



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACIÓN DE CANALES DE SODIO SENSIBLES A TTX POR PIP₂
EN NEURONAS SIMPÁTICAS DE RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ERIKA IRIS PUENTE GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL: DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

DEPARTAMENTO DE NEURODESARROLLO Y FISIOLÓGÍA, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, CDMX., AGOSTO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”

Maria Salomea Skłodowska-Curie

AGRADECIMIENTOS

Es para mí un verdadero honor utilizar este espacio, para ser justa con todos los que hicieron posible a través de su trabajo, consejos y apoyo moral, la realización de esta tesis, expresándoles mis más sinceros agradecimientos.

Agradezco:

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el cual me permitió realizar mi estancia doctoral en el excelso campo de las ciencias biomédicas y alcanzar mi meta, la obtención del grado de Doctora en Ciencias. La investigación aquí presentada fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, en el PDCB, bajo la dirección del Dr. David E. García Díaz. Asimismo, agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (Proyecto IN218016, responsable Dr. David E. García Díaz de la Facultad de Medicina y Proyecto IV100116, responsable Dr. Alejandro Frank Hoeflich del Centro de Ciencias de la Complejidad). Del mismo modo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto No. 255635, responsable Dr. David E. García Díaz y por la beca doctoral No. 267655, la cual me permitió lograr mi meta.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. David Erasmo García Díaz, por aceptar su compromiso como tutor conmigo y con el PDCB. Él guio mi camino, a través de su experiencia y amplísimo conocimiento; hacia el entendimiento, rigurosidad y formación que se requieren en el campo de la investigación científica; además, ha sembrado en mí la vocación de servir y de ser cada día mejor en todos los aspectos de mi vida. Para quien la principal satisfacción ha sido verme convertida en una Doctora, por aceptar la dirección de esta tesis. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su gran capacidad para guiar mis ideas, ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Las ideas propias, siempre enmarcadas bajo su orientación, rigurosidad y disciplina, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual se ve reflejado en el trabajo logrado, el cual, no se pudo concebir sin su oportuna participación. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia para resolver todas mis dudas e inquietudes que tuve durante mi estancia. Le agradezco también, el haberme facilitado siempre los medios necesarios para llevar a cabo todos los objetivos propuestos de esta tesis.

Agradezco:

A los miembros de mi comité tutor por su paciencia, tiempo, guía, comentarios, consejos, observaciones e ideas que aportaron para enriquecer esta tesis:

- Dr. David Erasmo García Díaz
- Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
- Dr. León David Islas Suárez

La asesoría técnica recibida durante mi estancia doctoral por la Biól. María Isabel Arenas Reyes.

Al Dr. Enrique Pinzón Estrada, Jefe del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, por facilitar los murinos que fue utilizados en este trabajo, los cuales, siempre se encontraron en excelentes condiciones y estado de salud, permitiendo la conclusión de esta tesis de manera óptima.

De manera especial el apoyo técnico, el cuidado de los animales de experimentación, así como del mantenimiento y limpieza del equipo e instrumentación del laboratorio, pero sobre todo, por su amistad sincera del auxiliar de laboratorio, el Sr. Luis Martínez.

A todos mis compañeros del laboratorio de células troncales y biofísica de membranas por su compañía y amistad. De manera especial, quiero agradecer el apoyo de mi gran amiga Diana Lizbeth de la Cruz “Liz”, quien nunca me dejó desistir en el largo camino hacia mi libertad. Asimismo, agradezco infinitamente el apoyo, consejos y amistad de la Dra. Julieta Garduño Torres y de Arturo “Arturito” “R2D2” Reyes Vaca, mi gran amigo y confidente.

A mi familia por los valores éticos y morales, educación y cariño que han compartido conmigo desde el día en que llegué a este mundo, al recibirme siempre no sólo con los brazos abiertos, sino también con el corazón; por conllevar conmigo todas esas noches de desvelo, días de agotamiento físico y mental, angustia y frustración que todo estudiante de doctorado recorre en su estancia. Asimismo, por disfrutar conmigo los logros, triunfos y peripecias a lo largo de mi vida. Agradezco a mi madre, Ana María Guzmán Huerta por su enorme corazón y cariño; a mi padre, el Ing. Químico Luis Alberto Puente Moreno, por su sabiduría, apoyo, consejos, correcciones, guía, experiencia y sobre todo por las tantas veces que me ha dicho: “lo peor que puedes hacer, es compararte con los demás”; a mi hermana, la Lic. en Gastronomía, Sandra Patricia Puente Guzmán para mi “la mujer de roca” por su gran fortaleza, por su cariño, consuelo, paciencia, compañía, su carácter fuerte que siempre me ha ayudado en los momentos más difíciles y su deliciosa comida; a mis mejores amigos: Tomás, Chester I † y II †, Changuito †, Nana II, Pollo, Estrella, Beba, Salem, Max, Lancelot y Botones por su cariño, compañía, travesuras, calor y ronroneos. Gracias a todos ellos por no dejarme desistir.

Agradezco el apoyo inquebrantable, cariño, amor y paciencia de mi compañero de vida; a mi esposo Juan Antonio Robles Ramírez.

Por último, pero no por eso menos importante, agradezco a todos los animales experimentales que son sacrificados, ya que a través de ellos se impulsa la ciencia hacia nuevos horizontes, *Requiem aeternam dona eis. Et lux perpetua luceat eis. Requiescat in pace.*

Índice

Abreviaturas	9
Resumen	12
Abstract	14
1. Introducción	
1.1 Los canales de sodio sensibles al voltaje.....	15
1.2 La regulación de canales iónicos por proteínas G.....	18
1.3 La regulación de los Nav por proteínas G.....	22
2. Planteamiento del problema	24
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	27
5. Metodología	
5.1 Cultivo primario de neuronas simpáticas de rata.....	28
5.2 Registro electrofisiológico.....	29
5.3 Soluciones para el registro de las corrientes de sodio en las neuronas SCGs.....	29
5.4 Reactivos.....	32
6. Resultados	
6.1 <i>Inhibición dosis-dependiente de las I_{Na} sensibles a TTX por Oxo-M</i>	33
6.2 <i>Oxo-M inhibe las I_{Na} mediante dos mecanismos</i>	35
6.3 <i>Angio II inhibe a las I_{Na} mediante dos componentes</i>	37
6.4 <i>Oxo-M inhibe a las I_{Na} mediante la activación de los receptores M1</i>	39
6.5 <i>El componente lento por Oxo-M en las I_{Na} es aislado por PTX</i>	42
6.6 <i>Inhibición de las I_{Na} por Oxo-M es prominentemente insensible al voltaje</i>	46
6.7 <i>La inhibición de las I_{Na} por Oxo-M no altera la activación e inactivación de los Nav</i>	47
6.8 <i>Reducción de la inhibición por Oxo-M en las I_{Na} por U73122</i>	48

6.9	<i>La inhibición en las I_{Na} por Oxo-M no requiere de la activación de PKC</i>	51
6.10	<i>Wortmanina impide la recuperación de la inhibición en las I_{Na} por Oxo-M</i>	54
6.11	<i>La inhibición de las I_{Na} por Oxo-M es reducida por PLL</i>	56
6.12	<i>La diálisis intracelular de PIP_2 ocluye la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M</i>	58
7.	Discusión	60
8.	Conclusiones	62
9.	Referencias	64

Abreviaturas	
Abreviatura	Significado
Al³⁺	cación aluminio
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
Angio II	angiotensina II
AT₁	receptor a angiotensina 1
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacetato
BIS-I	Bisindolylmaleimida I
BIS-V	Bisindolylmaleimida V
Ca²⁺	cación calcio
Ca_v	Canales de calcio sensibles a voltaje
cBIMPS:	5,6-Dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol-3',5'-cyclico monofosforotioato
Cal-C	Calfostina C
D1, D5	receptores dopaminérgicos (1,5)
DAG	Diacilglicerol
diC8-PIP₂	dioctanoilglicerol-PIP ₂
DMEM	medio Eagle modificado de Dulbecco
GMPc	monofosfato de guinidina cíclico
GPCR	receptores acoplados a proteínas G
G_{q/11}	subunidad α tipo q y 11 de las proteínas G
I_{Ca}	corriente de calcio
IF	Índice de facilitación
I_M	corriente M de potasio
I_{Na}	corrientes de sodio sensibles a TTX
IP₃	fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato
k	Pendiente
kDa	Kilodalton
KHz	Kilohertzio
K_v	canales de potasio sensibles a voltaje

L-15	medio Leibovitz-15
MΩ	mega ohm
M1-5	receptores muscarínicos (1-5)
MEM	medio de base de Eagle
Mg²⁺	cación magnesio
Na⁺	cación sodio
Nav	canales de sodio sensibles a voltaje
NE	Norepinefrina
NGF	factor de crecimiento neural
MT-7	Toxina muscarínica 7
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
Oxo-M	oxotremorina metiodida
pA	Picoamperios
pF	Picofaradios
PIs	Fosfoinósítidos
PIK	Fosfoquinasa
PIP₂	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKC	proteína cinasa dependiente de Ca ²⁺
pKi	Constante de disociación enzimática
PIKs	proteínas cinasas
PLC	fosfolipasa C
PLL	poly-L-lisina (30,000-70,000 MW)
PP	Prepulso fuertemente despolarizante
PTX	toxina pertussis
Pz	Pirenzepina
SCG	ganglio cervical superior
SV	sensible al voltaje
TRH	hormona liberadora de la tirotrona
TTX	Tetrodotoxina

$V_{1/2}$	Voltaje medio al cual se activan o inactivan el 50% de los canales iónicos
WMN	Wortmanina

Resumen

Las corrientes de sodio sensibles a TTX (I_{Na}) han sido extensamente estudiadas y se ha propuesto que éstas son las responsables de la generación y la propagación de los potenciales de acción. En la presente tesis, se muestra que los canales de sodio sensibles al voltaje (Nav) son regulados por la activación de los receptores muscarínicos y de angiotensina con sus antagonistas oxotremorina (Oxo-M) y angiotensina II (Angio II), respectivamente, por un mecanismo lento en las neuronas simpáticas de rata. Esta inhibición producida por el tratamiento con Oxo-M es de estabilización lenta, insensible a la toxina pertussis (PTX), es parcialmente removida después de varios segundos y no es liberada por un pulso fuertemente despolarizante, lo cual sugiere que es un mecanismo de inhibición insensible al voltaje (IV). La especificidad del receptor M1 fue probada mediante la toxina MT-7. Las curvas de activación e inactivación no muestran un corrimiento en su dependencia al voltaje bajo la inhibición por Oxo-M. Esta inhibición es bloqueada por un inhibidor de PLC (U73122), y la recuperación de la inhibición es impedida por wortmanina (WMN), un inhibidor de PI3/4 cinasas. En conjunto, estos datos sugieren que la vía de señalización que produce la inhibición de los Nav , involucra a las proteínas $G_{q/11}$ y es mediada por un segundo mensajero difusible. La inhibición por Oxo-M es ocluida por el apantallamiento de las cargas negativas del PIP_2 con poly-L-lisina (PLL) y es disminuida por la diálisis intracelular con un análogo hidrosoluble del PIP_2 . Adicionalmente el bisindolylmaleimida I (BIS-I) y calfostina C (Cal-C), ambos inhibidores de la PKC, no previenen la inhibición por Oxo-M sugiriendo que esta proteína cinasa no es responsable de la inhibición. Estos resultados sugieren que la inhibición de las I_{Na} esta mediada por la activación del M1R a través de un mecanismo dependiente de la hidrólisis de PIP_2 . Este mecanismo genérico que se había descrito para otros canales es reportado por primera vez en el presente trabajo en los Nav ; por lo que se puede inferir que este mecanismo se encuentra

ampliamente distribuido en las diversas proteínas de las células excitables a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) específicos.

Abstract

TTX-sensitive Na⁺ currents have been extensively studied as they play a major role in neuronal firing and bursting. Here, we show that voltage-dependent Na⁺ currents are regulated in a slow manner through the activation of muscarinic and angiotensin receptors by their agonists, oxotremorine (Oxo-M) and angiotensin II (Angio II), respectively, in rat sympathetic neurons. We found that these currents can be readily inhibited through a signaling pathway mediated by G proteins and PLCβ1. This inhibition is slowly established, PTX-insensitive, is partially reversed within tens of seconds after Oxo-M washout and is not relieved by a strong depolarization, suggesting a voltage-insensitive mechanism of inhibition. Specificity of the M1 receptor was tested by the MT-7 toxin. Activation and inactivation curves show no shift on the voltage-dependency under the inhibition by Oxo-M. This inhibition is blocked by a PLC inhibitor (U73122), and the recovery from inhibition is prevented by wortmannin (WMN), a PI3/4 kinase inhibitor. Hence, the pathway involves G_{q/11} and is mediated by a diffusible second messenger. Oxo-M inhibition is occluded by screening PIP₂ negative charges with poly-L-lysine (PLL) and prevented by intracellular dialysis with a PIP₂ analog. In addition, bisindolylmaleimide I (BIS-I), a specific ATP-competitive PKC inhibitor, rules out that this inhibition may be mediated by this protein kinase. Furthermore, Oxo-M-induced suppression of Na⁺ currents remains unchanged when neurons are treated with calphostin C (Cal-C), a PKC inhibitor that targets the diacylglycerol-binding site of the kinase. These results support a general mechanism of Na⁺ current inhibition that is widely present in excitable cells through modulation of ion channels by specific G protein-coupled receptors (GPCR).

1. Introducción

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants”

Isaac Newton.

1.1 Los canales de sodio sensibles al voltaje

Los Nav son proteínas integrales de la membrana celular, los cuales forman parte de la familia de los canales iónicos operados por voltaje. Estos canales son los responsables de la generación y la propagación de los potenciales de acción en células excitables (células nerviosas, musculares y endócrinas). Los Nav están constituidos principalmente por una subunidad α . Esta estructura forma el poro del canal la cual, es aproximadamente de 260 kilodaltones (KDa). La función de esta subunidad es la permeabilidad y selectividad a los iones de sodio. Esta subunidad presenta cuatro dominios homólogos (I-IV). Cada dominio está formado por seis segmentos transmembranales (S1-S6). Al segmento S4 se le denomina sensor de voltaje, ya que presenta aminoácidos cargados positivamente a pH fisiológico. Dichos aminoácidos son los responsables de conferirle a estas proteínas la propiedad de “percibir” el voltaje (Figura 1). Cambios en el potencial de la membrana celular promueven el desplazamiento de los aminoácidos que conforman el sensor de voltaje del canal dentro de la membrana lipídica. Este movimiento resulta en cambios conformacionales que le confieren a la proteína una mayor probabilidad de transitar hacia los estados abiertos o cerrados (Stuhmer *et al.*, 1989; Auld *et al.*, 1990).

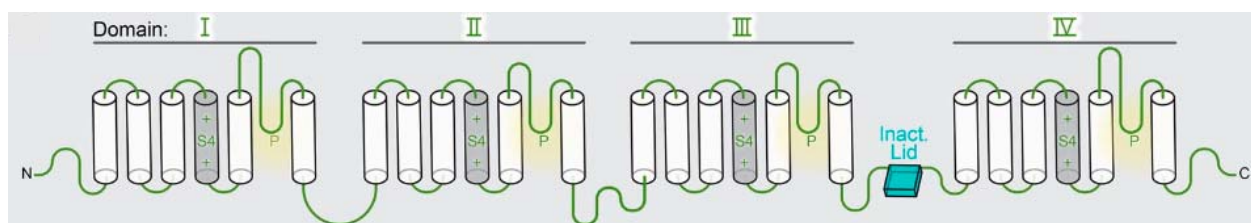


Figura 1. Esquema general de la subunidad α de los Nav. La subunidad α está conformada por cuatro dominios homólogos (numerados I-IV), cada dominio presenta seis segmentos transmembranales en color blanco. En color gris se representa al segmento S4 o sensor de voltaje, el cual “percibe” el voltaje mediante las cargas positivas, en rojo, que lo conforman. Los bucles P conforman el filtro de selectividad del canal. Tomado de (Ahern *et al.*, 2016)

A la fecha se ha reportado la existencia de 10 isoformas funcionales de Nav (Nav 1.1-9 y Nav_x; Tabla 1). La expresión de estas isoformas varía según el tejido donde se localiza. En el caso de mamíferos se ha reportado que en el sistema nervioso central expresan las isoformas Nav 1.1-3 y

1.6. Por otra parte, las isoformas Nav 1.7-9, se expresan principalmente en el sistema nervioso periférico, mientras que la isoforma Nav 1.4 se expresa en el músculo esquelético. Por último, la isoforma Nav 1.5 se expresa en el músculo cardiaco. Estas isoformas pueden subdividirse en 2 grandes grupos dependiendo de la sensibilidad que presenten a las toxinas tetrodotoxina (TTX, obtenida del actinopterigio del género *Takifugu*) y saxitoxina (STX, producida por el dinoflagelado *Gonyaulax catenella* y por algunos bivalvos). La afinidad de los canales de sodio por la TTX puede variar según su isoforma. Los Nav 1.1-4,1.6-7 presentan una constante de disociación (KD) para la TTX en el rango nanomolar (2-10 nM), por lo que se les denomina “sensibles a TTX”. Mientras que las isoformas Nav 1.5, 1.8-9 presentan una KD en el rango micromolar (>1 µM), por lo que son denominadas “insensibles a TTX”. Estas neurotoxinas se unen específicamente al poro de estos canales e impiden la conducción de los iones sodio y, por lo tanto, la generación de estas corrientes iónicas.

Table 1: Mammalian isoforms of Na_v α-subunits.

Isoform	TTX IC ₅₀ [nM]	Primary localization	Disease link ^[a]
<i>TTX-sensitive</i>			
Na _v 1.1	5.9 ^[28, 29]	CNS, ^[b] Heart	Epilepsy
Na _v 1.2	7.8 ^[30, 31]	CNS	Epilepsy
Na _v 1.3	2.0 ^[31, 32]	Embryonic CNS	Nerve injury
Na _v 1.4	4.5 ^[31, 33]	Skeletal muscle	Myotonias
Na _v 1.6	3.8 ^[31, 34]	DRG, ^[c] CNS	CNS disorders
Na _v 1.7	5.5 ^[31, 35]	DRG	Pain sensation
<i>TTX-resistant</i>			
Na _v 1.5	1970 ^[28, 31]	Heart, CNS	Cardiac arrhythmias
Na _v 1.8	1330 ^[31, 36]	DRG	Pain sensation
Na _v 1.9	59600 ^[37, 38]	DRG	Pain sensation

[a] This list represents only a partial list of associated disease states.

[b] CNS: Central nervous system. [c] DRG: Dorsal root ganglion.

Tabla 1. Isoformas de la subunidad α de los Nav en mamíferos. Isoformas, sensibilidad a la TTX, localización y enfermedad ligada a las diferentes subunidades α de los Nav expresadas en los tejidos de mamíferos. Tomado de (Thottumkara *et al.*, 2014)

Dada la importancia fisiológica que desempeñan los Nav en la propagación y generación del potencial de acción, entender de la regulación de estos canales es vital, aunque poco se conoce sobre la regulación de estas proteínas de membrana. Se ha establecido en la literatura, que la

activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) desencadena diferentes mecanismos de regulación sobre diversos tipos de canales iónicos. Los GPCRs son una familia de proteínas de 7 segmentos transmembranales y se caracterizan por su acoplamiento con una o varias proteínas G heterotriméricas (subunidades α , β y γ). La activación de estas proteínas G se inicia cuando un ligando se une a su receptor produciendo un cambio conformacional. Este cambio promueve el intercambio de GDP a GTP en la subunidad α de las proteínas G, originando la disociación de la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ (Figura 2).

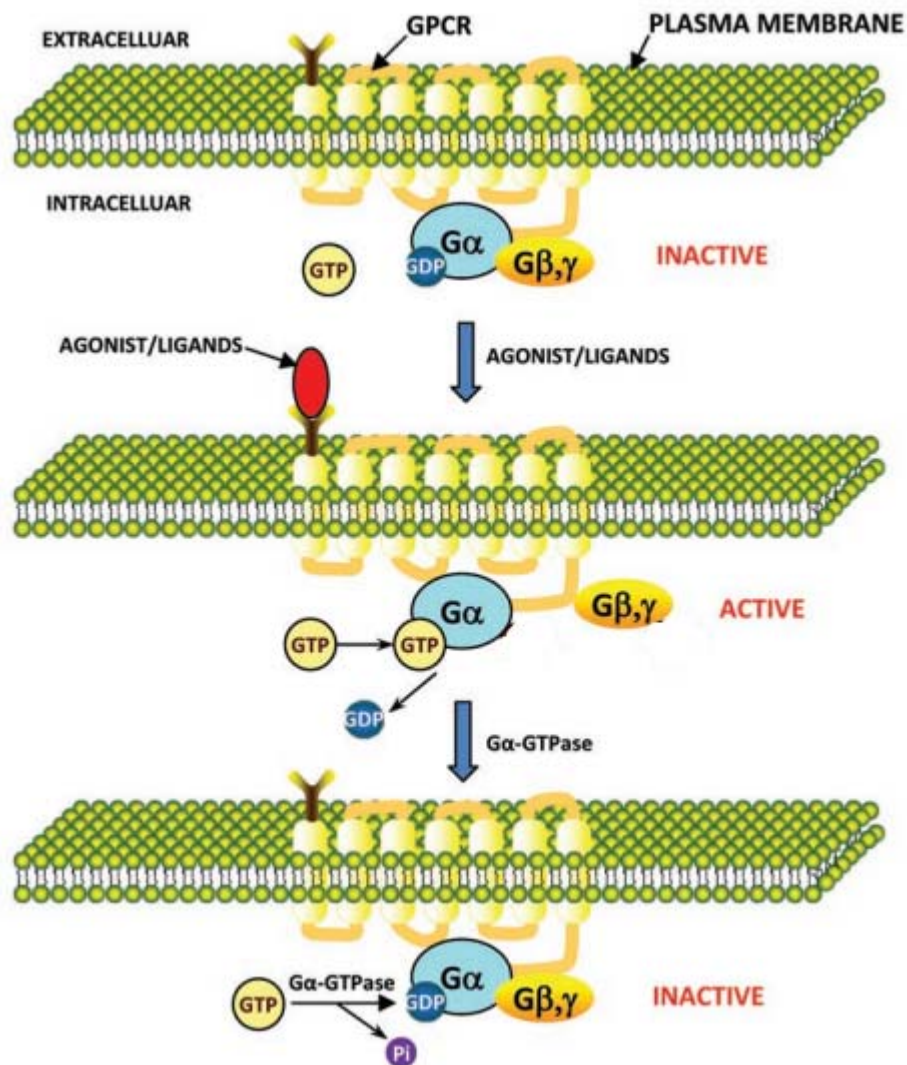


Figura 2. Modelo del mecanismo de activación de los GPCRs mediante GTP. Las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ en su estado inactivo se encuentran asociadas. En este estado, el GDP está unido a la subunidad $G\alpha$ ($G\alpha$ -GDP). En la cascada de señalización, primero el GPCR se activa al cambiar su conformación resultado de la unión del agonista o ligando, según sea el caso. El GPCR activo promueve la activación mediante la disociación del complejo $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$.

En el estado activo, el GTP está unido a la subunidad $G\alpha$ ($G\alpha$ -GTP). Por último, La $G\alpha$ -GTPasa hidroliza la unión del GTP ($G\alpha$ -GTP) en GDP y Pi e inactiva al complejo de las proteínas G mediante la re-asociación de la subunidad $G\alpha$ con el dímero $G\beta\gamma$. En este estado, nuevamente el GDP está unido a la subunidad $G\alpha$ ($G\alpha$ -GDP). Tomado de (Tuteja, 2009).

1.2 La regulación de los Cav por proteínas G

De acuerdo con Hille (1994), los Cav pueden ser regulados por proteínas G mediante dos vías, dependiendo de la subunidad $G\alpha$ a la que se encuentre acoplado el receptor. La activación de estas proteínas puede dar inicio al mecanismo delimitado a la membrana o al mediado por un segundo mensajero. El primero fue determinado como sensible al voltaje (SV), mientras que el segundo como insensible al voltaje (IV) (Hille, 1994). Aunque la caracterización de la regulación SV e IV fue realizada en canales de calcio, estos sistemas de regulación han sido reportados también en otros canales iónicos sensibles al voltaje, probablemente por la estrecha relación evolutiva que existe entre los diversos canales iónicos operados por voltaje.

El mecanismo SV es mediado por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G ($G\beta\gamma$), las cuales interactúan directamente con la subunidad α de los canales promoviendo una reducción en la amplitud de las corrientes iónicas mediante un mecanismo delimitado a la membrana. Adicionalmente, esta regulación presenta un enlentecimiento cinético en la activación de la corriente, así como un corrimiento en la curva de activación hacia potenciales más positivos (Dunlap y Fischbach, 1981; Bean, 1989; Elmslie *et al.*, 1990; Herlitze *et al.*, 1996). Este mecanismo se caracteriza por establecerse en un corto periodo de tiempo (<1 s) y su principal característica es que la inhibición es liberada tras un pulso fuertemente despolarizante (Bean, 1989; Elmslie *et al.*, 1990; Ikeda, 1991; Formenti *et al.*, 1993; Luebke y Dunlap, 1994; Herlitze *et al.*, 1996; Ikeda, 1996). Se ha propuesto que el protocolo de prepulsos, el cual mediante un prepulso fuertemente despolarizante (PP) provoca la disociación transitoria de las subunidades $G\beta\gamma$ con las subunidades α de los canales de calcio, libera sólo la inhibición SV de los canales iónicos; es por esta razón que a este tipo de regulación se le denominó sensible al voltaje.

Por otra parte, la regulación IV se caracteriza por mantener a las corrientes iónicas inhibidas aún después de aplicar un PP; este mecanismo se establece de manera lenta ($>>1$ s) sobre las corrientes iónicas, no altera la cinética de activación y no desplaza en el eje del voltaje las curvas de activación

e inactivación. Adicionalmente, este mecanismo es mediado a través de un segundo mensajero difusible. Se ha reportado que el segundo mensajero asociado específicamente para esta regulación es el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) (Suh y Hille, 2005; Falkenburger *et al.*, 2010). El decremento de su concentración en la membrana celular, a través de la activación de la PLC, disminuye la amplitud de las corrientes de los canales sensibles a voltaje que requieren de este lípido para su función y/o regulación; mientras que es necesaria la resíntesis del PIP₂ por cinasas dependientes de ATP para la recuperación de la amplitud de estas corrientes (Suh y Hille, 2002). En conjunto, estas evidencias sugieren que el PIP₂ es la molécula fundamental de la regulación IV.

Dadas las características de las regulaciones SV e IV, estos mecanismos pueden ser estudiados mediante el paradigma experimental del protocolo de prepulsos. Este protocolo consta de un pulso (P1), con el cual se genera la corriente en la que se observa la inhibición por la activación de un GPCRs. Seguido de este pulso el protocolo regresa al potencial de mantenimiento para separar el P1 del PP. El PP va desde un rango de voltaje de +80 mV hasta los +125 mV con un intervalo de duración de entre los 25 a 50 ms con el propósito garantizar la liberación de la inhibición. Este protocolo se ilustra en la Figura 3 A (Bean, 1989; Elmslie *et al.*, 1990; Ikeda, 1991; Herlitze *et al.*, 1996). Después del PP, se vuelve al pulso de mantenimiento lo suficiente, dependiendo de las propiedades de inactivación del canal con el que se trabaje, con el objetivo de evitar que los canales transiten hacia estados inactivados y sin que exceda el tiempo de reasociación, <100 ms, de las Gβγ con el canal (Elmslie *et al.*, 1990). En P2 se observa la corriente iónica liberada que se encontraba inhibida mediante la regulación SV y la corriente que permanece inhibida se encuentra regulada bajo la modulación IV (Figura 3 B).

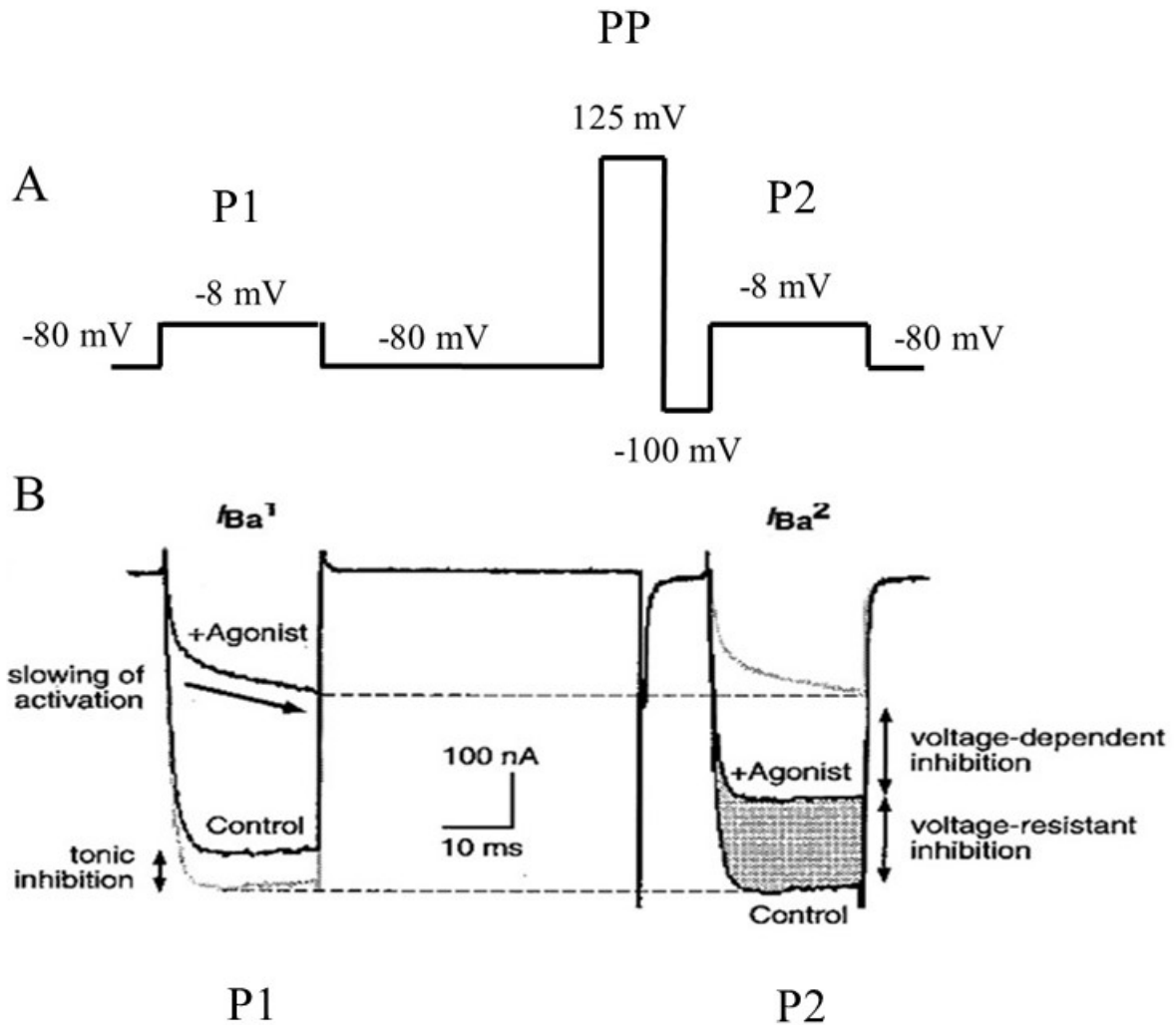


Figura 3. Paradigma experimental del protocolo de prepulso. En el panel A se ilustra el protocolo de prepulso, donde se observa el Pulso 1 (P1). Seguido de un pulso de mantenimiento largo, generalmente 1 segundo, posteriormente el pulso fuertemente despolarizante, el cual es responsable de liberar transitoriamente la inhibición de los canales por la disociación de las $G\beta\gamma$ con la subunidad α del canal iónico. En el panel B se muestra la corriente control generada por el P1; posteriormente la corriente iónica generada por el P2 liberada tras el PP, por lo que se le denomina regulación SV, mientras que la porción que permanece inhibida se encuentra regulada por un mecanismo IV. Modificado de (Kaneko *et al.*, 1999).

La corriente liberada transitoriamente por el PP se cuantifica dividiendo la amplitud de la corriente al pico generada por el pulso P2, entre la amplitud de la corriente al pico registrada en el pulso P1 ($\frac{P2}{P1}$). Al cociente resultante se le denomina índice de facilitación (IF) y valores mayores a 1 indican que una fracción de la inhibición corresponde al componente SV. Este paradigma experimental

permite separar la regulación SV de la IV generada por la activación de GPCRs mediante agonistas, éstos generan diferentes bandas de regulación sensible o insensible a voltaje dependiendo de la proteína G a la cual se encuentran acoplados.

Se ha propuesto que la vía SV utiliza un mecanismo delimitado a la membrana. Esto puede ocurrir al registrarse las corrientes en configuración *cell attached* ya que provoca una invaginación en la membrana que origina una barrera física para la interacción de la subunidades $\beta\gamma$ con el canal, se impide que se lleve a cabo la inhibición SV-delimitada a la membrana. En este sentido, la acción de los agonistas que activan la vía IV, que involucra a un segundo mensajero difusible en la membrana (Bernheim *et al.*, 1991), por lo tanto, este mecanismo no se ve comprometido por la barrera física en la membrana (Hille, 1994) como se muestra en la Figura 4.

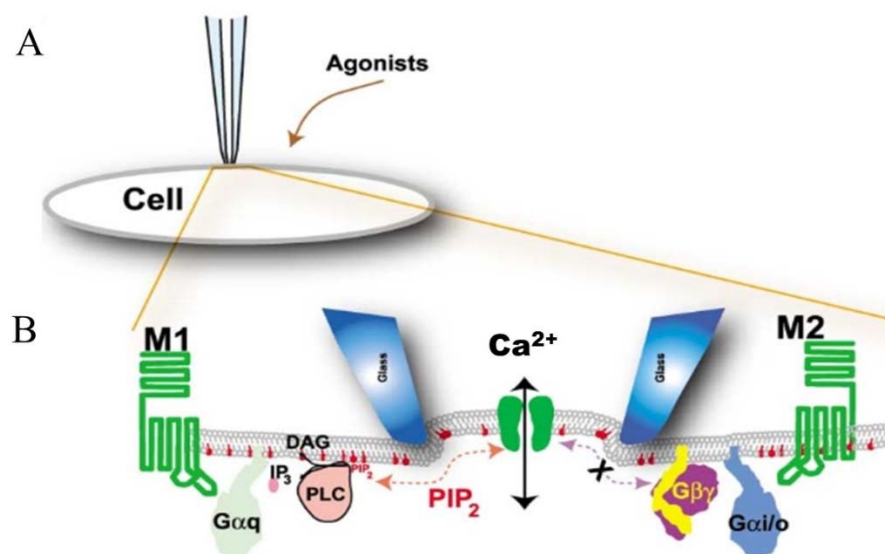


Figura 4. Diferencia del mecanismo delimitado a la membrana y el mediado por un segundo mensajero. En el panel A, se muestra una célula en presencia de un agonista. En B, se muestra la amplificación de lo que sucede en la membrana al registrar una célula en configuración *cell attach* en presencia de un agonista al activar los receptores muscarínicos. El mecanismo delimitado a la membrana se ilustra con la activación del receptor muscarínico M2, donde se muestra que la regulación mediada por las subunidades $G\beta\gamma$ no pueden ejercer su regulación mediante la interacción directa con la subunidad α del canal iónico, debido a la invaginación que sufre la membrana por el contacto de la pipeta de *patch*, en contraste, la regulación mediada por un segundo mensajero, ilustrado por la activación del receptor M1, no se compromete, permitiendo la regulación del canal iónico. Tomado de (Zhang *et al.*, 2003)

Dado que estos mecanismos de regulación, se activan mediante diferentes tipos de proteínas G, dichos componentes, rápido y lento, pueden ser aislados mediante toxinas. Una de ellas, es la toxina pertussis (PTX) de la bacteria gram negativa *Bordetella pertussis*. Esta toxina permitió clasificar a las proteínas G en dos grandes grupos: las sensibles a esta toxina de las que no lo son (Beech *et al.*, 1992; Hille, 1994). Las subunidades α de las proteínas G sensibles a la PTX, son las proteínas G de la familia de las subunidades α tipo $G_{i/o}$. Las cuales, inhiben a la adenilato ciclasa. Por otra parte, las proteínas insensibles a la PTX, cuyas subunidades α de las proteínas G son de la familia tipo $G_{q/11}$ y G_s . Estas últimas son sensibles a la toxina del cólera y son responsables de la activación de la AC. Mientras que las proteínas $G_{q/11}$ activan a la vía de la PLC β 1 (Lee *et al.*, 1992), la cual es responsable de la hidrólisis del PIP₂ disponible en la membrana celular.

1.3 La regulación de los Nav por proteínas G

Se ha reportado que la activación genérica de proteínas G mediante el análogo no hidrolizable del GTP, el GTP γ S, disminuye la amplitud de las I_{Na} en ovocitos de *Xenopus* inyectados con RNA de cerebro de rata mediante dos mecanismos: uno que aumenta la amplitud de las I_{Na} a través de la activación de proteínas G sensibles a la PTX, mientras que el otro inhibe las I_{Na} utilizando a las proteínas G insensibles a la PTX. (Cohen-Armon *et al.*, 1989). Por otra parte, la activación de receptores específicos como los β -adrenérgicos por el agonista isoproterenol, en miocitos de rata. La activación de estos receptores induce la regulación de las I_{Na} mediante 2 mecanismos mediados por proteínas G, el delimitado la membrana y el mediado por un segundo mensajero cuya subunidad $G_{\alpha s}$ acoplada a estos receptores es del tipo insensible a la PTX. La inhibición de las I_{Na} por receptores los β -adrenérgicos, es mediante la activación del AMPc, ya que el el 8-bromo-AMPc, un análogo del AMPc permeable a la membrana, reproduce el efecto inhibitorio de las I_{Na} por isoproterenol (Schubert *et al.*, 1989). Por otra parte, otros receptores que se han reportado en la regulación de los Nav, son los dopaminérgicos (D5), cuya proteína G a la que se encuentran acoplados es del tipo G_s , dado que al activar estos receptores por el agonista 6-cloro-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina-7,8-diol (SKF 81297) inhibe a las I_{Na} neuronas piramidales de hipocampo de rata. El mecanismo por el cual este receptor inhibe a las I_{Na} , es mediante la activación de la proteína cinasa A, ya que al utilizar un activador permeable a la membrana de esta cinasa, el 5,6-Dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol-3',5'-cyclic monofosforotioato (cBIMPS), mimetiza el efecto inducido por el agonista SKF 81297 para receptores D₁ en las I_{Na}

(Cantrell *et al.*, 1997). Asimismo, se ha reportado que la activación de receptores D1 induce la inhibición de los potenciales de acción de las neuronas estriatales de rata mediante la regulación de los Nav por la activación de la proteína cinasa A (Schiffmann *et al.*, 1995).

Por otra parte, se ha reportado en neuronas estriatales de rata, que el ácido araquidónico (AA) disminuye la amplitud de las I_{Na} , desplazando hacia potenciales más negativos la curva de inactivación de estos canales; mientras que la curva de activación permanece sin cambios. En esta regulación se mostró que, al utilizar el inhibidor de la PKC, el 1-[5-isoquinolinesulfonil]-2-metilpiperazina (H-7) la inhibición por el AA se mantiene, por lo que en esta regulación no requiere de la activación de la PKC (Fraser *et al.*, 1993). Adicionalmente a estos resultados, la presencia de *cis*-ácidos grasos de cadena corta inducen la inhibición de las I_{Na} en células de neuroblastoma de ratón mediante la activación de la PKC (Linden y Routtenberg, 1989). Se ha reportado que la activación de receptores muscarínicos (M1-M5) por carbacol, inhiben a las I_{Na} en neuronas de hipocampo de rata mediante la activación de la PKC (Cantrell *et al.*, 1996). Por otra parte, la activación de receptores a angiotensina reduce a las I_{Na} en neuronas SCG de rata mediante una regulación lenta (Hernandez-Ochoa *et al.*, 2007). Adicionalmente, la activación de estos receptores induce el incremento de las I_{Na} de miocitos de rata, sin que intervenga la activación de la PKC, ya que la activación de esta cinasa induce una respuesta opuesta a la observada por la activación de receptores a angiotensina (Benz *et al.*, 1992). Por último, se ha reportado en neuronas septales de cobayo que la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) la cual activa GPCRs acoplados a proteínas $G_{q/11}$, inhibe a las I_{Na} mediante un mecanismo IV sin que se conozca hasta el momento el segundo mensajero responsable en esta regulación (Lopez-Barneo *et al.*, 1990). En conjunto, estos datos argumentan la regulación de las I_{Na} mediante la activación de GPCRs específicos. Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado de manera precisa la regulación IV para los Nav. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar la regulación IV en los Nav sensibles a TTX en neuronas simpáticas de rata.

2. Planteamiento del problema

La vía de señalización activada por las proteínas $G_{\alpha q/11}$ se ha estudiado y caracterizado durante las últimas tres décadas, particularmente en las I_M (KCNQ o Kv7) y en los Cav 2.2, por diferentes grupos de investigación (Brown *et al.*, 1989; Haraguchi y Rodbell, 1991; Bernheim *et al.*, 1992; Selyanko *et al.*, 1992; Haley *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003). Esta cascada de señalización provoca la degradación de un fosfoinosítido de la membrana celular, el PIP_2 , mediante la activación de la $PLC\beta_1$ (Smrcka *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992; Caulfield *et al.*, 1994; Horowitz *et al.*, 2005). Esta enzima hidroliza al PIP_2 en dos moléculas: en IP_3 y en DAG. Esto provoca que la concentración disponible del PIP_2 en la membrana celular disminuya, lo cual modifica la función de las proteínas membranales que dependen o requieren de cierta concentración de este lípido en la membrana celular (Suh y Hille, 2005; Falkenburger *et al.*, 2010). Dada la implicación de la activación de proteínas intermediarias involucradas en la hidrólisis del PIP_2 , esta regulación tarda varios segundos en establecerse, así mismo el proceso de recuperación, por lo tanto, también requiere de la resíntesis de este lípido. Por otra parte, dado que no involucra al mecanismo delimitado a la membrana, la regulación no es liberada por un PP, dado que se caracteriza por ser un mecanismo insensible al voltaje (Grassi y Lux, 1989).

Estudios cuantitativos señalan que el PIP_2 constituye $\sim 1\%$ de los fosfolípidos y $\sim 99\%$ de los bifosfoinosítoles en las membranas biológicas de mamíferos (McLaughlin *et al.*, 2002; Gamper y Shapiro, 2007; Falkenburger *et al.*, 2010). A pesar de su escasa concentración en las membranas biológicas, $\sim 10 \mu M$ (Gamper y Shapiro, 2007), ha sido catalogado como segundo mensajero debido a su amplio repertorio de regulación en diferentes proteínas blanco (Suh y Hille, 2005; Gamper y Shapiro, 2007; Falkenburger *et al.*, 2010).

Una de las propuestas del mecanismo de regulación que lleva a cabo el PIP_2 con sus proteínas blanco, es mediante la interacción electrostática que ocurre entre lípido-proteína. Los fosfolípidos aniónicos, como es el caso del PIP_2 ($z = -4$ a pH 7) interactúan con los aminoácidos catiónicos (R y K a pH 7) de las proteínas mediante uniones iónicas, dependiendo de la distancia y localización del aminoácido con respecto al lípido, al ser expuestos los aminoácidos de las proteínas al ambiente lipídico de la membrana biológica. Estas interacciones estabilizan y mantienen la función de las proteínas (Schmidt *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Si esta interacción se interrumpe o se elimina, entonces la función de las proteínas se altera (Schmidt *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008).

Como se mostró en la parte de antecedentes, los Nav son regulados por receptores muscarínicos y de angiotensina acoplados a diferentes proteínas G (Cohen-Armon *et al.*, 1989; Schubert *et al.*, 1989; Cantrell *et al.*, 1997; Benz *et al.*, 1992; Lopez-Barneo *et al.*, 1990; Hernandez-Ochoa *et al.*, 2007), entre ellas la $G_{\alpha q/11}$ y adicionalmente estos canales son proteínas integrales de membrana que presentan aminoácidos cargados positivamente expuestos al ambiente lipídico (Payandeh *et al.*, 2012). Por lo que es posible proponer que este canal también sea regulado por un mecanismo IV mediado por la concentración fisiológica e hidrólisis de PIP_2 en la membrana celular. Por último, existe evidencia en las características fisiológica-estructural que comparten los Cav con los Nav debido a su estrecha relación filogenética, por lo que es posible que la regulación IV en los Cav también exista en los Nav, lo cual dicho mecanismo sería resultado de un proceso fisiológico-evolutivo generalizado que comparten diversas proteínas de membrana con un origen común.

Pregunta central: ¿Es la I_{Na} regulada por un mecanismo IV mediado por la hidrólisis del PIP_2 ?

3. Hipótesis

La hidrólisis de PIP₂ es la causa de la inhibición lenta de las I_{Na} mediante un mecanismo IV a través de la activación de GPCRs.

4. Objetivos

GENERAL

Aportar evidencias experimentales que sustenten la existencia de la regulación IV por PIP₂ en las I_{Na} sensibles a TTX en neuronas del SCG.

PARTICULARES

1. Promover la activación de GPCRs con Oxo-M y Angio II y estudiar la respuesta sobre las I_{Na}.
2. Establecer la relación dosis-respuesta por Oxo-M con las I_{Na}.
3. Mostar si la respuesta por Oxo-M en las I_{Na} se encuentra mediada por la activación de proteínas G insensibles a PTX.
4. Determinar si la respuesta por Oxo-M en las I_{Na} requiere la activación de la PLC.
5. Identificar si en la respuesta por Oxo-M requiere de un segundo mensajero.
6. Relacionar si la recuperación de la respuesta por Oxo-M sobre las I_{Na} requiere de la activación de PI3 y 4K.
7. Aducir sobre la especificidad del receptor responsable de la regulación inducida por Oxo-M en las I_{Na}.
8. Sustentar que la regulación por Oxo-M es insensible al voltaje en los Nav sensibles a TTX en neuronas mediante el protocolo de prepulsos.
9. Descartar mediante inhibidores específicos la participación de la PKC en la regulación de las I_{Na} por la activación de M1R.

5. Metodología

5.1 Cultivo primario de neuronas simpáticas de rata

De acuerdo con el protocolo estándar de obtención del cultivo primario de neuronas del SCG (Garcia-Ferreiro *et al.*, 2001); las neuronas del SCG fueron aisladas de ratas macho de la cepa Wistar de 5 semanas de edad; obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso, Cuidado y Reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Las ratas fueron anestesiadas con CO₂ y posteriormente fueron sacrificadas mediante decapitación por guillotina. La cabeza fue colocada en una solución desinfectante durante 2 minutos. La cabeza de la rata fue colocada ventralmente sobre una caja de disección con solución fría de Hank's para su disección. Se realizó una incisión media en el cuello desde su base hasta la barbilla. En la incisión, se separaron sucesivamente la piel y la musculatura del cuello hasta exponer la tráquea. Una vez localizada, ésta fue retraída hacia la parte rostral quedando expuestas las glándulas submandibulares; éstas fueron removidas para exponer la capa de músculo. En este punto son visibles la bifurcación de la arteria carótida y el nervio vago. El tejido compuesto por la carótida, el nervio vago y el ganglio fueron removidos desde la región más profunda después de la bifurcación de la carótida; en seguida, los ganglios fueron colocados en una caja Petri con solución de Hank's bajo oxigenación y hielo. Los ganglios fueron aislados de los demás tejidos, limpiados, decapsulados y cortados en pequeñas secciones; posteriormente fueron transferidos secuencialmente a una solución con 20 U/ml de papaína durante 20 minutos. Posteriormente, los ganglios seccionados fueron colocados en una solución con 1 mg/ml de colagenasa tipo I y 10 mg/ml de dispasa. En ella, se incubaron los ganglios durante cuarenta minutos y se realizó una disgregación mecánica mediante una pipeta de 10 ml cada veinte minutos, durante el proceso de disociación enzimática. Todas estas soluciones fueron mantenidas a 37°C bajo agitación ligera durante el procedimiento.

Al término del procedimiento descrito, la preparación fue centrifugada a 100 g durante 8 min y resuspendida tres veces, en dos ocasiones en un medio Leibovitz (L-15) y por última vez en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés), ambos medios suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina.

Posteriormente, las células fueron resuspendidas en un volumen pequeño de DMEM y sembradas en este mismo medio en cajas de Petri de poliestireno de 35 mm para cultivo de tejidos y fueron transferidas a una incubadora en presencia 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C.

Con el fin de mantener a las neuronas obtenidas centradas en la caja de Petri, se colocó un anillo de clonación de acrílico tratado con Sigmacote, de Sigma, en el centro de cada caja de Petri, sobre una base de poli-L-lisina (70,000-150,000 MW). Los anillos de clonación fueron retirados una hora después de concluido el cultivo. Las neuronas fueron registradas dentro de las primeras 24 horas posteriores al sembrado.

5.2 Registro electrofisiológico

Las I_{Na} estudiadas en el presente trabajo fueron registradas utilizando la técnica de fijación de voltaje *patch-clamp*, desarrollada por Neher y Sakmann (Hamill *et al.*, 1981), en la configuración de célula completa, *whole cell*.

Las corrientes fueron registradas mediante un amplificador EPC-9 (Heka Instruments). Las pipetas para el registro electrofisiológico, fueron elaboradas con vidrio de borosilicato y con un estirador modelo P-97 (Sutter Instruments), las pipetas utilizadas en el presente trabajo, tuvieron una resistencia promedio de 1.8 - 2.2 MΩ.

Las resistencias en serie fueron compensadas >70%. La frecuencia de muestreo fue de 10 KHz y la señal fue filtrada a 3 KHz. La adquisición y análisis de los datos fueron realizados con el programa Pulse+PulseFit (Heka Instruments), y el análisis posterior a la adquisición fue realizado con los programas Graph Pad Prism 6.0 y Origin Pro 9.0. Para su análisis, las corrientes fueron normalizadas respecto a la capacitancia de las células.

En el presente trabajo, la inhibición observada en la I_{Na} fue expresada en términos porcentuales como una fracción 0-1 los datos fueron expresados como la media ± el error estándar de la media y la diferencia estadística fue evaluada con la prueba *t* de Student no pareada y la hipótesis nula fue rechazada con **p*<0.05.

5.3 Soluciones para el registro de las corrientes de sodio en las neuronas del SCG

En el presente estudio, las soluciones fueron diseñadas para aislar y registrar la I_{Na} en las neuronas del SCG, dichas soluciones se muestran en las tablas 1 y 2. Estas soluciones fueron diseñadas a

partir de las soluciones reportadas por Hernández-Ochoa y colaboradores (Hernandez-Ochoa *et al.*, 2007).

Solución extracelular para el registro la I_{Na}

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	63.6
TEA-Cl	103
MgCl ₂	2.9
Glucosa	8
HEPES	10
CaCl ₂	0.3
CdCl ₂	10

Esta solución fue ajustada a pH 7.3 con TEA-OH

Solución intracelular para el registro la I_{Na}

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	5
TEA-Cl	40
MgCl ₂	5
HEPES	10
CsCl ₂	125
BAPTA-4Cs	1
ATP	3
GTP	0.3
Leupeptina	0.1

Esta solución fue ajustada a pH 7.3 con CsOH

Las células fueron bañadas continuamente con solución externa o de prueba (solución externa más el agonista) a una velocidad de 2 ml/min, por medio de un sistema de perfusión de válvulas múltiples ubicado a una distancia muy cercana a la célula para permitir el intercambio de soluciones en 500 ms.

5.4 Reactivos

Los reactivos utilizados en el presente estudio, fueron adquiridos de las siguientes compañías: L-15 y DMEM (Invitrogen Corp., Carlsband, CA, USA), BAPTA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), BIS-I (HCl), U73122 y U73343 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), diC8-PIP₂ (Echelon, Salt Lake City, UT, USA) MT-7 fue adquirida de Peptides International (Louisville, KY); Calfofostina C por Cayman chemical y el resto de los reactivos (SIGMA, St. Louis, MO, USA).

La Wortmanina, el BIS-I, el BIS-V, el U73122, el U73343 y la calfofostina C se disolvieron en DMSO. La concentración de DMSO en la solución externa no superó el 0.3%. El diC8-PIP₂ es soluble en agua a 1mg/ml. La solución de diC8-PIP₂ fue sonicada en hielo por 35 minutos y posteriormente alicuotada; el U73122, U73343 y el diC8-PIP₂, fueron congelados bajo nitrógeno líquido en criotubos.

6. Resultados

“El mundo del hombre contemporáneo, se funda sobre los resultados de la ciencia: el dato reemplaza al mito, la teoría a la fantasía, la predicción a la profecía”. Mario Augusto Bunge.

6.1 Inhibición dosis-dependiente de las I_{Na} por Oxo-M

Para poder definir una concentración de trabajo de Oxo-M sobre las I_{Na} con una respuesta significativa y comparable con la reportada en las I_{Ca} , se procedió a realizar una curva dosis-respuesta de este agonista en las I_{Na} ; para ello se usaron diferentes concentraciones crecientes de Oxo-M de 1×10^{-6} mM a 1 mM.

Se inició con una concentración de 1×10^{-6} mM de Oxo-M durante 35 segundos, la cual produjo una reducción de la I_{Na} del $3.85 \pm 1.31\%$ ($n=7$) (Fig. 5 C), posteriormente se incrementó la dosis de Oxo-M a una concentración de 1×10^{-3} mM, dicha dosis redujo $11.32 \pm 2.86\%$ las I_{Na} (Fig. 5 D); posteriormente se probó una concentración de 1×10^{-2} mM, la cual indujo una inhibición en las I_{Na} del $15.05 \pm 2.80\%$; a continuación, se aplicó una concentración de 0.1 mM, la cual provocó una inhibición de $71 \pm 9.56\%$ (Fig. 5 E). Por último, se aplicó una concentración de 1 mM, la cual provocó una inhibición del $97.45 \pm 1.15\%$ (Fig. 5 F). A continuación, se muestra una tabla donde se resumen los datos arrojados por un ajuste a la curva dosis-respuesta mediante la ecuación de Hill, $E = \frac{E_{max} C^\alpha}{EC_{50}^\alpha + C^\alpha}$ ecuación [1] (Figs. 5 A y B).

Tabla 1. Parámetros arrojados por la ecuación de Hill al ajuste de la curva dosis-respuesta de Oxo-M en los canales de sodio sensibles a TTX		
EC₅₀	64 μ M	
Coefficiente de Hill	1.0	
Inhibición máxima	1000 μ M	$97.45 \pm 1.15\%$
Concentración de trabajo para las I_{Na}	100 μ M	$71 \pm 9.56\%$
n= 7		

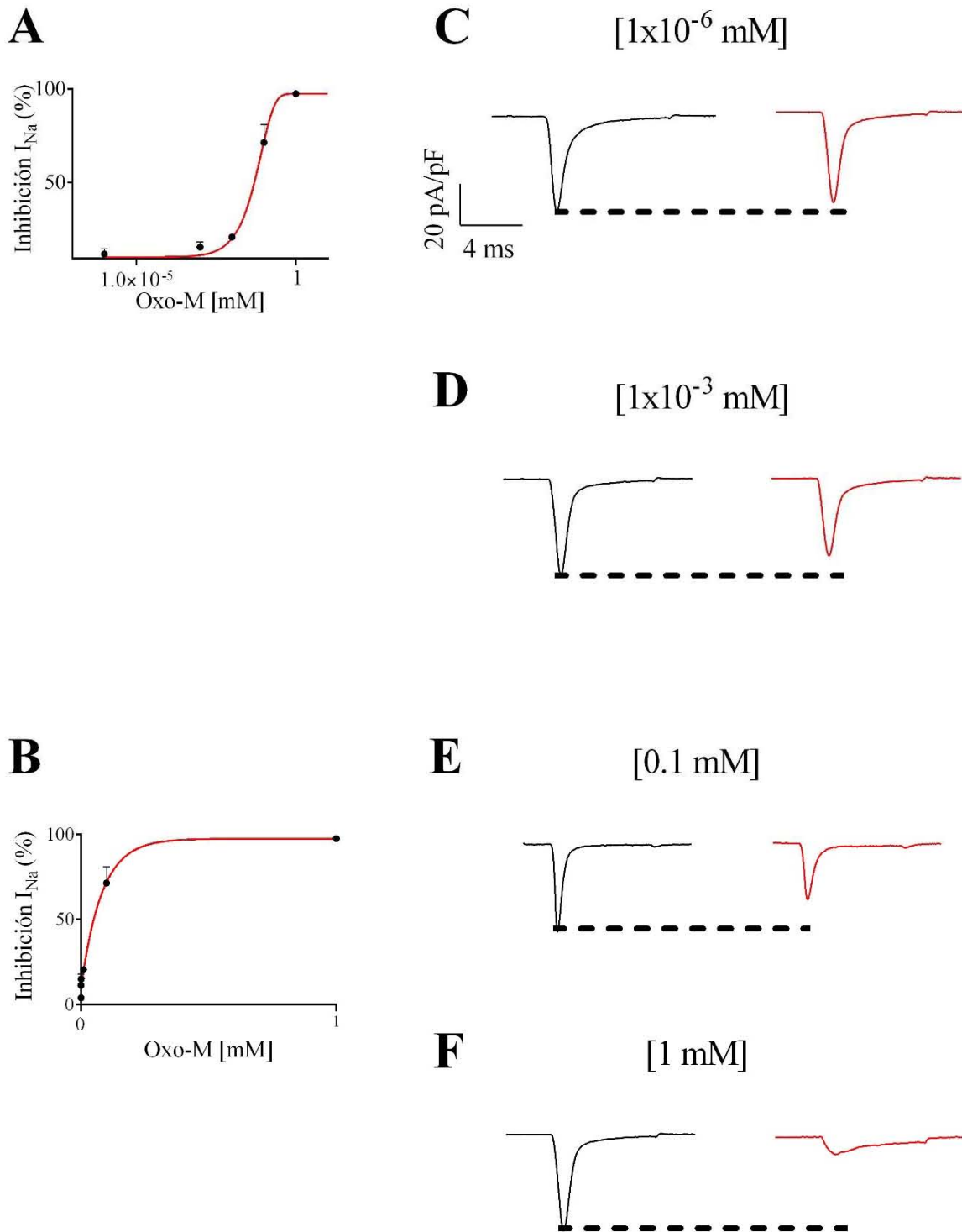


Figura 5. Inhibición dosis-dependiente de la I_{Na} por Oxo-M. En A, se muestra el ajuste de la curva dosis-respuesta mediante la ecuación de Hill, a diferentes concentraciones (1×10^{-6} , 1×10^{-2} , 0.1 y 1 mM). En B, se muestra el porcentaje de inhibición de la I_{Na} por Oxo-M a las concentraciones previamente mencionadas. En C, D, E y F, se muestran los trazos representativos de la I_{Na} en presencia de las diferentes dosis utilizadas para la curva dosis-respuesta.

6.2 Oxo-M inhibe las I_{Na} mediante dos mecanismos.

Se ha reportado que la activación de receptores muscarínicos por Oxo-M, reduce las I_{Ca} mediante dos mecanismos uno rápido y otro lento. Dado que Oxo-M es un agonista inespecífico para receptores muscarínicos, los cuales se encuentran acoplados a diferentes tipos de proteínas G los cuales promueven la activación de diferentes vías de regulación (Beech *et al.*, 1992; Beech *et al.*, 1991; Berstein *et al.*, 1992b), entre los cuales se encuentran los mecanismos SV e IV. Entre las subunidades $G\alpha$ que se encuentran acopladas a receptores muscarínicos en neuronas del SCG, se encuentran las subunidades $G_{i/0}$ para los receptores M2, M4 y $G_{q/11}$ para los M1 (Cruzblanca, 2006). Se ha reportado para los $Ca_v2.2$ que la activación de la vía de señalización por las subunidades $G_{i/0}$, es la delimitada a la membrana y SV (Hille, 1994); mientras que la mediada por las subunidades $G_{q/11}$ activan una vía mediada por un segundo mensajero e IV (Berstein *et al.*, 1992a; Berstein *et al.*, 1992b; Vivas *et al.*, 2013). Dada la estrecha relación evolutiva que existe entre los Ca_v con los Na_v , la regulación inducida por Oxo-M sobre las I_{Ca} podría también estar presente en las I_{Na} .

Para reunir evidencia que sustente dicha hipótesis, se procedió a determinar si la activación de receptores mucarínicos por Oxo-M induce algún cambio en las I_{Na} , de manera similar en la regulación reportada en los $Ca_v2.2$ por el mismo agonista. Para ello, se registraron las I_{Na} mediante la aplicación de un pulso cuadrado, como se muestra en la Figura 4A con las siguientes características: se inició con un pulso de mantenimiento de -100 mV, posteriormente se estimuló las I_{Na} mediante un pulso de prueba de -30 mV; este protocolo fue repetido cada 5 segundos con el fin de evitar la inactivación acumulada de la I_{Na} en presencia de Oxo-M (100 μ M). Durante los primeros 45 segundos se registró la corriente en estado control; al segundo 50, se registró las I_{Na} en presencia de Oxo-M en el baño mediante perfusión extracelular durante 80 segundos. Al aplicar el agonista, se observó un componente rápido (>1 segundo) y un componente lento de inhibición (20-65 segundos). En este experimento, el componente rápido duró aproximadamente 15 segundos después de la aplicación del agonista, obteniéndose un porcentaje de inhibición de las I_{Na} por el componente rápido del $22.05\% \pm 11.69\%$ ($n = 6$) (Fig. 6 D) del total de la I_{Na} . Después de 20 segundos de la aplicación del agonista, inició el componente lento, el cual fue registrado desde el segundo 65 hasta que se dejó de aplicar Oxo-M, el cual fue suspendido a los 130 segundos (65 segundos de aplicación). La inhibición lenta en la I_{Na} después de sustraer la inhibición inducida por

el componente rápido, fue del $28.37\% \pm 3.9\%$ ($n = 6$) (Fig. 6 D), este último componente, no cambió aparentemente las propiedades voltaje-dependientes de las I_{Na} , como se muestra en la relación corriente-voltaje (I-V) de esta corriente en estado estacionario del efecto con Oxo-M ($n = 6$) (Fig. 6 C). La inhibición muscarínica inducida por ambos componentes resultaron ser diferentes estadísticamente con respecto al control.

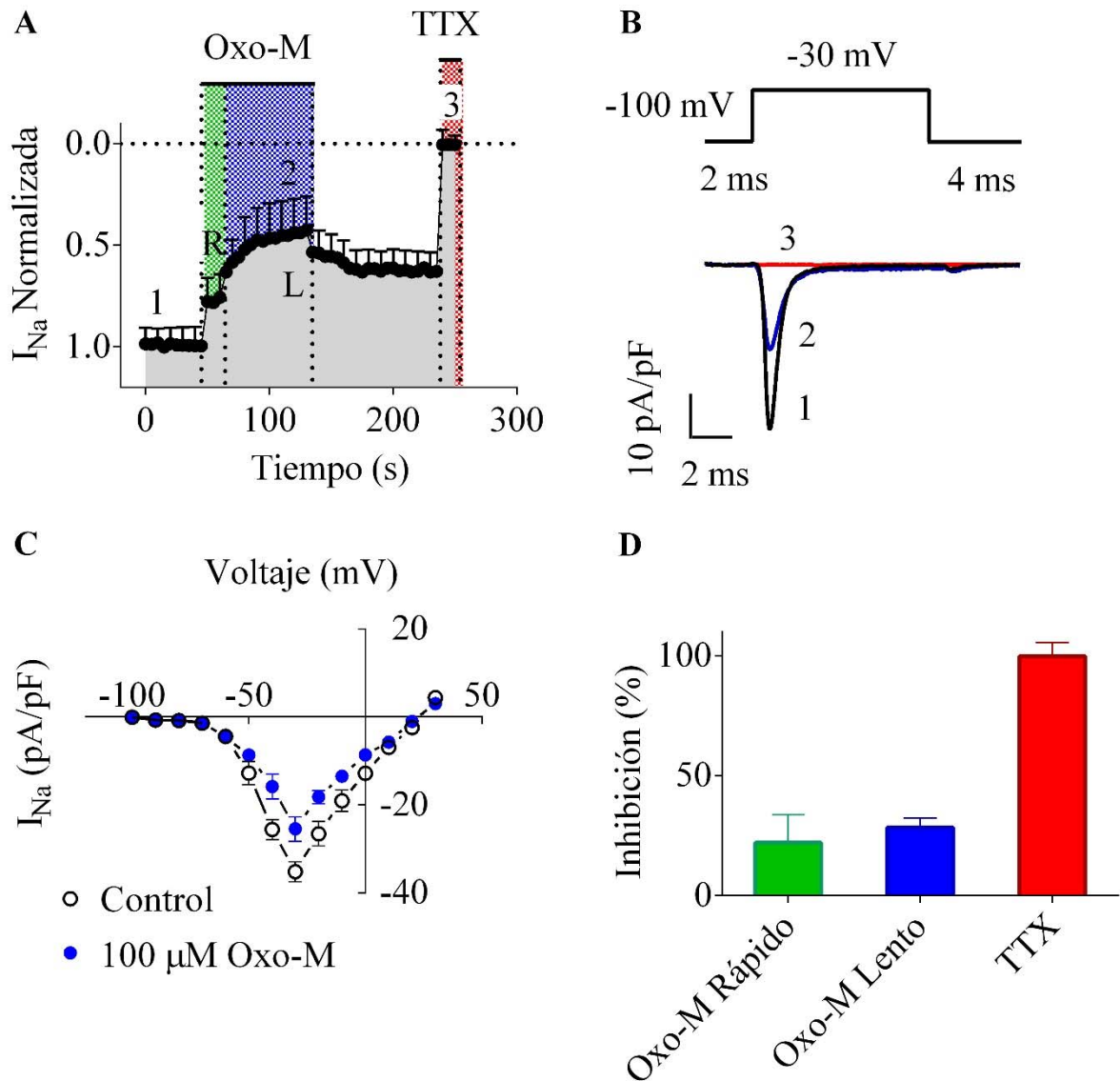


Figura. 6 Inhibición de las I_{Na} por Oxo-M en neuronas SCG. A, Curso temporal de la corriente de sodio por Oxo-M (100 μ M). B, trazos representativos de las I_{Na} en control 1) en presencia de Oxo-M 2) y en presencia de TTX 3). C, curvas I-V de la corriente de sodio sensible a TTX en control (○ círculos abiertos) y en presencia de Oxo-M (● círculos cerrados). D, Porcentaje de inhibición por Oxo-M en las condiciones señaladas en A.

6.3 Angio II inhibe a las I_{Na} mediante dos vías

Se ha reportado que la vía de señalización de la PLC es activada por diferentes receptores de membrana, entre los cuales se encuentran los muscarínicos y los de angiotensina; éstos últimos se encuentran acoplados a proteínas $G\alpha_{q/11}$ (Bai *et al.*, 2004). Los receptores a angiotensina han sido reportados como inductores de la inhibición de la I_M , así como de la I_{Ca} (Brown *et al.*, 1980; Shapiro *et al.*, 1994). Esta última, mediante la activación de un mecanismo IV mediado por un segundo mensajero, semejante a la regulación reportada por la activación de receptores muscarínicos. Así mismo, de nuestro laboratorio existe el antecedente realizado por Hernández Ochoa y colaboradores, donde los I_{Na} en neuronas del SCG son inhibidas en presencia de Angio II (500 nM). Por otra parte, se ha reportado que en las neuronas del SCG, se expresan los receptores a angiotensina AT1 (Shapiro *et al.*, 1994), los cuales se encuentran acoplados a dos tipos de subunidades $G\alpha$: las $G\alpha_{q/11}$ y las $G\alpha_i$ (de Gasparo *et al.*, 2000). Cuya activación puede regular a los I_{Na} mediante una vía similar a la regulación IV reportada en los Cav (Benz *et al.*, 1992; Hernandez-Ochoa *et al.*, 2007).

Para poder establecer si las I_{Na} son reguladas por un mecanismo similar al obtenido por Oxo-M, se procedió a registrar las I_{Na} en presencia de Angio II (500 nM). Durante los primeros 40 segundos, se registraron las I_{Na} en estado control, al segundo 45 se aplicó Angio II en el baño mediante perfusión extracelular, durante 75 segundos. La aplicación del agonista produjo una inhibición con dos componentes: un componente rápido (<1 segundo) desde el segundo 45 al segundo 55 y un componente lento desde el segundo 60 hasta el segundo 120. La duración de cada componente, fue similar a la obtenida en la respuesta con Oxo-M, véase Figura 6 A y Figura 7 A. La inhibición inducida por el componente rápido por Angio II, mostró una reducción de las I_{Na} del $28.32\% \pm 11.86\%$ ($n = 6$) (Fig. 7 D). La inhibición de las I_{Na} obtenida por el componente lento, después de sustraer el componente rápido, fue del $17.0\% \pm 3.14\%$ ($n = 6$) (Fig. 7 D). Este último componente, no cambió aparentemente las propiedades voltaje-dependientes de las I_{Na} , como se muestra en la I-V de esta corriente en estado estacionario del efecto con Angio II ($n = 6$) (Fig. 7 C). Las diferencias entre el componente rápido contra el componente lento mostraron ser diferentes estadísticamente entre sí.

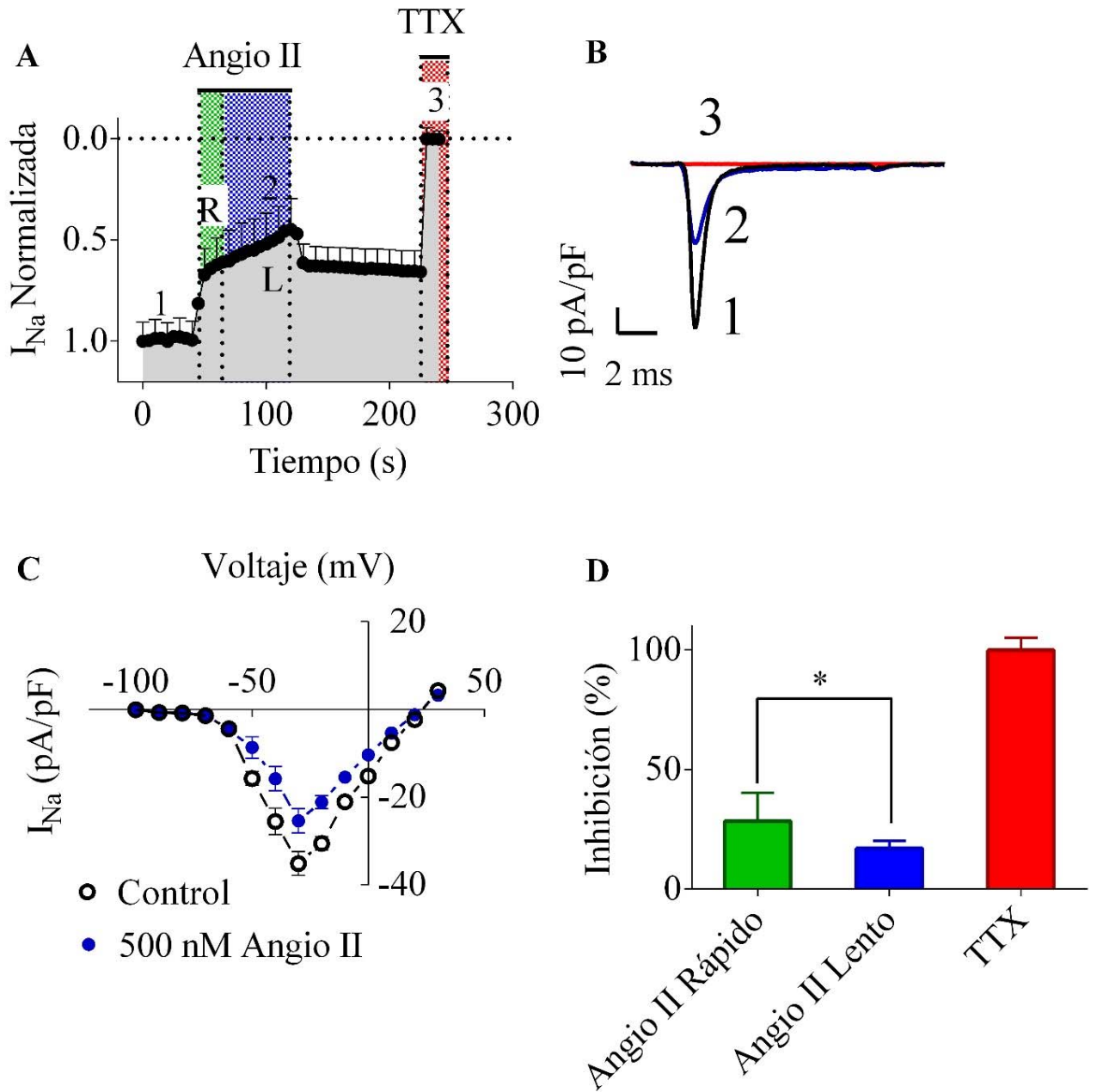


Figura 7. Inhibición de las I_{Na} por Angio II en neuronas SCG. A, Curso temporal de la corriente de sodio por Angio II (500 nM). B, trazos representativos de las I_{Na} 1) en control en presencia de Angio II 2) 3) y en presencia de TTX C, curvas I-V de la corriente de sodio sensible a TTX en control (○ círculos abiertos) y en presencia de Angio II (● círculos cerrados) D, Porcentaje de inhibición por Angio II en las condiciones señaladas A. * ($p < 0.05$).

6.4 Oxo-M inhibe a las I_{Na} mediante la activación de los receptores M1

La toxina muscarínica 7 (MT-7) es el antagonista alostérico más selectivo y no reversible conocido hasta el momento para receptores M1 muscarínicos (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2008), con una constante de inhibición para este receptor de $pK_i=14$ pM (Servent y Fruchart-Gaillard, 2009).

Las neuronas del SCG, expresan de manera nativa a los receptores M1, M2 y M4 (Cruzblanca, 2006); estos receptores se encuentran acoplados a diferentes proteínas G. Los M1 se encuentran acoplados a las proteínas $G_{q/11}$, mientras que los M2 y M4 a las G_0 , y dado que, Oxo-M es un agonista inespecífico para receptores muscarínicos, se propuso determinar si el componente lento inhibitorio en las I_{Na} por Oxo-M, es mediado por la activación del receptor muscarínico M1.

Así también, se propuso determinar la selectividad de la vía de señalización; para ello, se registraron las I_{Na} en presencia de Oxo-M, el cual, produjo una inhibición de las I_{Na} de $42.9 \pm 22.4\%$, ($n = 5$), véase Figura 8 C. Por otra parte, se incubaron neuronas con la toxina MT-7, durante 1 hora previa al registro electrofisiológico a 37°C . Posteriormente, estas neuronas pre-tratadas con la MT-7 fueron perfundidas extracelularmente con Oxo-M, mostrando una inhibición de las corrientes de sodio de $8.72 \pm 12.5\%$, ($n = 6$) (Fig. 8 C). Las diferencias entre la inhibición inducida por Oxo-M + MT-7 mostraron ser estadísticamente significativas con respecto a Oxo-M.

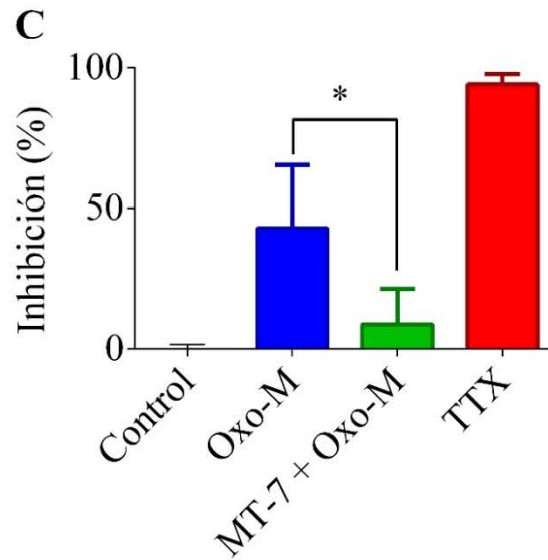
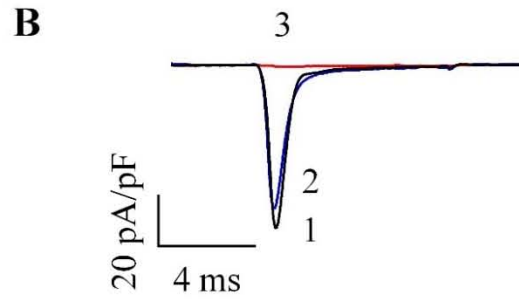
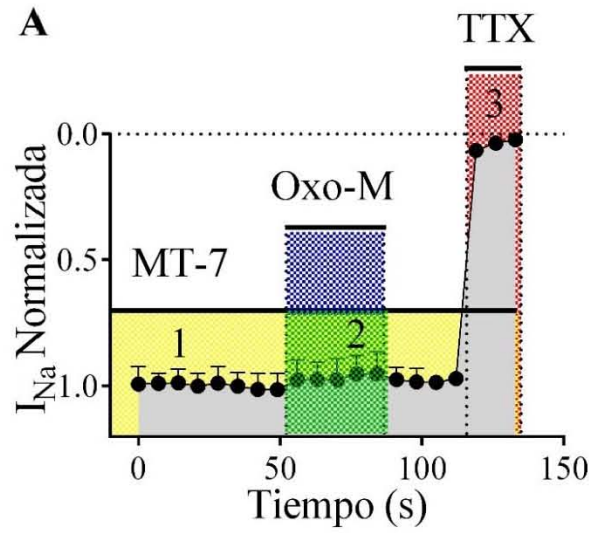


Figura 8. *Oxo-M* inhibe a las I_{Na} mediante la activación de receptores *M1*. A, Curso temporal de neuronas SCGs preincubadas con MT-7 en presencia de *Oxo-M*. B, Trazos representativos en 1) control, 2) *Oxo-M* + MT-7 y 3) TTX. C, porcentaje de inhibición por *Oxo-M* y *Oxo-M* + MT-7. *($p < 0.05$).

Adicionalmente, se pre-incubaron neuronas durante 10 minutos a temperatura ambiente con pirenzepina (Pz) (Fig. 9 A), el cual, es un antagonista selectivo a receptores M1 muscarínicos con una $pK_i = 6.76$ (Matsumoto *et al.*, 1994). Las I_{Na} , mostraron una inhibición de 41.07 ± 22.79 , ($n = 5$) (Fig. 9 C), con Oxo-M y en presencia de Pz, la inhibición de las I_{Na} se redujo a 6.76%, ($n = 5$) (Fig. 9 C). Las medias de los resultados mostraron ser diferentes estadísticamente.

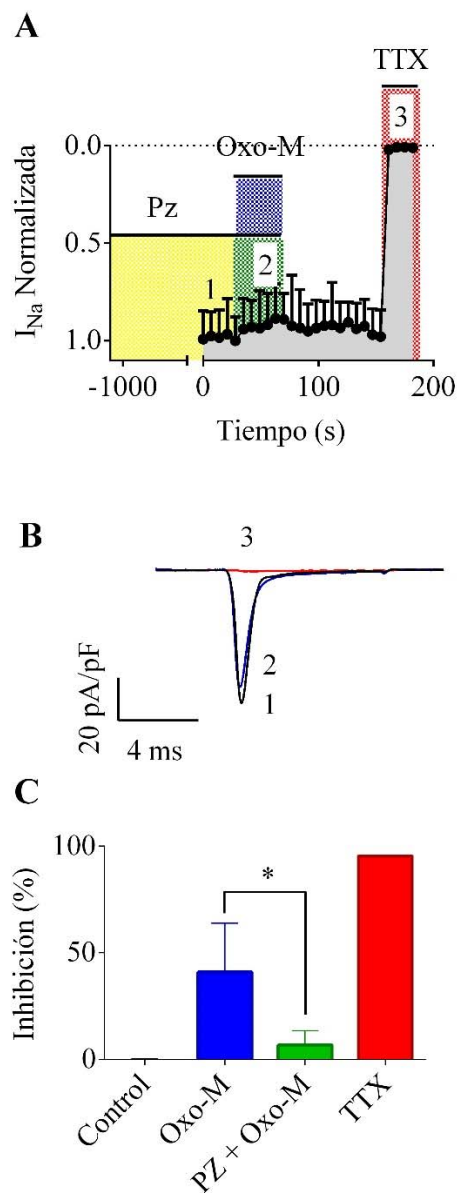


Figura 9. Pz reduce la inhibición de Oxo-M en las I_{Na} . A, Curso temporal de las I_{Na} pre-tratadas con Pz y en presencia de Oxo-M. B, Trazos representativos de las I_{Na} en 1) control, 2) Oxo-M + Pz, 3) TTX. C, Porcentaje de inhibición por Oxo-M. *($p < 0.05$).

6.5 El componente lento por Oxo-M en las I_{Na} es aislado por PTX.

En los Cav2.2 se ha reportado que la regulación extrínseca es mediada por diferentes subunidades $G\alpha$ acopladas a GPCRs, las cuales, activan distintas vías de señalización (Hille, 1994). Éstas pueden ser disecadas mediante la presencia de toxinas que inhiben la activación de las $G\alpha$ de la familia G_i/G_0 mediante la catalización del ADP. Una de estas toxinas, es la PTX, la cual se ha reportado como una inhibidora de algunas proteínas G (Beech *et al.*, 1992).

Las proteínas $G_{q/11}$, son responsables de la activación de la regulación IV en los Cav, en la que se involucra a un segundo mensajero y muestran resistencia a la toxina PTX (Berstein *et al.*, 1992b; del Rio *et al.*, 1999; Vivas *et al.*, 2013); de lo anterior, se propuso determinar si el componente lento inhibitorio inducido por Oxo-M en las I_{Na} , es aislado mediante la toxina pertussis de manera análoga a la regulación muscarínica en los Cav2.2 (Beech *et al.*, 1992). Para ello, se procedió a incubar a las neuronas del SCG con la PTX (500 ng/ml) durante 12 horas previas al registro celular (Beech *et al.*, 1992), para después inducir la inhibición de las I_{Na} por la presencia de Oxo-M.

El registro control de las I_{Na} fue obtenido desde el segundo 0 hasta los 35 segundos. Posteriormente, se aplicó Oxo-M 100 μ M en el baño mediante perfusión extracelular desde el segundo 40 y hasta los 115 segundos, con una duración de aplicación del agonista de 75 segundos, el cual indujo la inhibición de las I_{Na} con un solo componente, como se observa en la Figura 10 A, eliminando el componente rápido. El componente lento expresado redujo la corriente de sodio normalizada un $26.39\% \pm 11.04\%$ ($n = 6$) (Fig. 10 C), este resultado es similar al obtenido en la Figura 6. Los resultados obtenidos muestran que la respuesta lenta es aislada bajo el tratamiento con la PTX, por lo tanto, esta respuesta es mediada por la activación de proteínas G insensibles a PTX, de manera similar a la reportada en los Cav2.2 (Beech *et al.*, 1992). La diferencia entre la inhibición lenta en las I_{Na} por Oxo-M en ausencia de PTX *versus* en presencia de la toxina no mostraron diferencias estadísticas.

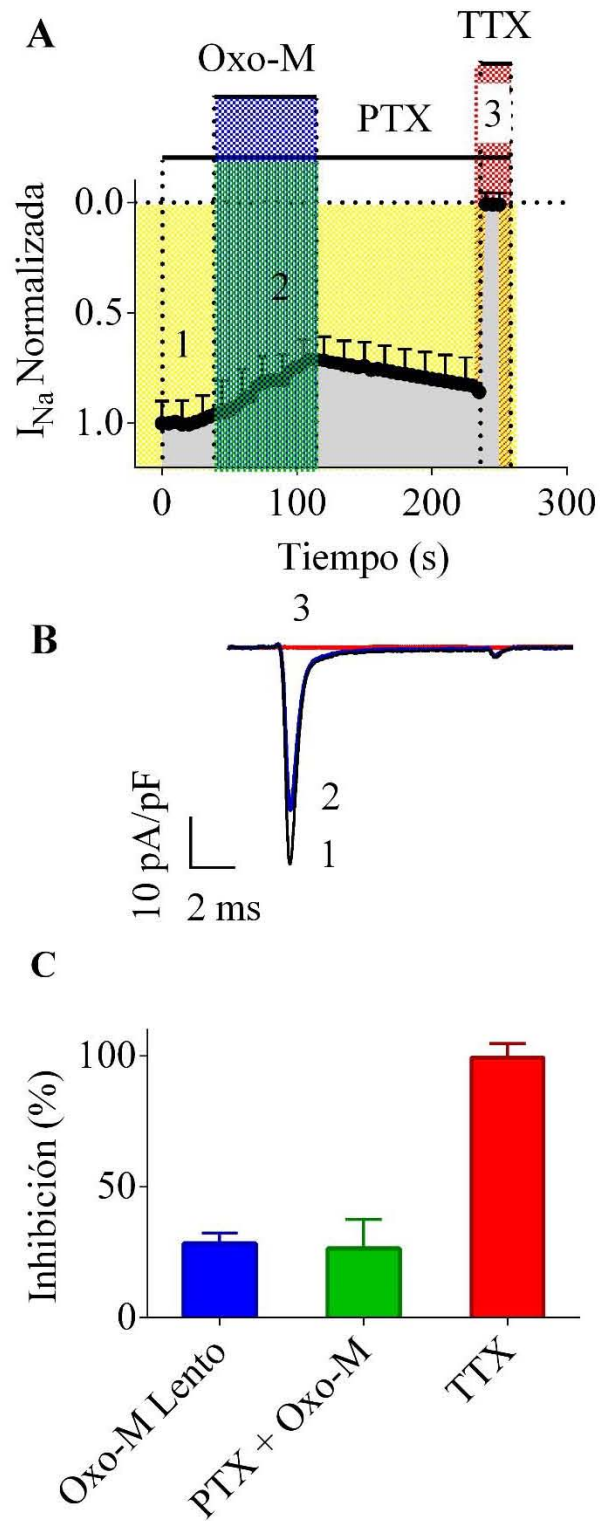


Figura 10. Aislamiento de la inhibición lenta muscarínica las I_{Na} mediante incubación con la PTX. A, Curso temporal de las I_{Na} por Oxo-M (100 μ M) previamente incubadas con PTX (500 ng/ml). B, trazos representativos de la I_{Na} en 1)

control 2) Oxo-M y 3) TTX. C, Porcentaje de inhibición de Oxo-M mediante sustracción analógica del componente rápido y en presencia de PTX. *7.6 Aislamiento del componente lento inhibitorio de angio II por PTX en las corrientes de sodio sensibles a TTX*

Por otra parte, con el propósito de determinar si el componente lento inhibitorio en las I_{Na} por la activación de receptores a angiotensina es mediado por proteínas G insensibles a PTX, se procedió a registrar a las neuronas del SCGs incubadas 12 horas previas al registro con PTX con 500 ng/ml. En estas condiciones, se registraron las I_{Na} en presencia de Angio II 500 nM en el baño mediante perfusión extracelular. El curso temporal duró 250 segundos, el control se registró desde el segundo 0 al 45; posteriormente se registraron las I_{Na} en presencia de Angio II desde el segundo 50 hasta los 145 segundos (95 segundos) bajo estas condiciones, las I_{Na} mostraron una inhibición por Angio II con un solo componente, como se observa en la Figura 11 A, del cual se obtuvo una inhibición de las corrientes de sodio de $19.04\% \pm 11.66\%$ ($n = 6$) (Fig. 11 C). La inhibición del componente lento por la Angio II después de sustraer el componente rápido, inhibe a la corriente de sodio un $17.0\% \pm 3.14\%$ Figura 7 C, ambas medias no fueron diferentes estadísticamente.

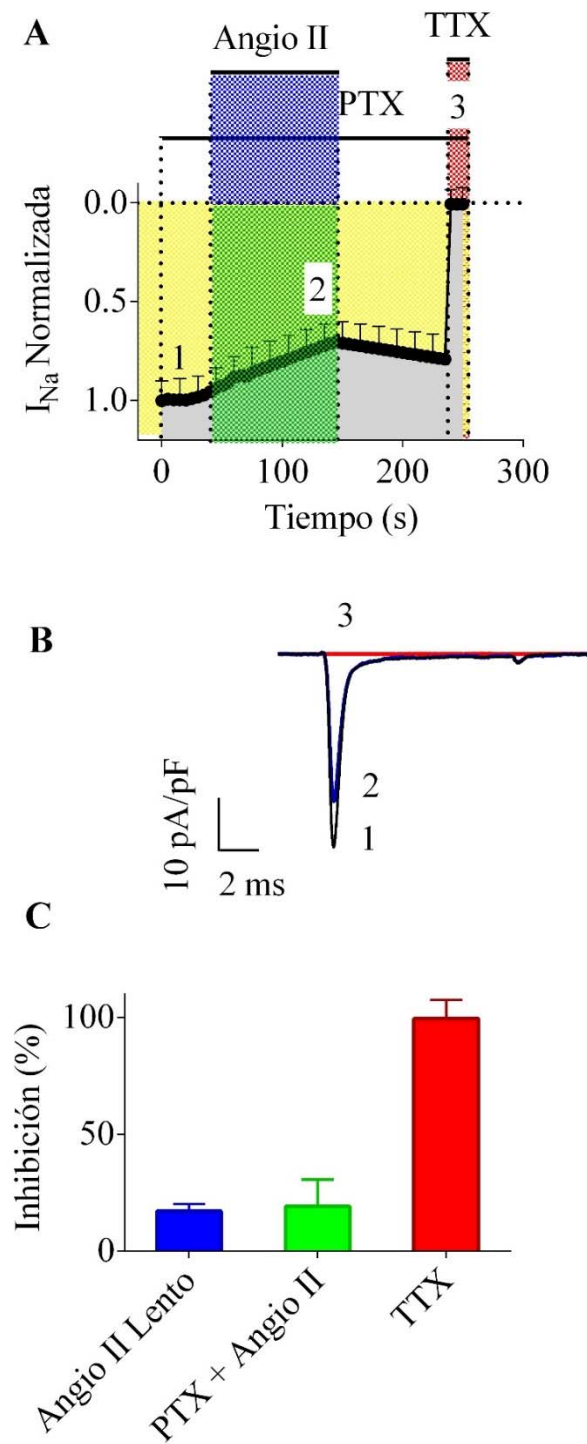


Figura 11. Aislamiento del componente lento inhibitorio de las I_{Na} por Angio II mediante incubación con la PTX. A, Curso temporal de la corriente de sodio en presencia de Angio II (500 nM) previamente incubadas con PTX (500 ng/ml). B, trazos representativos de la corriente de sodio en 1) control, 2) en presencia de Angio II, y 3) en presencia de TTX. C) Porcentaje de inhibición de Angio II mediante sustracción analógica del componente rápido y en presencia de PTX.

6.6 Inhibición de las I_{Na} por Oxo-M es prominentemente insensible al voltaje

En los Cav2.2 se ha reportado que mediante el uso del paradigma experimental del protocolo de prepulsos la inhibición de las I_{Ca} por Oxo-M es prominentemente IV (Vivas *et al.*, 2013). Para determinar si esta regulación en las I_{Na} por Oxo-M utiliza un mecanismo prominentemente IV análogo al descrito en las I_{Ca} , se aplicó un protocolo de prepulsos donde P1 es un pulso de prueba para generar la corriente control. Este pulso inició con un potencial de mantenimiento de -100 mV durante 10 ms; posteriormente se aplicó un voltaje de -30 mV durante 5 ms; para separar el prepulso del P1. Posteriormente se utilizó un pulso de 1 segundo a -100 mV seguido del pulso despolarizante de +125 mV durante 25 ms. El propósito de este pulso es remover transitoriamente a las subunidades $G\beta\gamma$ unidas a la subunidad α del canal al cual están regulando (Herlitze *et al.*, 1996). A continuación, se hiperpolarizó la membrana celular a -125 mV, con el propósito de evitar que mayoría de la población de canales pase al estado inactivado; se aplicó durante 25 ms este tiempo es tiempo suficiente para evitar que la mayoría de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G se vuelvan a unir a los canales regulados por éstas (Elmslie *et al.*, 1990). Por último, se aplicó el pulso de prueba P2, el cual reproduce las características de P1 (Fig. 12 A).

El IF obtenido, fue el resultado del cociente de la corriente al pico generada por el P2 sobre la corriente al pico generada por el P1 ($P2/P1$), el cual tuvo un promedio en las corrientes generadas por la corriente control de 0.92 ± 0.2 ($n = 17$) (Fig. 12 C) y en presencia de Oxo-M de 0.88 ± 0.1 ($n = 10$) (Fig. 12 C) las diferencias de los IF obtenidos en control versus en presencia de Oxo-M mostraron no ser estadísticamente diferentes.

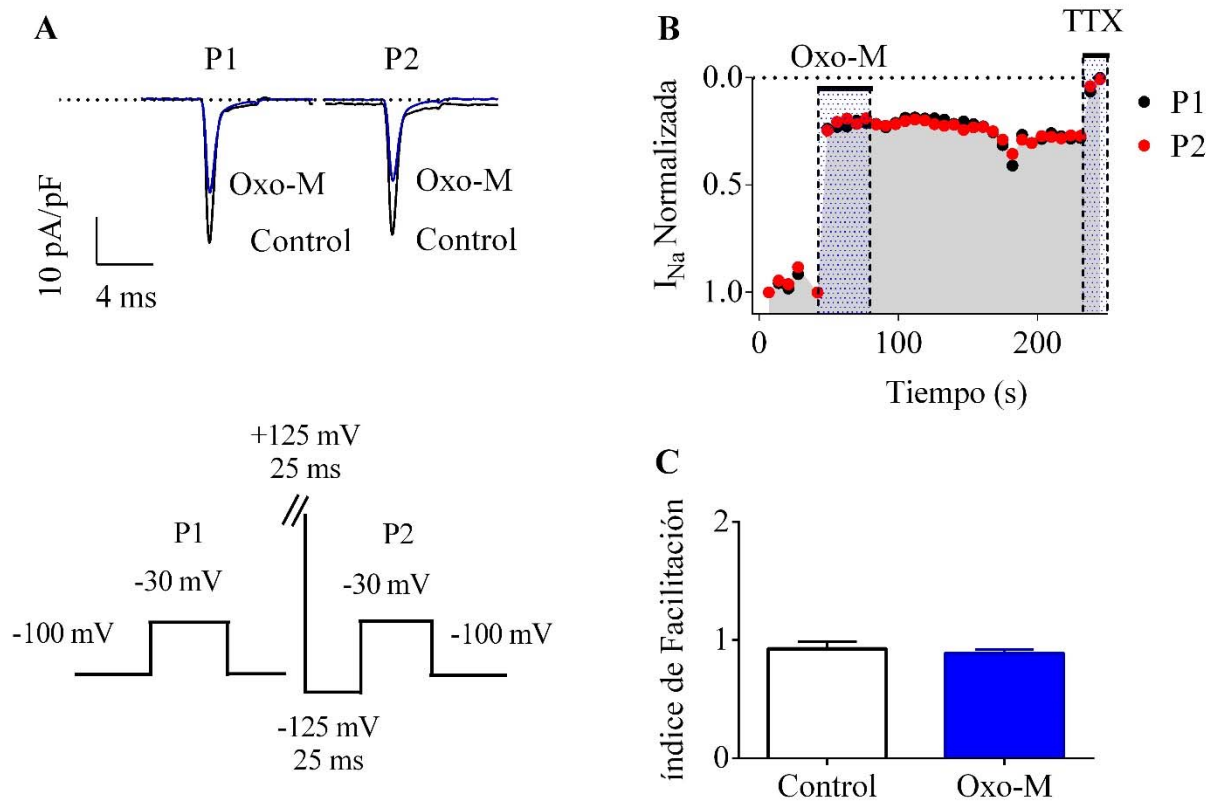


Figura 12. Inhibición IV de las I_{Na} por Oxo-M. A, Se muestran los trazos representativos obtenidos del protocolo de prepulso (abajo). B, Curso temporal de las corrientes de sodio generadas por el protocolo de prepulsos en presencia de Oxo-M. C, IF en control (abierto) $n=17$ versus Oxo-M (azul) $n=10$.

6.7 La inhibición de las I_{Na} por Oxo-M no altera la activación e inactivación de los Nav

Dado que la inhibición inducida por Oxo-M se ha reportado que es prominentemente un fenómeno IV que no altera significativamente las curvas de activación e inactivación, se propuso investigar si la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M modifica las curvas de activación e inactivación en estado estacionario de los canales de sodio; para ello, se registraron las I_{Na} mediante un protocolo h infinito, con el objetivo de medir la inactivación en estado estacionario de los Nav. El protocolo consistió en un pulso de mantenimiento de -80 mV durante 500 ms, seguido de un pulso de -30 mV durante 10 ms; posteriormente se aplicó un pulso de -130 mV durante 500 ms seguido de una serie de 10 pulsos de -130 mV durante 500 ms con un $\Delta V = 20$ mV; este tiempo es suficiente para llevar a los Nav en estado estacionario inactivado (Schofield y Ikeda, 1988). Posteriormente se aplicó un pulso de prueba de -30 mV durante 10 ms y por último se regresó al pulso de mantenimiento a -80 mV durante 500 ms dicho protocolo se ilustra en la Figura 13 B.

Mientras que la curva de activación, fue construida a partir del protocolo utilizado para generar la relación corriente-voltaje. Las curvas de activación e inactivación, fueron ajustadas a una función de Boltzmann [2] $I = I_{\max} / \{1 + \exp[(-V + V_h)/k]\}$.

Los parámetros arrojados por la ecuación de Boltzmann, se muestra en la tabla 4, los cuales no resultaron ser estadísticamente significativos.

	$V_{\frac{1}{2}} \text{ (mV)}$	$k \text{ (mV)}$
<i>Control</i>	-35.44 ± 0.96	1.5 ± 0.31
<i>Oxo-M</i>	-31.99 ± 0.56	5.75 ± 0.40

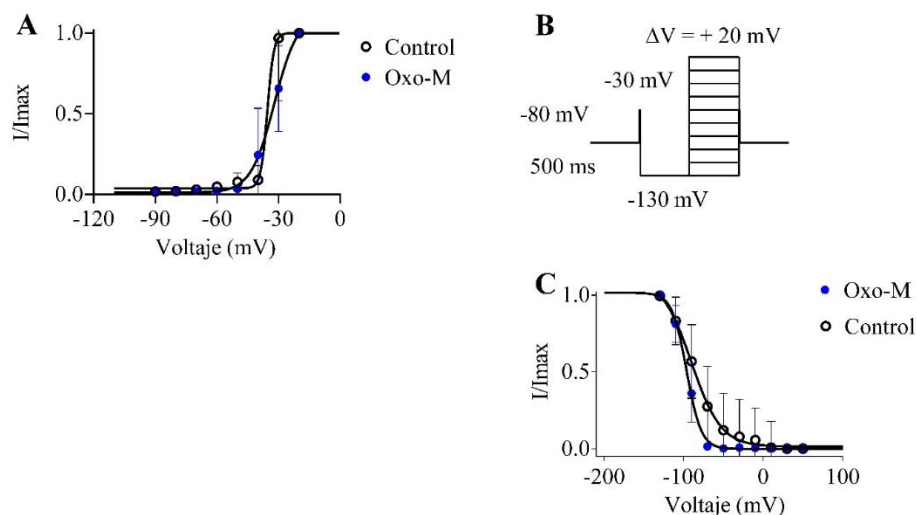


Figura 13. *Oxo-M* no altera la activación e inactivación de los Na_v . A, Curva de activación en control (○) y en presencia de *Oxo-M* (●). B, Protocolo h infinito utilizado para generar la curva de inactivación en estado estacionario. C, Curva de inactivación en estado estacionario en control (○) y en presencia de *Oxo-M* (●).

6.8 Reducción de la inhibición por *Oxo-M* en las I_{Na} por U73122

Se ha reportado que algunos receptores muscarínicos activan a la vía de señalización de la PLC β 1 a través de las proteínas $G\alpha_{q/11}$ (Berstein *et al.*, 1992a; Lee *et al.*, 1992; Caulfield y Birdsall, 1998), la cual provoca la inhibición de los canales KCNQ, Cav2.2 y Cav2.3, caracterizada por ser una respuesta lenta, debido a que involucra varios intermediarios, como son la activación de: receptores

por agonistas específicos, proteínas G y fosfolipasas específicas que generan la hidrólisis de PIs (Suh y Hille, 2005; Falkenburger *et al.*, 2010).

La PLC pertenece a una familia de proteínas cuya función es la hidrólisis de fosfoinosítidos en la membrana celular. Esta fosfolipasa es activada por las proteínas $G_{q/11}$ (Smrcka *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992) disminuye la concentración de PIP_2 en la membrana celular. Éstos al ser hidrolizados, inducen cambios en la función de sus proteínas blanco (Zhang *et al.*, 2003; Vivas *et al.*, 2013). Para investigar si en la inhibición muscarínica de las I_{Na} se encuentra involucrada la activación de la PLC, se procedió a utilizar el inhibidor (U73122) de la PLC, el cual fue aplicado en el baño mediante perfusión extracelular a una concentración de $3 \mu M$. A esta concentración se ha reportado que se impide el efecto inhibitorio de la I_M por Oxo-M (Suh y Hille, 2002). Los cursos temporales (los tiempos de aplicación se utilizaron de igual manera en la aplicación de U73122 y su análogo inactivo, el U73343) duraron 800 segundos, los controles se registraron desde el segundo 0 hasta los 80 segundos. Posteriormente, se aplicó desde el segundo 85 hasta el segundo 355 (270 segundos), el U73122 o U73342, según sea el caso. A continuación, se aplicó $100 \mu M$ de Oxo-M desde segundo 360 hasta el segundo 500 (140 segundos). Los resultados obtenidos, muestran que el efecto inhibitorio por Oxo-M sobre las I_{Na} fue de un $4.19\% \pm 5.89\%$ ($n = 6$) (Fig.14 E), en presencia del inhibidor de la PLC; el U73122 (Fig. 14 A). Por contraparte, en presencia del análogo inactivo, el U73343 (Fig. 12 B), mantiene la inhibición muscarínica sobre las I_{Na} $26.88\% \pm 2.27\%$ ($n = 6$) (Fig. 14 E). Las diferencias de la inhibición por Oxo-M en presencia de U73122 y con U73343, resultaron ser estadísticamente significativas ($*p < 0.05$).

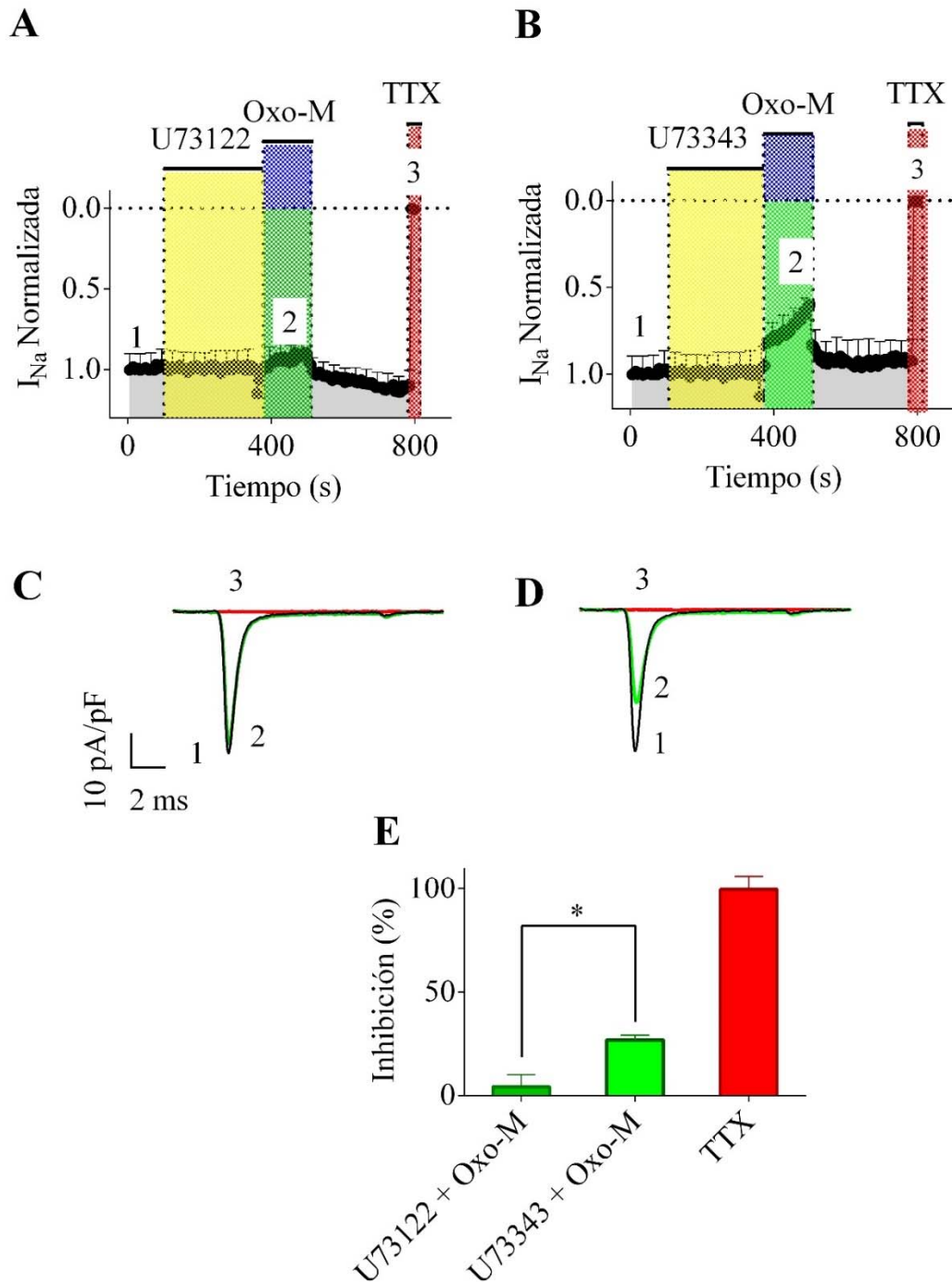


Figura 14. Inhibición de las I_{Na} por Oxo-M requiere de la activación de la PLC. A, curso temporal de las corrientes de sodio en 1) control, 2) en presencia de Oxo-M, previamente expuesta al U73122 y 3) TTX. B, curso temporal de las corrientes de sodio en 1) control, 2) en presencia de Oxo-M, previamente expuesta al análogo inactivo U73343 y 3) TTX. C, Trazos representativos de las corrientes de sodio tomados en las condiciones anteriormente mencionadas en A. D, Trazos representativos de las corrientes de sodio tomados en las condiciones anteriormente mencionadas en B de los cursos temporales, los números representan las condiciones previamente descritas. E) Porcentaje de inhibición de Oxo-M en presencia de U72122 y U73343.

6.9 La inhibición en las I_{Na} por Oxo-M no requiere de la activación de PKC.

Las I_{Na} , han sido ampliamente estudiadas bajo la regulación de la PKC, cuya característica de esta regulación es aumentar las corrientes de sodio mediante la fosforilación en el residuo de serina 1479 del dominio III-IV de la subunidad α de estos canales (Tan *et al.*, 2014); dado que la vía de señalización acoplada a los receptores muscarínicos M1, en la cual, se degradan fosfoinosítidos, y se generan los segundos mensajeros IP_3 y DAG. Éste último, activa a la PKC (Lee y Bell, 1991), y como resultado, la fosforilación de los residuos de los canales de sodio y por ende el incremento de la amplitud de la corriente. Por esta razón, se pretendió descartar a la PKC de la inhibición inducida por Oxo-M en las I_{Na} . Con este propósito, se pre-incubaron las células durante 10 minutos con 100 nM de un inhibidor de PKC, el bisindolilmaleimida I (BIS-I) (Garcia *et al.*, 1998). El BIS-I, presenta un pK_i de 14 nM para el ATP (Toullec *et al.*, 1991).

Las células perfundidas con Oxo-M, mostraron una inhibición en las I_{Na} de $52.89 \pm 14.5\%$ ($n=4$) (Fig. 15 C), *versus* las células tratadas con BIS-I, mostraron una inhibición en las I_{Na} de $41.42 \pm 9.6\%$ ($n=8$) (Fig. 15 A y C) y con BIS-V de $34.42 \pm 11.02\%$ ($n=5$) (Fig. 15 C). Los promedios de Oxo-M *versus* BIS-I, no mostraron ser estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Por lo que no interviene la activación de PKC en la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M.

Por otra parte, dado que la activación de la cascada de señalización que involucra la hidrólisis del PIP_2 genera otros segundos mensajeros, como es el DAG, el cual, se ha mostrado que regula las corrientes de sodio en cerebro de rata (Cantrell *et al.*, 1996); por otra parte, como se mostró en el experimento anterior, al utilizar un inhibidor que compite por ATP con la PKC para fosforilación, BIS-I (Garcia *et al.*, 1998), Oxo-M mantiene su inhibición. Sin embargo, se ha reportado en la I_M que utilizar BIS-I como inhibidor de la PKC no es suficiente argumento para descartar a esta enzima en la inhibición por Oxo-M, dado que al utilizar un inhibidor de PKC, como la calfoestina C (Cal-C), cuyo mecanismo de acción es mediante el impedimento del DAG a su sitio de unión con la PKC, evita su activación y, por lo tanto, la inhibición por Oxo-M en las I_M , se altera, (Boehm *et al.*, 1996; Hoshi *et al.*, 2010).

Para investigar si se activa la PKC por DAG se lleva a cabo aún mediante el bloqueo del sitio de unión del DAG con la PKC. Se trataron las células mediante preincubación extracelular con Cal-C 100 nM, durante 10 minutos previos al registro celular. Posteriormente, se registraron las I_{Na} , en

presencia de Cal-C como control durante 35 segundos, en presencia de Oxo-M 100 μ M durante 45 segundos, lavado durante 70 segundos y en presencia de TTX 100 nM durante 21 segundos.

La inhibición de Oxo-M sobre las I_{Na} fue de $54.48 \pm 8.64\%$ ($n = 3$) (Fig. 16 C), mientras que en presencia del inhibidor de PKC, Cal-C, fue de $47.32 \pm 10.50\%$ ($n = 6$) (Fig. 16 A y C), mediante una prueba de t de Student, las diferencias en las medias resultaron no ser estadísticamente significativas. Lo cual implica que en esta regulación no se requiere la activación de PKC.

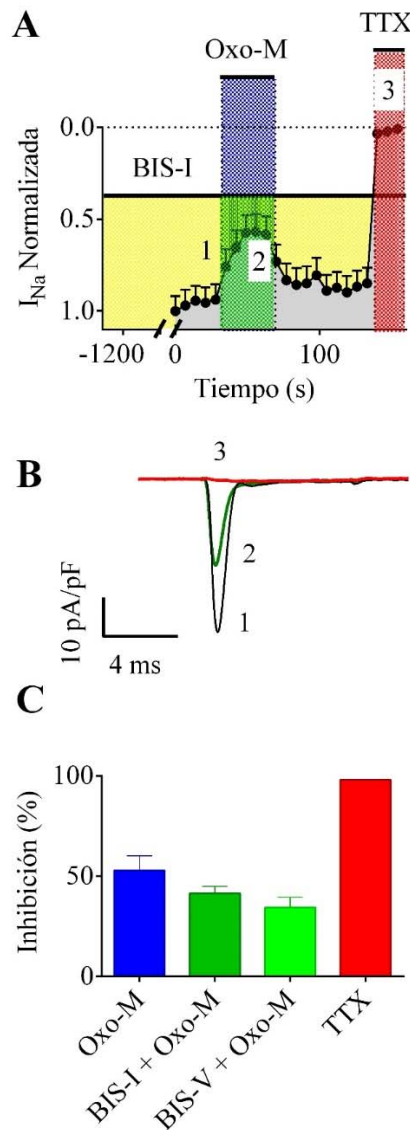


Figura 15. La inhibición de las I_{Na} por Oxo-M no requiere de la activación de PKC. En A, Se muestra el curso temporal de las I_{Na} en neuronas tratadas con BIS-I en presencia de Oxo-M 1) Control. 2) BIS-I y Oxo-M y 3) TTX. B, Trazos representativos en 1) control, 2) Oxo-M y BIS-I y 3) TTX. C, Porcentaje de inhibición de Oxo-M en presencia de BIS-I o BIS-V.

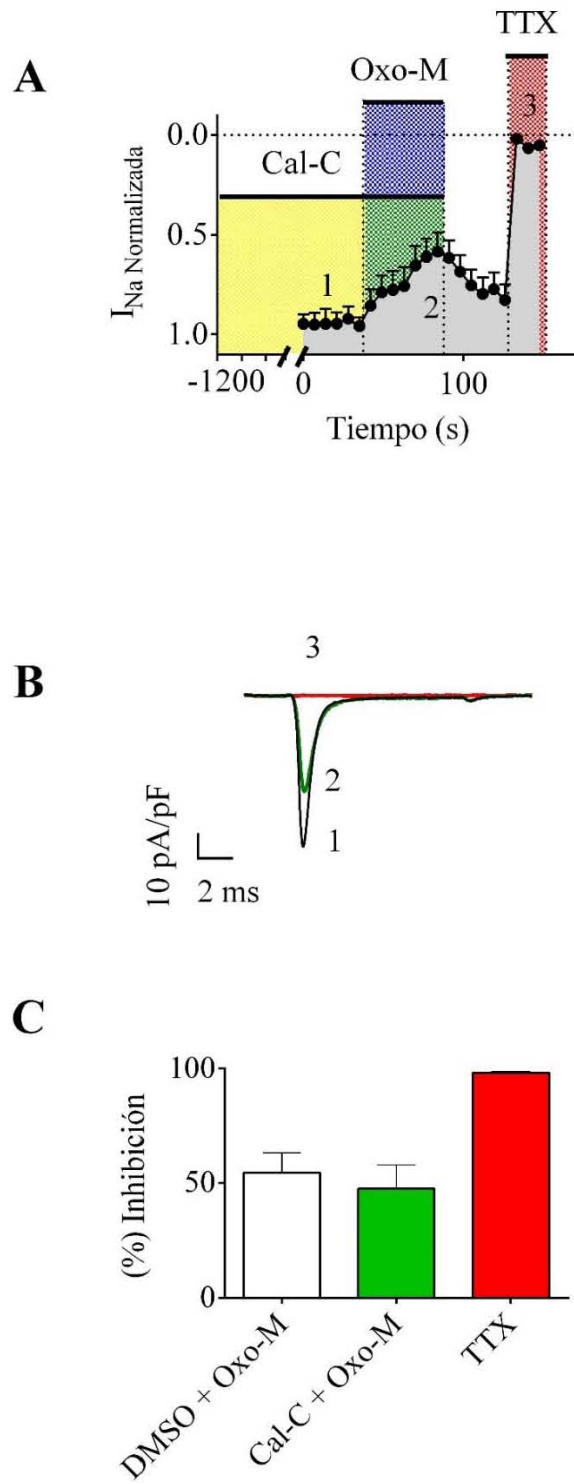


Figura 16. La inhibición de PKC mediante Cal-C, no altera la reducción de las I_{Na} por Oxo-M. En A, Se muestra el curso temporal de las I_{Na} en neuronas tratadas con Cal-C y en presencia de Oxo-M en 1) control, 2) Cal-C y Oxo-M y 3) TTX. B, trazos representativos en 1) control, 2) Oxo-M y Cal-C y 3) TTX. C Porcentaje de inhibición de Oxo-M en presencia de Cal-C.

6.10 Wortmanina impide la recuperación de la inhibición en las I_{Na} por Oxo-M

Se ha reportado que la aplicación del inhibidor, wortmanina, de las PI3K y PI4K evita la recuperación de la I_M y la I_{Ca} por Oxo-M (Suh y Hille, 2002; Vivas *et al.*, 2013), esto sugiere que en el proceso de la recuperación de estas corrientes iónicas se requiere de la concentración disponible de PIs en la membrana celular.

Para obtener evidencias experimentales que sugieran que la recuperación de la inhibición de las I_{Na} inducida por Oxo-M requiere de la resíntesis de Pis, se procedió a incubar las neuronas con (500 ng/ml) de PTX 12 horas previas al registro celular en presencia del inhibidor wortmanina mediante perfusión extracelular a una concentración de 50 μ M (Suh y Hille, 2002).

El control se realizó desde el segundo 0 hasta los 25 segundos. Posteriormente se realizó la aplicación de Oxo-M desde el segundo 30 al segundo 50 (20 segundos). A continuación, se realizó un lavado desde el segundo 55 al segundo 130 (75 segundos) mostrando un porcentaje de recuperación del $23.07\% \pm 8.60\%$ ($n = 6$) (Fig. 17 C). Al término del lavado se empezó la aplicación de wortmanina (desde el segundo 135 hasta los 800 segundos (665 segundos) dentro de este intervalo, se realizó la segunda aplicación de Oxo-M, desde el segundo 360 a los 385 segundos (25 segundos). Por último, se realizó un lavado desde el segundo 390 al segundo 785 (395 segundos) (Fig. 17 A), mostrando un porcentaje de recuperación del $0.12\% \pm 9.3\%$ ($n = 6$) (Fig. 17 C). La diferencia obtenida entre la recuperación control *versus* la recuperación con wortmanina fue estadísticamente significativa ($*p < 0.05$).

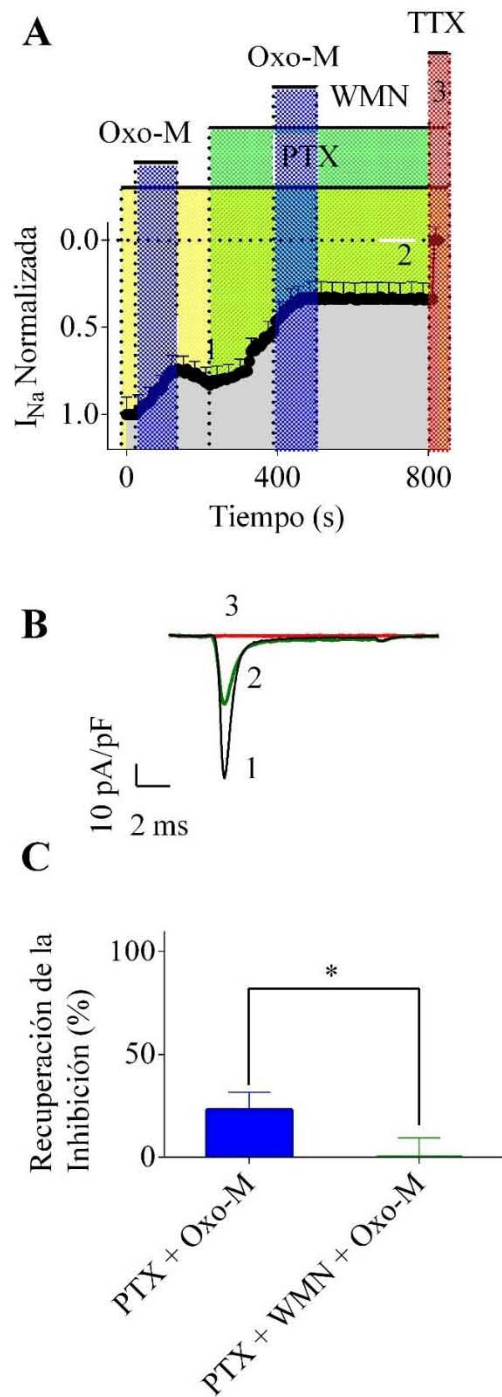


Figura 17. La recuperación de la inhibición de la I_{Na} por Oxo-M requiere de la activación de PIK. A, Curso temporal de la corriente de sodio sensible a TTX previamente incubadas con PTX (500 ng/ml) en control y en presencia de Oxo-M, 1) durante el primer lavado, en tratamiento con el inhibidor, wortmanina, de cinasas, y en presencia de Oxo-M, 2) durante el segundo lavado y, 3) en presencia de TTX. B, Trazos representativos de las I_{Na} en 1) primer lavado después de la aplicación de Oxo-M, 2) segundo lavado de Oxo-M y 3) TTX. C, Porcentaje de recuperación de las I_{Na} por Oxo-M en presencia de wortmanina.

6.11 La inhibición de las I_{Na} por Oxo-M es reducida por PLL

Se ha reportado que algunos fosfolípidos aniónicos regulan a canales iónicos mediante la interacción electrostática entre estos fosfolípidos y los canales al exponer sus residuos de aminoácidos básicos al ambiente lipídico. Asimismo, si el ambiente lipídico es alterado, la función de las proteínas cambia (Schmidt *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Se ha reportado que algunos policationes como la neomicina, la PLL y iones polivalentes como el Mg^{2+} y el Al^{3+} , pueden interaccionar electrostáticamente con el PIP_2 e inducen un enmascaramiento de las cargas negativas del lípido por la presencia de los policationes (Toner *et al.*, 1988; Gabev *et al.*, 1989). Dichos enlaces interrumpen la interacción electrostática directa que ocurre entre el PIP_2 con las proteínas con las que interactúa, entre ellas canales iónicos y la PLC (Wang *et al.*, 2005; Suh y Hille, 2007). El ejemplo más estudiado de las interacciones electrostáticas del PIP_2 con canales iónicos, es sobre la I_M , donde la interrupción de la interacción entre el PIP_2 con el canal por cationes, provoca la inhibición de la corriente, cuyo efecto es dependiente de la concentración y del número de cargas del catión (Suh y Hille, 2007). Dado que esta interacción ocurre entre el PIP_2 y un polication, todas las proteínas que se unen al PIP_2 mediante interacción electrostática, ya no pueden interactuar con el fosfolípido, como es el caso de la PLC o los canales iónicos; se ha reportado que la PLC presenta un dominio denominado PH, el cual presenta aminoácidos básicos responsables de la interacción electrostática entre la PLC y el PIP_2 ; permitiendo a la PLC reconocer a su sustrato (Harlan *et al.*, 1994; Yagisawa *et al.*, 1998) al impedir dicho reconocimiento mediante la interacción electrostática (McDonald y Mamrack, 1995; Nostrandt *et al.*, 1996; Verstraeten *et al.*, 2003) se evita la hidrólisis del PIP_2 (Verstraeten y Oteiza, 2002; Wang *et al.*, 2005). Con los argumentos anteriores, se propuso identificar si la regulación muscarínica de las I_{Na} depende del PIP_2 y si ésta puede ser interrumpida por la presencia de policationes. Para ello, se realizó la perfusión intracelular de 50 μM con PLL vía la pipeta de *patch*, para poder realizar las mediciones en la misma célula en condiciones control y en presencia de PLL, se utilizó la técnica de microperfusión para el recambio de solución control por la solución con PLL, separadas por una burbuja de aire, sin que ésta alterara la resistencia del sello (Kakei y Ashcroft, 1987). Los resultados sugieren que las I_{Na} decaen con respecto al tiempo, hasta llegar a un punto de saturación. A la curva de inhibición se le ajustó una función para obtener el tiempo de inhibición a la cual la corriente decae 50% (t_{INa50}) (Fig. 18 A), este tiempo ocurre aproximadamente a los 5 minutos (295 s). El segundo 0 es el tiempo promedio en el cual empezó a inhibirse la corriente de sodio en presencia de PLL.

Posteriormente, se procedió a realizar la medición al tiempo de $t_{\text{INa}50}$ en presencia de Oxo-M, con el objeto de relacionar la cascada de señalización que involucra al PIP_2 , en presencia de PLL y si ésta interrumpe la señalización al activar a los receptores muscarínicos. Por lo que se procedió a registrar a las I_{Na} en presencia de Oxo-M y PLL.

El curso temporal tuvo una duración de 500 segundos más 100 segundos (divididos en tres tiempos, uno control 25 segundos + 20 segundos con Oxo-M + 55 segundos de lavado) en estado control previos a la difusión de la PLL, el registro control, tuvo una duración de 20 segundos, los cuales fueron previos a la difusión de la PLL posteriormente, se aplicó Oxo-M mediante perfusión extracelular desde el segundo 30 hasta el segundo 50 previos a la perfusión de la PLL, obteniéndose una inhibición de las I_{Na} de $13.96\% \pm 2.8\%$ ($n = 6$) (Fig. 18 C). Posteriormente, se realizó un lavado hasta que empezó a difundirse la PLL a los 0 segundos. A continuación, se realizó una segunda aplicación de Oxo-M desde el segundo 210 hasta los 230 segundos (20 segundos) (Fig. 18 D), obteniéndose una inhibición de las I_{Na} del $6.46\% \pm 1.7\%$ ($n = 6$) (Fig. 18 F), la diferencia obtenida entre los valores observados de la inhibición con Oxo-M control *versus* Oxo-M + PLL fue estadísticamente significativa ($*p < 0.05$).

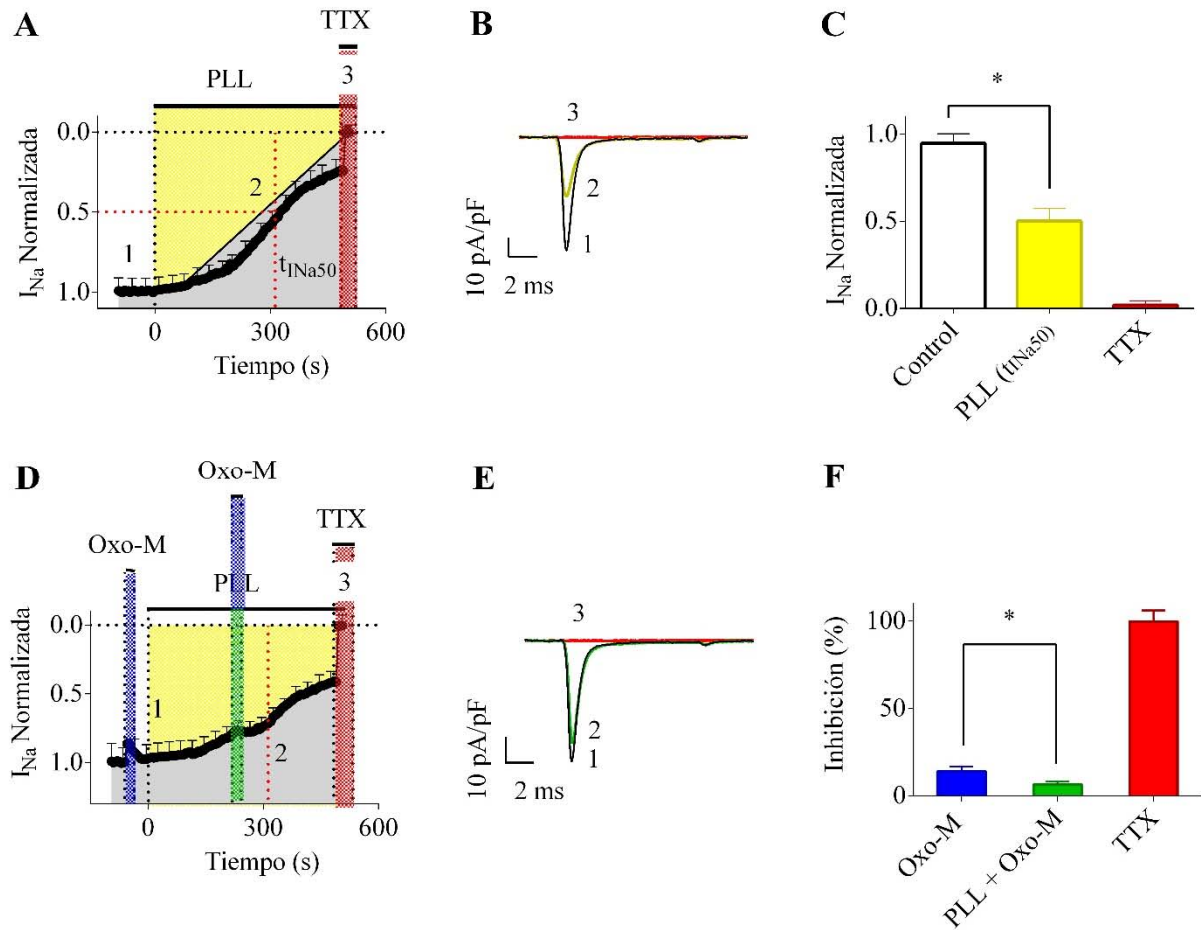


Figura 18. Reducción de la inhibición muscarínica en las I_{Na} por PLL. A, Curso temporal de la I_{Na} en presencia de PLL 50 μ M, 1) previo a la difusión de la PLL, 2) al t_{INa50} . D, en presencia de Oxo-M + PLL, 1) después del primer lavado de Oxo-M + PLL, 2) al t_{INa50} . B y E, Trazos representativos de las I_{Na} en 1) después del lavado de Oxo-M, 2) al t_{INa50} y 3) TTX. C, porcentaje de inhibición por PLL y F, Porcentaje de inhibición de Oxo-M en presencia de PLL

6.12 La diálisis intracelular de PIP_2 ocluye la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M

Se ha reportado que la perfusión intracelular con PIP_2 puede prevenir tanto la inhibición muscarínica de los Cav2.2 (Vivas *et al.*, 2013) así como el cierre de los canales KCNQ por la activación de receptores muscarínicos (Quintero *et al.*, 2005), dado que, al exponer a la célula a una fuente inagotable de este lípido, la activación de PLC por receptores muscarínicos no puede hidrolizar todas las moléculas de PIP_2 disponibles en la membrana celular.

Con el propósito de investigar si en la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M requiere del PIP_2 se procedió a perfundir intracelularmente el homólogo hidrolizable del PIP_2 el diC8- PIP_2 , a una concentración

de 100 μM (Vivas *et al.*, 2013). En estado control, se aplicó Oxo-M sustrayendo el componente rápido, cuya inhibición de la corriente fue de $26.5\% \pm 2.4\%$ ($n = 5$) (Fig. 19 A y C). Tres minutos después de la diálisis del diC8-PIP₂ 100 μM , con el propósito de que el diC8-PIP₂ alcance la membrana celular (Sohn *et al.*, 2007) en presencia de Oxo-M desde el segundo 100 hasta el segundo 140 (40 segundos), obteniéndose una inhibición del $0.02\% \pm 0.04\%$ de las I_{Na} por Oxo-M ($n = 8$) (Fig. 19 C). Esto sugiere que la inhibición lenta es resultado de la hidrólisis del PIP₂ disponible en la membrana celular. Las diferencias entre las inhibiciones inducidas por Oxo-M en control versus la de Oxo-M + diC8-PIP₂ mostraron ser estadísticamente significativas ($*p < 0.05$).

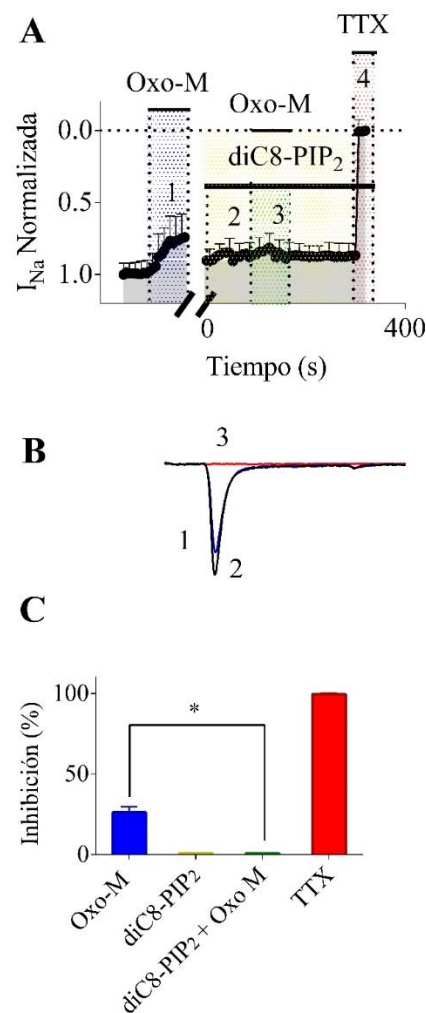


Figura 19. La diálisis intracelular del PIP₂ ocluye la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M. A, Curso temporal de la I_{Na} en presencia de diC8 PIP₂ 100 μM , 1) control, 2) en presencia de Oxo-M 3) en presencia de TTX. B, Trazos representativos de la I_{Na} en 1) control, 2) Oxo-M + diC-8PIP₂ y 3) TTX. C, Porcentaje de inhibición de las I_{Na} en control, diC-8PIP₂, diC-8PIP₂ + Oxo-M y TTX.

8. Discusión

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las I_{Na} son reguladas por un mecanismo insensible al voltaje a través de la hidrólisis del PIP_2 . En los experimentos realizados en el presente trabajo, se activaron los receptores muscarínicos y de angiotensina. Se observó que las I_{Na} son inhibidas por estos receptores mediante dos mecanismos: uno rápido <1 s y otro lento que se establece en varios segundos. Esto sugiere que las I_{Na} son reguladas tanto por el mecanismo delimitado a la membrana como por el mediado por un segundo mensajero. Los resultados concuerdan con los expuestos en la literatura, donde al activar distintos receptores se observan dos mecanismos por los cuales se inhiben las I_{Na} (Schubert *et al.*, 1989; Schiffmann *et al.*, 1995; Lopez-Barneo *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1994; Cantrell *et al.*, 1996; Cantrell *et al.*, 1997; Benz *et al.*, 1992; Hernandez-Ochoa *et al.*, 2007). Por otra parte, la inhibición lenta de las I_{Na} mediante Oxo-M, desaparece en presencia de los antagonistas MT-7 y Pz. Ésto indica que la inhibición por Oxo-M está mediada por la activación de los receptores M1, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura respecto de un mecanismo similar por la activación del mismo receptor reportado en las I_{Ca} (Bernheim *et al.*, 1992; Bernstaein *et al.*, 1992b; Kammermeier *et al.*, 2000). Adicionalmente, se observó que al incubarse previamente las células con PTX, la inhibición rápida de las I_{Na} por Oxo-M desaparece, mientras que la lenta permanece; esto sugiere que el mecanismo lento activado por los receptores M1 está mediado por la activación de proteínas G insensibles a PTX. Estos resultados concuerdan con un mecanismo análogo descrito en el caso de las I_{Ca} , dependiente de la activación de proteínas G insensibles a PTX, al activar los receptores muscarínicos (Beech *et al.*, 1992).

Al aplicar el protocolo de prepulsos para generar las I_{Na} en presencia del agonista muscarínico, se obtiene un IF cercano a 1, lo cual indica que la corriente obtenida en el P2 es igual a la obtenida en el P1. Adicionalmente, Oxo-M no corre la corriente en el eje del voltaje ni altera la pendiente de las curvas de activación e inactivación de las I_{Na} . Por lo tanto, el conjunto de estos resultados implica que el mecanismo por el cual se inhiben las I_{Na} por Oxo-M es predominantemente insensible al voltaje y es congruente con el mecanismo IV descrito en las I_{Ca} por Oxo-M (Suh *et al.*, 2010; Vivas *et al.* 2013).

Al inhibir la PLC con U73122, la inhibición lenta de las I_{Na} por Oxo-M ya no se lleva a cabo; este resultado indica que el mecanismo lento en las I_{Na} por la activación del receptor M1 requiere de la

hidrólisis de fosfoinosítidos para que se lleve a cabo. Aunado a este resultado, al inhibir las cinasas que resintetizan el PIP₂ en la membrana celular, se inhibe la recuperación de la inhibición lenta de las I_{Na}. Por lo tanto, la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M requiere de la hidrólisis del PIP₂, mientras que la recuperación de la inhibición requiere de la resíntesis de éste. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura para la I_{Ca} e I_M, cuyo mecanismo es similar (Suh *et al*, 2002; Quintero *et al*; 2005, Suh *et al*, 2010; Vivas *et al*, 2013).

Al exponer las células a una fuente inagotable de PIP₂, la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M se ocluye; asimismo, al dializarlas con PLL. Ambos resultados sugieren que el PIP₂ es el segundo mensajero de la regulación de las I_{Na} por Oxo-M. De esta forma, es el mediador de la regulación IV de los Nav, probablemente a través de la interacción de las cargas de éste fosfolípido con el canal. Esta hipótesis coincide con los mecanismos reportados en la literatura para los canales Cav y Kv (Suh *et al*, 2002; Quintero *et al*, 2005; Suh *et al*, 2010; Vivas *et al*, 2013).

Al tratar las células con inhibidores de PKC, BIS-I y Cal-C, los cuales inhiben a la cinasa C por mecanismos distintos, se observa que la inhibición de las I_{Na} por Oxo-M permanece sin cambios. Esto sugiere que la regulación lenta de los Nav por Oxo-M no requiere de la activación de la PKC, en concordancia con los resultados observados por Benz y colaboradores (1992) y no así con los de Cantrell y colaboradores (1997).

En conjunto, estos resultados sugieren que las I_{Na} son reguladas por un mecanismo insensible al voltaje mediado por la hidrólisis de PIP₂. La regulación de los Nav por este lípido de membrana, impacta en la excitabilidad celular de los diversos tejidos de los organismos. Así mismo modula el patrón y la frecuencia de los potenciales de acción de las células excitables. Por lo tanto, este fosfoinosítido es un componente lipídico fundamental de la membrana celular para la regulación de diversos canales iónicos responsables de la actividad celular (Suh and Hille, 2005; Falkenburger *et al.*, 2010). Entre estos canales destacan los Cav 2.2 y los KCNQ, lo que lo ha posicionado como un componente indispensable para la regulación de la actividad eléctrica, a través de distintas vías de señalización, tanto en células excitables como no excitables, mediante un mecanismo genérico. Probablemente, debido a que las proteínas membranales poseen un origen monofilético, éstas controlan procesos fisiológicos básicos vitales que dirigen la adaptación y la supervivencia de los organismos.

9. Conclusiones

De acuerdo con la evidencia experimental obtenida durante el proyecto, se proponen las siguientes conclusiones:

1. La activación de receptores de angiotensina o muscarínicos inducen la inhibición de las I_{Na} .
2. Oxo-M inhibe a las I_{Na} de manera dosis-dependiente.
3. La inhibición de las I_{Na} inducida por Angio II u Oxo-M presenta dos componentes, uno rápido y otro lento.
4. La inhibición de las I_{Na} por Oxo-M es mediada por la activación de los receptores muscarínicos M1.
5. El componente lento inhibitorio de las I_{Na} inducido por Angio II u Oxo-M es mediante la activación de proteínas G insensibles a PTX.
6. El PIP_2 regula a las I_{Na} mediante un mecanismo insensible al voltaje.
7. La presencia de cationes intracelulares interfiere con la inhibición lenta muscarínica en las I_{Na} , por lo que la regulación del PIP_2 con el canal es directa.
8. La inhibición muscarínica de las I_{Na} requiere de la hidrólisis de PIP_2 mediante la activación de la PLC.
9. En la inhibición por la activación de receptores M1 en las I_{Na} no depende de la activación por PKC
10. La recuperación de la inhibición muscarínica de las I_{Na} requiere de la resíntesis de PIP_2 por medio de la activación de PI cinasas.

En la Figura 20, se resume en forma esquemática los mecanismos genéricos de regulación en canales iónicos sensibles a voltaje por la activación de GPCRs, los cuales los pueden regular

mediante una vía sensible al voltaje o insensible a voltaje; dependiendo del tipo de canal iónico, sus requerimientos de regulación por estos mecanismos serán diferentes.

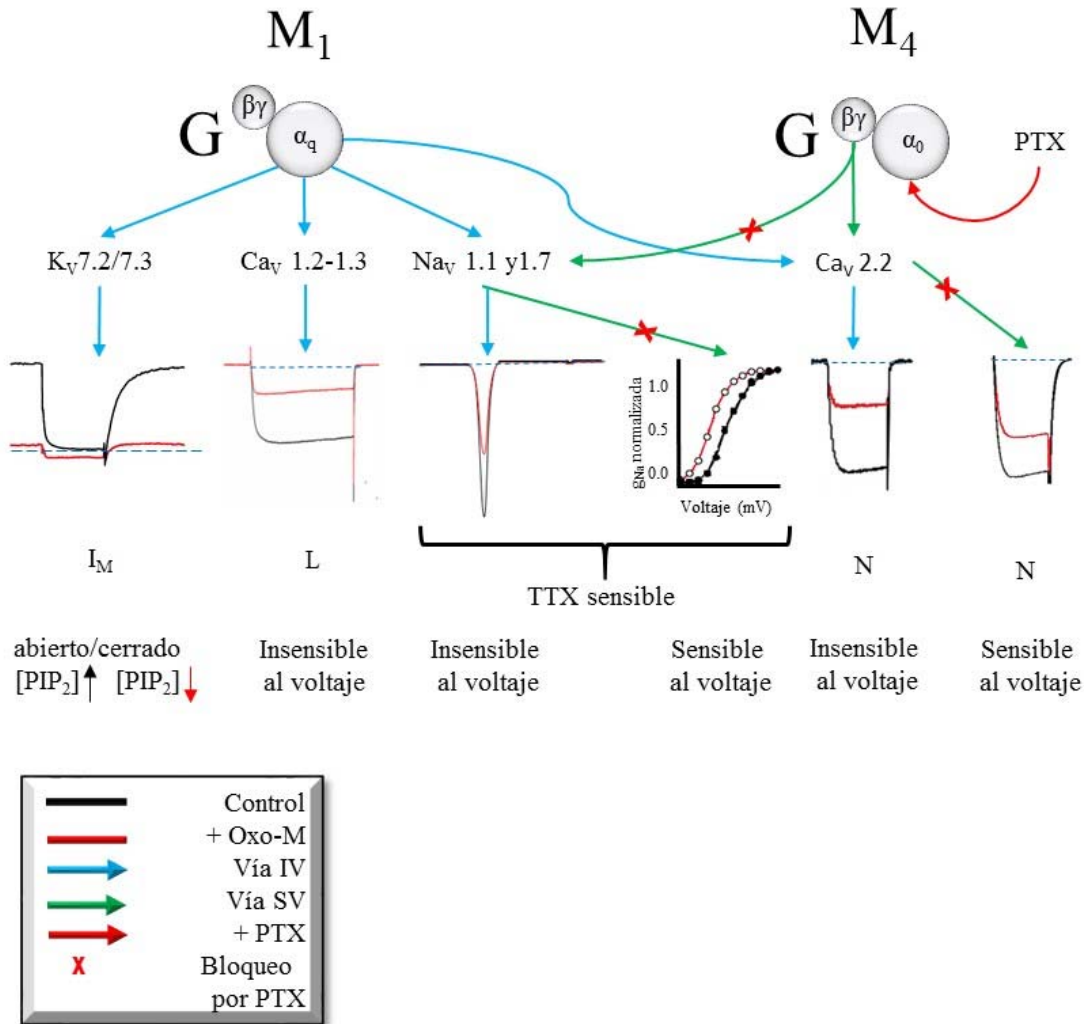


Figura 20. Diagrama explicativo de las vías de señalización por proteínas G en los canales iónicos sensibles a voltaje. La activación de GPCRs, induce dos mecanismos de regulación a través de proteínas G, estos procesos, son mediados por las subunidades $G\alpha_q$ y $G\beta\gamma$; el mecanismo IV, (flechas azules), es mediado por la activación de la subunidad $G\alpha_q$ insensible a PTX, la cual induce una vía que regula a las corrientes iónicas sin alterar sus propiedades voltaje-dependientes (trazos rojos), por otra parte, el mecanismo SV, (flechas verdes), regula a las corrientes iónicas a través de la activación de la subunidad $G\alpha_0$ sensible a PTX, la cual, se disocia de las subunidades $G\beta\gamma$, éstas son las responsables del mecanismo delimitado a la membrana y sensible al voltaje, este mecanismo, regula a las corrientes iónicas alterando sus propiedades voltaje-dependientes (trazos negros).

10. Referencias

- Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F. and Chanda, B. (2016) The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J Gen Physiol*, 147, 1-24.
- Auld, V. J., Goldin, A. L., Krafte, D. S., Catterall, W. A., Lester, H. A., Davidson, N. and Dunn, R. J. (1990) A neutral amino acid change in segment IIS4 dramatically alters the gating properties of the voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 323-327.
- Bai, H., Wu, L. L., Xing, D. Q., Liu, J. and Zhao, Y. L. (2004) Angiotensin II induced upregulation of G alpha q/11, phospholipase C beta 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 via angiotensin II type 1 receptor. *Chin Med J (Engl)*, 117, 88-93.
- Beech, D. J., Bernheim, L. and Hille, B. (1992) Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron*, 8, 97-106.
- Beech, D. J., Bernheim, L., Mathie, A. and Hille, B. (1991) Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 652-656.
- Benz, I., Herzig, J. W. and Kohlhardt, M. (1992) Opposite effects of angiotensin II and the protein kinase C activator OAG on cardiac Na⁺ channels. *J Membr Biol*, 130, 183-190.
- Bernheim, L., Beech, D. J. and Hille, B. (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron*, 6, 859-867.
- Bernheim, L., Mathie, A. and Hille, B. (1992) Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9544-9548.
- Berstein, G., Blank, J. L., Jhon, D. Y., Exton, J. H., Rhee, S. G. and Ross, E. M. (1992a) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell*, 70, 411-418.
- Berstein, G., Blank, J. L., Smrcka, A. V., Higashijima, T., Sternweis, P. C., Exton, J. H. and Ross, E. M. (1992b) Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, Gq/11, and phospholipase C-beta 1. *The Journal of biological chemistry*, 267, 8081-8088.
- Boehm, S., Huck, S. and Freissmuth, M. (1996) Involvement of a phorbol ester-insensitive protein kinase C in the alpha2-adrenergic inhibition of voltage-gated calcium current in chick sympathetic neurons. *J Neurosci*, 16, 4596-4603.
- Brown, D. A., Constanti, A. and Marsh, S. (1980) Angiotensin mimics the action of muscarinic agonists on rat sympathetic neurones. *Brain Res*, 193, 614-619.
- Brown, D. A., Marrion, N. V. and Smart, T. G. (1989) On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 413, 469-488.
- Cantrell, A. R., Ma, J. Y., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron*, 16, 1019-1026.
- Cantrell, A. R., Smith, R. D., Goldin, A. L., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1997) Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci*, 17, 7330-7338.
- Caulfield, M. P. and Birdsall, N. J. (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, 50, 279-290.
- Caulfield, M. P., Jones, S., Vallis, Y., Buckley, N. J., Kim, G. D., Milligan, G. and Brown, D. A. (1994) Muscarinic M-current inhibition via G alpha q/11 and alpha-adrenoceptor inhibition of Ca²⁺ current via G alpha o in rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 477 (Pt 3), 415-422.
- Cohen-Armon, M., Sokolovsky, M. and Dascal, N. (1989) Modulation of the voltage-dependent sodium channel by agents affecting G-proteins: a study in *Xenopus* oocytes injected with brain RNA. *Brain Res*, 496, 197-203.
- Cruzblanca, H. (2006) An M2-like muscarinic receptor enhances a delayed rectifier K⁺ current in rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol*, 149, 441-449.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 415-472.
- del Rio, E., Bevilacqua, J. A., Marsh, S. J., Halley, P. and Caulfield, M. P. (1999) Muscarinic M1 receptors activate phosphoinositide turnover and Ca²⁺ mobilisation in rat sympathetic neurones, but this signalling pathway does not mediate M-current inhibition. *J Physiol*, 520 Pt 1, 101-111.
- Dunlap, K. and Fischbach, G. D. (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol*, 317, 519-535.

- Elmslie, K. S., Zhou, W. and Jones, S. W. (1990) LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*, 5, 75-80.
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B. C. and Hille, B. (2010) Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J Physiol*, 588, 3179-3185.
- Formenti, A., Arrigoni, E. and Mancina, M. (1993) Two distinct modulatory effects on calcium channels in adult rat sensory neurons. *Biophys J*, 64, 1029-1037.
- Fraser, D. D., Hoehn, K., Weiss, S. and MacVicar, B. A. (1993) Arachidonic acid inhibits sodium currents and synaptic transmission in cultured striatal neurons. *Neuron*, 11, 633-644.
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Stura, E., Birdsall, N. J. and Servent, D. (2008) Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states. *Mol Pharmacol*, 74, 1554-1563.
- Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T. and McLaughlin, S. (1989) Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). *Biochimica et biophysica acta*, 979, 105-112.
- Gamper, N. and Shapiro, M. S. (2007) Target-specific PIP₂ signalling: how might it work? *J Physiol*, 582, 967-975.
- Garcia-Ferreiro, R. E., Hernandez-Ochoa, E. O. and Garcia, D. E. (2001) Modulation of N-type Ca²⁺ channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 442, 848-858.
- Garcia, D. E., Brown, S., Hille, B. and Mackie, K. (1998) Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 18, 2834-2841.
- Grassi, F. and Lux, H. D. (1989) Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neurosci Lett*, 105, 113-119.
- Haley, J. E., Abogadie, F. C., Delmas, P., Dayrell, M., Vallis, Y., Milligan, G., Caulfield, M. P., Brown, D. A. and Buckley, N. J. (1998) The alpha subunit of Gq contributes to muscarinic inhibition of the M-type potassium current in sympathetic neurons. *J Neurosci*, 18, 4521-4531.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 391, 85-100.
- Haraguchi, K. and Rodbell, M. (1991) Carbachol-activated muscarinic (M1 and M3) receptors transfected into Chinese hamster ovary cells inhibit trafficking of endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5964-5968.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. and Fesik, S. W. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, 371, 168-170.
- Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 380, 258-262.
- Hernandez-Ochoa, E. O., Garcia-Ferreiro, R. E. and Garcia, D. E. (2007) G protein activation inhibits gating charge movement in rat sympathetic neurons. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292, C2226-2238.
- Hille, B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci*, 17, 531-536.
- Horowitz, L. F., Hirdes, W., Suh, B. C., Hilgemann, D. W., Mackie, K. and Hille, B. (2005) Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol*, 126, 243-262.
- Hoshi, N., Langeberg, L. K., Gould, C. M., Newton, A. C. and Scott, J. D. (2010) Interaction with AKAP79 modifies the cellular pharmacology of PKC. *Molecular cell*, 37, 541-550.
- Ikeda, S. R. (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 439, 181-214.
- Ikeda, S. R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 380, 255-258.
- Kakei, M. and Ashcroft, F. M. (1987) A microflow superfusion system for use with excised membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 409, 337-341.
- Kammermeier, P. J., Ruiz-Velasco, V. and Ikeda, S. R. (2000) A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both G_{alpha} q/11 and G_{beta} gamma. *J Neurosci*, 20, 5623-5629.
- Kaneko, S., Akaike, A. and Satoh, M. (1999) Receptor-mediated modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels via heterotrimeric G-proteins in neurons. *Japanese journal of pharmacology*, 81, 324-331.
- Lee, C. H., Park, D., Wu, D., Rhee, S. G. and Simon, M. I. (1992) Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *The Journal of biological chemistry*, 267, 16044-16047.
- Lee, M. H. and Bell, R. M. (1991) Mechanism of protein kinase C activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*, 30, 1041-1049.

- Linden, D. J. and Routtenberg, A. (1989) cis-Fatty acids, which activate protein kinase C, attenuate Na⁺ and Ca²⁺ currents in mouse neuroblastoma cells. *J Physiol*, 419, 95-119.
- Lopez-Barneo, J., Castellano, A. and Toledo-Aral, J. (1990) Thyrotropin-releasing-hormone (TRH) and its physiological metabolite TRH-OH inhibit Na⁺ channel activity in mammalian septal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8150-8154.
- Luebke, J. I. and Dunlap, K. (1994) Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 428, 499-507.
- Matsumoto, S., Yorio, T., DeSantis, L. and Pang, I. H. (1994) Muscarinic effects on cellular functions in cultured human ciliary muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 3732-3738.
- McDonald, L. J. and Mamrack, M. D. (1995) Phosphoinositide hydrolysis by phospholipase C modulated by multivalent cations La(3+), Al(3+), neomycin, polyamines, and melittin. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 11, 81-91.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. and Murray, D. (2002) PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31, 151-175.
- Nostrandt, A. C., Shafer, T. J., Mundy, W. R. and Padilla, S. (1996) Inhibition of rat brain phosphatidylinositol-specific phospholipase C by aluminum: regional differences, interactions with aluminum salts, and mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136, 118-125.
- Payandeh, J., Gamal El-Din, T. M., Scheuer, T., Zheng, N. and Catterall, W. A. (2012) Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, 486, 135-139.
- Quintero, J. L., Arenas, M. I. and Garcia, D. E. (2005) The antidepressant imipramine inhibits M current by activating a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-dependent pathway in rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol*, 145, 837-843.
- Schiffmann, S. N., Lledo, P. M. and Vincent, J. D. (1995) Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *J Physiol*, 483 (Pt 1), 95-107.
- Schmidt, D., Jiang, Q. X. and MacKinnon, R. (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature*, 444, 775-779.
- Schofield, G. G. and Ikeda, S. R. (1988) Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 411, 481-490.
- Schubert, B., VanDongen, A. M., Kirsch, G. E. and Brown, A. M. (1989) Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science*, 245, 516-519.
- Selyanko, A. A., Stansfeld, C. E. and Brown, D. A. (1992) Closure of potassium M-channels by muscarinic acetylcholine-receptor stimulants requires a diffusible messenger. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 250, 119-125.
- Servent, D. and Fruchart-Gaillard, C. (2009) Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem*, 109, 1193-1202.
- Shapiro, M. S., Wollmuth, L. P. and Hille, B. (1994) Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron*, 12, 1319-1329.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O. and Sternweis, P. C. (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*, 251, 804-807.
- Sohn, J. W., Lim, A., Lee, S. H. and Ho, W. K. (2007) Decrease in PIP(2) channel interactions is the final common mechanism involved in PKC- and arachidonic acid-mediated inhibitions of GABA(B)-activated K⁺ current. *J Physiol*, 582, 1037-1046.
- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. and Numa, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339, 597-603.
- Suh, B. C. and Hille, B. (2002) Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron*, 35, 507-520.
- Suh, B. C. and Hille, B. (2005) Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 370-378.
- Suh, B. C. and Hille, B. (2007) Electrostatic interaction of internal Mg²⁺ with membrane PIP2 Seen with KCNQ K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 130, 241-256.
- Suh, B. C., Leal, K. and Hille, B. (2010) Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron*, 67, 224-238.
- Tan, Z. Y., Priest, B. T., Krajewski, J. L., Knopp, K. L., Nisenbaum, E. S. and Cummins, T. R. (2014) Protein kinase C enhances human sodium channel hNav1.7 resurgent currents via a serine residue in the domain III-IV linker. *FEBS Lett*, 588, 3964-3969.

- Thottumkara, A. P., Parsons, W. H. and Du Bois, J. (2014) Saxitoxin. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 53, 5760-5784.
- Toner, M., Vaio, G., McLaughlin, A. and McLaughlin, S. (1988) Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*, 27, 7435-7443.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F. and et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 266, 15771-15781.
- Tuteja, N. (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior*, 4, 942-947.
- Verstraeten, S. V. and Oteiza, P. I. (2002) Al(3+)-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis. *Arch Biochem Biophys*, 408, 263-271.
- Verstraeten, S. V., Villaverde, M. S. and Oteiza, P. I. (2003) Al(3+)-mediated changes on membrane fluidity affects the activity of PI-PLC but not of PLC. *Chem Phys Lipids*, 122, 159-163.
- Vivas, O., Castro, H., Arenas, I., Elias-Vinas, D. and Garcia, D. E. (2013) PIP(2) hydrolysis is responsible for voltage independent inhibition of CaV2.2 channels in sympathetic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 432, 275-280.
- Wang, C., Du, X. N., Jia, Q. Z. and Zhang, H. L. (2005) Binding of PLCdelta1PH-GFP to PtdIns(4,5)P2 prevents inhibition of phospholipase C-mediated hydrolysis of PtdIns(4,5)P2 by neomycin. *Acta Pharmacol Sin*, 26, 1485-1491.
- Xu, Y., Ramu, Y. and Lu, Z. (2008) Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature*, 451, 826-829.
- Yagisawa, H., Sakuma, K., Paterson, H. F., Cheung, R., Allen, V., Hirata, H., Watanabe, Y., Hirata, M., Williams, R. L. and Katan, M. (1998) Replacements of single basic amino acids in the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 alter the ligand binding, phospholipase activity, and interaction with the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, 273, 417-424.
- Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohacs, T., Lopes, C. M., Jin, T. and Logothetis, D. E. (2003) PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*, 37, 963-975.