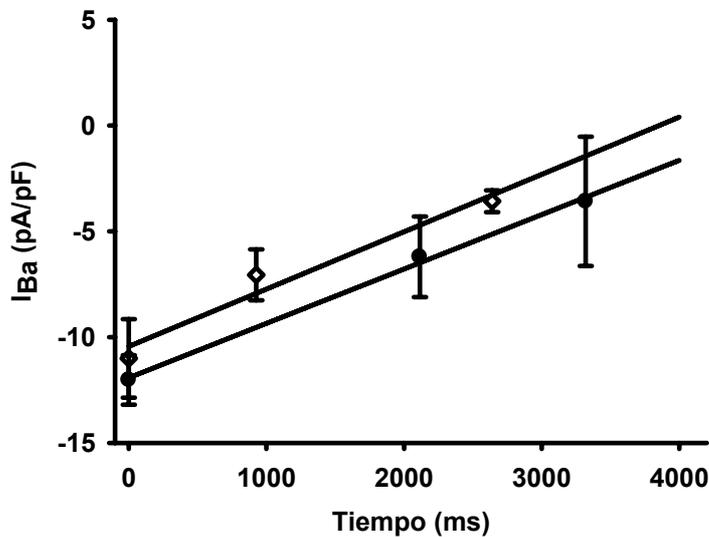


Fig. 23. Pérdida de la I_{Ba} por efecto del agotamiento

Los círculos vacíos representan la amplitud de la corriente del protocolo corrido a 30, 100 y 200 ms, mientras que los círculos rellenos representan la amplitud de la corriente del protocolo corrido a 200, 100 y 30 ms. No se observaron diferencias en la amplitud de la corriente al correr ambos tipos de protocolos.

9.3. Curvas de conductancia de la población dispuesta y reluctante en el tiempo

Otra forma de conocer las propiedades cinéticas de permeabilidad de un ión a través del poro del canal es mediante la conductancia, la cual se determina por medio de la corriente (Kandel *et al.*, 2000). Con base en la idea anterior, es posible medir las condiciones del poro para saber si la permeabilidad es afectada en el tiempo en el que las neuronas son dializadas con GTP γ S y mostrar si el componente de la población reluctante (R) aumenta, mientras que el componente dispuesto (W) disminuye, figura 20. La conductancia máxima en neuronas dializadas con GTP γ S no cambió en el tiempo a diferencia de las neuronas control, en las cuales se observó que hubo una disminución en el tiempo. No se observaron cambios en la pendiente ni en el voltaje medio de las curvas de conductancia tanto en neuronas dializadas con GTP γ S como en neuronas control, Figura 24. La conductancia en neuronas dializadas con GTP γ S decreció aproximadamente el 85% en comparación con las neuronas control.

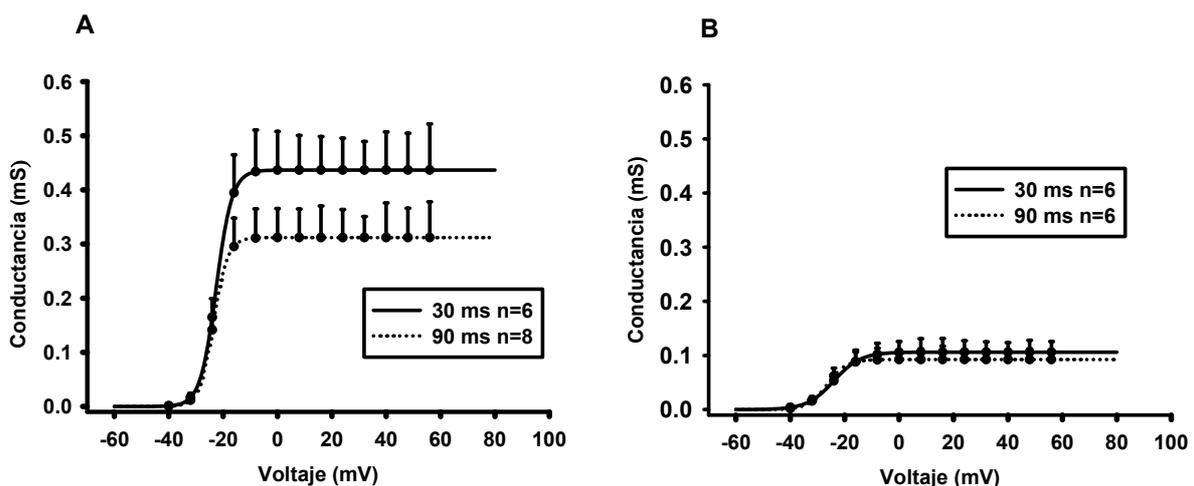


Fig. 24. Conductancia de los canales de los Ca_v2.2

En A se muestran las curvas de conductancia para las neuronas control, y en B para las células dializadas con GTP γ S, registradas a 30 y 90 ms. La conductancia sólo cambio en las neuronas control.

X. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio del comportamiento dependiente del tiempo de las poblaciones de los canales $Ca_v2.2$ en neuronas simpáticas de rata. El estudio mostró que las poblaciones dispuesta y reluctante presentan diferencias en los parámetros de la función de Boltzmann durante el tiempo de registro, en neuronas dializadas con GTP γ S.

La conductancia en las neuronas moduladas con GTP γ S no cambia en el tiempo a diferencia de las neuronas control. Por otra parte, se propone un modelo dispuesto-reluctante que explica las principales características de modulación sensible a voltaje por proteínas G.

10.1. La activación de las proteínas G preserva la apertura de los canales $Ca_v2.2$ en modo reluctante

Como se ha reportado en estudios realizados por otros autores (Elmslie *et al.*, 1990 y García-Ferreiro *et al.*, 2001), durante el tiempo de registro de la I_{Ba} en neuronas simpáticas dializadas con GTP γ S hay un predominio de la población reluctante durante el registro de la corriente. Esta idea sugiere entonces que en las condiciones en las cuales prevalece la modulación de las proteínas G la amplitud de la I_{Ba} se puede explicar en parte por la modulación de éstas, lo cual sugiere que las proteínas G están involucradas en dicho proceso. Se ha sugerido que la unión de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ a la subunidad α de los canales $Ca_v2.2$ mimetiza los efectos producidos por la modulación de las proteínas G (Herlitze *et al.*, 1996), provocando un cambio en la subunidad α de los canales $Ca_v2.2$ del modo

dispuesto al modo reluctante y en su apertura ésta todavía permanece unida; este mecanismo es delimitado a la membrana (Elmslie, 2003). Por lo tanto, posiblemente la subunidad $G_{\beta\gamma}$ es la responsable de que los canales $Ca_v2.2$ en modo reluctante todavía se mantengan activos durante el tiempo de registro con GTP γ S.

En condiciones basales existe una modulación de la PKC (proteína cinasa C) que compite en ciertos puntos de interacción de la subunidad α del canal $Ca_v2.2$ con la subunidad $G_{\beta\gamma}$. La PKC no permite que la subunidad $G_{\beta\gamma}$ se una a la subunidad α del canal $Ca_v2.2$, lo cual implica que el canal permanezca en estado dispuesto (García-Ferreiro *et al.*, 2001). Los canales $Ca_v2.2$ en modo dispuesto muestran una cinética totalmente contrastante con respecto al modo reluctante, pues estos se inactivan rápidamente y posteriormente se cierran, a diferencia de los canales en modo reluctante los cuales se mantienen activos en el tiempo. La propuesta anterior concuerda con mis resultados, Figura 19, pues el componente reluctante no crece en las curvas de activación, sino que en realidad se preserva a diferencia del componente dispuesto, el cual decae en el tiempo. Por lo cual, una posible explicación sobre la disminución del componente dispuesto es que este inactiva a diferencia de la población reluctante. Esto refuerza la idea de que los canales en estado reluctante permanecen activos cuando están modulados por la subunidad $G_{\beta\gamma}$. Entonces la población dispuesta tiende a desaparecer posiblemente debido a la inactivación, a diferencia de la población reluctante que permanece activa en el tiempo pues no inactiva.

Algo bastante notable e interesante surge con la disminución de la pendiente en el tiempo de la población reluctante, Figura 22. De acuerdo a los resultados

mostrados por Boland *et al.* (1993) con respecto al aumento de la pendiente en las curvas de activación a medida que se unen más proteínas G a la subunidad α del canal Ca_v2.2, se podría sugerir que la disminución de la pendiente en el tiempo durante el registro con GTP γ S se debe a la desunión de las subunidades de las proteínas G del mismo. Sin embargo, se necesitarían hacer más experimentos para corroborar esta idea.

10.2. La activación de las proteínas G preservan la conductancia de los Cav2.2 en estado activo

A partir de la Figura 19, se había mencionado anteriormente que posiblemente el componente reluctante (R) aumentaba en las curvas de activación construidas a distintos tiempos, si esto fuese cierto entonces la conductancia en el tiempo debería aumentar, sin embargo la conductancia no cambio, Figura 24. El aumento del componente reluctante se debe a que la población dispuesta está desapareciendo. Las curvas de activación bifásicas a partir de las cuales surgen estas dos componentes (dispuesta y reluctante) se componen de la suma de ambas (García-Ferreiro *et al.*, 2001). Durante el registro, para cada tiempo al hacer la suma de las componentes dispuesta y reluctante la que se preserva es la reluctante, por lo cual se ve que aumenta mientras que la otra disminuye. Por otra parte la pérdida de la corriente en el tiempo de la población dispuesta es mucho mayor que la población reluctante, aunque hubo una pérdida constante de la corriente en ambas poblaciones, esta puede ser atribuida al fenómeno de agotamiento.

Si las subunidades de las proteínas G siguen unidas al canal una vez que este ha abierto, entonces el mejor modelo que describiría la modulación por proteínas G sería el modelo de cambio permisivo. Mientras que la ausencia de la modulación sería mejor descrita por el modelo de inactivación preferentemente en estados cerrados intermedios propuesto por Patil *et al.*, 1998. La sobreposición de ambos modelos, Figura 25, explica de alguna u otra manera que las proteínas G en estados cerrados profundos atrapan al canal, originando que la población se active

más lentamente (García-Ferreiro *et al.*, 2001). Entonces el canal una vez que se ha activado estaría bajo cierta conformación molecular de la cual no saldría hasta que las subunidades de las proteínas G se desprendieran del canal. Con ello el canal primero tendría que pasar por una serie de conformaciones antes de convertirse al modo dispuesto e inactivar, pues esta serie de conformaciones posiblemente corresponden a las desuniones de las subunidades de la proteína G de la subunidad α del canal (Elmslie *et al.*, 1990).

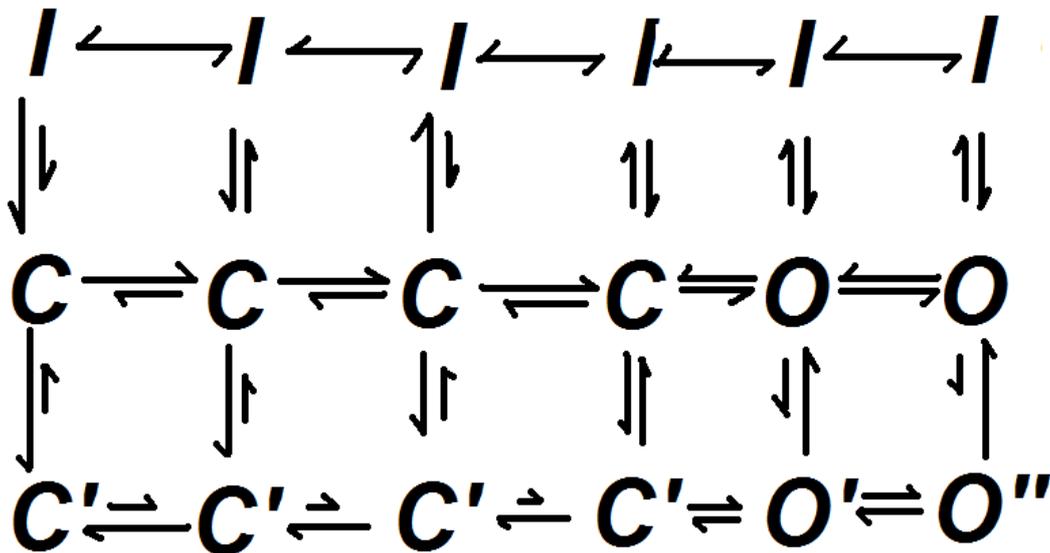


Fig. 25. Modelo dispuesto- reluctant

Los símbolos I, C y O representan los estados del canal inactivado, cerrado y abierto respectivamente. Las flechas en vertical representan cambios a distintos modos, mientras que las flechas horizontales representan cambios conformacionales del canal durante la ruta de activación. Los estados modulados se representan con apóstrofe.

CONCLUSIONES

- La activación de proteínas G sostiene en el tiempo a la corriente de los canales $Ca_v2.2$. En estas condiciones la corriente no decae.
- En la población reluctante el valor de la pendiente decrecimiento en el tiempo, mientras que en la dispuesta se mantuvo constante.
- La conductancia en las neuronas dializadas con GTP γ S se mantuvo constante en el tiempo a diferencia de las neuronas control en las cuales disminuyó.

PERSPECTIVAS

En la actualidad sabemos que existen varias rutas de modulación que tienen como diana al canal de calcio $Ca_v2.2$, y a pesar de que algunas de ellas han sido identificadas y estudiadas, todavía existen dudas con respecto a los efectos funcionales de las proteínas G sobre la subunidad α del canal.

Los estudios macroscópicos arrojan información sobre la estructura y función de los canales iónicos; sin embargo, se sabe muy poco sobre la interacción que existe entre los distintos tipos de subunidades que conforman y modulan al canal, pues no se ha hecho una asociación con el modo de cierre y apertura.

Por ello, un estudio en el tiempo a nivel de canal unitario permitiría determinar con mayor precisión los distintos grados de modulación que se presentan tanto en las subunidades accesorias del canal como en aquellas proteínas que interactúan con él, asociando el modo de cierre y apertura para cada una de estas.

Estos estudios ayudarían a entender mejor las distintas rutas de modulación que convergen en los canales de calcio $Ca_v2.2$, tanto sensible a voltaje como insensible al mismo; así como, los distintos tipos de modo bajo los cuales opera el canal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agler H.L., Evans J., Colecraft H.M. and Yue D.T. (2003) Custom distinctions in the interaction of G-protein β subunits with N-type ($Ca_v2.2$) versus P/Q-type ($Ca_v2.1$) calcium channels. *J. Physiol.* 121:495-510.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis, Raff M, Roberts K y Walter P. (2003) *Molecular biology of the cell.* USA.
3. Bean, BP (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153-156.
4. Becq F. (1996) Ionic channel rundown in excised membrane patches. *Biochim biophys Acta.* 1286 (1):53-63.
5. Boland L.M. y Bean B.P. (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by the luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence: *J neurosci.* 13(2):516-533.
6. Colecraft H.M., Brody D.L. and Yue D.T. (2000) G-protein inhibition of N- and P/Q-type calcium channels: distinctive elementary mechanisms and their functional impact. *Neuroscience.* 21:1137-1147.
7. Diaz-Cardenas A.F., Arenas I. y Garcia D.E. (2008) PMA counteracts G protein action on $Ca_v2.2$ channels in rat sympathetic neurons.

8. Dolphin A.C. (2008) A short history of voltage-gated calcium channels. *British journal of pharmacology* 147:52-62.
9. Dulanp, K. y Fischback (1978) Neurotransmitter decrease the calcium component of sensory neuron action potentials. *Nature* 276:837-839.
10. Dulanp, K y Fischback (1981) Neurotransmitter decrease the calcium conductance activated by depolarization of embrionic chick sensory neurones. *J. Physiol.* 317: 519-535.
11. Elmslie K.S., Zhou W. y Jones S.W. (1990) LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neurons.* 5(1): 75-80.
12. Elmslie K.S. (2003) Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. *J. bioenergetics and biomembranes.* 35:477-489.
13. Garcia-Ferreiro R.E., Hernandez-Ochoa E.O., Garcia D.E. (2001) Modulation of N-type Ca^{2+} channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 442: 848-858.
14. Hille, B (1994) Modulation of ion-channel fuction by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531-536.
15. Hille B, 2001. *Ion channels of excitable membrane.* Surderland. Mass. Sinahuer. 814 p.
16. Herlitz S, García DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T y Catterall WA (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380(6571):258-62.

-
17. Holz G.G., Rane S.G. y Dunlap K (1986) GTP-Binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-depend. *Nature* 319:670-672.
 18. Lacinová L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24, suppl 1:1-78.
 19. Jones S.W. y Marks T.N. (1989) Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. Activation kinetics and pharmacology. *J Gen Physiol.* 94 (1):151-67.
 20. Lee H.K. y Elmslie K.S. (2000) Reluctant gating of single N-type calcium channels during neurotransmitter-induced inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *Neuroscience.* 20 (9):3115-3128.
 21. Lipscombe D., Kongsamut S. y Tsien W. (1989) Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature.* 340(6235):639-642.
 22. McAfee D.A., Hennon B.K., Horn J.P. y Yarowsky P. (1981) Calcium currents modulated by adrenergic receptors in sympathetic neurons. *Fed Proc.* 40(8):2246-9.
 23. Marchetti C., Carbone E. y Lux H.D. (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory neurons of chick. *Pflugers.* 431: 341-352.
 24. Nowycky M.C., Fox A.P. y Tsien R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 316:440-3.
-

25. Patil P. G., De leon M., Reed R.R., Dubel S., Snutch P.T. y Yue D.T. (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type Calcium channels. *J. Biophysical*. 71:2509-2521
26. Patil P.G., Brody D.L. y Yue D.T. (1998) Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron*. 20:1027-38.
27. Tedford H.W. y Zamponi G.W. (2006) Direct G protein modulation of Ca_v2 calcium channels. *Pharmacol rev* 58(4):837-862.
28. Kandel E. Schwartz J. y Jessell T. (2000) *Principios de Neurociencias*. Mc Graw Hill. USA.

ANEXO

5-HT: 5-hidroxitriptamina (tirosina)
Ba²⁺: Ion bario
Ca²⁺: Ion calcio
Ca_v2.2: Canal de calcio sensible a voltaje tipo N
DHP: Dihidropiridinas
GABA: Ácido γ -aminobutírico.
GPCR: Receptores acoplados a proteínas G
GTP γ S: Guanosin 5'-O-[gamma-tio]trifosfato
G α : Subunidad alfa de las proteínas G
G $\beta\gamma$: Dímero beta-gamma de las proteínas G
HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293
HVA: Canales activados a alto umbral
I_{Ba}: corriente de barrio
LVA: Canales activados a bajo umbral
ms: Milisegundos
mS: Milisiemens
NE: Norepinefrina
PA: Potencial de acción
pF: Picofaradios
PKC: Proteína Cinasa C
TEA: Tetraetilamonio
TTX: Tetrodotoxina
 μ M: Micromolar
 Ω -CTX: ω -conotoxina