



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA
DE LAS ACCIONES DEL PIRACETAM SOBRE
CANALES DE CALCIO TIPO N DE NEURONAS
SIMPÁTICAS DE RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ERIKA IRIS PUENTE GUZMÁN

Tutor

DR. JOSÉ MARÍA FARÍAS SÁNCHEZ

Realizada en el Departamento de Fisiología de la
Facultad de Medicina, UNAM

Año 2008



Facultad de ciencias
UNAM



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno: Puente Apellido materno: Guzmán Nombres: Erika Iris Teléfono: 56-89-27-57 Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad: Ciencias Carrera: Biología No. de cuenta: 30033525-5</p>
<p>2. Datos del tutor Grado: Doctor Nombres: José María Apellido paterno: Farías Apellido materno: Sánchez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado: Doctor Nombres: René de Jesús Apellido paterno: Cárdenas Apellido materno: Vázquez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado: Doctor Nombres: Manuel Apellido paterno: Miranda Apellido materno: Anaya</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado: Doctora Nombres: Elsa Guadalupe Apellido paterno: Escamilla Apellido materno: Chimal</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado: Maestra en Investigación Biomédica Básica Nombres: Alette Apellido paterno: Ortega Apellido materno: Gómez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Título: Caracterización electrofisiológica de las acciones del Piracetam sobre canales de calcio tipo N en neuronas simpáticas de rata No. de páginas: 5 Año: 2008</p>

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción	
2.1 Canales de calcio.....	2
2.2 Tipos de canales de calcio.....	4
2.3 La estructura de los canales de calcio.....	6
2.4 Proteínas G y su papel en la modulación sensible al voltaje de los canales de calcio.....	8
2.5 Sensibilidad al voltaje.....	11
2.6 Moléculas que interaccionan con sitios específicos de los canales iónicos.....	12
2.7 Sitios de Interacción de la subunidad α	12
2.8 Fármacos nootrópicos y derivados pirrolidónicos.....	15
2.9 El Piracetam.....	17
3. Antecedentes	
2.1 Derivados pirrolidónicos y canales de calcio.....	18
4. Planteamiento del problema.....	27
5. Pregunta central.....	29
6. Hipótesis.....	30
7. Objetivos	
6.1 General.....	31
6.2 Particulares.....	31
8. Material y Método	
8.1 Neuronas SCG.....	32
8.2 Cultivo de neuronas SCG.....	32
8.3 Registro electrofisiológico.....	34
8.3 Soluciones utilizadas para el registro electrofisiológico.....	35
9. Resultados	
9.1 El Piracetam reduce la amplitud de las corrientes de calcio tipo N.....	38
9.2 El efecto del Piracetam es dependiente de la dosis.....	39
9.3 El efecto del Piracetam es reversible.....	40

9.4 El Piracetam y la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio tipo N de neuronas SCG.....	42
10. Discusión	
10.1 El Piracetam actúa de manera extracelular con efecto reversible.....	47
10.2 El Piracetam presenta selectividad sobre los canales de calcio tipo N.....	47
10.3 El Piracetam incrementa la actividad de los canales de calcio tipo N.....	48
10.4 Las proteínas G y las acciones del Piracetam.....	48
11. Propuestas	
11.1 Posible sitio de interacción del Piracetam en los canales de calcio tipo N.....	49
11.2 Posible efecto de bloqueo de los canales de calcio tipo N por Piracetam.....	49
11.3 Perspectivas.....	50
12. Conclusiones.....	51
13. Referencias Bibliográficas.....	52
Anexo.....	55

1. Resumen

1. RESUMEN

El Piracetam, es un fármaco nootrópico de la familia de la pirrolidóna, el cual induce en los canales de calcio tipo N ($Ca_v2.2$) de neuronas simpáticas de rata, (las cuales son una preparación nativa de neuronas periféricas), una reducción en la amplitud de la corriente de calcio (I_{Ca}) de manera selectiva, rápida, reversible y dependiente de la dosis de manera extracelular. A demás, este fármaco induce en el canal de calcio tipo N un cambio en su sensibilidad al voltaje, hacia potenciales más hiperpolarizantes, incrementando su actividad, sin afectar la cascada de señalización ligada al canal.

2.1 Canales de calcio

Los canales de calcio, como el resto de los canales iónicos, son proteínas transmembranales, los cuales presentan mecanismos de apertura y cierre del poro en respuesta a diversos estímulos biológicos, como la unión de un ligando o un cambio en el voltaje de la membrana de la célula (Yallen, 1998).

Existe una gran variedad de canales de calcio expresados en el sistema nervioso de los mamíferos, sin embargo, son los canales de calcio tipo N los que predominan en las terminales sinápticas centrales y periféricas (Elmslie, 2003). De estos canales depende la entrada de calcio, que a su vez controla la liberación del neurotransmisor.

Por lo tanto, la acción de sustancias que puedan modular a estos canales es particularmente relevante, porque puede dar lugar a una modificación funcional de la transmisión sináptica.

Hay principalmente dos superfamilias de canales iónicos, los que son sensibles al voltaje y los dependientes de ligando (Hille, 2001). Los canales con sensibilidad al voltaje, responden al potencial de membrana y son la base del potencial de acción, estos canales son selectivamente permeables a iones de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- (Figura 1), mientras que los dependientes de ligando, se encuentran regulados por señales químicas que se unen a dominios extracelulares o intracelulares sobre estas proteínas. Este tipo de canales pueden ser selectivos para iones específicos como K^+ o Cl^- o permeables a todos los cationes fisiológicos (Figura 1). Incluso, hay otro tipo de canales los cuales son sensibles al desplazamiento mecánico o a cambios en la temperatura (Purves, *et al*, 2004).

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CANALES DE CALCIO

2.2 TIPOS DE CANALES DE CALCIO

2.3 LA ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE CALCIO

2.4 PROTEÍNAS G Y SU PAPEL EN LA MODULACIÓN SENSIBLE AL VOLTAJE DE LOS CANALES DE CALCIO

2.5 SENSIBILIDAD AL VOLTAJE

2.6 MOLÉCULAS QUE INTERACCIONAN CON SITIOS ESPECÍFICOS DE LOS CANALES IÓNICOS

2.7 SITIOS DE INTERACCIÓN DE LA SUBUNIDAD α

2.8 FÁRMACOS NOOTRÓPICOS Y DERIVADOS PIRROLIDÓNICOS

2.9 EL PIRACETAM

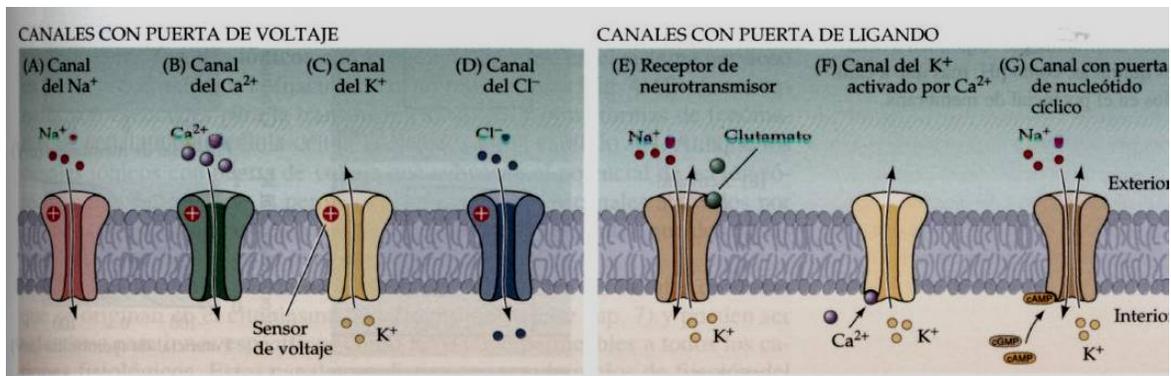


Figura 1. Canales sensibles al voltaje y canales dependientes de ligando (Tomado de Purves, et al, 2003)

El incremento del calcio libre en el citoplasma puede provenir de diferentes fuentes. Una de ellas es mediante la entrada de calcio a través de canales selectivos para este ión. Estos juegan dos tipos de acciones fisiológicas principales. Una de estas es produciendo la despolarización eléctrica cuando los iones de calcio cruzan la membrana a través de los canales, en forma semejante a como lo hacen otros iones como los de sodio o los de potasio. Sin embargo, existe otro mecanismo de acción del calcio, semejante al del AMP cíclico, al del IP₃, o al de cualquier otro mensajero de las vías de señalización intracelular. Un aumento transitorio en el calcio libre intracelular puede iniciar cambios de muy diverso tipo como lo es a nivel de la transcripción genómica, la migración celular o la liberación de un neurotransmisor o de una hormona. De esta forma el calcio se comporta como un mensajero intracelular. En este sentido, los mecanismos que afectan la entrada de calcio pueden establecer modificaciones en las funciones de la célula.

Los canales de calcio sensibles al voltaje son sumamente importantes para el inicio de las señales eléctricas, mediante la despolarización de la membrana celular a través de un flujo de iones de calcio, los cuales desencadenan el inicio de múltiples funciones del organismo, como lo son el inicio de la contracción muscular, la secreción, la neurotransmisión, entre otros (Catterall, *et al*, 2007).

La modulación de estos canales mediante mecanismos que modifican su sensibilidad al voltaje y aquellos insensibles al voltaje, destacan por la gran cantidad de información disponible sobre los mediadores intracelulares que los afectan.

2.2 Tipos de canales de calcio

El uso de fármacos, toxinas selectivas y propiedades biofísicas, han permitido tanto en neuronas nativas como en otro tipo de células la identificación de seis diferentes tipos de corrientes de calcio, las cuales corresponden a un tipo de canal en particular, los cuales son los tipos L, N, P/Q, R y los tipo T (Dolphin, 2005).

En los tejidos se encuentran principalmente dos tipos de corrientes de calcio, una es activada por pequeñas despolarizaciones de la membrana y muestra una inactivación rápida sensible al voltaje, a este tipo de corrientes se les denomina de bajo umbral (LVA por sus siglas en inglés). Los canales de bajo umbral, únicamente presentan un tipo de canal, los denominados tipo T (transient en inglés) (Dolphin, 2005).

El segundo tipo de corrientes son aquellas que se activan a grandes despolarizaciones de la membrana celular, y a estas se les denomina de alto umbral (HVA por sus siglas en inglés). Este tipo de corrientes corresponden a diferentes tipos de canales, los cuales pueden predominar en determinados tejidos que conforman a un organismo (Dolphin, 2005). Los HVA comprenden los tipo L, N, P/Q y R.

Los canales de calcio tipo L (long lasting en inglés) son sensibles a antagonistas orgánicos como lo son las dihidropiridinas, las fenilalquilamidas y las benzodiazepinas. Este tipo de canales se encuentran principalmente en los músculos, neuronas, células marcapaso del corazón y células endócrinas (Catterall, *et al*, 2005).

Los canales de calcio tipo N (neuronal), presentan una conductancia intermedia (13-18 pS), este tipo de canales son sensibles a la ω -conotoxina GVIA (ω -CTX GVIA), la cual es una toxina del molusco *Conus geographus* (Olivera, *et al*, 1984). Este tipo de canales determinan la entrada de Ca^{2+} en las terminales nerviosas presinápticas (García-Ferreiro, 2001).

Las corrientes de calcio tipo P (Purkinje) se han reportado en diversos tejidos. Este tipo de canales son sensibles al veneno ω -Agatoxina IVA (ω -Aga IVA) del arácnido *Agelenopsis aperta*, sin embargo, grandes concentraciones de esta toxina pueden bloquear al componente Q, por lo que la diferencia entre las corrientes P y Q no se han aclarado del todo (Dolphin, 2005). Este tipo de canales se encuentran en las terminaciones dendríticas y generalmente en las neuronas (Catterall, *et al*, 2005).

La corriente residual, es la denominada R (por resistente a las toxinas conocidas inicialmente), para la cual durante mucho tiempo no se le había encontrado un bloqueador selectivo. Sin embargo, ya se ha reportado que este canal es sensible al veneno SNX-482 del arácnido *Hysteroocrates gigas*. Este tipo de canal se encuentra en los cuerpos neuronales y en las dendritas.

En los mamíferos el poro de los canales de calcio está formado por la subunidad α_1 , la cual está asociada con subunidades auxiliares denominadas $\alpha_2\delta$, β y γ . El poro está codificado por al menos 10 genes, los cuales codifican para la subunidad que conforma esta estructura de los diferentes tipos de canales de calcio. La nomenclatura que se ha utilizado para nombrar a la subunidad α , consiste en la letra griega α , un número secuencial y una letra mayúscula que corresponde al tipo de canal.

La subfamilia Ca_v1 ($\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$), presenta las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} , todas estas subunidades corresponden a la corriente de calcio tipo L.

A la subfamilia Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$), le corresponden las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} , los cuales se asocian a los canales tipo P/Q, N y R respectivamente.

A la subfamilia Ca_v3 ($Ca_v3.1 - Ca_v3.3$) pertenecen las subunidades α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} , las cuales corresponden a las corrientes de calcio tipo T (Catterall, *et al*, 2005).

Las secuencias de aminoácidos que conforman la subunidad α_1 de las tres subfamilias de canales de calcio, presentan 40% de secuencias idénticas, mientras que el porcentaje de identidad intrafamiliar es del 70%. El porcentaje de similitud de las diferentes subfamilias de los canales de calcio se muestra en la figura 2.

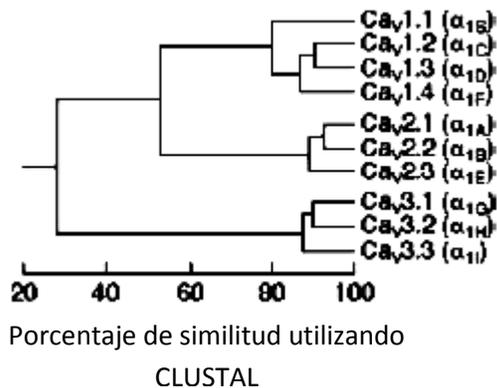


Figura 2. Árbol de similitud de las subunidades α_1 de los diferentes canales de calcio obtenido a partir de secuencia de aminoácidos. Tomado

2.3 La estructura de los canales de calcio

Los canales de calcio están compuestos por cinco proteínas, las cuales conforman a las subunidades del canal. Estas subunidades son las α_1 (~200 kD), α_2 (~140 kD), β (~50 kD), δ (~20 kD) y γ (~30 kD), éste peso molecular corresponde a músculo.

La subunidad α_1

Esta estructura consiste de 24 segmentos α -hélices transmembranales arreglados en cuatro dominios repetidos (I-IV) (Figura 3). Esta estructura forma al poro del canal (Dolphin, 2005), el cual es acuoso y presenta un filtro de selectividad (Yallen, 1998). Las asas que unen a los segmentos transmembranales 5 y 6 de cada dominio se les denominan P y forman la boca externa que forma al poro. Dentro de cada asa P, hay residuos de Glutamato (o Aspartato en algunos puntos de los canales LVA) cargados negativamente, los cuales parecen proveer el filtro de selectividad del canal. Estos residuos coordinan al Ca^{2+} durante

su paso a través del canal, e incluso proveen un mecanismo para el bloqueo del canal por metales pesados.

Cada dominio de esta subunidad presenta elementos estructurales específicos que incluyen Arginina y Lisina cargadas positivamente en el segmento transmembranal S4. Estos aminoácidos son los que conforman al sensor de voltaje, el cual físicamente se mueve en la membrana, en respuesta a la despolarización y provoca el movimiento de cargas responsables de la apertura del canal.

La subunidad β

Se le ha denominado como subunidad accesoria o auxiliar. Esta estructura no forma parte del poro del canal y solamente contiene un dominio denominado SH3, el cual se une a regiones ricas en Prolinas, reforzando la idea de que esta subunidad sirve como ancla de la subunidad $\alpha 1$ de otras proteínas.

Se han clonado cuatro genes codificantes para la subunidad β , las cuales difieren dependiendo del tejido en el que se expresen. La subunidad β_{1a} se expresa en el músculo esquelético, la β_{1b} en el cerebro, la β_2 en el corazón, pulmones y cerebro, la β_3 en el cerebro y músculo liso y la β_4 en el cerebro, particularmente en el cerebelo.

La subunidad β se une a la $\alpha 1$ mediante una secuencia específica en el asa intracelular entre los dominios I y II (Figura 3), denominada dominio de interacción α (AID por sus siglas en inglés).

Las funciones de la subunidad β son varias y son importantes para la expresión de las subunidades $\alpha 1$ en la membrana. Además, tienen efectos en las propiedades biofísicas de las subunidades $\alpha 1$, permitiendo una activación a potenciales más hiperpolarizados. Los efectos de inactivación son específicos para las diferentes subunidades β .

La subunidad α_2 - δ

Las dos proteínas auxiliares $\alpha 2$ y δ son productos del mismo gen. La subunidad $\alpha 2$ se localiza en la parte extracelular y mediante un enlace disulfuro se une a la subunidad δ (Figura 3), que se encuentra en la parte transmembranal del canal.

La subunidad γ

Esta subunidad presenta 4 segmentos transmembranales (Figura 3), su función permanece sin conocerse del todo (Dolphin, 2005).

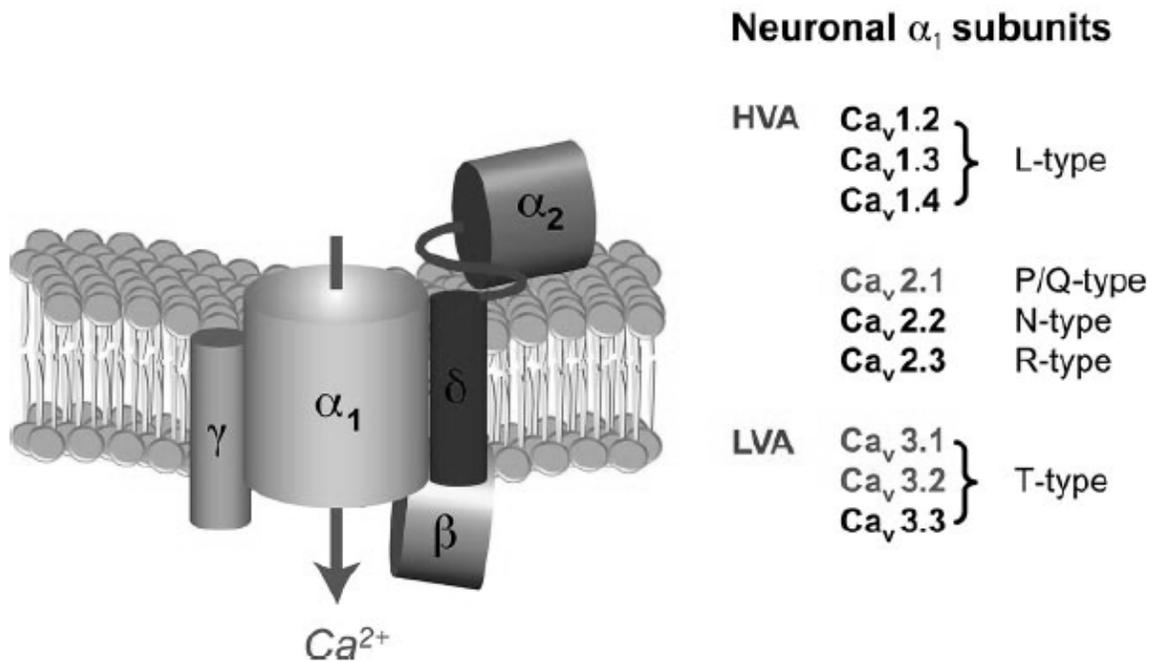


Figura 3. Subunidades que conforman al canal de calcio. Tomado de Khosravani y Zamponi, 2006.

2.4 Proteínas G y su papel en la modulación sensible al voltaje de los canales de calcio

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés), son una familia multimérica de siete segmentos transmembranales, los cuales pueden activarse por medio de numerosos estímulos fisiológicos.

Cuando estos GPCRs, son activados por agonistas, interactúan mediante proteínas G heterotriméricas denominadas $G\alpha\beta\gamma$ (Tedford y Zamponi, 2006).

El mecanismo de activación de las proteínas G, se efectúa mediante el ciclo de la GTPasa, al unirse el GDP y el GTP a la subunidad $G\alpha$. El principal cambio conformacional se lleva a cabo durante la transición de la forma inactiva (unión GDP) a la forma activa (unión GTP) cambiando la posición de los fosfatos y del Mg^{2+} (Orun, 2006). El cambio de nucleótidos favorece la disociación del complejo heterotrimérico ($G\alpha$ -GTP y por otra parte las subunidades $G\beta\gamma$). La actividad de la GTPasa de la subunidad $G\alpha$ hidroliza la unión GTP y lo cambia por $GDP+P_i$, provocando un reensamblaje de la forma inactiva $G\alpha$ - $GDPG\beta\gamma$ (Tedford y Zamponi, 2006).

La forma en que las proteínas G modulan los canales de calcio mediante inhibición sensible al voltaje, se efectúa por la unión de las subunidades $G\beta\gamma$ a los canales de calcio. Se han reportado posibilidades de uniones en múltiples sitios de los canales de calcio, una en el amino terminal, otra en las asas entre los dominios I y II ($I-II_{s1}$, $I-II_{s2}$ y $I-II_{s3}$) y dos uniones en el carboxilo terminal (De Waard, *et al*, 2005). Al unirse las subunidades $G\beta\gamma$, promueven la inhibición de estos canales (Tedford y Zamponi, 2006). Por lo tanto, otra forma de identificar la modificación en la sensibilidad al voltaje del canal es la propuesta por Emslie en 2003, la cual se puede demostrar mediante un protocolo compuesto de tres pulsos distintos, que a continuación se explica.

En el primer pulso denominado Pulso 1, la corriente es inhibida de manera intracelular por la proteína G, mediante la unión a un receptor del canal. Durante el pulso despolarizante, las proteínas G, las cuales son sensibles al voltaje, se desprenden del canal, sin embargo éste último no conduce iones a través del poro. Posteriormente, durante el siguiente pulso denominado pulso 2, la corriente se recupera casi a nivel control, debido a que hay un efecto sensible al voltaje de las proteínas G, las cuales son retiradas de su unión con el canal, provocando el incremento de la corriente (Figura 4). A este efecto se le denomina facilitación. El cual es un método importante para identificar cambios en la sensibilidad al voltaje del canal (Emslie, 2003).

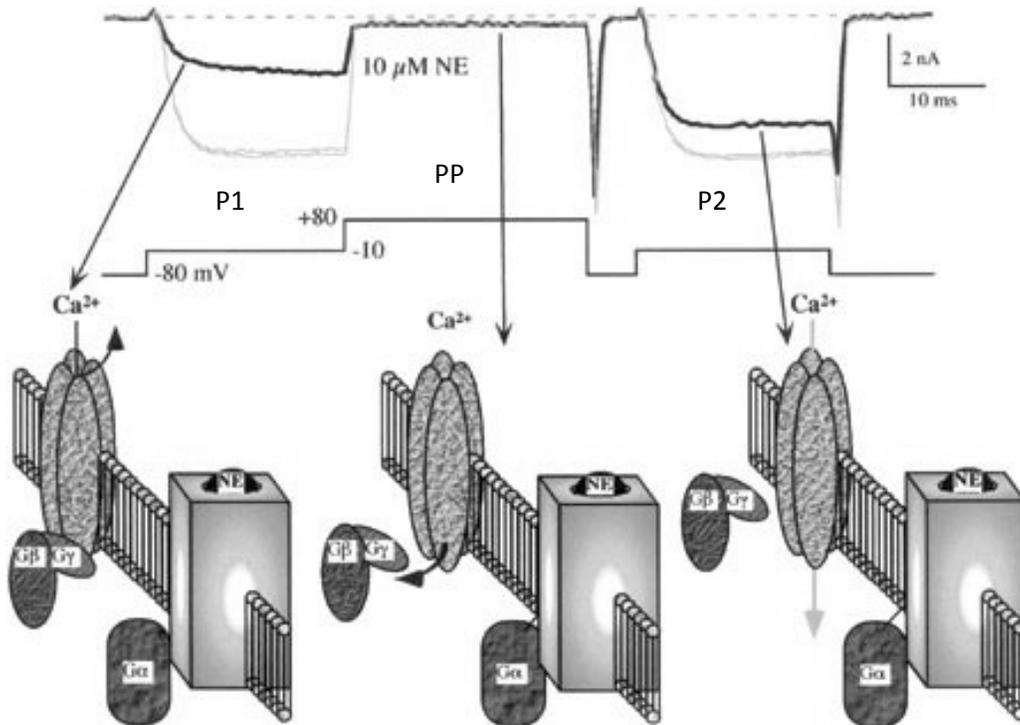


Figura 4. Se muestra el protocolo de doble pulso, en el Pulso 1 (P1) hay una inhibición de la corriente, durante el Pulso despolarizante (PP), se genera un despegue sensible al voltaje de las moléculas que interactúan con el canal, en el Pulso 2 (P2), la corriente se recupera casi a niveles del control. Modificado de Elmslie, 2003.

Estos efectos de las proteínas G sobre los canales Ca_v2 , pueden dividirse en efectos sobre la cinética de activación y efectos sobre la inactivación. Durante el proceso de activación de las proteínas G alcanzan una eficiente inhibición sobre los canales Ca_v2 . El lavado del agonista unido a su receptor, permite la recuperación de la amplitud de la corriente.

Los efectos inhibitorios de las proteínas G, se caracterizan por un enlentecimiento de la corriente iónica, y después de aplicar un pulso despolarizante, sucede la disociación de las subunidades $G\beta\gamma$ sobre el canal, la cual es sensible al voltaje, y después del pulso 2 se presenta la corriente queda transitoriamente en estado facilitado, denominada facilitación (De Waard, *et al*, 2005).

2.5 Sensibilidad al voltaje

El segmento S4 de la subunidad α de los canales con sensibilidad al voltaje (Figura 5), acarrea un determinado número de cargas, las cuales se mueven físicamente en respuesta a los cambios del potencial de membrana.

Varias de las cargas positivas se exponen al medio interno a un potencial negativo y a un medio externo a potenciales positivos, y solo una pequeña región del S4 está ocluida por la membrana dieléctrica.

El sensor de voltaje es una estructura especializada que incluye tanto al segmento S4 como a otros elementos transmembranales que forman las interfaces invaginadas del medio interno con el externo alrededor del segmento S4.

La apertura de los canales sensibles al voltaje es principalmente debida a cambios en el potencial de membrana, el cual causa el movimiento de cargas de apertura a través de la membrana, provocando cambios conformacionales del canal, el cual ocasiona la apertura o el cierre del poro.

La sensibilidad al voltaje de apertura depende principalmente del segmento S4 de la subunidad α del canal (dominio del sensor de voltaje). El segmento S4 cargado positivamente (Figura 5), presenta movimientos rotacionales a través de la estructura de la proteína durante el proceso de apertura.

El dominio del sensor de voltaje interactúa con el dominio del poro de la subunidad adyacente (Figura 5), provocando los cambios estructurales necesarios para la apertura o cierre del poro (Catterall, *et al*, 2007).

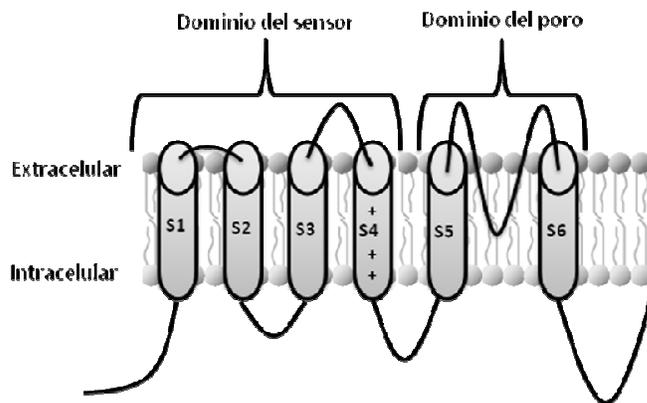


Figura 5. Dominios del sensor de voltaje (S1-S4) y del poro del canal (S5 y S6).

2.6 Moléculas que interaccionan con sitios específicos de los canales iónicos

Los canales iónicos son el blanco de diversos fármacos, los cuales se unen a sitios específicos del canal. Trabajos anteriores han documentado los sitios en los cuales estas moléculas interactúan con el canal, modificando la sensibilidad al voltaje, la cinética de apertura y cierre de los canales iónicos (McDonough, 2007).

Cestéle y Catterall en el año 2000 y nuevamente Catterall *et al* en el 2007, identifican los sitios en los cuales ciertas moléculas se unen a receptores específicos de la subunidad α de los canales iónicos. Estos autores identifican cinco sitios de esta subunidad en los cuales se pueden unir estas moléculas y dependiendo del sitio al que se una la molécula, se tendrá una respuesta diferente en la funcionalidad del canal.

2.7 Sitios de Interacción de la subunidad α

Sitio de interacción 1

El efecto que presentan algunas moléculas al unirse a esta subunidad es un efecto de bloqueo, debido a que se unen al poro del canal (Figura 6), de tal forma que impiden la conductancia de los iones por medio del poro. Este tipo de sustancias son hidrosolubles y actúan en la parte extracelular de la membrana lipídica (Cestéle y Catterall, 2000, Catterall, *et al*, 2007). Este sitio se localiza en el asa del poro que conforma el filtro de selectividad (Catterall, *et al*, 2007).

Sitio de interacción 2

Este tipo de moléculas tienen la capacidad de difundirse a través de la membrana e interactuar con su sitio de unión, el cual está localizado en la parte interna de la membrana

plasmática. Su efecto en el canal iónico es mediante modulación alostérica, debido a que no se unen directamente al poro ni al segmento S4, sin embargo, mediante la interacción con el sitio de unión, pueden modificar tanto la sensibilidad al voltaje como la cinética de apertura y cierre del canal, modificando la interacción de los segmentos que conforman la subunidad α del canal.

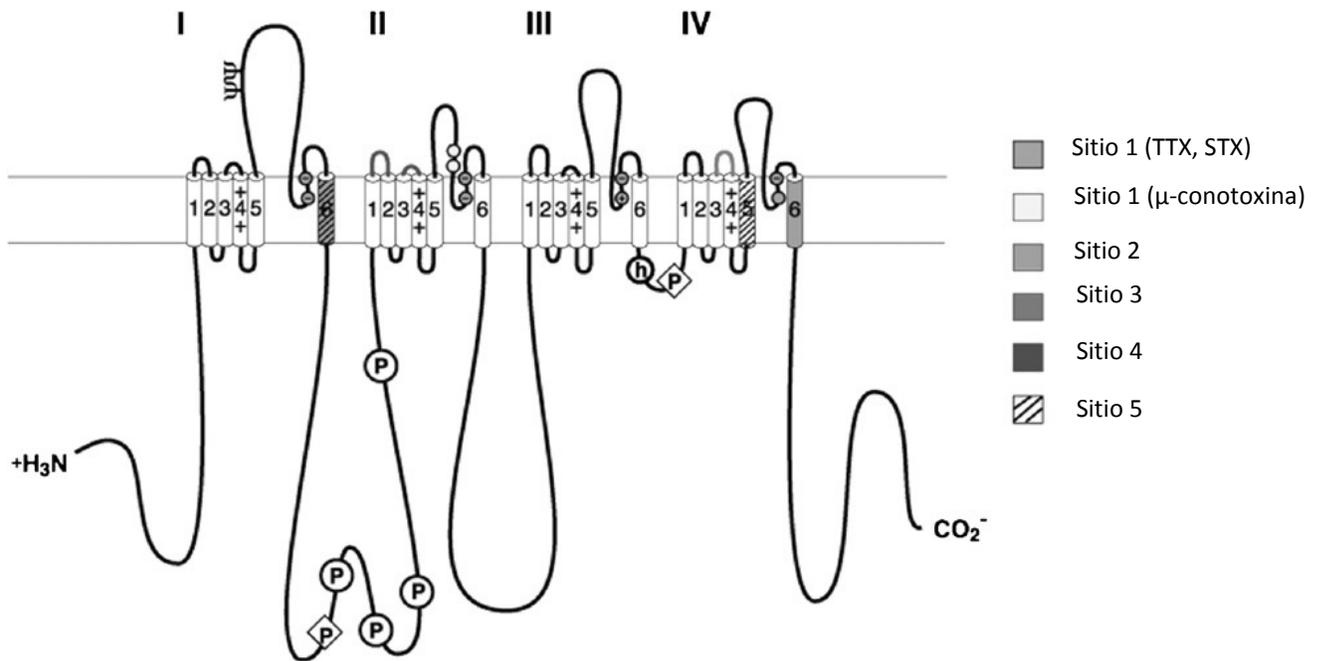


Figura 6. Sitios de interacción de la subunidad α de los canales iónicos (P significa sitios posibles de fosforilación). Modificado de Catterall, *et al*, 2007.

La modificación de la sensibilidad al voltaje se lleva a cabo mediante la unión preferencial de la molécula al estado activado del canal. Las subunidades involucradas en el sitio dos son el IS6 y el IVS6 (Figura 6). Estos sitios son importantes en la inactivación rápida del canal, además, estos sitios son adyacentes al segmento S4, provocando una alteración del sensor de voltaje mediante una modificación alostérica de la activación y a su vez permite una inactivación persistente, provocando que esta ocurra a potenciales de membrana más negativos.

Sitio de interacción 3

Estas moléculas llevan a cabo una interacción extramembranal, donde su efecto es enlentecer o bloquear la inactivación del canal iónico. La unión a este sitio es sensible al voltaje, debido a que la interacción de la molécula con este sitio decrece con las despolarizaciones, sugiriendo que las despolarizaciones cambian el estado conformacional de este sitio de interacción. Los segmentos que participan en este sitio son las asas que unen los segmentos S6 y S5 de los dominios I y IV (Figura 6), los cuales son importantes en la activación e inactivación del canal y la unión de la molécula con este sitio evita el cambio conformacional del canal, debido a una modulación alostérica del segmento S4 requerida para la inactivación rápida. Además, repetidas despolarizaciones de la membrana causan una disociación sensible al voltaje de la molécula con este sitio.

Sitio de interacción 4

Al igual que el sitio de interacción 3, este sitio se encuentra en la parte extramembranal de la subunidad α , estas moléculas inducen un cambio en la sensibilidad al voltaje en la activación del canal, haciéndolo más negativo y reduciendo el pico de amplitud de la corriente. Los segmentos involucrados en este sitio son las asas que conectan los segmentos IIS1- IIS2 y IIS3- IIS4, respectivamente (Figura 6), donde el segmento S4 es atrapado y estabilizado en la posición extracelular durante la despolarización, provocando un cambio en la sensibilidad al voltaje hacia potenciales más negativos.

Sitio de interacción 5

Como en el sitio de interacción 2, este sitio se encuentra en la parte intramembranal de la subunidad α y por lo tanto son liposolubles, estas moléculas incrementan la actividad del canal iónico al cambiar la activación del canal hacia potenciales más negativos y bloqueando la inactivación. Los segmentos involucrados en el sitio de interacción 5 son los IS6 y IVS5 (Cestéle y Catterall 2000, Catterall, *et al*, 2007) (Figura 6).

Sitio de interacción 6

Al igual que los sitios 3 y 4, este sitio se encuentra en la parte extramembranal de la subunidad α , en el cual, la unión de estas moléculas provocan una inactivación lenta del canal. El segmento involucrado en este sitio es el IVS4 (Figura 6), el cual es atrapado por la molécula que interactúa con él (Catterall, *et al*, 2007).

La sensibilidad al voltaje de un canal puede ser alterada por la unión de una molécula a un sitio de unión específico del canal. Una forma de identificar este cambio en la sensibilidad al voltaje, es mediante el corrimiento a la derecha, en caso de que la activación o inactivación del canal suceda a potenciales más positivos de las curvas de activación o inactivación o a la izquierda en caso de que suceda la activación o inactivación a potenciales más negativos.

2.8 Fármacos nootrópicos y derivados pirrolidónicos

La palabra nootrópico, proviene de las raíces griegas *noos*, que significa memoria y *tropos* que significa encender, éste término fue acuñado por C.E. Guirgea en 1972, a los nootrópicos se les atribuye las características de incrementar la memoria y el aprendizaje, protección neuronal por daños físicos o químicos, facilitan el flujo de información y promueven un mecanismo tónico eficiente, sin presentar los efectos negativos que producen los psicofármacos (Balaraman y Shingala, 2002).

Este tipo de sustancias pueden ser artificiales o naturales, las cuales son utilizadas para mejorar las capacidades cognitivas. El Piracetam, es un derivado cíclico del ácido gamma aminobutírico (GABA), sin embargo, no presenta efectos GABA miméticos (Castillo y Medina, 2005). El componente principal del Piracetam es una estructura denominada anillo de la pirrolidona (Castillo y Medina, 2005).

El primer fármaco pirrolidónico que llamó la atención fue el Piracetam en la década de 1970 y desde entonces, 1600 derivados pirrolidónicos se han sintetizado. Entre ellos, se

encuentran el Piracetam, el Levetiracetam, el Aniracetam, el Fasoracetam, el Nefiracetam, el Pramiracetam, el Nebracetam y el Oxiracetam. Sus estructuras químicas se presentan en la figura 7.

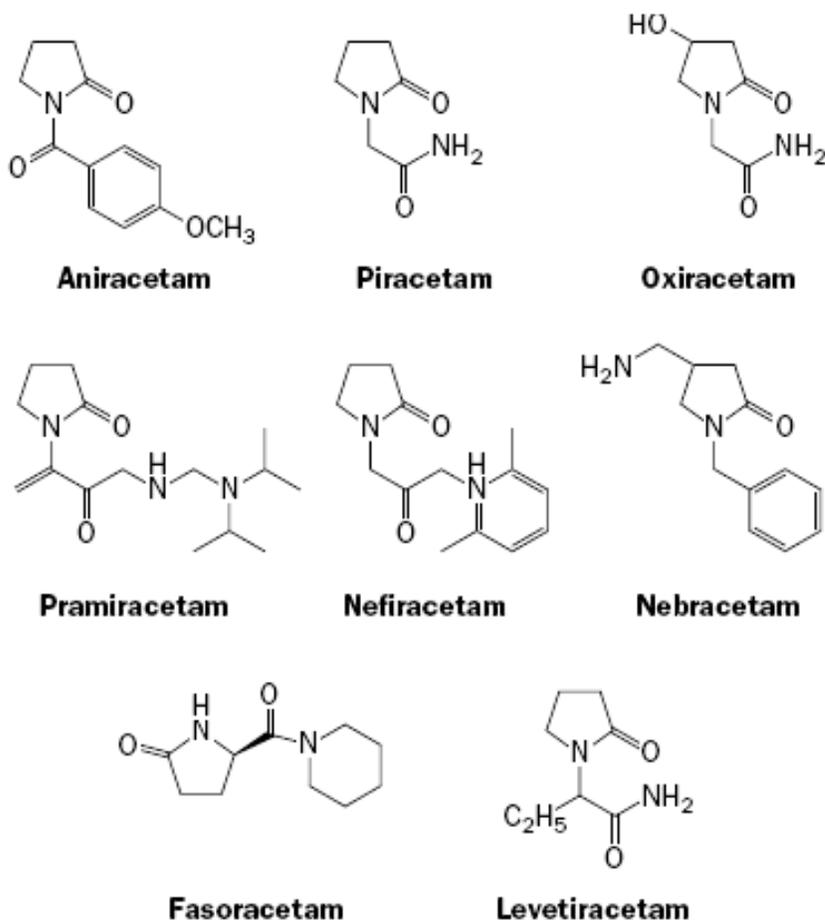


Figura 7. Estructura química de los fármacos pirrolidónicos. Tomado de Shorvon, 2001.

La acción de los derivados pirrolidónicos ha revelado varios efectos farmacológicos, mostrando pequeñas diferencias entre los fármacos.

Algunos de estos fármacos presentan efectos en los canales de calcio tipo N o L, e incluso, se ha visto que cambian las propiedades físicas de la membrana, incrementando su fluidez (Shorvon, 2001).

2.9 El Piracetam

El Piracetam es un fármaco inodoro, de sabor amargo, soluble en agua y metanol. Estudios de estereoscopia de resonancia magnética prueban que la molécula del Piracetam se une a las cabeza polar de los fosfolípidos de las membranas lipídicas (Winblad, 2005). El nombre químico de este fármaco es 2-(2-oxo-pirrolidinil) acetamida, y la estructura núcleo es el racetam (Figura 8), la cual se relaciona con la actividad farmacológica nootrópica (Castillo y Medina, 2005). Su fórmula química es $C_6H_{10}N_2O_2$, la cual se muestra en la figura 8, y su peso molecular es de 142.15 g/mol (Castillo y Medina, 2005).

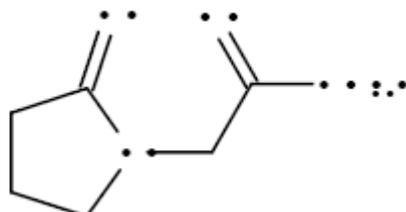


Figura 8. Estructura química del Piracetam. Tomado de Castillo y Medina, 2005

Farmacocinética del Piracetam

El Piracetam presenta una absorción rápida por parte del organismo (Castillo y Medina, 2005, Winblad, 2005). Los niveles de concentración máxima del Piracetam en el suero sanguíneo pueden encontrarse después de 45 a 60 minutos, mientras que en el líquido céfalo-raquídeo después de 2 a 8 horas de su administración y es eliminado por completo después de 30 horas en la orina. (Castillo y Medina, 2005). Su concentración máxima es generalmente de 84 $\mu\text{g/mL}$ (Winblad, 2005).

3.1 Derivados pirrolidónicos y canales de calcio

Se han reportado varios trabajos en los cuales se describen las acciones que presentan estos fármacos sobre los canales de calcio.

En 1994, Yoshii y Watabe, reportaron las acciones del Nefiracetam, las cuales se muestran a en neuronas híbridas de neuroblastoma y glioma, donde hay predominancia de canales de calcio tipo L y T.

Sus resultados muestran que este fármaco incrementa de manera preferencial la amplitud de la corriente de los canales de calcio tipo L sensibles al voltaje (Figura 9), sin afectar su sensibilidad al voltaje.

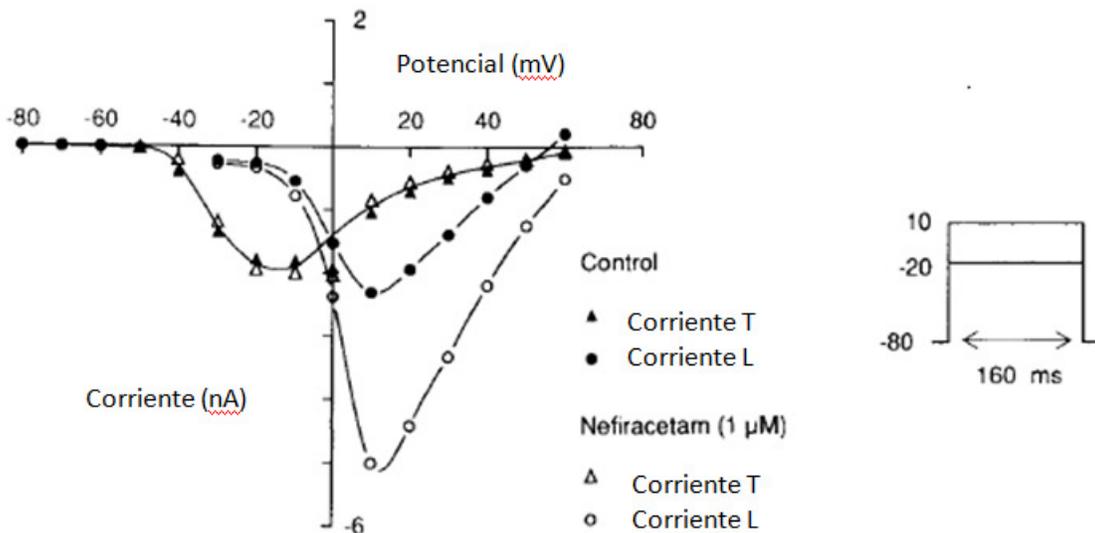


Figura 9. Efectos del Nefiracetam en la amplitud de las corrientes de calcio tipo L. Modificado de Yoshii y Watabe, 1994. En A, se muestra el efecto del Nefiracetam en la corriente tipo L, en control (izquierda) y en presencia de Nefiracetam 1μM (derecha), en B, se muestra el efecto selectivo del

3. ANTECEDENTES

3.1 DERIVADOS PIRROLIDÓNICOS Y CANALES DE CALCIO

Nefiracetam sobre las corrientes de calcio tipo L en comparación con la corriente tipo T en control y en presencia de Nefiracetam. Modificado de Yoshii y Watabe, 1994.

Este fármaco presenta un efecto dosis-dependiente. Al incrementar la dosis del fármaco, aumenta la amplitud de las corrientes tipo L, sin embargo, presenta un decremento en sus efectos al llegar a una concentración de $10\mu\text{M}$.

Para comprobar la selectividad al canal de calcio tipo L, Yoshii y Watabe adicionaron el bloqueador selectivo de este canal, la Nifedipina, el cual, en presencia de Nefiracetam, provocó que no se presentaran los efectos del fármaco (Figura 11).

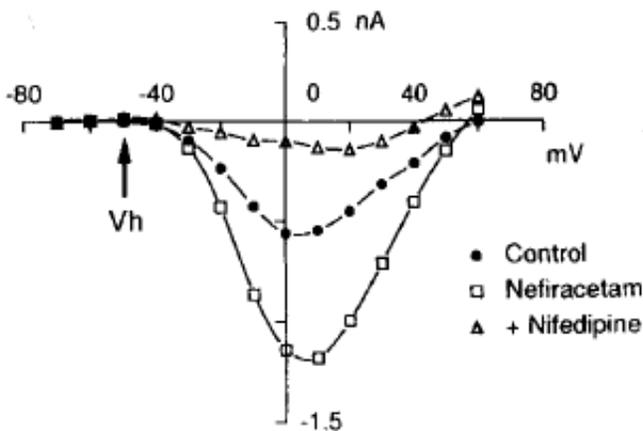


Figura 11. Efectos de selectividad del Nefiracetam al aplicar la Nifedipina. En A, se muestra las corrientes de calcio tipo L en control, en presencia de Nefiracetam $1\mu\text{M}$ y en presencia de Nefiracetam más Nifedipina $10\mu\text{M}$, en B, se muestra la curva corriente-voltaje (I-V), donde se observa los efectos selectivos del Nefiracetam y en presencia del bloqueador selectivo comparados con el control Modificado de Yoshii y Watabe, 1994.

En 1997, Solntseva y colaboradores, reportaron los efectos del Piracetam y de su análogo GVS-111 sobre los canales de calcio tipo L en neuronas del caracol *Helix pomatia*. La principal acción del Piracetam y del GVS-111, fue el decremento en la amplitud de las corrientes de calcio, los cuales resultaron ser reversibles después del lavado y dependientes de la dosis.

Los autores reportaron un cambio en la sensibilidad al voltaje del fármaco GVS-111 hacia potenciales más negativos (Figura 13), pero no mencionaron cambio en la sensibilidad al voltaje provocada por el Piracetam en los canales de calcio tipo L.

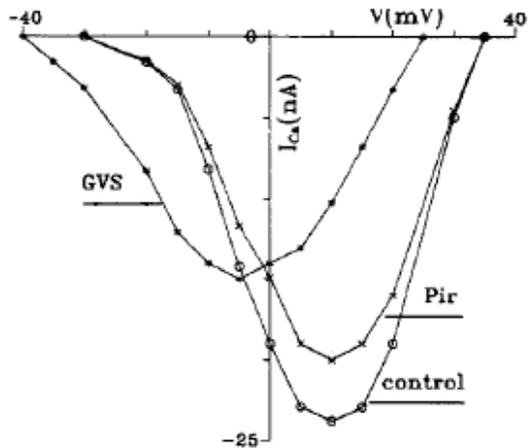


Figura 13. Muestra el corrimiento de la curva I-V del fármaco GVS-111 hacia la izquierda, mientras que sólo se muestra el decremento de la amplitud de las corrientes de calcio provocada por Piracetam y comparando ambas con la corriente control. Tomado de Solntseva, *et al*, 1997.

Koike y colaboradores en 1992, estudiaron el efecto del Aniracetam en neuronas del hipotálamo ventromedial de la rata, en el que se encuentran tres tipos principales de corrientes de calcio, las de tipo T, L y N.

Los resultados indican que el efecto del fármaco es dependiente de la dosis al realizar la curva dosis-respuesta en las corrientes de calcio (Figura 14) y reversible después del lavado.

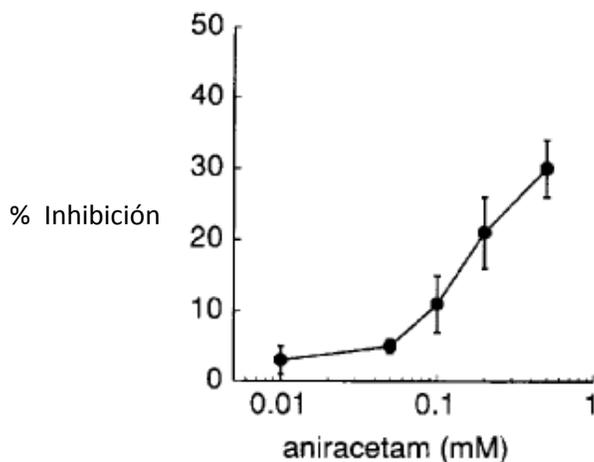


Figura 14. Curva dosis-respuesta del Aniracetam. Modificado de Koike, *et al*, 1992.

El efecto del Aniracetam sobre las corrientes de calcio fue la reducción de su amplitud. En la curva I-V (Figura 15), se muestra un corrimiento a la izquierda de la corriente de calcio y una reducción en su amplitud.

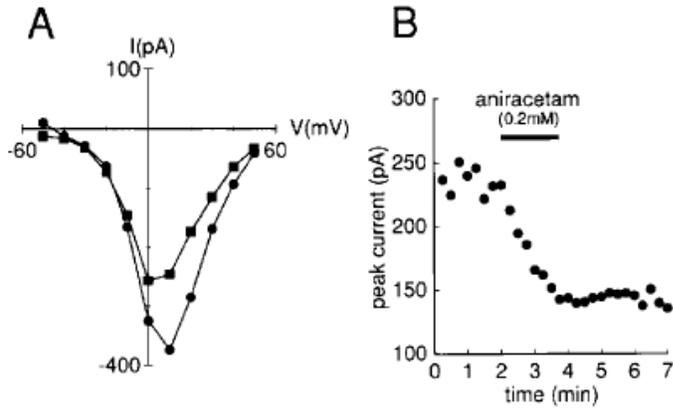


Figura 15. Efecto del Aniracetam sobre las corrientes de calcio. En A, se muestra la curva I-V. En B, se muestra el efecto del Aniracetam sobre la corriente pico. Tomado de Koike, *et al*, 1992.

También, se realizó una prueba de selectividad del fármaco (Figura 16). Aplicando bloqueadores selectivos, para los canales tipo L y N, Koike y colaboradores encontraron que al aplicar Nicardipina en presencia de Aniracetam, se aprecia que hay efecto del fármaco sobre el canal de calcio tipo L, sin embargo, al aplicar ω -conotoxina en presencia de Aniracetam, ya no se observó efecto alguno sobre las corrientes de calcio tipo N, indicando que este fármaco es selectivo a este tipo de canal.

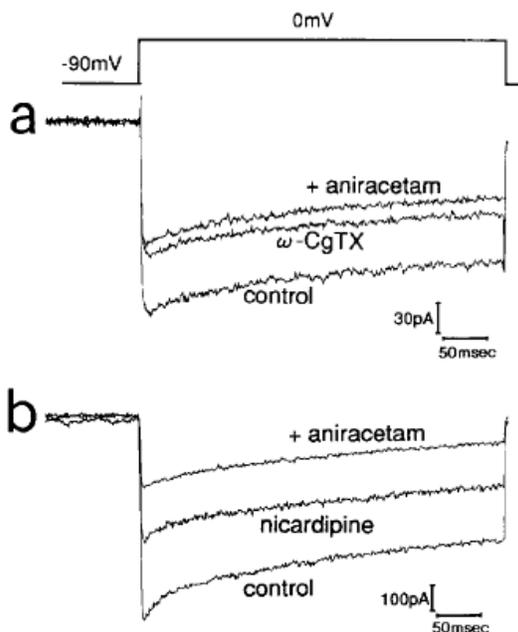


Figura 16. Efecto del Aniracetam sobre los canales de calcio tipo L y N. En a, se muestran las corrientes de calcio tipo N, en control, en presencia del aniracetam y en presencia de ω -conotoxina (CgTX), en b, se muestran las corrientes de calcio tipo L, en control, en presencia de aniracetam y en presencia de nicardipina (bloqueador de la corriente tipo L) Modificado de Koike, *et al*, 1992.

Niespodziany y colaboradores en 2001 reportaron en neuronas del hipocampo CA1 de la rata las acciones inhibitorias de las corrientes de calcio de alto umbral (L y N) producidas por el fármaco Levetiracetam (Figura 17).

En ese estudio se realizó la aplicación del Levetiracetam con solamente dos dosis diferentes, las cuales no presentaron diferencias importantes, por lo que se concluyó que este fármaco no es dependiente de la dosis (Figura 17). Sin embargo, sí presentó reversibilidad después del lavado.

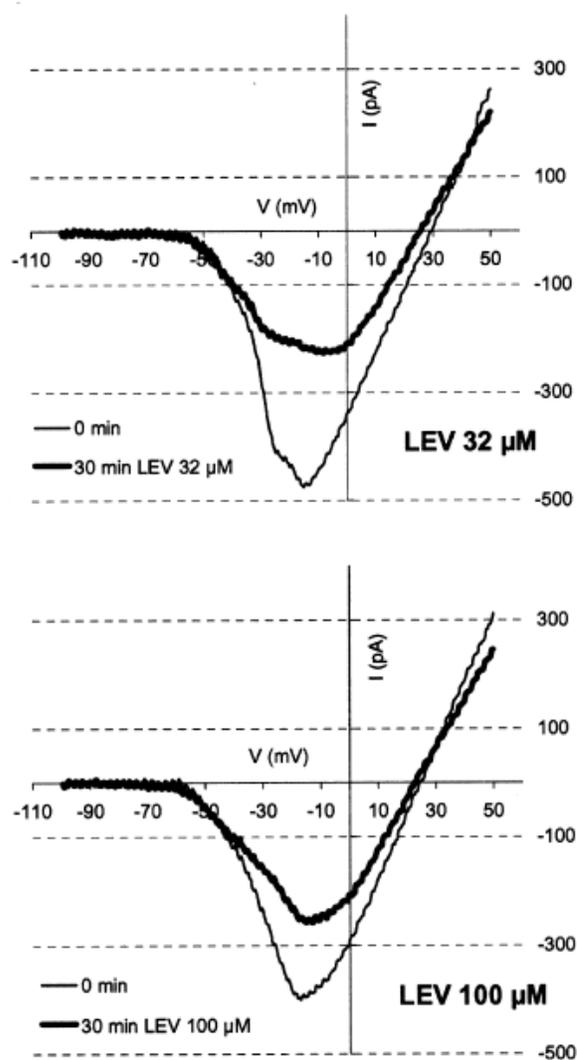


Figura 17. Curvas I-V, en las cuales en la superior se muestra el efecto del Levetiracetam en la corriente de calcio a una concentración de 32 μM , mientras que en la inferior se muestra a una concentración de 100 μM . Tomado de Niespodziany, *et al*, 2001.

En el trabajo realizado por Lukyanetz y colaboradores en el 2002, se demostraron los efectos del Levetiracetam en canales de calcio en neuronas CA1 del hipocampo de la rata, donde se presentó una reducción en la amplitud de las corrientes de calcio (Figura 18).

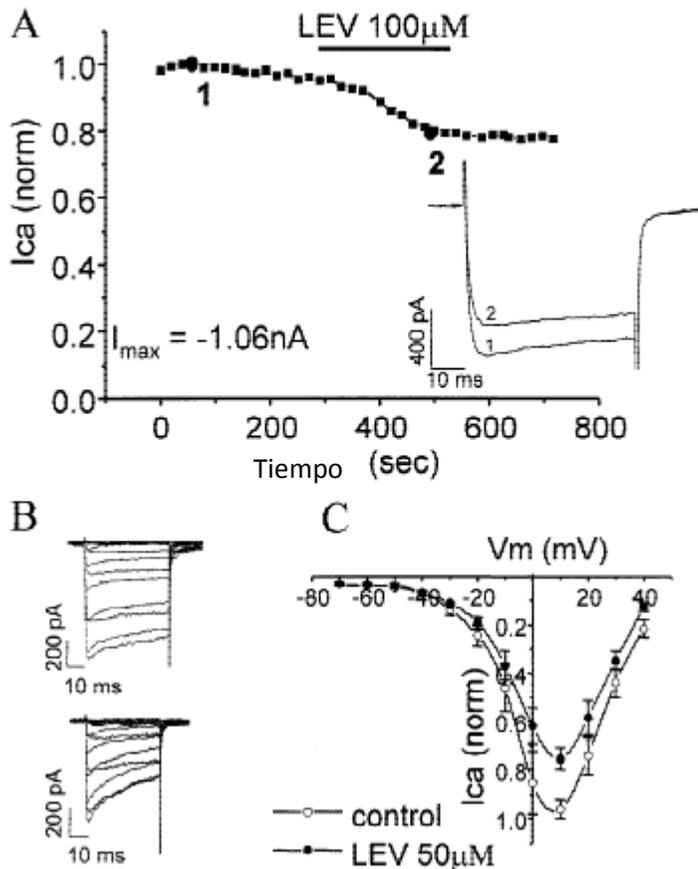


Figura 18. Efecto del Levetiracetam sobre las corrientes de calcio. En A se muestra el efecto del Levetiracetam en la corriente de calcio, 1 es el control y 2 es en presencia del Levetiracetam a 100 μ M, en B se muestran los trazos de la corriente de calcio donde el trazo superior es en condiciones control y el trazo inferior en presencia de Levetiracetam a una concentración de 50 μ M, en C se muestra a la curva I-V en condiciones control y en presencia de Levetiracetam a 50 μ M. Modificado de Lukyanetz, *et al*, 2001.

El Levetiracetam no mostró un cambio en la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio, debido a que no había un corrimiento de las curvas de activación ni en las de inactivación, tampoco se produjo facilitación cuando utilizaron un protocolo de doble pulso.

Este fármaco no presentó reversibilidad después del lavado, pero sí una respuesta dependiente de la dosis, como se muestra en la curva dosis respuesta, sin llegar a un 100% de bloqueo de las corrientes de calcio, con una dosis media de 14.7 μM (Figura 20).

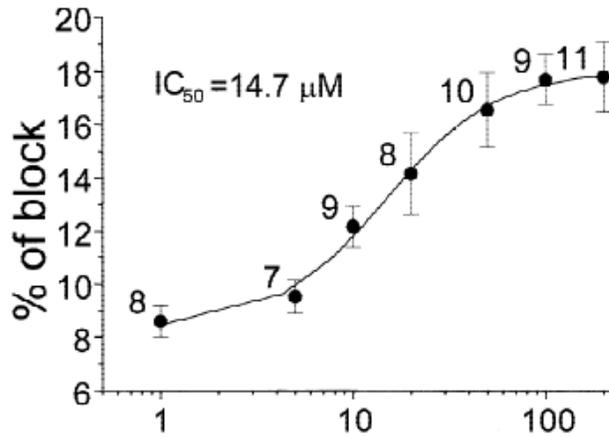


Figura 20. Curva dosis-respuesta del Levetiracetam en corrientes de calcio, donde la concentración máxima es 200 μM . Tomado de Lukyanetz, *et al*, 2001.

Además, Lukyanetz y colaboradores, investigaron el efecto del fármaco en presencia de bloqueadores selectivos de los diferentes tipos de canales de calcio de alto voltaje (L, N y P/Q), comprobando de esta forma que este fármaco es selectivo a canales de calcio tipo N (Figura 21)

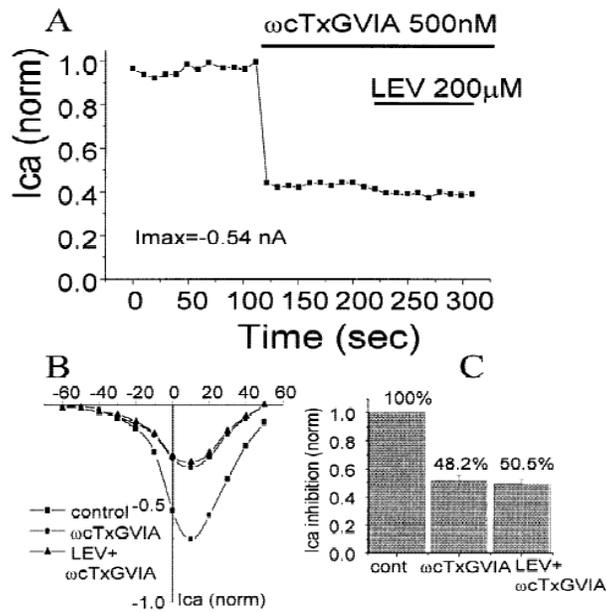


Figura 21. Efecto del Levetiracetam en las corrientes de calcio tipo N. En A, se muestra la corriente en condiciones control, en presencia de ω -conotoxina a 500 nM y en presencia de Levetiracetam a 200 μ M + ω -conotoxina a 500 nM. En B, se muestra la curva I-V en condiciones control, en presencia de ω -conotoxina y en presencia de Levetiracetam + ω -conotoxina. En C, el porcentaje de inhibición de las corrientes en condiciones control, en presencia de ω -conotoxina y en presencia de Levetiracetam + ω -conotoxina. Modificado de Lukyanetz, *et al*, 2001.

En el 2004, Pisani y colaboradores, realizaron la investigación en neuronas CA1 del hipocampo de rata, en presencia de Levetiracetam, reportando que este fármaco presenta efectos dependientes de la dosis y además es reversible después del lavado. El efecto del fármaco fue reducir la amplitud de las corrientes de calcio (Figura 22).

Finalmente, aplicaron bloqueadores selectivos para cada canal (Figura 23), con la finalidad de identificar la selectividad del fármaco hacia un tipo de canal, resultando ser el Levetiracetam parcialmente selectivo al canal de calcio tipo N, y con poca selectividad hacia canales de calcio tipo P y Q.

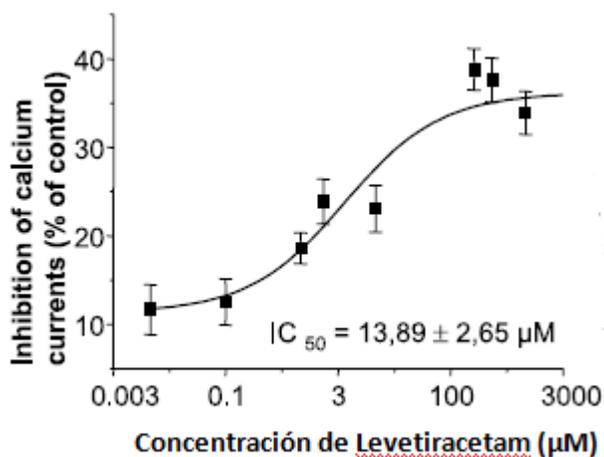


Figura 22. Efecto del Levetiracetam sobre las corrientes de calcio (superior) y curva dosis respuesta del Levetiracetam (inferior), en el cual sus efectos demuestran ser dependientes de la dosis. Tomado de Pisani, *et al*, 2004.

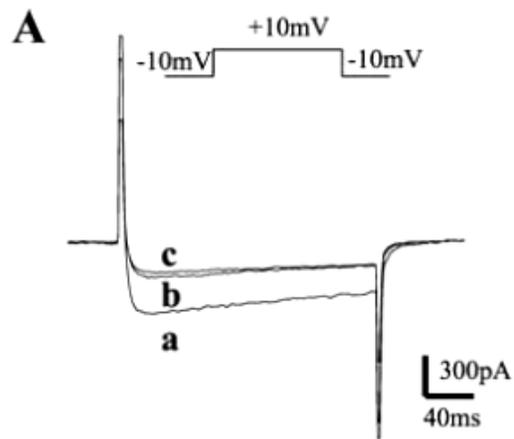
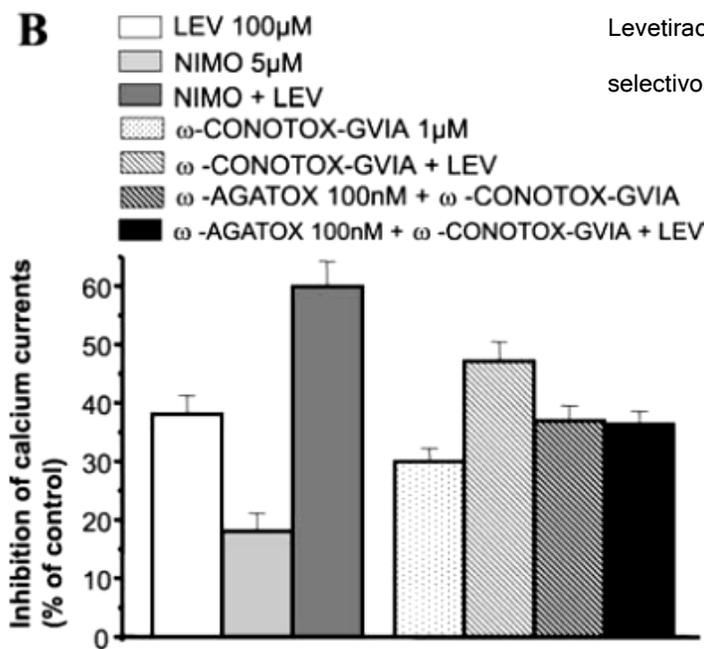


Figura 23. Efecto parcialmente selectivo en canales de calcio tipo N. En A, se muestran las corrientes de calcio en presencia de los bloqueadores selectivos para los canales de calcio tipo N y P/Q, (a) es la corriente control, en (b) las corrientes en presencia de los bloqueadores y (c) las corrientes en presencia de los bloqueadores y Levetiracetam. En B, se muestra el efecto del Levetiracetam en presencia de bloqueadores selectivos. Tomado de Pisani, *et al*, 2004.



- ω -conotox-GVIA= ω -conotoxina, bloqueador selectivo de los canales tipo N
- Nimo= Nifedipina, bloqueador selectivo de las corrientes de calcio tipo L
- ω -Agatox= ω -Agatoxina, bloqueador de las corrientes P/Q

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Investigaciones anteriores han confirmado la existencia de moléculas que modifican la actividad de los canales iónicos, interactuando con segmentos específicos del canal, denominados sitios de acción, los cuales provocan que las corrientes de apertura se presenten a potenciales más despolarizantes o menos despolarizantes, presentándose una reducción o incremento en la amplitud de las corrientes y bloqueo de los canales iónicos (Cestelé y Catterall, 2000, Catterall, *et al*, 2007, McDonough 2007).

Este tipo de moléculas pueden ser fármacos nootrópicos, como los derivados de la pirrolidina, los cuales han mostrado actividad terapéutica a través de su interacción con canales de calcio como el Piracetam. Sin embargo, hay investigadores que han trabajado con este tipo de fármacos, y no han encontrado que alteren la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio (Yoshii *et al*, 1994, Lukyanetz *et al* 2002). Por otro lado, hay otros investigadores que reportan en sus resultados cambios en la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio producido por los derivados pirrolidónicos (Solntseva, *et al*, 1997, Koike, *et al*, 1992).

Existen reportes de que los efectos de los derivados pirrolidónicos pueden tener efectos reversibles después del lavado (Solntseva, *et al*, 1997, Koike, *et al*, 1992, Niespodziany, *et al*, en 2001, Pisani, *et al*, 2004), sin embargo, Lukyanetz y colaboradores, 2002, reportan que no hay reversibilidad.

La mayoría de estas investigaciones reportan que disminuye la amplitud de las corrientes de calcio (Solntseva, *et al*, 1997, Koike, *et al*, 1992, Niespodziany, *et al*, en 2001, Lukyanetz *et al*, 2002, Pisani, *et al*, 2004), sin embargo, Yoshii y Watabe, 1994, reportan que el Nefiracetam aumenta la amplitud de las corrientes de calcio.

En cuanto a la dependencia de la dosis, se ha reportado que la mayoría de este tipo de fármacos presentan dependencia a la dosis, (Yoshii y Watabe, 1994, Solntseva, *et al*, 1997, Koike, *et al*, 1992, Lukyanetz *et al*, 2001, Pisani, *et al*, 2004), sin embargo, Niespodziany, *et al*, en 2001, reporta que el Levetiracetam no presenta dependencia a la dosis.

Hasta ahora se ha reportado que este tipo de fármacos son parcialmente selectivos a canales de calcio tipo N (Koike, *et al*, 1992, Niespodziany, *et al*, 2001, Lukyanetz *et al*, 2002, Pisani *et al*, 2004) en preparaciones en las que coexisten varias poblaciones de canales de calcio, como en las preparaciones del ganglio cervical superior de la rata los canales de calcio tipo N representan más del 80% del total de los canales (García-Ferreiro, 2001), esta característica hace a esta preparación más ventajosa para el estudio de los canales de calcio tipo N.

Cabe mencionar que en los trabajos publicados han utilizado preparaciones, fármacos nootrópicos y concentraciones marcadamente diferentes entre ellas, conduciéndolos a resultados con una gran variabilidad en las acciones producidas por este tipo de fármacos sobre los canales de calcio tipo N.

Considerando los antecedentes citados, el presente trabajo se enfoca a la investigación de la modificación de las propiedades electrofisiológicas en los canales de calcio tipo N en neuronas del ganglio cervical superior de la rata en presencia del fármaco Piracetam (2-(2-oxo-pirrolidinil) acetamida).

5. PREGUNTA CENTRAL

¿Qué características electrofisiológicas de los canales de calcio tipo N modifica el Piracetam en neuronas SCG?

6. HIPÓTESIS

Hipótesis:

Si el Piracetam ejerce un efecto rápido, reversible, y dosis-dependiente sobre la corriente del canal de calcio tipo N, sin afectar la cascada de señalización ligada al canal, entonces sus efectos pueden explicarse por acciones distintas sobre el canal.

Por lo tanto, si estas acciones pueden afectar el sensor de voltaje del canal, explicaría el cambio en la sensibilidad al voltaje y la facilitación de la corriente.

7. OBJETIVOS

7.1 GENERAL

7.2 PARTICULARES

7.1 General

- Caracterizar electrofisiológicamente las acciones del Piracetam sobre los canales de calcio tipo N en neuronas del Ganglio Cervical Superior (SCG)

7.2 Particulares

- Cualificar si la sensibilidad al voltaje en canales de calcio tipo N es modificada por el Piracetam en neuronas del ganglio cervical superior de la rata.
- Cuantificar el efecto del Piracetam sobre la amplitud de las corrientes de los canales de calcio tipo N en neuronas del ganglio cervical superior de la rata.
- Evaluar la reversibilidad del efecto del Piracetam
- Construir una curva dosis-respuesta

8.1 Neuronas SCG

El uso de cultivo de neuronas del ganglio cervical superior de rata (SCG por sus siglas en inglés) es un modelo para la evaluación electrofisiológica *in vitro* de los canales de calcio tipo N.

Trabajos anteriores, han reportado la presencia de canales de calcio con porcentajes variables dependiendo de la preparación utilizada, tanto en neuronas del sistema central como periférico de los mamíferos. El ganglio cervical superior de la rata presenta una población alta de canales de calcio tipo N, mayor al 85% (Regan, *et al*, 1991; García-Ferreiro, *et al*, 2001), mientras que el resto de las preparaciones neuronales muestran una población inferior de estos canales. Con estos datos se postula que la preparación de neuronas del ganglio simpático cervical de la rata (SCG) es el modelo neuronal más adecuado para el estudio de canales de calcio tipo N.

Para conocer la modulación sensible al voltaje de los canales de calcio tipo N producida por fármacos, se trabajó en esta Tesis con una población homogénea y elevada de los mismos, como ocurre en las neuronas periféricas del ganglio cervical superior de la rata, caracterizando electrofisiológicamente las acciones del Piracetam, el cuál es una sustancia nootrópica que actúa sobre este tipo de neuronas.

8.2 Cultivo de Neuronas SCG

24 horas previas al experimento, se realizó un tratamiento a 4 cajas petri estériles con polilisina (1 mg/l) en un ambiente estéril, con el fin de facilitar la adhesión de las células al sustrato de las cajas.

8. MATERIAL Y MÉTODO

8.1 NEURONAS SCG

8.2 CULTIVO DE NEURONAS SCG

8.3 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

8.4 SOLUCIONES UTILIZADAS PARA EL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

El modelo animal que se utilizó para los experimentos, fueron ratas macho de la cepa Wistar de 5 semanas de edad, las cuales fueron anestesiadas con CO₂ y posteriormente decapitadas.

Posteriormente, se procedió a extirpar los ganglios, los cuales se colocaron en solución Hank's en cuatro cajas petri de 60 mm, las cuales fueron colocadas en hielo y bajo oxigenación constante, con el fin de mantenerlos bajo condiciones fisiológicas.

A los ganglios, se les retiró el tejido conectivo que los recubre y se les efectuaron de siete a diez cortes similares, teniendo precaución de no fraccionarlos, posteriormente fueron incubados durante 20 minutos a 37° C, en una solución de papaína (20 U/ml), cisteína (4 mg/ml) y 3 ml de solución de Hank's, para disociar el tejido.

Al terminar el tiempo de incubación, se intercambié la solución de papaína y cisteína, por una solución de dispasa (20 mg/3 ml) y colagenasa (2 mg/3 ml), y se volvieron a incubar de 20 minutos a 37° C, con el fin de facilitar la disociación del tejido

Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó dispersión mecánica del tejido, con el fin de separarlo.

Una vez obtenidas las células aisladas de SCG, se adicionaron 7 ml de L-15 a la suspensión celular, y se centrifugaron a 1000 rpm durante 8 minutos, esta operación se repitió por segunda vez.

Al terminar el lapso 1 de centrifugación, se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron con 10 ml de DMEM y se sometieron de nuevo a centrifugación durante 8 minutos.

Al finalizar el tiempo 2 de centrifugación, se retiró el sobrenadante, dejando 210 µl para la resuspensión.

Durante los tiempos de centrifugación, las cajas petri tratadas con polilisina, se lavaron con agua desionizada estéril varias veces. Al final del lavado, las cajas fueron secadas con succión de agua-aire. Se aplicó polilisina con el fin facilitar la adhesión celular pero que no ocasionara la muerte al cultivo celular.

Al terminar el proceso de lavado, se colocó en cada una de las cajas con polilisina, 2 ml de medio DMEM y un anillo de precipitación, donde posteriormente se sembraron 70 μ l de la solución con las células.

Por último, las células se incubaron a 95% de O₂ y 5% de CO₂, a una temperatura de 37° C durante 24 horas.

7.3 Registro electrofisiológico

Se utilizó la técnica de patch clamp, en configuración de célula completa, los datos se obtuvieron utilizando un amplificador HEKA EPC-9 patch-clamp (HEKA elektronik, Germany).

Los electrodos utilizados se obtuvieron a partir del pulido de capilares de vidrio, que posteriormente se sometieron a un proceso de afinación de la punta, a partir de un shock térmico mediante una resistencia. La resistencia de las pipetas utilizadas fue de entre 1.5 y 2 M Ω .

Durante el registro, se realizó una frecuencia de muestreo de una n de 5 a 6 células, las cuales fueron perfundidas localmente por goteo continuo con solución control, mediante el flujo continuo de válvulas solenoides.

El voltaje del protocolo del pulso comando fueron generalizados utilizando BASIC-FASTLAB (Indec Systems, Capitola, CA, USA) o Patchmaster and fitmaster (HEKA Instruments, Inc).

Las corrientes fueron típicamente filtradas de 3 a 10 kHz (filtro Bessel de 3 polos) y en la digitalización de utilizó una tarjeta A/D de 12 Lab Master borard. Las corrientes en estado inicial fueron muestreadas a 10 kHz.

La corriente de membrana fue medida bajo configuración de célula completa mediante una pipeta y la cancelación de la capacitancia.

7.4 Soluciones utilizadas para el registro electrofisiológico

Solución de sello

Compuesto	Concentración mM
NaCl	160
KCl	2.5
HEPES	10
Glucosa	8
CaCl₂	5
MgCl₂	1

Solución externa

Compuesto	Concentración mM
TEA-Cl	165
BaCl ₂	1
Glucosa	8
HEPES	10
MgCl ₂	1
Adicionar los siguientes compuestos al realizar los registros	
TTX	0.2
Nifedipina	2μM
Piracetam	10μM

Solución Interna

Compuesto	Concentración mM
CsCl	140
TEA-Cl	20
HEPES	10
BAPTA tetra Cs	0.1
MgCl ₂	5
Adicionar los siguientes compuestos al realizar los registros	

ATP	4
GTP	2
Leupeptina	0.1

Estas soluciones se filtraron con un filtro de 0.22 μ M, antes de utilizar las soluciones, se ajustaron a un pH final de 7.4 (solución interna con CsOH 1M, solución de sello con NaOH y solución externa con TEA-OH).

9.1 El Piracetam reduce la amplitud de las corrientes de calcio tipo N

Para determinar si el Piracetam reduce la amplitud de las corrientes de calcio tipo N, se utilizó un protocolo de un pulso, iniciando a un potencial de -80 mV durante 5 ms, posteriormente se aumentó a -8 mV durante 20 ms y un regreso de -40 mV durante 15 ms.

Se utilizaron varias dosis de Piracetam durante el registro electrofisiológico, obteniéndose una reducción en la amplitud de la corriente de calcio tipo N. El efecto se observa en la figura 24, donde la reducción de las corrientes de bario (el cual se utilizó como acarreador) fue provocada por el Piracetam.

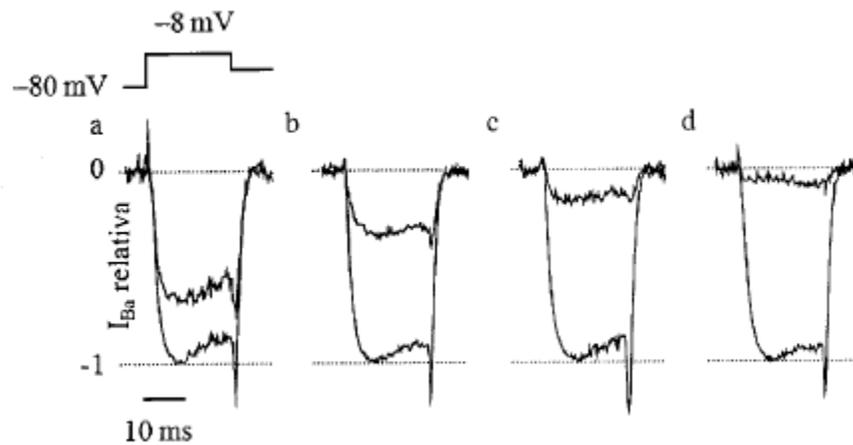


Figura 24. Se muestra el efecto del Piracetam en la amplitud de la corriente de bario normalizada comparada con la corriente control, en a, a una concentración de 2 μM , en b, a una concentración de 10 μM , en c, a una concentración de 20 μM y en d a una concentración de 2000 μM .

9. RESULTADOS

9.1 EL PIRACETAM REDUCE LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES DE CALCIO TIPO N

9.2 EL EFECTO DEL PIRACETM ES DEPENDIENTE DE LA DOSIS

9.3 LA REVERSIBILIDAD DEL EFECTO DEL PIRACETAM

9.4 EL PIRACETAM Y LA SENSIBILIDAD AL VOLTAJE DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO N DE NUERONAS SCG

9.2 El efecto del Piracetam es dependiente de la dosis

Mediante los datos obtenidos de los registros de la figura 24, en la que se muestra el efecto de reducción de las corrientes de bario a varias dosis del Piracetam, se obtuvo la gráfica de dosis respuesta, la cual fue ajustada mediante una ecuación logística $E = [(A_1 - A_2)/(1 + (C/IC_{50})^n)] + A_2$, donde E es el efecto producido por el Piracetam a una concentración C, A_1 y A_2 son el porcentaje de la corriente pico mínima y máxima del efecto, IC_{50} es la dosis media inhibitoria producida por el efecto del Piracetam, y n es el ajuste del coeficiente de Hill, indicando los pasos de la curva.

El IC_{50} obtenido para esta preparación fue de $3.37 \pm 0.58 \mu\text{M}$ con una n de 17 células. El coeficiente de Hill fue de 1, lo cual sugiere que el Piracetam solamente se puede unir a un solo sitio del canal, como se muestra en la figura 25, a medida que se va aumentando la dosis, la corriente va disminuyendo. El porcentaje de bloqueo en relación con la concentración del fármaco es proporcional al logaritmo de la dosis.

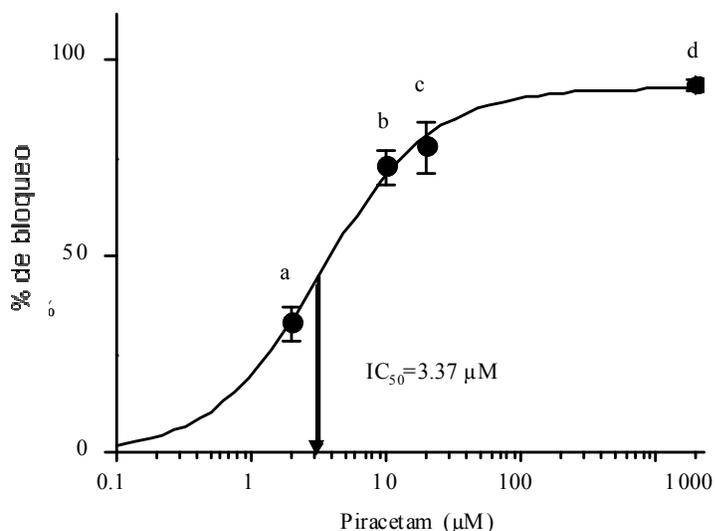


Figura 25. Curva dosis-respuesta, la flecha indica la dosis media del fármaco. El porcentaje máximo de bloqueo fue de $93.56 \pm 1.56\%$ a una concentración de $2 \mu\text{M}$. Para realizar la curva se utilizó una n de 17 células.

9.3 El efecto del Piracetam es reversible

Para la determinación del efecto, se realizó un protocolo de curso temporal, en control, en presencia de Piracetam $10\mu\text{M}$ y lavado. El protocolo presentó las siguientes características: Se aplicó un pulso cada 6 segundos desde un pulso de mantenimiento de -80 mV , se llevó a un pulso de -8 mV durante 20ms y un regreso a -30 mV (Figura 26).

Durante los primeros 12 segundos sólo se aplicó solución externa (control), posteriormente se aplicó del milisegundo 13 al 84 el Piracetam a una concentración de $10\mu\text{M}$ y después del segundo 85 al 150 de nuevo solución externa.

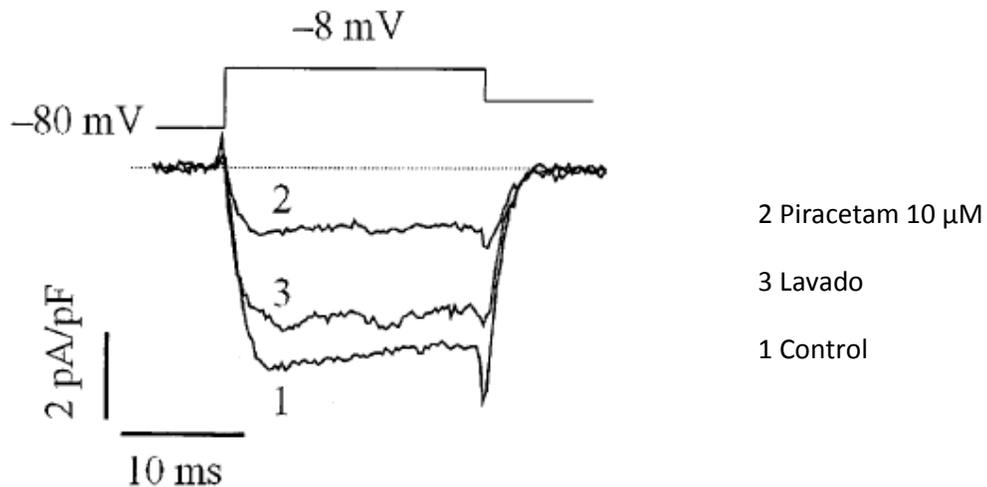


Figura 26. Efecto reversible del Piracetam, al aplicar el protocolo de curso temporal, en condiciones control, en presencia de Piracetam $10\mu\text{M}$, observándose una reducción en la amplitud de la corriente y después del lavado, donde se observa una recuperación de la corriente.

Durante la aplicación del Piracetam se observa una disminución en la amplitud de la corriente de Ba^{2+} y durante el lavado se empieza una recuperación de la corriente a partir del milisegundo 90, teniendo una reversibilidad rápida después del lavado (Figura 27).

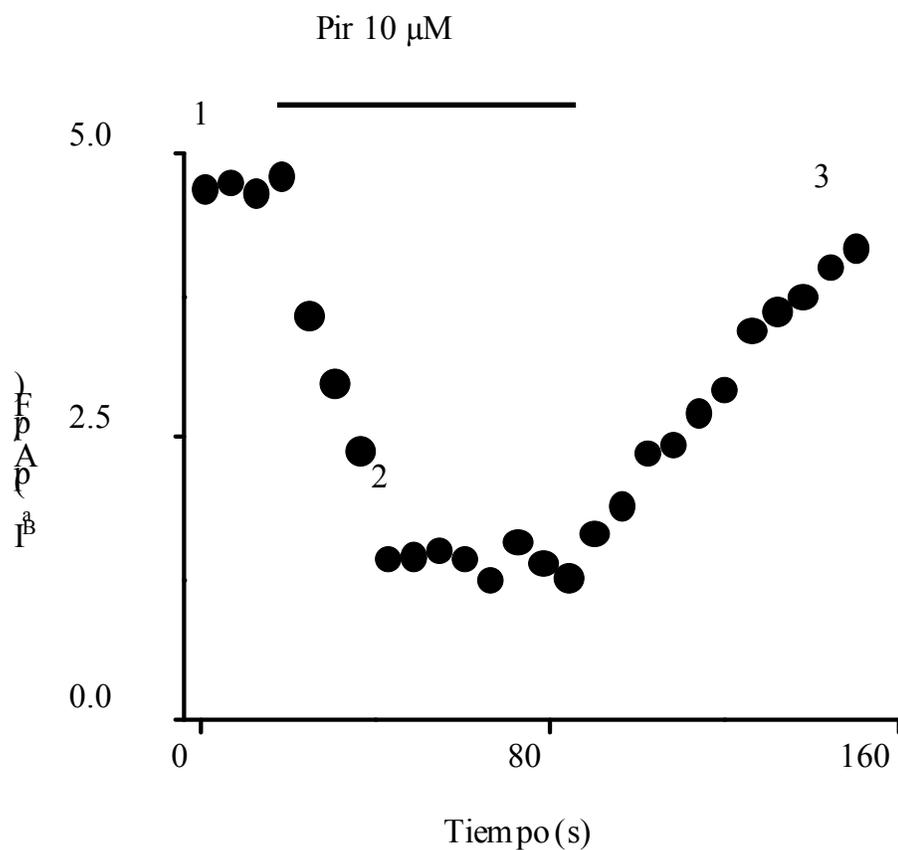
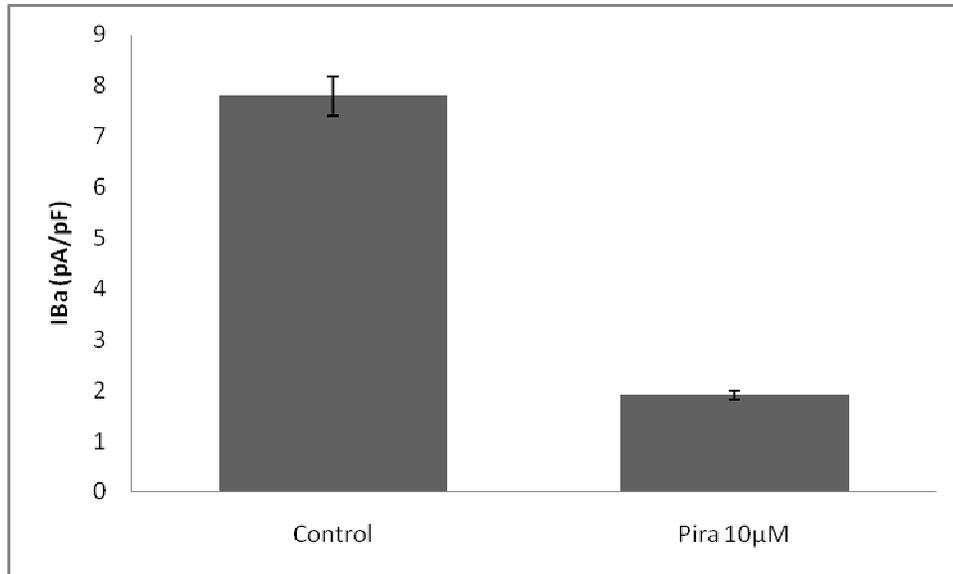


Figura 27. Efecto reversible del Piracetam después del lavado. Donde se observa en 1, en condiciones control, en 2, en presencia de Piracetam a una concentración de $10 \mu M$ y en 3, después del lavado.



*	Control	Piracetam 10µM
IBa (pA/pF)	7.79±1.9	1.9±0.27

* A los datos se les aplicó una prueba de t de Student con una $p < 0.05$, entre el control y el Piracetam, resultando ser estadísticamente diferentes.

8.4 El Piracetam y la sensibilidad al voltaje de canales de calcio tipo N de neuronas SCG

Para identificar de que manera participan las acciones del Piracetam sobre la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio tipo N, se realizó una curva corriente-voltaje del canal de calcio tipo N. Para ello, se construyó un protocolo iniciando con un potencial de mantenimiento inicial de -80 mV, posteriormente se dieron varios pulsos, iniciando a -50 mV con incrementos de 8 mV hasta llegar a un pulso de 38 mV y un regreso de -40 mV, donde los trazos obtenidos en presencia de Piracetam y en condiciones control fueron utilizados para determinar las corrientes máximas en los dos estados.

En la figura 28, se observa una disminución de la amplitud de la corriente y un ligero corrimiento a la izquierda de la curva de la corriente de Bario en presencia de 10 μM de Piracetam, en comparación con la curva de la corriente control.

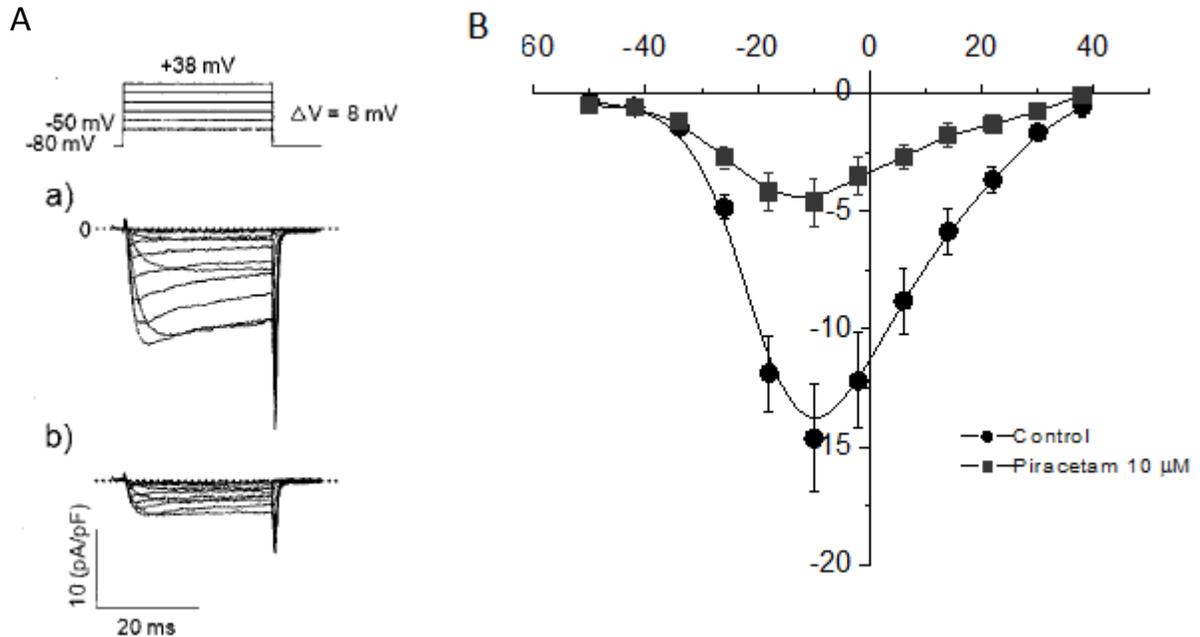
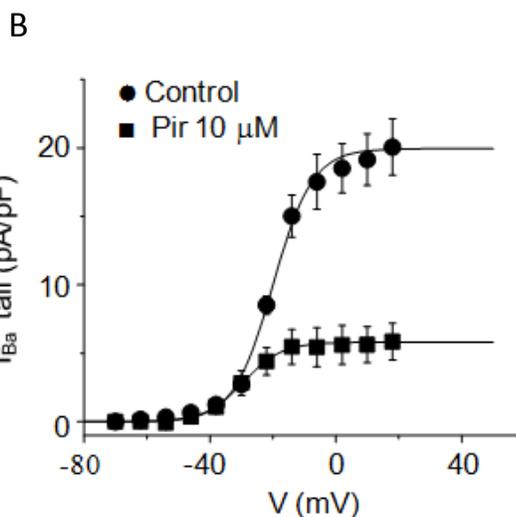
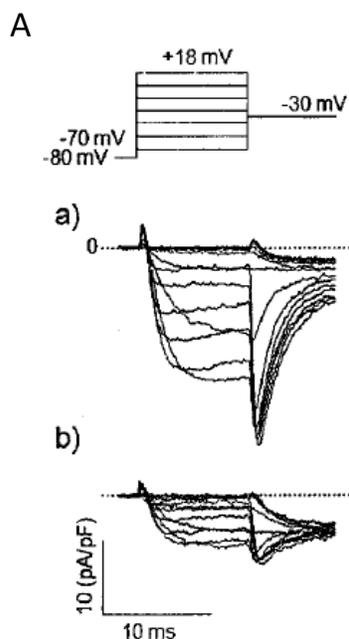


Figura 28. Corrientes de Bario y curva I-V, En A, se muestra el protocolo utilizado con sus respectivas corrientes en a) control y b) en presencia de Piracetam 10 μM donde se muestra la corriente de Bario en presencia del Piracetam, observándose una reducción y corrimiento a la izquierda de la misma en comparación con la corriente control. La corriente de apertura inicia a un voltaje de -40 mV, la máxima a -10mV y un regreso a -40 mV. Para realizar la curva I-V, se utilizó una n de 5 células.

Se elaboró una curva de activación mediante el protocolo que se muestra en la Figura 29 la medición se realizó en los milisegundos 2-3 en la cola de corriente, la cual fue normalizada y ajustada por la ecuación de Boltzmann $I = I_{max} / [1 + \exp((-V + V_h) / k)]$. Las variables arrojadas por la ecuación de Boltzmann (I es el ajuste de la amplitud de la curva, I_{max} (A2) es la corriente máxima, V_h (x0) es el voltaje de activación media, y k (dx) es la pendiente) fueron sometidas a una prueba t de Student, resultado ser diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) el control del Piracetam. La curva de activación, no normalizada, muestra que el

Piracetam reduce la amplitud de las corrientes de calcio tipo N, mientras que la curva de activación normalizada muestra como el Piracetam incrementa la actividad de los canales de calcio tipo N, activándolos en potenciales más hiperpolarizantes.



No normalizada

Variable	Control	Piracetam 10 μ M
A1	0.55270 \pm 0.197	0.37020 \pm 0.312
A2	21.113 \pm 0.192	5.5681 \pm 0.232
Xo	-22.684 \pm 0.322	-32.585 \pm 1.71
dx	4.0909 \pm 0.293	3.7214 \pm 1.43

A los datos de amplitud, se les aplicó una prueba de t de Student entre en control y el Piracetam, resultando ser estadísticamente diferentes.

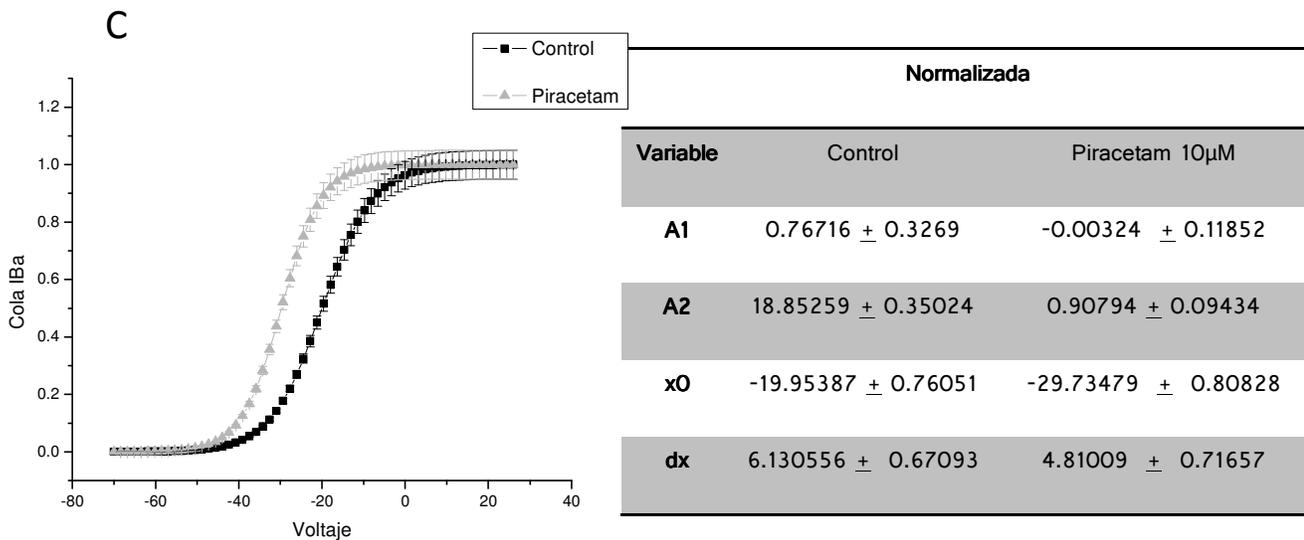


Figura 29. Curvas de activación de canales de calcio tipo N, En A, se muestra el protocolo utilizado con las corrientes obtenidas en control a) y en presencia de Piracetam 10 µM b), B, curva de activación sin normalizar. En C, normalizada, donde se muestra un corrimiento hacia potenciales más hiperpolarizantes de la corriente de Ba en presencia de Piracetam 10 µM, los ajustes de las curvas B y C se realizaron por una ecuación de Boltzmann, $I = I_{max}/[1+exp((-V+V_h)/k)]$, donde I es el ajuste de la amplitud de la curva, I_{max} (A2) es la corriente máxima, V_h (x0) es el voltaje de activación media, y k (dx) es la pendiente, a estas gráficas se les aplicó una prueba t con una $p < 0.05$, las cuales resultaron ser estadísticamente diferentes el control del Piracetam. Se utilizó una n de 5 células para realizar la gráfica.

Por último se registraron las corrientes de los canales de calcio tipo N mediante un protocolo de doble pulso. Este protocolo se inició a un potencial de mantenimiento de -80 mV durante 5 ms, en seguida se llevó a -8 mV durante 20 ms y un regreso de -40 ms durante 10 ms en el pulso 1, posteriormente se dio un pulso condicionante a 80 mV durante 50 ms y al terminar se lleva a -80 mV nuevamente durante 5 ms, posteriormente a -8 mV durante 20 ms y un regreso a -40 mV durante 10 ms en el pulso 2.

Se midió el índice de facilitación, el cual es definido como el valor de la amplitud de la corriente del pulso dos entre la del pulso uno. Las mediciones se realizaron en los primeros milisegundos de los pulsos 1 y 2, donde se observa un incremento en la facilitación de la corriente en presencia del Piracetam comparado con el control (Figura 30). El índice de facilitación, el cual se muestra el resumen en la figura 31, fue sometido a una prueba t de Student, resultando ser diferentes estadísticamente ($p < 0.05$), con una n de 7 células.

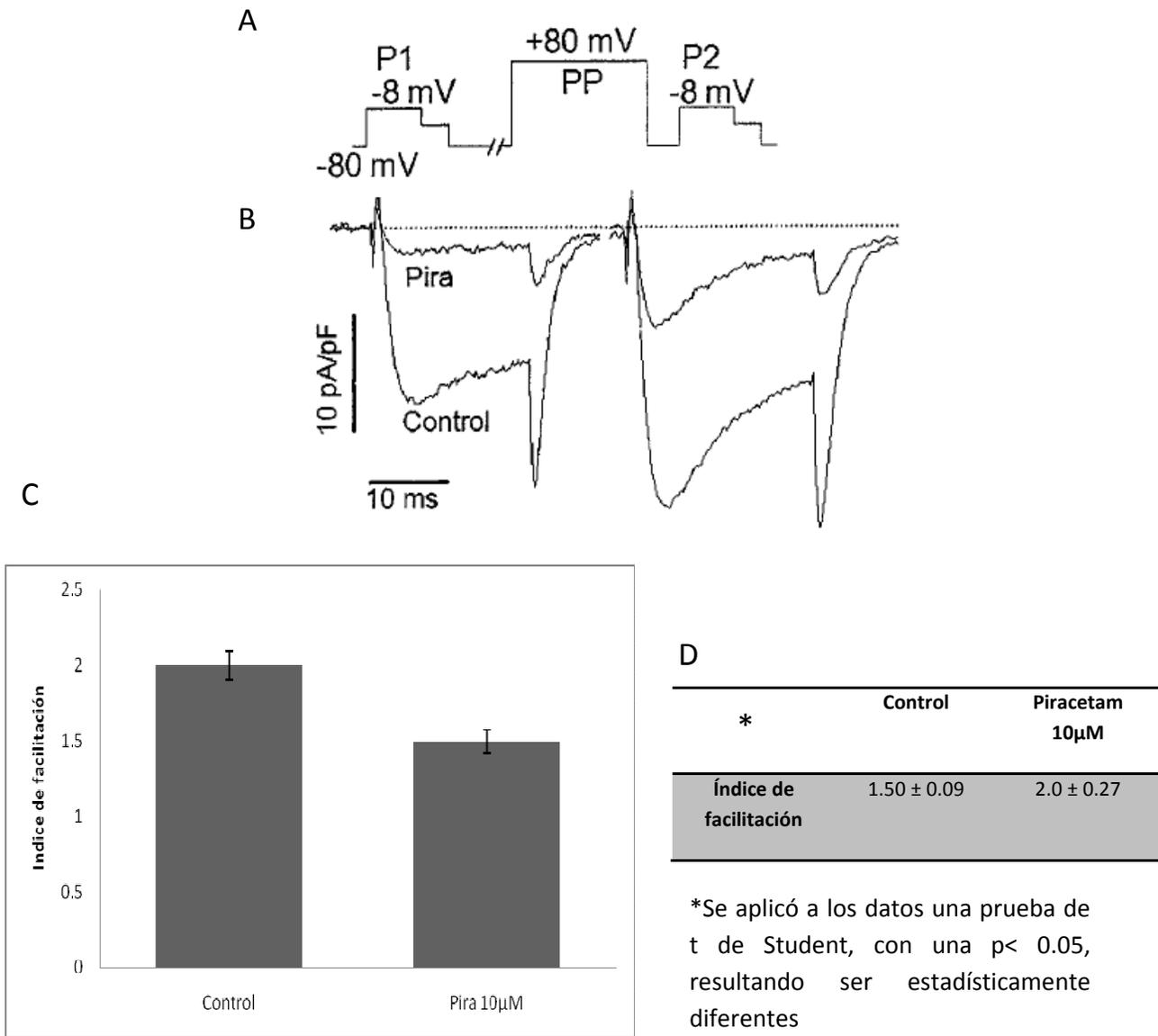


Figura 30. Incremento de la facilitación por presencia de Piracetam 10 μM. En A se muestra el protocolo de doble pulso, en B, se muestran los trazos en control y en presencia de Piracetam 10 μM, en C, se muestra graficado en índice de facilitación obtenido en condiciones control y en presencia de Piracetam 10 μM y en D, se muestran los valores obtenidos del índice de facilitación en control y en presencia de Piracetam 10 μM

10.1 El Piracetam actúa de manera extracelular con efecto reversible

El Piracetam es una molécula hidrosoluble (Castillo y Medina, 2005, Winblad, 2005) y se une a las cabezas de fosfolípidos de la membrana celular (Windblad, 2005). El hecho de que en los presentes resultados al igual que en trabajos reportados anteriormente, el efecto del Piracetam sea reversible durante el lavado (Yoshii y Watabe, 1994, Solntseva, *et al*, 1997, Koike, *et al*, 1992, Niespodziany, *et al*, 2001, Lukyanetz *et al* 2001, Pisani, *et al*, 2004), indica que dicho efecto sea temporal, debido a que hay recuperación de las corrientes después del lavado y actúa de manera extracelular (Figs. 26 y 27)

10.2 El Piracetam presenta selectividad sobre los canales de calcio tipo N

El IC₅₀ obtenido en los resultados, comparado con los de Lukyanetz, *et al*, 2001 y Pisani, *et al*, 2004, es mucho menor. Esto indica que en las SCGs hay una mayor sensibilidad al Piracetam. La alta concentración de canales de calcio tipo N que se encuentra en las preparaciones en neuronas SCG (García-Ferreiro, 2001), muestra a su vez su alta especificidad cuando se utiliza una concentración dentro del rango micromolar del fármaco, además de presentar un bloqueo muy efectivo (93% figura 25) de los canales de calcio tipo N en las preparaciones utilizadas en el presente trabajo.

10. DISCUSION

10.1 EL PIRACETAM ACTÚA DE MANERA EXTRACELULAR CON EFECTO REVERSIBLE

10.2 EL PIRACETAM PRESENTA SELECTIVIDAD SOBRE LOS CANALES DE CALCIO TIPO N

10.3 EL PIRACETAM INCREMENTA LA ACTIVIDAD DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO N

10.4 LAS PROTEÍNAS G Y LAS ACCIONES DEL PIRACETAM

10.3 El Piracetam incrementa la actividad de los canales de calcio tipo N

Las curvas I-V y de activación obtenidas (Figs. 28 y 29), sugieren que el Piracetam activa las corrientes de calcio tipo N hacia potenciales más hiperpolarizantes, concordando con los resultados reportados por Koike, *et al*, 1992 y Solntseva, *et al*, 1997, apoyando la idea de que algunos fármacos nootrópicos modifican la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio, y en particular hacia potenciales más hiperpolarizantes, de tal forma que se incrementa la actividad del canal. De esta manera, se sugiere que las acciones del Piracetam actúan sobre la sensibilidad al voltaje del canal de calcio tipo N mediante su interacción directa o indirecta con el segmento S4, responsable de la sensibilidad al voltaje.

10.4 Las Proteínas G y las acciones del Piracetam

Otra evidencia a favor de la modificación de la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio tipo N, es el incremento del índice de facilitación provocado por el Piracetam al dar el segundo pulso, sumándose ambas facilitaciones, la de las proteínas G (control) con la de Piracetam (Emslie, 2003), o presentándose en forma independiente pero en paralelo.

Los efectos de inhibición se pudieron apreciar durante el desarrollo de los registros, los cuales se caracterizan por la presencia de corrientes facilitadas (De Waard, *et al*, 2005). Esto contrasta con la acción de las proteínas G que producen estados activados, los cuales incluyen el corrimiento a la derecha de la curva de activación y enlentecimiento de la corriente de activación (De Waard, *et al*, 2005). Los cuales no fueron observados en presencia del Piracetam.

11.1 Posible sitio de interacción del Piracetam en los canales de calcio tipo N

El Piracetam actúa de manera extracelular, concordando con los resultados, antecedentes y discusiones anteriormente mencionadas, y por lo tanto su sitio de interacción es extracelular. Además, debido a que

induce a la activación del canal de calcio hacia potenciales más negativos, el posible sitio de interacción de los canales de calcio es el sitio de interacción 4 (Cestéle y Catterall, 2000, Catterall, *et al*, 2007). El cual se encuentra en las asas que unen los dominios IIS1- IIS2 y IIS3- IIS4, (Cestéle y Catterall, 2000, Catterall, *et al*, 2007), en los cuales está involucrado el sensor de voltaje IIS4. Estas moléculas alteran la apertura del canal al unirse al asa que une a los segmentos S3-S4, impidiendo un movimiento libre del segmento S4 durante el proceso de apertura (Cestéle y Catterall, 2000, Catterall, *et al*, 2007).

11.2 Posible efecto de bloqueo de los canales de calcio tipo N por Piracetam

Un mecanismo de la inhibición de las corrientes de calcio, posiblemente sea causado por bloqueo provocado por la molécula de Piracetam. El bloqueo puede ser explicado mediante dos teorías, una en la que el bloqueador se une dentro del poro del canal, obstruyendo el flujo de iones. La otra vía podría ser mediante un mecanismo alostérico, donde el bloqueador se une a un receptor, donde la macromolécula establece el estado conformacional cerrado del poro, llevándolo a un estado en el que la apertura sea más difícil (Hille, 2001).

Las evidencias que se muestran a favor de que la molécula del Piracetam produce bloqueo, son que la molécula del Piracetam es muy semejante a la del Levetiracetam, más que a la del Aniracetam, los cuales fueron probados en presencia del bloqueador selectivo (ω -

11. PROPUESTAS

11.1 POSIBLE SITIO DE INTERACCIÓN DEL PIRACETAM EN LOS CANALES DE CALCIO TIPO N

11.2 POSIBLE EFECTO DE BLOQUEO DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO N POR PIRACETAM

11.3 PERSPECTIVAS

conotoxina GVIA). Al añadir el Aniracetam después del bloqueador selectivo, todavía se redujo un poco más la amplitud de la corriente (Koike, *et al*, 1992), lo cual indica que no hay competencia del receptor del canal por ambas moléculas, debido a que ambos presentan receptores distintos, al haber una suma de efectos al añadir el fármaco. Por el contrario, al añadir el Levetiracetam en presencia del bloqueador selectivo, no hay reducción extra por parte del fármaco (Lukyanetz, *et al*, 2001), por lo que ambas moléculas compiten por el mismo receptor del canal, mostrando ambas efecto de bloqueo. Por lo tanto, se sugiere que la inhibición de la amplitud de las corrientes es provocada por el bloqueo de la molécula de Piracetam.

El presente estudio propone que el Piracetam puede ser una herramienta útil en el estudio tanto funcional como estructural del canal de calcio tipo N, debido a su alta especificidad y a sus sitios de interacción con el canal. El hecho de que el Piracetam participe en la modulación de los canales de calcio tipo N, los cuales desempeñan un papel fundamental en la regulación de la entrada de calcio intracelular en las terminales nerviosas (García-Ferreiro, 2001) y de ser uno de los principales causantes de la liberación de neurotransmisores (De Waard, *et al*, 2005), permiten su uso farmacológico en enfermedades neuronales.

Perspectivas

Debido a su alta especificidad y eficacia sobre los canales de calcio tipo N, el Piracetam podría ser una herramienta útil para investigaciones futuras, tanto de manera funcional como estructural del canal, además de presentar propiedades nootrópicas de interés terapéutico, al modular las corrientes de calcio y por lo tanto la entrada de calcio intracelular.

12. CONCLUSIONES

1. El Piracetam es un fármaco altamente selectivo en canales de calcio tipo N.
2. El Piracetam actúa de manera extracelular, dependiente de la dosis, rápidamente y con efectos reversibles.
3. Las acciones del Piracetam en los canales de calcio tipo N en neuronas SCG son: una disminución de las corrientes, el aumento del índice de facilitación, sumándose a la facilitación de las proteínas G y modificación de la sensibilidad al voltaje de los canales de calcio tipo N, incrementando su actividad al cambiar la curva de activación hacia potenciales más hiperpolarizantes
4. El posible sitio de interacción del Piracetam en los canales de calcio tipo N en neuronas SCG, es el sitio de interacción 4 (asas entre los dominios IIS1- IIS2 y IIS3- IIS4), esto es debido a que los efectos reportados por Cestéle y Catterall, 2000, Catterall, *et al*, 2007 al unirse ciertas toxinas a este sitio provocan en la reducción de la corriente, a demás como un cambio en la sensibilidad al voltaje hacia potenciales más hiperpolarizantes, actuando de manera extracelular, concordando con los resultados obtenidos en la presente tesis.

12. REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. R. Balaraman, J. Shingala, 2002. Nootropics. *Indian Journal of Pharmacology*. 34: 439-440.
2. S. Castillo, A. Medina, 2005. Síntesis de compuestos análogos de Piracetam. Tesis de licenciatura. UNAM. 2-14.
3. W. A. Catterall, E. Pérez-Reyes, T. P. Snutch, J. Striessnig. 2005. International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57:411-425.
4. W. A. Catterall, S. Cestéle, V. Yarov-Yarovoy, F.H. Yu, K. Konoki, T. Scheuer. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. 49: 124-141.
5. S. Cestéle, W. A. Catterall, 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. 82: 883-892.
6. M. De Waard, J. Hering, N. Weiss, A. Feltz. 2005. How do G proteins directly control neural Ca²⁺ channels functions? *Trends in pharmacological science*. 26(8): 427-436.
7. A. Dolphin. 2005. Calcium channels diversity. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
8. K. Elmslie, 2003. Neurotransmitter Modulation of Neuronal Calcium Channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 35: 477-489.
9. R. E. García-Ferreiro, E. O. Hernández-Ochoa, D.E. García. 2001. Modulation of N-type Ca²⁺ channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 442:848-858.

10. B. Hille, 2001. Ion channels of excitable membrane, Sunderland, Mass, Sinauer Associates. (páginas)
11. H. Koike, H. Siato, N. Matsuki, 1992. Inhibitory effect of Aniracetam on N type calcium current in acutely isolated rat neuronal cells. Japan. J. Pharmacol. 61: 277-281.
12. E. Lukyanetz, M. V. Shkryl, P.G. Kostyuk. 2001. Selective blockade of N type calcium channels by Levetiracetam. Epilepsia. 43: 9-18.
13. S. McDonough. 2007. Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. Toxicon. 49: 202-212.
14. I. Niespodziany, H. Klitgaard, D. G. Marginianu. 2001. Levetiracetam inhibits the high-voltage gated activated Ca^{2+} current in pyramidal neurons of rat hippocampal slices. Neuroscience letters. 306: 5-8.
15. B.M. Olivera, J.M. McIntosh, L.J. Cruz, F.A. Luque, W.R. Gray. 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. Biochemistry. 23: 5087-5090.
16. O. Orun. 2006. A structural approach to G protein signaling mechanism: α subunits. Marmara Medical Journal. 19: 41-45.
17. A. Pisani, P. Bonsi, G. Martella, C. De Persis, C. Costa, F. Pisani, F. Bernardi, P. Calabresi. 2004. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by Levetiracetam and Lamotrigine. Epilepsia. 45: 719- 728.
18. Purves, *et al*, 2004. Neurociencia. Editorial médica panamericana, Madrid.

19. L.J. Regan, D.W. Sah, B. P. Bean. 1991. Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron*. 6: 269-280.
20. S. Shorvon. 2001. Pyrrolidone derivatives. *Lancet*. 358: 1885-1892.
21. E. I. Solntseva, J.V. Bukanova, R. U. Ostrovskaya, T. A. Guadasheva, T. A. Voronina, V.G. Skrevitski. 1997. The effects of Piracetam and its novel peptide analogue GVS-111 of neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. *Gen. Pharmac.* 29: 85-89.
22. W. Tedford, G. Zamponi. 2006. Direct G protein modulation of Ca_v2 calcium channels. *Pharmacological Reviews*. 58: 837-862.
23. B. Winblad. 2005. Piracetam: A review of pharmacological properties and clinical uses. *CNS Drug Reviews*. 11:169– 182.
24. G. Yellen. 1998. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 31: 239- 295.
25. M. Yoshii, S. Watabe, 1994. Enhancement of neuronal calcium channel currents by the nootropic agent, Nefiracetam (DM-9384) in NG 108-15 cells. *Brain Research*. 642: 123-131.

ANEXO

ω -AGA: ω -Agatoxina

ω -CTX: ω -Conotoxina

μ M: Micromoles

Ca²⁺: ión de Calcio

DMEM: Medio Aguila Modificado Dubeco's

G α : Subunidad α de la proteína G

G β : Subunidad β de la proteína G

G γ : Subunidad γ de la proteína G

I_{Ba}: Corriente de Bario

I_{Ca}: Corriente de Calcio

ms: Milisegundos

mV: Milivoltios

SCGs: Neuronas simpáticas del Ganglio Cervical Superior

TEA: Tetraetilamonio

TTX: Tetrodotoxina