



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y MOLECULARES DE LA REGULACIÓN
RESISTENTE AL VOLTAJE EN LOS CANALES DE CALCIO $Ca_v2.2$ DE
NEURONAS SIMPÁTICAS DE RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

OSCAR LEONARDO VIVAS RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ

MÉXICO D.F.

JUNIO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi esposa, Claudia

**Quien siempre ha apoyado mi sueño de ser investigador
Por una etapa hermosa que vivimos juntos**

A mi familia:

**Betty, Héctor, Miller y Cristian
Por su voz de apoyo y cariño desde la distancia**

A mi padre

Quien hubiese estado muy orgulloso

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	3
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	
2.1. Modulación de los canales $Ca_v2.2$ por proteínas G.....	9
2.2. Inhibición dependiente del voltaje.....	11
2.2.1. Características biofísicas de la corriente modulada.....	11
2.2.2. Mecanismo molecular de la inhibición.....	15
2.2.2.1. Modelo <i>Willing-Reluctant</i>	17
2.2.2.2. Inhibición tónica.....	21
2.3. Inhibición resistente al voltaje.....	22
2.3.1. Características biofísicas de la corriente modulada.....	22
2.3.2. Mecanismos moleculares de inhibición propuestos.....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
6. MÉTODOS	
6.1. Cultivo de neuronas.....	34
6.2. Registro electrofisiológico.....	36
6.3. Reactivos.....	38
7. RESULTADOS	
7.1. Aislamiento de la inhibición resistente al voltaje por el protocolo de doble pulso.....	40

7.2.Determinación de la relación entre la inhibición resistente al voltaje y el voltaje de activación de los canales.....	51
7.3.Evaluación del PIP ₂ como la molécula que subyace a la inhibición resistente al voltaje.....	58

8. DISCUSIÓN

8.1.Propiedades biofísicas de la inhibición resistente al voltaje de los canales Ca _v 2.2.....	65
8.1.1. Sensibilidad al pulso condicionante.....	65
8.1.2. Dependencia del voltaje de activación de los canales...	67
8.2. Propiedades moleculares de la inhibición resistente al voltaje de los canales Ca _v 2.2.....	68
8.2.1. El PIP ₂ como molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje.....	68
8.3. Significado funcional de la acción del PIP ₂	70

9. PERSPECTIVAS.....	73
----------------------	----

10. REFERENCIAS.....	74
----------------------	----

11. ANEXOS

ARTÍCULO PUBLICADO: *Voltage-independent inhibition of Ca_v2.2 channels is delimited to a specific region of the membrane potential in rat SCG neurons.* Vivas O, Arenas I, García DE. Acta Biochim Biophys Sin. 2012.

ARTÍCULO EN PREPARACIÓN: *PIP₂ hydrolysis is responsible for voltage independent inhibition of Ca_v2.2 channels in sympathetic neurons.* Vivas O, Castro H, Arenas I, García DE.

AGRADECIMIENTOS

A **México** por haberme abierto las puertas.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por dejarme ser uno de sus estudiantes. Es un honor haberme formado en esta casa de estudios.

Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** por la formación en investigación que me brindó, con un conjunto de investigadores de primer nivel y por las oportunidades que me dio y que enriquecieron mi educación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca de doctorado que me fue otorgada y que permitió la realización de mi doctorado.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA)**, por su apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Al **Dr. David García** por su apoyo incondicional, sus enseñanzas científicas, su tiempo y su guía a lo largo de este proceso. Gracias.

A los miembros de mi comité tutor: **Dr. Rafael Gutiérrez y Dr. Román Vidal Tamayo**, por su tiempo y asesoría a lo largo de mi doctorado.

Al **Dr. Humberto Cruzblanca** quien impulso enormemente mi trabajo con sus enseñanzas y consejos sobre la productividad científica. Gracias también por su amistad.

A los integrantes del Jurado: **Dr. Froylan Gómez, Dr. Fidel Ramón, Dr. José Bargas y al Dr. José de Jesús García** por sus valiosos comentarios a esta tesis.

A los integrantes del laboratorio de Biofísica de Membranas y Células Troncales, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UNAM: **Isabel Arenas, Jorge Bravo, Arturo Vaca, Héctor Castro y Luis Martínez** por su compañía durante este proceso.

Especialmente a **Isabel Arenas** por su ayuda durante los experimentos presentados en esta tesis.

A **Jorge Bravo y Claudia Peña Segura** por su asistencia técnica.

A **Luis Martínez** por su apoyo técnico en el laboratorio

A mis amigos: **Marylin Bejarano, Carolina Castellanos, Sonia León, Carolina León, Aida Otálora, Galileo Escobedo y Joselin Hernández.** Gracias por siempre estar dispuestos para las discusiones académicas que alimentan la creatividad y la pasión por la ciencia.

Y, con cariño especial, a **CLAUDIA MORENO** por las discusiones académicas que enriquecieron mi formación, por su compañía crítica durante los experimentos y por sus críticas constructivas durante la elaboración de mis escritos.

RESUMEN

Los canales de calcio $Ca_v2.2$ son regulados por neurotransmisores y hormonas mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G. Esta regulación tiene dos componentes: la inhibición dependiente del voltaje y la inhibición resistente al voltaje. La inhibición dependiente del voltaje puede ser liberada por un tren de potenciales de acción y experimentalmente por un pulso condicionante a voltajes altamente despolarizados. Al remover esta inhibición, se desenmascara un componente remanente, el cual corresponde a la inhibición resistente al voltaje.

Las investigaciones en este campo se han centrado en el estudio de la inhibición dependiente del voltaje, arrojando varios resultados que han esclarecido sus características biofísicas y la identidad de las moléculas responsables de esta inhibición. Sin embargo, en lo que respecta a la inhibición resistente al voltaje quedan aún muchas preguntas por contestar. En esta tesis nos enfocamos en la caracterización de las propiedades biofísicas y moleculares de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$. Particularmente, nosotros estudiamos su dependencia con el voltaje de activación de los canales $Ca_v2.2$. Además abordamos la pregunta de cuál es la molécula efectora de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$.

Para contestar estas preguntas, la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$ se aisló mediante un protocolo de doble pulso en neuronas del ganglio cervical superior de rata. La primera parte de nuestro trabajo se enfocó en determinar los parámetros óptimos de este protocolo para lograr un aislamiento adecuado del componente de inhibición resistente al voltaje.

En la segunda parte, nosotros evaluamos la relación entre la inhibición resistente al voltaje y el voltaje de activación de los canales. Para esto analizamos la variación del porcentaje de inhibición al activar los canales $Ca_v2.2$ en un rango de voltaje entre -40 mV y $+40$ mV. En estos experimentos encontramos que el porcentaje de inhibición resistente al voltaje, inducido tanto por un agonista adrenérgico como por uno muscarínico, cambió con el voltaje de activación empleado. Estos resultados sugieren que la inhibición resistente al voltaje depende del voltaje de activación de los canales.

Por último, estudiamos la posible participación del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) como molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$. Nuestros resultados mostraron que la inhibición resistente al voltaje inducida por un agonista muscarínico requiere de la activación de la enzima fosfolipasa C, ya que la inhibición de ésta enzima con el compuesto U73122 evitó la inhibición resistente al voltaje. También observamos que al dializar las neuronas con PIP_2 se impidió la inhibición resistente al voltaje. Además, al aplicar un bloqueador de una de las enzimas responsables de la re-síntesis del PIP_2 , no se observó la recuperación desde la inhibición resistente al voltaje. En conjunto estos resultados soportan nuestra hipótesis de que la hidrólisis del PIP_2 es la responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$.

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ca_v2.2	Canales de calcio dependientes de voltaje tipo 2.2 ó N
DAG	Diacilglicerol
GDPβS	Guanosina 5'-O-(β-tio)difosfato
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTPγS	Guanosina 5'-O-(γ-tio)trifosfato
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
Oxo-M	Oxotremorina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PI4K	Fosfatidilinositol-4-cinasa
PI4P	Fosfatidilinositol-4-fosfato
PI4P5K	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-cinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PTX	Toxina Pertussis
VGCC	Canales de calcio dependientes del voltaje

“Ja, Kalzium, das ist alles”. Otto Loewi, 1959

1. INTRODUCCIÓN

La homeostasis y la adaptabilidad de los organismos son fenómenos que siempre han sido foco de atención en el campo de la fisiología. Con el propósito de mantener los parámetros vitales (homeostasis) y de modificar éstos ante determinadas condiciones (adaptabilidad), los organismos han desarrollado mecanismos para detectar los cambios en su ambiente, para interpretar fisiológicamente estos cambios y para emitir respuestas ante ellos. Detectar, integrar y responder son parte de las funciones generales que le atribuimos al sistema nervioso. Uno de los mecanismos de regulación mejor conocidos que participa en la homeostasis es la retroalimentación, principalmente la negativa. Esta retroalimentación puede ser flexible y regulada, causando cambios en la homeostasis que conducen a la adaptación.

El sistema nervioso cumple sus funciones a través de las neuronas, células altamente especializadas en la comunicación. El flujo de información entre las neuronas puede ocurrir en forma eléctrica o química y requiere de la activación de canales iónicos sensibles a voltaje. Estos canales son expresados en la membrana plasmática de las neuronas y poseen una estructura que les confiere la capacidad de detectar cambios en el potencial de membrana y de abrirse en respuesta a cambios de este potencial permitiendo el flujo de iones. Algunos canales iónicos están involucrados principalmente en la generación y propagación de señales eléctricas, este es el caso de muchos canales permeables

a sodio y a potasio que son importantes para el disparo del potencial de acción [1-5]. Otros canales iónicos, como es el caso de muchos canales permeables a calcio, están involucrados en la liberación de neurotransmisores, los cuales son la base de la señalización química [6, 7]. El estudio de la regulación de la transmisión eléctrica y química en las neuronas, y en otras células excitables, ha permitido explicar la regulación de muchas funciones a nivel fisiológico del organismo. Un ejemplo de ello es el aumento de la frecuencia cardíaca, el cual ocurre bajo condiciones de esfuerzo físico o de estrés, y que está mediado por la liberación de noradrenalina, un neurotransmisor que regula la función de canales iónicos permeables a calcio presentes en las células cardíacas.

Los canales de calcio dependientes de voltaje son fundamentales para la función neuronal. Algunos de estos canales se localizan específicamente en la sinapsis, que es la zona donde ocurre la liberación de neurotransmisores [8]. Los iones de calcio que fluyen a través de estos canales median directamente el proceso de exocitosis [9], de tal manera que la regulación de los canales de calcio puede conducir al ajuste fino de la cantidad de neurotransmisor liberado [10-16]. Estas moléculas liberadas en la sinapsis pueden a su vez regular los canales de calcio al unirse a receptores ubicados en la membrana de la terminal pre-sináptica [17], lo cual representa un mecanismo importante de retroalimentación negativa que permite modular la transmisión sináptica.

El continuo interés en el entendimiento de cómo nuestro organismo se adapta a diferentes condiciones hace necesario el estudio a nivel celular de los procesos que regulan la comunicación neuronal, y en particular de la regulación de los canales de calcio. Este trabajo de investigación está enfocado en entender las propiedades básicas, tanto biofísicas como moleculares, de un tipo de regulación que ocurre sobre los canales de calcio $Ca_v2.2$, los cuales se localizan en las

terminales pre-sinápticas de las neuronas. Esta regulación se ha denominado “inhibición resistente al voltaje”, está mediada por la unión de neurotransmisores a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y comienza a ser entendida como un mecanismo básico de regulación de diversos eventos fisiológicos. A lo largo del texto esperamos dar luz sobre el mecanismo que subyace a esta regulación y sobre algunas de sus características biofísicas que permiten proponer la acción que la molécula efectora tiene sobre los canales $Ca_v2.2$.

2. ANTECEDENTES

2.1. Modulación de los canales $Ca_v2.2$ por proteínas G.

El flujo de iones de calcio a través de los canales en la membrana plasmática de las neuronas tiene dos efectos: la despolarización de la membrana y la activación de diferentes vías de señalización, ya que este ión actúa como un segundo mensajero. Así, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), funciona como un puente entre la despolarización de la membrana y la función celular. Como segundo mensajero, el calcio regula muchos procesos neuronales tales como la exocitosis [18, 19], la remodelación del citoesqueleto [20, 21] y la transcripción génica [22]. Debido a su relevancia fisiológica, la neurona posee varios mecanismos para regular la concentración intracelular de calcio, entre los cuales la modulación de la apertura de los VGCC es uno de los más importantes.

Los canales de calcio dependientes de voltaje tipo $Ca_v2.2$, o también llamados tipo N, son un componente esencial de las terminales pre-sinápticas [8], aunque también están presentes en el soma de las neuronas [23, 24]. La entrada de calcio a través de los canales $Ca_v2.2$ contribuye a la liberación de neurotransmisores en la sinapsis [25], mientras que en el soma participa en la adaptación de la frecuencia de disparo [26]. Los canales $Ca_v2.2$ son modulados por diferentes vías tales como la señalización por proteínas G [27], la fosforilación [28, 29] y por el mismo ión calcio [30-32]. La regulación de los canales $Ca_v2.2$ por proteínas G, es en sí mismo, un proceso complejo y relevante que se ha estudiado ya por más de tres décadas y que aún tiene varias preguntas de reconocida importancia científica por contestar.

Los sistemas de señalización que involucran a las proteínas G son un componente esencial del sistema nervioso. Estas vías son activadas por neurotransmisores y hormonas que se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Actualmente se conocen cientos de GPCRs [33, 34] y varias cascadas de señalización que estos controlan [35]. Los GPCRs activan cuatro vías de señalización diferentes, clasificadas según el tipo de subunidad α a la que están acoplados y al tipo de respuesta celular que desencadenan. Las cuatro vías se describen esquemáticamente en la Figura 1. El canal $Ca_v2.2$ es blanco de regulación de estas cuatro diferentes vías. Ha sido visto que un gran número de agonistas que se unen a GPCRs inhiben los canales $Ca_v2.2$ en neuronas simpáticas [27], entre estas moléculas encontramos varios tipos de neurotransmisores incluyendo las catecolamina [36-39], los índoles [40, 41], las purinas [42, 43] y la acetilcolina [37, 44-46], así como péptidos y hormonas tales como el péptido intestinal vasoactivo [47], la sustancia P [48], la hormona liberadora de gonadotropina [49, 50] y la angiotensina [51]. Esto pone de manifiesto la importancia de la regulación de los canales $Ca_v2.2$ mediante la activación de los GPCRs por sus agonistas específicos.

La señalización por proteínas G está caracterizada por ser pleiotrópica y la regulación de los canales $Ca_v2.2$ no es la excepción [52]. Cada agonista, de los antes mencionados, se une a más de un tipo de GPCR, los cuales a su vez pueden activar vías de señalización independientes. Así, la modulación de los canales $Ca_v2.2$ por un determinado agonista ocurre por más de una vía molecular y posee características biofísicas propias. Las neuronas simpáticas de rata han sido extensivamente usadas para el estudio de la regulación por proteínas G de los canales $Ca_v2.2$. En estos estudios se ha propuesto que existen dos vías principales por las que las proteínas G ejercen la modulación sobre los canales [27]. Estas vías son ampliamente reconocidas, primero por el gran

número de agonistas que las activan y segundo por las consecuencias fisiológicas potenciales que conllevan, y han sido clasificadas como inhibición dependiente del voltaje e inhibición resistente al voltaje, las cuales se abordaran en los siguientes capítulos.

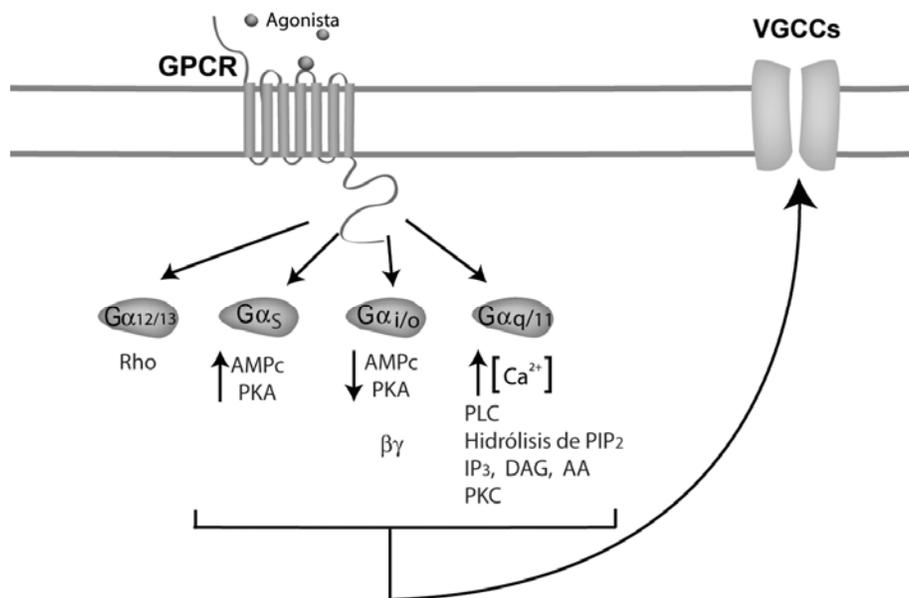


Figura 1. Vías de señalización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y su modulación sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs).

2.2. Inhibición dependiente del voltaje

2.2.1. Características biofísicas de la corriente modulada.

En registros electrofisiológicos, realizados con la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera [53], las corrientes de calcio moduladas por

proteínas G presentan características que las diferencian de las corrientes no moduladas [27]. La característica más prominente de la corriente de calcio modulada es una reducción en la amplitud [54]. Esta reducción está acompañada de un cambio en la cinética de la corriente, siendo la activación de las corrientes moduladas más lenta que la de las corrientes control [55]. A esta característica se le denomina enlentecimiento cinético (Figura 2) [50].

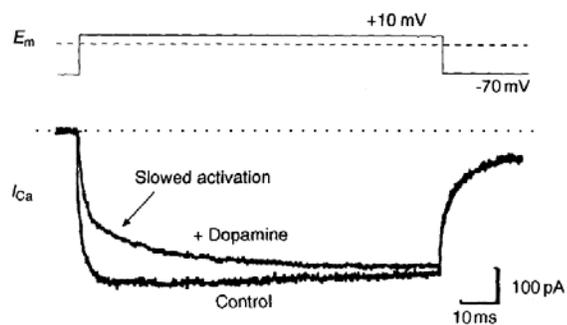


Figura 2. Enlentecimiento de la corriente de calcio tras la adición de dopamina. Adaptado de Hille, 1994.

La activación de la vía de señalización por proteínas G induce, además, cambios en la dependencia al voltaje de la activación de los canales de calcio [36]. El parámetro de voltaje medio de activación es menos negativo en corrientes moduladas por proteínas G, es decir los VGCCs modulados por proteínas G requieren de mayor voltaje para activarse, lo cual se observa como un corrimiento en la curva de activación (Figura 3) [36]. Este corrimiento de la dependencia al voltaje de los canales se ha relacionado con la observación, en registro de canal unitario, de que los canales modulados presentan un tiempo más prolongado a la primera apertura [56].

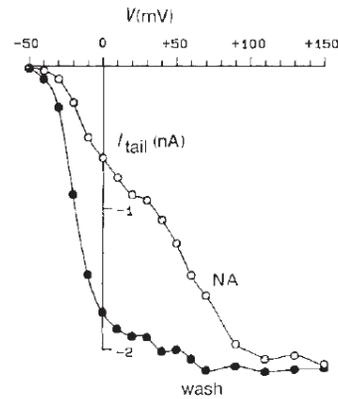


Figura 3. Corrimiento de la curva de activación inducida por la aplicación de noradrenalina. Adaptado de Bean, 1989.

La relación entre la amplitud de las colas de corriente y el pulso de voltaje al cual es activada la corriente, observada en la figura 3, tiene una forma sigmoidea doble y puede ser modelada por una función doble de Boltzmann de la forma:

$$I_{tail}(V) = I1 / (1 + \exp(Vh1 - V)/k1) + I2 / (1 + \exp(Vh2 - V)/k2)$$

En donde $I_{tail}(V)$ es la amplitud de la cola de corriente luego de un pulso de voltaje, I es la amplitud de la corriente, Vh es el voltaje medio de activación y k es el factor pendiente, para cada componente. El ajuste de una doble función de Boltzmann sugiere que los canales de calcio pueden encontrarse en dos estados funcionales, uno no modulado y otro modulado por proteínas G. Este modelo de dos estados se explicará más adelante.

Otra característica biofísica de esta regulación, y una muy relevante para el presente proyecto, es que esta regulación es dependiente del voltaje. El grupo de Lux fue el primero en reconocer que la cantidad de corriente inhibida dependía

del voltaje al cual los canales eran activados [55], y propusieron que de ser así la corriente se recuperaría de la modulación al aplicar pulsos despolarizantes consecutivos. Efectivamente, un pulso de voltaje a potenciales mayores a +70 mV [50, 57] o pulsos repetitivos con la forma de potenciales de acción [58, 59] remueven transitoriamente la inhibición de la corriente inducida por proteínas G. Por esta razón se le denominó “inhibición dependiente del voltaje”. Se diseñó un protocolo para estudiar la dependencia al voltaje de esta regulación el cual se conoce como protocolo de doble pulso, este protocolo consiste en aplicar dos pulsos de magnitud idéntica (Pulso 1 y 2), pero entre estos dos pulsos se aplica un pulso despolarizante llamado pulso condicionante. Cuando se compara la amplitud de la corriente modulada entre el pulso 1 y el 2, la amplitud durante el segundo pulso es casi dos veces mayor a la observada en el primer pulso. Esto sugiere que el pulso condicionante causa la remoción de la inhibición por proteínas G. Al cociente entre la corriente en el pulso 2 y la corriente en el pulso 1 se le denomina índice de facilitación. Este índice de facilitación ha permitido caracterizar detalladamente las diferentes moléculas involucradas en esta regulación dependiente del voltaje.

Una última característica de la corriente modulada por proteínas G, y que aún está en discusión, es la reducción de la inactivación de la corriente. Inicialmente, se propuso que los neurotransmisores afectan mínimamente la dependencia al voltaje de la inactivación [36], pero cada vez hay mayor evidencia de que las proteínas G sí tienen un efecto sobre la inactivación de los canales. Por ejemplo, las corrientes moduladas por proteínas G, en células dializadas con un activador constitutivo de proteínas G (GTP γ S), no decaen aún cuando los pulsos de voltaje tienen una duración de 500 ms, a diferencia de las corrientes no moduladas [60]. Además, ha sido visto que la activación de proteínas G usando GTP γ S ó la sobreexpresión de subunidades de las proteínas G reducen la inactivación

dependiente de calcio y la inactivación dependiente de voltaje de estos canales, causando un corrimiento de la dependencia al voltaje de la inactivación hacia voltajes más positivos [61].

2.2.2. *Mecanismo molecular de la inhibición*

El estudio del mecanismo molecular por el cual un neurotransmisor desencadena una respuesta fisiológica se ha dado en un ambiente lleno de elogios científicos: el descubrimiento de que las neuronas liberan agentes químicos durante la transmisión química (Premio Nobel de 1936 otorgado a Sir Henry Dale), el descubrimiento de segundos mensajeros intracelulares, como el AMPc, subsecuente a la activación de esta vía de señalización (Premio Nobel de 1971 otorgado a Earl Sutherland) y la descripción de la vía de señalización completa que ocurre tras la activación de proteínas G heterotriméricas, una vez se une un neurotransmisor a sus receptores en la membrana celular (Premio nobel de 1994 otorgado conjuntamente a Alfred Gilman y Martin Robdell). Estos tres pasos son esenciales en la regulación de muchos procesos fisiológicos y en muchas ocasiones los efectores tempranos de esta vía de señalización son canales iónicos. Pero, ¿Cuál es la vía de señalización entre un neurotransmisor activador de proteínas G y la regulación dependiente al voltaje de los canales de calcio? La vía de señalización de la inhibición dependiente al voltaje se ilustra en la Figura 4 y se explica a continuación.

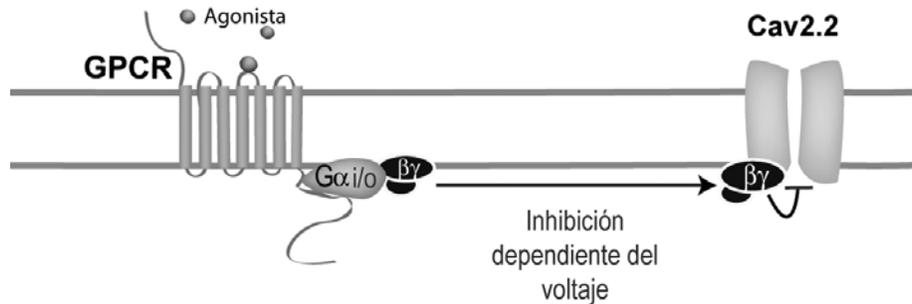


Figura 4. Vía de inhibición dependiente del voltaje de los canales Ca_v2.2 inducida por la activación de GPCR.

La inhibición de los canales Ca_v2.2 requiere de la activación de proteínas G heterotrímicas. Ha sido visto que la inhibición dependiente del voltaje se reduce al dializar dentro de la célula compuestos como es el GDPβS que impide la activación de las proteínas G [44, 62]. Por otro lado, la inhibición dependiente del voltaje inducida por neurotransmisores puede imitarse al dializar compuestos que activan constitutivamente a las proteínas G, como es el caso del GTPγS [44, 50, 63-65]. Por medio de ensayos farmacológicos, y posteriormente demostrado con herramientas moleculares, se ha establecido cuáles son las subunidades específicas de las proteínas G que están involucradas en la inhibición dependiente del voltaje. Este tipo de inhibición es abolida al incubar las neuronas con toxina pertussis (PTX) [44, 66], lo cual sugiere que esta modulación está mediada por proteínas G de la familia Gαo/i [67-69]. Esta idea ha sido apoyada por resultados obtenidos al inyectar anticuerpos dirigidos contra las subunidades Gαo y Gαi, los cuales inducen una reducción de la inhibición dependiente del voltaje activada por noradrenalina [70] o por acetilcolina [71]. La forma en que las proteínas G inhiben a los canales de calcio no involucra ningún segundo mensajero, sino que es mediada probablemente por una

interacción directa entre unas de las subunidades de la proteína G y el canal [27, 46, 72].

Las subunidades $G\beta\gamma$ de las proteínas G son las moléculas responsables de la inhibición dependiente del voltaje de los canales de calcio [73, 74]. Una vez activado el GPCR, la unión de una molécula de GTP a la proteína G conduce a la activación de la subunidad $G\alpha_i/o$, esto conlleva a la separación de dos subunidades formando dos complejos, por un lado la subunidad $G\alpha_i/o$ que inhibe la síntesis de AMPc, y por el otro las subunidades $G\beta\gamma$. Cada una de las cinco subunidades $G\beta$ conocidas induce una inhibición dependiente al voltaje característica con magnitud de inhibición y índice de facilitación propia para cada una de ellas [75].

2.2.2.1. Modelo *Willing-Reluctant*

¿Qué efecto tiene la unión de las subunidades $G\beta\gamma$ sobre el canal de calcio $Ca_v2.2$? Como se describió antes, la corriente macroscópica de calcio en su forma modulada presenta un enlentecimiento cinético y un corrimiento en la dependencia del voltaje, lo cual se ha relacionado con una latencia mayor a la primera apertura del canal y es debido a la unión de las subunidades $G\beta\gamma$ al canal. Un modelo que permite explicar estas modificaciones de la corriente es el modelo de dos estados: “*Willing-Reluctant*” [36].

De manera general, la apertura de canales dependientes de voltaje puede representarse por la transición entre varios estados cerrados del canal y un estado abierto. Cuando el canal se encuentra en cualquier estado cerrado no permite el flujo de iones, mientras que cuando se encuentra en el estado abierto los iones calcio permean a través de este desde el exterior hacia el interior de la

célula. La transición entre los estados cerrados y el abierto es un proceso que depende del voltaje y del tiempo. El canal modulado por proteínas G se puede representar como otro estado funcional, es decir el canal presenta dos estados funcionales diferentes, el primero de ellos es el canal sin proteínas G unidas denominado disponible (“*Willing*”), y el otro es el canal unido a la subunidad $G\beta\gamma$ denominado reluctante (“*Reluctant*”). La Figura 5 ilustra el modelo cinético de ambos estados funcionales. La transición entre los dos estados funcionales depende de la tasa de unión y desunión de las proteínas G con el canal. Además, Las proteínas G son removidas del canal ante una fuerte despolarización de la membrana.

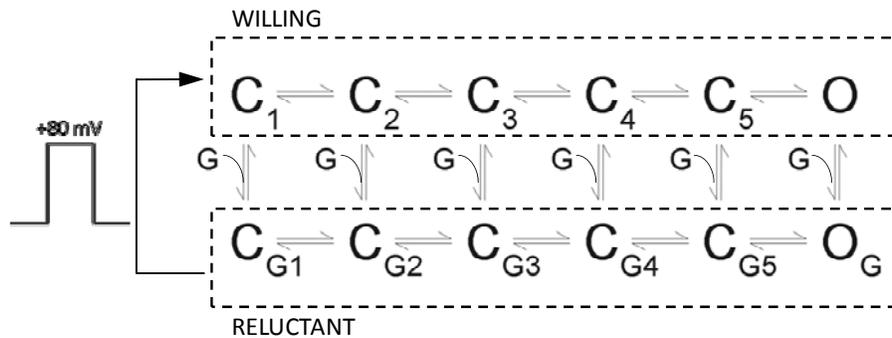


Figura 5. Modelo cinético de la apertura de los canales $Ca_v2.2$ en los dos estados funcionales. Adaptado de Boland and Bean, 1993.

La idea de que existen dos estados funcionales del canal surgió de la observación de que la curva de activación de los canales $Ca_v2.2$ es bifásica y se ajusta a una función doble de Boltzmann. Una componente de la función doble de Boltzmann representa los canales disponibles y la otra los canales reluctantes. Los canales reluctantes requieren de una mayor despolarización de la membrana

para pasar por los estados cerrados y abrirse. Así el voltaje medio de activación de los canales disponibles es aproximadamente -15 mV mientras que el voltaje medio de activación para los canales reluctantes es de aproximadamente +62 mV (Figura 6) [36].

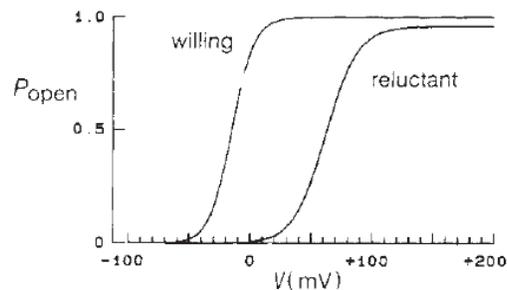


Figura 6. Diferencia en el voltaje medio de activación de los canales de calcio en estado disponible (Willing) y en estado reluctante (Reluctant). Adaptado de Bean, 1989.

El modelo *Willing-Reluctant* permite explicar el enlentecimiento cinético de la corriente observada en presencia de un neurotransmisor que activa las proteínas G. En este caso, un pulso a voltajes moderados induce primero el paso del estado cerrado al abierto de la población de canales disponibles, mientras que los canales en estado cerrado-reluctante deben pasar primero al estado cerrado-disponible y luego transitar hacia el estado abierto-disponible, es decir, los canales reluctantes deben liberarse de las proteínas G antes de poder transitar al estado abierto. Pulsos a voltajes más despolarizados promueven la apertura de los dos estados funcionales del canal. Bajo estos pulsos, los canales reluctantes transitan desde el estado cerrado-reluctante hasta el estado abierto-reluctante, lo que coincide con la desaparición del enlentecimiento cinético. Este modelo cinético de los canales $Ca_v2.2$ modulados se basa en la unión de una subunidad $G\beta\gamma$ por cada canal, por lo que las constantes de tiempo entre los dos estados

funcionales, disponible y reluctante, representa la velocidad de unión y desunión de la subunidad $G\beta\gamma$ [49, 50]. Sin embargo, también ha sido sugerido que para que se dé la modulación se requiere una subunidad $G\beta\gamma$ por cada subunidad del canal, así los canales modulados tendrían cuatro subunidades $G\beta\gamma$ unidas.

Adicionalmente en el modelo *Willing-Reluctant* se sugiere que el efecto de un pulso fuertemente despolarizante, como el utilizado en el protocolo de doble pulso, induce un desprendimiento transitorio de las subunidades $G\beta\gamma$ del canal $Ca_v2.2$, ya que la corriente modulada durante el segundo pulso es más grande y además presenta una cinética similar a la de corrientes no moduladas [49]. De tal manera el índice de facilitación reflejaría la cantidad de canales que se han desinhibido, consecuencia del desprendimiento de las proteínas G (Figura 7).

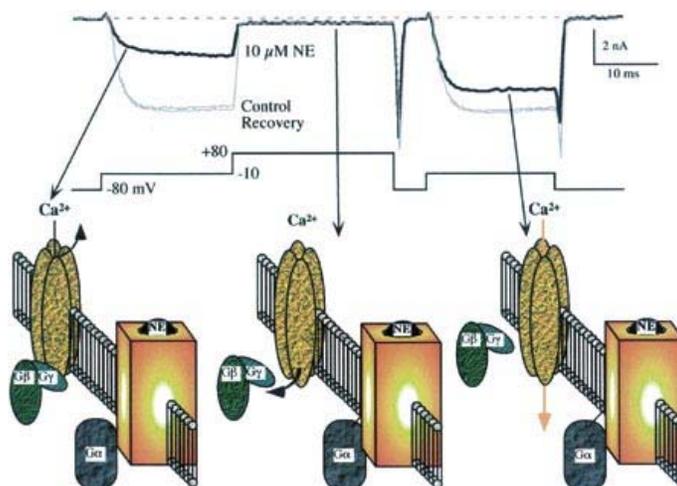


Figura 7. La facilitación de la corriente de calcio tras la aplicación de un pulso condicionante subyace a la disrupción del acoplamiento canal-subunidad $G\beta\gamma$. Adaptado de Elmslie 2003 [76].

2.2.2.2. Inhibición tónica

El protocolo de doble pulso ha sido ampliamente usado para el estudio de la dependencia al voltaje de la inhibición por proteínas G de los canales $Ca_v2.2$. Al aplicar el protocolo de doble pulso en corrientes no moduladas, es decir en ausencia de la activación de GPCRs, se encontró un efecto inesperado: la amplitud de la corriente del pulso dos fue mayor a la amplitud de la corriente en el pulso uno; un resultado muy similar a lo que ocurre en corrientes moduladas. Esta observación sugiere que en las neuronas hay una inhibición basal de los canales $Ca_v2.2$. En términos moleculares esto quiere decir que en condiciones de no estimulación una fracción de los canales $Ca_v2.2$ se encuentra unida a subunidades $G\beta\gamma$. Este modelo concuerda con que la curva de activación de corrientes no moduladas también presenta un comportamiento bifásico, en el cual el 94% de los canales se encuentran en estado disponible y el 6% se encuentran en estado reluctante, es decir unido a proteínas G [36]. Esta inhibición basal se conoce como inhibición tónica. La inhibición tónica de los canales $Ca_v2.2$ comparte otras características con la inhibición dependiente del voltaje. La corriente obtenida al liberar la inhibición tónica, es decir luego del pulso condicionante, tiene mayor amplitud, su cinética de activación es más rápida y su curva de activación tiene solo un componente, el cual concuerda con canales en estado disponible. Además y como prueba de que la inhibición dependiente del voltaje y la inhibición tónica están mediadas por el mismo mecanismo molecular, la inhibición tónica también es eliminada al dializar las células con $GDP\beta S$ [77].

2.3. Inhibición resistente al voltaje

Como se describió en el capítulo anterior, la inhibición de los canales $Ca_v2.2$ por proteínas G puede ser liberada por un pulso condicionante [50, 57] o por un tren de potenciales de acción [58, 59]. Sin embargo, esta inhibición no puede ser removida completamente, ya que aún a voltajes superiores a +70 mV se observa una inhibición remanente de la corriente [49, 50, 57, 78-80]. A esta inhibición remanente se le denominó “inhibición resistente al voltaje” (Figura 8) [80], siendo esta inhibición el objeto de nuestro estudio. A continuación se describen algunas de las características que permiten reconocer y separar esta inhibición.

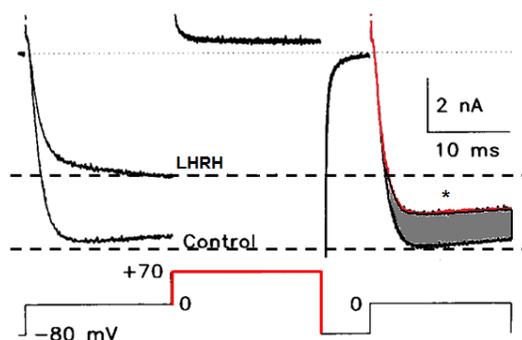


Figura 8. Componentes de la regulación de la corriente de calcio. * señala la inhibición dependiente del voltaje. La inhibición resistente al voltaje está señalada en gris. Abajo se muestra el protocolo con el pulso condicionante en rojo. Adaptado de Elmslie y cols., 1990.

2.3.1. Características biofísicas de la corriente modulada

Las características de la inhibición resistente al voltaje se han estudiado al eliminar la inhibición dependiente del voltaje mediada por las subunidades $G\beta\gamma$.

Esta remoción puede hacerse por medio de un pulso condicionante o tratando a las células con PTX. Sin embargo estas dos estrategias experimentales no son intercambiables y no hay una demostración directa de que la inhibición insensible a PTX sea la misma inhibición resistente al voltaje. En este trabajo nos enfocamos en las características de la inhibición resistente a un pulso condicionante y discutiremos su similitud con la obtenida al tratar las células con PTX.

La inhibición resistente al voltaje reduce la amplitud de la corriente de los canales $Ca_v2.2$ entre un 10% y un 80%, según el neurotransmisor empleado. La reducción en la amplitud no está asociada con cambios cinéticos de la corriente ni con cambios en la dependencia al voltaje [37, 78, 80, 81]. En resumen las corrientes inhibidas por una modulación resistente al voltaje presentan una amplitud menor a la de las corrientes control, pero sus características biofísicas son iguales, lo que sugiere que el mecanismo involucrado es diferente al que subyace a la inhibición dependiente del voltaje.

¿Cuál es la vía de señalización entre un neurotransmisor activador de proteínas G y la inhibición resistente al voltaje de los canales de calcio $Ca_v2.2$? Y cuál es la molécula efectora de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$?, son preguntas fundamentales que permanecen aún sin contestarse.

Se ha visto que los diferentes tipos de neurotransmisores que activan a las proteínas G difieren en el tipo de inhibición que ejercen sobre los canales $Ca_v2.2$, de esta forma algunos neurotransmisores inducen principalmente una inhibición dependiente del voltaje mientras que otros inducen una inhibición resistente al voltaje [37, 46, 48, 51, 78, 82]. Sin embargo los dos tipos de modulación coexisten ante la estimulación con la mayoría de neurotransmisores.

Esto sugiere que los receptores a estos agonistas están acoplados a más de una vía de señalización o que las inhibiciones dependiente y resistente al voltaje subyacen al mismo mecanismo pero con diferentes sensibilidades al pulso condicionante. Sin embargo esta pregunta también permanece sin contestarse.

2.1.1. *Mecanismos moleculares de inhibición propuestos*

Hasta ahora se han propuesto diferentes vías de señalización que pueden explicar la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$. Entre las vías propuestas para explicar esta inhibición se encuentran la activación de la proteína cinasa C (PKC) [83, 84], la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) [85] y la liberación del ácido araquidónico (AA) [86]. De esta forma, la PKC, el PIP_2 y el AA son las moléculas candidatas para explicar la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$.

Como vía de señalización común a las tres moléculas propuestas se sabe que la inhibición resistente al voltaje requiere de la activación de las proteínas G heterotriméricas, la cual fisiológicamente ocurre en respuesta a la activación de los GPCRs. La activación de las proteínas G sin la aplicación de ningún neurotransmisor, a través de la diálisis de $\text{GTP}\gamma\text{S}$, induce también una inhibición resistente al voltaje [78]. Además la modulación resistente al voltaje inducida por neurotransmisores es disminuida cuando las proteínas G son bloqueadas con la diálisis de $\text{GDP}\beta\text{S}$ [48]. Estos resultados confirman que la modulación resistente al voltaje, al igual que la dependiente, esta mediada por proteínas G.

El grupo de Dunlap propuso que, posterior a la activación de las proteínas G, se activa una vía de señalización que culmina en la activación de la PKC. En ésta hipótesis, la PKC induce una inhibición resistente al voltaje al fosforilar

algunos residuos del canal de calcio. En neuronas cultivadas a partir de ganglios de la raíz dorsal de embriones de pollo, activadores de la PKC inhiben la corriente de calcio, sin alterar su cinética ni afectar su dependencia al voltaje [84]. Además bloqueadores específicos de la PKC impiden la inhibición de la corriente por noradrenalina o por activadores de la PKC [81, 83]. De manera aún más específica la estaurosporina, un bloqueador de la PKC, evita únicamente la inhibición resistente al voltaje por noradrenalina lo que sugiere que la PKC es el sustrato de esta regulación [87]. El uso de anticuerpos dirigidos contra las subunidades de las proteínas G sugirió que la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$ podría estar mediada por las subunidades $G_{\alpha i}$ y las subunidades $G_{\beta 1\gamma 2}$. Esto coincide con que la PKC estudiada pertenece a la familia de isoformas convencionales que son activadas por las subunidades $G_{\beta 1\gamma 2}$ vía fosfolipasa C (PLC) [88].

La hipótesis de que la PKC es la molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$ ha sido refutada por varios argumentos experimentales. En neuronas de ganglios de la raíz dorsal de ratas recién nacidas o en neuronas del ganglio cervical superior de rata, los inhibidores de la PKC no previenen el efecto de activadores de las proteínas G; por otro lado, el activador de la PKC, 1,2-deoctanoylglycerol tampoco inhibe la corriente de calcio [44, 89]. Además en otros tipos neuronales se ha visto que la aplicación de activadores de la PKC en lugar de inhibir, aumenta la corriente de calcio [90-92]. En conclusión, la vía de señalización de la PKC no parece ser la responsable de la regulación resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$, y si lo fuera, podría ser un efecto específico de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de pollo.

Otras hipótesis surgieron a partir de la similitud entre la modulación colinérgica de los canales $Cav2.2$ y la modulación colinérgica de los canales KCNQ 2/3. La oxotremorina (oxo-M), un agonista muscarínico, inhibe la corriente de calcio y la corriente de los KCNQ 2/3, con una cinética más lenta que la inhibición por noradrenalina [46]. Además se reportó que la inhibición de ambos canales es sensible a altas concentraciones de quelantes de calcio aplicados intracelularmente [45], no es dependiente del voltaje de activación de los canales y no cambia la cinética de la corriente [37]. A partir de este hallazgo, y también del hecho de que estudiar las corrientes KCNQ 2/3 resultaba ser más sencillo, la investigación se enfocó en la inhibición colinérgica de los canales KCNQ 2/3. El primer avance importante en la disección de la vía que inhibe los canales KCNQ 2/3 fue el hallazgo de que se requiere un segundo mensajero intracelular [46]. Los resultados mostraron que esta inhibición no involucraba a subunidades $G\alpha/i$ ya que no era sensible a PTX [37], y que está mediada por receptores muscarínicos tipo 1 (MR1) [93]. Los MR1 están acoplados a proteínas $G\alpha q/11$ [94, 95], las cuales activan la PLC [96-98]. Todas estas investigaciones convergían en este punto de la vía de la señalización, sin embargo, la evidencia difería en cuanto al segundo mensajero responsable de la inhibición. Los resultados obtenidos hasta ahora han descartado que la inhibición de los canales KCNQ 2/3 sea mediada por el AMPc, el calcio, el inositol 3,4,5-trisfosfato (IP3) ó el diacilglicerol (DAG). Se ha encontrado que la molécula responsable de la inhibición de los canales KCNQ 2/3 es el PIP_2 , siendo su hidrólisis el evento que causa la inhibición del canal [99-105].

Ya que la hidrólisis del PIP_2 lleva a la generación de AA, algunos autores han planteado la posibilidad de que sea el AA el responsable de la regulación resistente al voltaje [86, 106-108]. Sin embargo, ha sido demostrado que ni la fosfolipasa A2 ni la diacilglicerol lipasa, dos enzimas necesarias para la síntesis

de AA, son necesarias para la inhibición de los canales KCNQ 2/3 [109], razón por la cual la hidrólisis del PIP_2 es el proceso que mejor explica esta inhibición. Las tres posibles vías de inhibición resistente al voltaje se ilustran en la Figura 9.

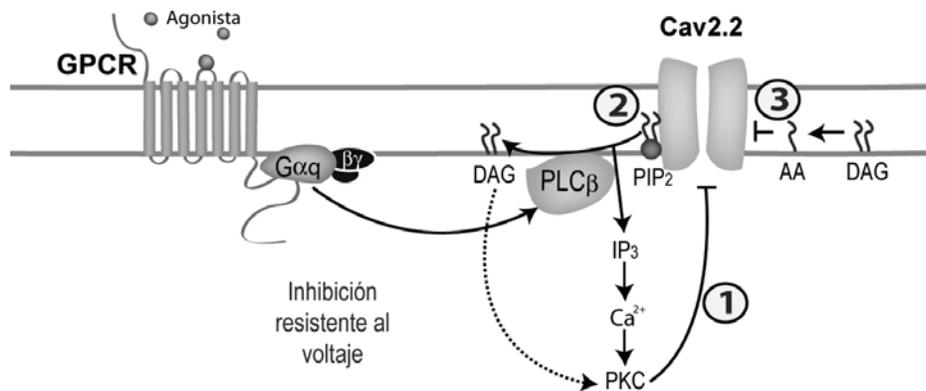


Figura 9. Vías de señalización propuestas para explicar la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$ tras la activación de GPCRs. (1) Fosforilación por PKC. (2) Hidrólisis del PIP_2 . (3) Inhibición por ácido araquidónico (AA).

Hay que resaltar que no hay evidencia que demuestre directamente, mediante el uso de protocolos adecuados, que la inhibición muscarínica de los canales $\text{Ca}_v2.2$ es efectivamente una inhibición resistente al voltaje, siendo este un punto importante que nosotros abordamos en este trabajo. El hecho de que la inhibición mediada por receptores muscarínicos de los canales KCNQ 2/3 y de los canales $\text{Ca}_v2.2$ compartan algunas características, nos lleva a pensar que estas inhibiciones están empleando el mismo mecanismo. Esto sugiere que el PIP_2 podría ser la molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje inducida tanto por la muscarina como por otros neurotransmisores. Hay evidencia de que el PIP_2 puede ser la molécula responsable de la inhibición de los canales de calcio por diferentes agonistas [85, 110, 111]. Aunque las inhibiciones inducidas por estos agonistas tienen un componente resistente al

voltaje, no hay ningún estudio que establezca una relación directa entre el PIP₂ y la inhibición resistente al voltaje de los canales Cav2.2.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los canales de calcio $Ca_v2.2$ son inhibidos por la activación de proteínas G cuando un neurotransmisor activa la vía de los GPCR. Ésta inhibición tiene dos componentes: la inhibición dependiente del voltaje y la inhibición resistente al voltaje. Estos dos tipos de inhibición han sido clasificados según sus propiedades biofísicas y su proporción varía dependiendo del tipo de neurotransmisor. Dada la relevancia funcional de la regulación de los canales de calcio $Ca_v2.2$ y sus implicaciones a nivel fisiológico, el estudio de los mecanismos implicados en esta inhibición mediada por proteínas G ha requerido de décadas de investigación. Hasta la fecha las investigaciones se han centrado en el estudio de la inhibición dependiente del voltaje, arrojando varios resultados que han esclarecido sus características biofísicas y la identidad de las moléculas responsables de la inhibición. Sin embargo, en lo que respecta a la inhibición resistente al voltaje quedan aún muchas preguntas por contestar. Entre estas podemos destacar: cuál es la vía de señalización entre un neurotransmisor activador de proteínas G y la inhibición resistente al voltaje de los canales de calcio $Ca_v2.2$? ¿Se debe esta inhibición de la corriente a una reducción en el número de canales disponibles para abrirse o a un cambio en la conductancia unitaria de los canales? ¿Existe alguna dependencia entre el mecanismo de inhibición y el potencial al que se activan los canales $Ca_v2.2$? ¿Cuál es la molécula efectora de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$?

En este proyecto nos enfocamos en la caracterización de las propiedades biofísicas y moleculares de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$. Nosotros abordamos este tema planteando dos preguntas específicas que se fundamentan en la evidencia presentada a continuación:

1. Se sabe que el porcentaje de inhibición que induce la noradrenalina sobre la corriente de calcio depende del voltaje al cual se activan los canales $Ca_v2.2$ [55]. Ésta, se piensa, que es una característica exclusiva de la inhibición dependiente del voltaje [27]. Lo que sugiere que el porcentaje de inhibición resistente al voltaje no varía en relación al potencial al cual los canales $Ca_v2.2$ se activan. Dos ejemplos que soportan esta hipótesis son que la inhibición resistente al voltaje inducida por noradrenalina reduce la amplitud de la corriente en un 30% cuando los canales se activan tanto a 0 mV como a +110 mV [80]; y que por otro lado, la oxotremorina, un agonista muscarínico que induce principalmente regulación resistente al voltaje, reduce la corriente de calcio en un 90% cuando los canales se activan a 0 mV o a +140 mV [37]. Sin embargo, para estos dos casos se observa que las variaciones en el porcentaje de inhibición resistente al voltaje fueron evaluadas a potenciales no fisiológicos. Nosotros creemos que la relación entre la inhibición resistente al voltaje y el voltaje de activación del canal puede ser un aspecto importante para el entendimiento del mecanismo molecular de inhibición. Por esta razón planteamos la pregunta de si hay variaciones en el porcentaje de inhibición resistente al voltaje al activar los canales $Ca_v2.2$ con diferentes potenciales dentro de un rango fisiológico (entre -40 mV y +40 mV)
2. La resistencia a un pulso condicionante sugiere que la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$ emplea una vía de señalización diferente a la que subyace a la regulación dependiente del voltaje. Aunque varias moléculas han sido propuestas como efectoras de esta inhibición, aún no se conoce la molécula responsable de la regulación

resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$. Tomando en cuenta que los agonistas muscarínicos inducen una regulación sobre los canales $\text{Ca}_v2.2$ diferente a la regulación dependiente del voltaje [37, 45, 46], y que estos agonistas también modulan a los canales $\text{KCNQ } 2/3$ [112], entonces la pregunta que surge es si estas dos inhibiciones utilizan el mismo mecanismo. Actualmente está bien documentado que el PIP_2 es el segundo mensajero que media la inhibición muscarínica de los canales $\text{KCNQ } 2/3$ [102, 104, 113] y algunos reportes muestran que esto mismo pudiera estar ocurriendo para los canales $\text{Ca}_v2.2$ [85]. Hasta la fecha no hay estudios que empleen los protocolos adecuados (como es el caso del protocolo de doble pulso), que permitan comprobar si el PIP_2 es la molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$ y si manipulaciones en la disponibilidad de PIP_2 pueden reproducir las características de esta inhibición que es causada por diversos neurotransmisores. El PIP_2 podría explicar las acciones del segundo mensajero que inhibe de manera resistente al voltaje a los canales $\text{Ca}_v2.2$ y que ha sido buscado por más de una década de experimentación. Este fosfolípido cumple varias de las características planteadas para dicho mensajero, funciona como un segundo mensajero difusible, su mecanismo de acción está delimitado a la membrana celular y no es dializable en el citoplasma. La síntesis del PIP_2 por la fosfatidil-4-fosfato-5-cinasa (PI4P5K) requiere de calcio intracelular y de ATP [104] y su hidrólisis ocurre a través de la activación de la PLC, lo que coincide con la sensibilidad de la regulación resistente al voltaje a una alta concentración de quelantes de calcio [45], a niveles bajos de ATP y a inhibidores de la vía $\text{G}\alpha\text{q}$ [70]. Así la segunda pregunta es si el PIP_2 es el segundo mensajero responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$.

4. HIPÓTESIS

En neuronas simpáticas la activación de los receptores muscarínicos inhibe tanto a los canales de calcio $Ca_v2.2$ como a los canales $KCNQ\ 2/3$ [44, 114]. Se ha mostrado que los canales $KCNQ\ 2/3$ requieren del PIP_2 para abrirse y que la hidrólisis de esta molécula es el mecanismo causante de esta inhibición [102, 104, 113, 115-117]. En cuanto a los canales $Ca_v2.2$, evidencia reciente muestra que también requieren del PIP_2 para abrirse [118, 119] y que la hidrólisis de esta molécula podría ser la responsable de la inhibición por agonistas muscarínicos [85]. Ya que la corriente modulada por los agonistas muscarínicos presenta las características de una inhibición resistente al voltaje. Nosotros proponemos que la inhibición muscarínica de los canales $Ca_v2.2$ no será removida por un pulso condicionante y que la hidrólisis del PIP_2 inducida por la activación de proteínas G es el mecanismo que subyace a la inhibición resistente al voltaje. Esto podrá ser demostrado mediante el protocolo de doble pulso en el que la hidrólisis del PIP_2 reproducirá las características de la inhibición resistente al voltaje inducida por muscarina.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer cuáles son las propiedades biofísicas y moleculares de la inhibición resistente al voltaje de los canales de calcio $Ca_v2.2$ en neuronas simpáticas de rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar la inhibición resistente al voltaje de los canales de calcio $Ca_v2.2$ de neuronas simpáticas de rata (SCG) mediante el protocolo de doble pulso.
2. Determinar si la inhibición resistente al voltaje varía con el voltaje al cual se activan los canales de calcio $Ca_v2.2$.
3. Establecer qué fracción de la inhibición resistente al voltaje de los canales de calcio $Ca_v2.2$ se reproduce por la hidrólisis del PIP_2 .

6. MÉTODOS

6.1. Cultivo de neuronas

Las neuronas en cultivo, lejos de ser una imitación exacta del sistema nervioso *in situ*, han permitido el estudio de las corrientes iónicas y las vías de señalización que las regulan [27]. En este trabajo utilizamos neuronas simpáticas extraídas del ganglio cervical superior (SCG) de rata. Esta preparación es morfológica [120], bioquímica [121, 122] y electrofisiológicamente [123] homogénea. En los cultivos de neuronas SCG se observan pocas células gliales o de otros tipos celulares [124]. Además, las neuronas SCG en cultivo conservan y expresan las características electrofisiológicas y quimio-sensibles de la modulación de canales iónicos que se observa originalmente *in situ* [125]. A diferencia de los sistemas de expresión heterólogos, las neuronas SCG poseen todas las subunidades necesarias para el funcionamiento del canal $Ca_v2.2$ y las proteínas principales y auxiliares requeridas para la inhibición de estos canales por proteínas G. Esto representa a la vez la ventaja de estudiar la vía de señalización con los elementos celulares nativos y el reto de aislarla sin tener efectos colaterales de otras vías presentes.

El ganglio cervical superior de rata es una entidad anatómica discreta, visible, de color gris rojizo y con una forma ovalada fácilmente reconocible. Estos ganglios se localizan en la región cervical, detrás de la segunda y tercera vértebras cervicales, en la bifurcación de la arteria carótida. Sus células pueden ser disgregadas fácilmente y mantenidas en cultivo por periodos mayores a 48 horas [126, 127].

Las neuronas SCG fueron aisladas de ratas 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 fueron decapitadas con una guillotina. Sobre una caja de disección, cubierta con Sylgard, la cabeza fue ubicada ventralmente, la piel y los músculos fueron separados y las carótidas que se localizan por debajo de la tráquea fueron expuestas. El tejido compuesto por la carótida, el nervio vago y el ganglio fue cortado en la región más profunda, después de la bifurcación de la carótida. Los ganglios, puestos en una caja con solución de Hank's, fueron aislados de los demás tejidos, limpiados, decapsulados y cortados en pequeñas secciones. Los ganglios seccionados fueron transferidos secuencialmente a una solución que contenía 20 U/ml de papaína por 15 minutos y luego dos veces por una solución con una mezcla de 1 mg/ml de colagenasa y 10 mg/ml de dispasa por 8 min, todo estas soluciones fueron mantenidas a 37°C durante el procedimiento. El tejido fue disgregado mecánicamente con una pipeta Pasteur. La suspensión celular fue centrifugada a 180 g por 3 min y lavada dos veces en medio Leibovitz (L-15) y una vez en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal y 1% de penicilina-estreptomina. Las neuronas fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio de 4x4 mm, cubiertos con poli-L-lisina, y puestos sobre cajas de plástico de 35 mm de diámetro. Las neuronas fueron incubadas en una atmosfera de 95% aire y 5% de CO₂ a 37°C. Las células fueron usadas para registro antes de las 24 horas de cultivo para evitar el crecimiento de proyecciones que dificultaran la fijación del voltaje.

6.2. Registro electrofisiológico

Las corrientes macroscópicas de calcio presentadas en esta tesis fueron registradas usando la configuración de célula entera de la técnica de patch-clamp desarrollada por Neher y Sackmann [53]. Esta configuración permite el estudio poblacional de los canales presentes en la membrana celular y la diálisis de moléculas hacia el interior de la célula a través de la pipeta de registro.

Las corrientes fueron registradas con un amplificador EPC-9 (Heka Instruments). Las pipetas de registro, elaboradas con vidrio de borosilicato y con un estirador modelo P-97 (Sutter Instruments), tuvieron una resistencia de 1.4 – 2.2 M Ω . Los registros fueron seleccionados con base en los siguientes criterios: somas esféricos sin proyecciones evidentes, capacitancia menor a 100 pF y resistencias en serie menores a 7 M Ω . Las resistencias en serie fueron compensadas al menos en un 60%. La frecuencia de muestreo fue de 10 KHz y la señal fue filtrada a 2.9 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 el programa Igor Pro 6.1.2. (WaveMetrics). Para el análisis las corrientes fueron normalizadas respecto a la capacitancia de la célula. Los datos presentados corresponden a la densidad de corriente y fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media. La diferencia estadística fue evaluada con la prueba *t* de Student y la hipótesis nula fue rechazada con $p < 0.05$.

Para aislar las corrientes de calcio de los canales Ca_v2.2 se utilizaron soluciones de registro que contenían bloqueadores de las corrientes iónicas de sodio, de potasio y de calcio tipo Ca_v1. La composición de la solución externa, ajustada a pH 7.4 con NaOH, fue:

Compuesto	[mM]
NaCl	160
KCl	2.5
HEPES	10
Glucosa	8
CaCl ₂	5
MgCl ₂	1
TTX	0.0002
Nifedipina	0.005

Mientras que la composición de la solución interna, ajustada a pH 7.4 con CsOH, fue:

Compuesto	[mM]
CsCl	140
TEA-Cl	32
HEPES	10
BAPTA-4Cs	0.1
MgCl ₂	1
ATP	3
GTP	0.3
Leupeptina	0.1

En las neuronas SCG los canales de calcio Ca_v2.2 son los más importantes. De la corriente de calcio observada en estas neuronas el 10% es acarreada por canales tipo Ca_v1 y el 80% de la corriente fluye a través de los canales Ca_v2.2

[128-130], el 10% restante ha sido atribuido a canales del tipo $\text{Ca}_v2.3$ ya que las neuronas SCG no expresan canales de calcio tipo Ca_v3 [55, 123, 131]. La corriente que fluye a través de los $\text{Ca}_v2.2$ fue definida como el componente de corriente sensible a $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 en presencia de $5 \mu\text{M}$ de Nifedipina. 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 . La amplitud de la corriente fue calculada como el valor promedio del registro entre el 4° y 5° ms después de iniciado el pulso de voltaje. El porcentaje de inhibición total fue calculado como la amplitud de la corriente control, antes de la aplicación del agonista, menos la amplitud de la corriente durante de su aplicación, normalizado por la corriente control. El porcentaje de inhibición resistente al voltaje fue calculado como la amplitud de la corriente control en el pulso 1 menos la amplitud de la corriente durante la aplicación del agonista en el pulso 2, normalizada por la corriente control en el pulso 1.

6.3. Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de las siguiente compañías: BAPTA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), L-15 y DMEM (Invitrogen Corp., Carlsband, CA, USA), U73122 y U73343 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), diC8-PIP2 (Echelon, Salt Lake City, UT, USA) y todos los otros reactivos (SIGMA, St. Louis, MO, USA). La Wortmannina, el LY204002, el U73122 y el U73343 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 1 mg/ml . La solución de diC8-PIP2 fue sonicada en hielo por 35 minutos y

posteriormente alicuotada. Las alícuotas fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y conservadas a -20°C según las indicaciones del fabricante.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de la inhibición resistente al voltaje por el protocolo de doble pulso.

El protocolo de doble pulso ha sido empleado ampliamente para establecer las características de la inhibición dependiente del voltaje [80]. Este protocolo se compone de dos pulsos idénticos en el cual el segundo pulso (P2), esta precedido por un pulso condicionante (mayor a +70 mV), que tiene el fin de liberar al canal de las subunidades $G\beta\gamma$, de acuerdo con el modelo planteado por Elmslie en 1990. Algunas de las características que se han establecido previamente para el protocolo de doble pulso son que la duración del pulso condicionante a +70 mV debe ser mayor a 20 ms y que el tiempo entre el pulso condicionante y el P2 debe ser menor a 10 ms, ya que las subunidades $G\beta\gamma$ vuelven a inhibir al canal con una constante de tiempo ($\tau_{\text{reinhibición}}$) de aproximadamente 100 ms [50]. La Figura 10 muestra corrientes representativas sobrepuestas antes y durante la aplicación de 10 μM de noradrenalina bajo un protocolo de doble pulso. Durante el pulso 1 (P1), se observa claramente el efecto de la noradrenalina sobre las corrientes de calcio. La noradrenalina reduce la magnitud de la corriente y cambia su cinética, lo que concuerda con una inhibición dependiente del voltaje. Durante el P2, y como un efecto del pulso condicionante, la corriente aún en presencia de noradrenalina es de mayor magnitud y recupera su cinética. Sin embargo, se puede observar que pese a la aplicación del pulso condicionante, la inhibición inducida por la noradrenalina no se libera completamente, esta inhibición remanente corresponde a la inhibición resistente al voltaje. La diferencia entre la corriente control y la corriente modulada por noradrenalina en el P2 corresponde a la inhibición resistente al voltaje inducida por este agonista (región en gris). Así, este

protocolo permite remover transitoriamente la inhibición dependiente del voltaje y por lo tanto aislar la inhibición resistente al voltaje, la cual es el objeto de estudio de este trabajo.

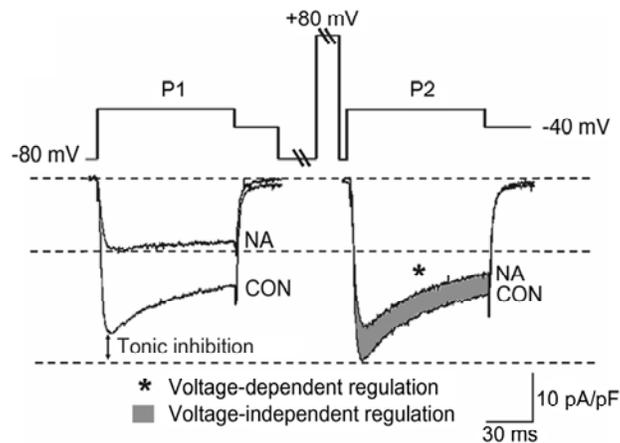


Figura 10. Aislamiento de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_{v2.2}$ mediante el protocolo de doble pulso. Trazos representativos de la corriente de calcio en condiciones control (CON) o en presencia de noradrenalina (NA).

Quisimos evaluar la eficacia del protocolo de doble pulso en la liberación de la regulación dependiente del voltaje, ya que la reproducibilidad de los resultados que se obtengan más adelante sobre la inhibición resistente al voltaje dependerá de la remoción completa de la inhibición dependiente. Para esto variamos el voltaje y la duración del pulso condicionante y el intervalo de tiempo entre el pulso condicionante y el P2.

Primero realizamos experimentos para determinar el efecto de la magnitud del voltaje del pulso condicionante sobre el índice de facilitación. Se denomina

índice de facilitación a la relación entre la magnitud de la corriente obtenida en el P2 sobre la obtenida en el P1, este índice es mayor a 1 ya que la corriente en el P2 es mayor que la corriente en el P1, debido a la remoción de la inhibición dependiente del voltaje y de la inhibición tónica tras el pulso condicionante. Un mayor índice de facilitación indica una remoción más eficiente de la inhibición dependiente del voltaje. Bajo estas condiciones la inhibición remanente corresponderá en su totalidad al componente de inhibición resistente al voltaje. En este experimento se varió la magnitud del pulso condicionante desde +35 mV hasta +145 mV con incrementos de 10 mV. El pulso condicionante tuvo una duración de 25 ms y precedió al P2 por 10 ms. El índice de facilitación fue calculado para la regulación tónica (antes de aplicar el agonista) y para la inhibición dependiente del voltaje inducida al aplicar noradrenalina. La relación entre estos índices de facilitación y el voltaje del pulso condicionante se ajustó a una función exponencial. Estos resultados mostraron que para ambas inhibiciones hay un mayor índice de facilitación cuando el pulso condicionante es mayor (Figura 11). El análisis de estas funciones muestra que el 63% de la facilitación ($V_{0.63}$ PP Voltage) se obtuvo a un voltaje de 89 ± 5 mV ($n = 4$) para la inhibición tónica y de 72 ± 14 mV ($n = 4$) para la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina, sin ser estas dos significativamente diferentes. El índice de facilitación máximo obtenido a +145 mV bajo la aplicación de noradrenalina fue de 1.7 ± 0.2 , mientras que el índice de facilitación máximo obtenido a +145 mV en condiciones control fue de 1.26 ± 0.02 , lo que concuerda con datos ya reportados [75].

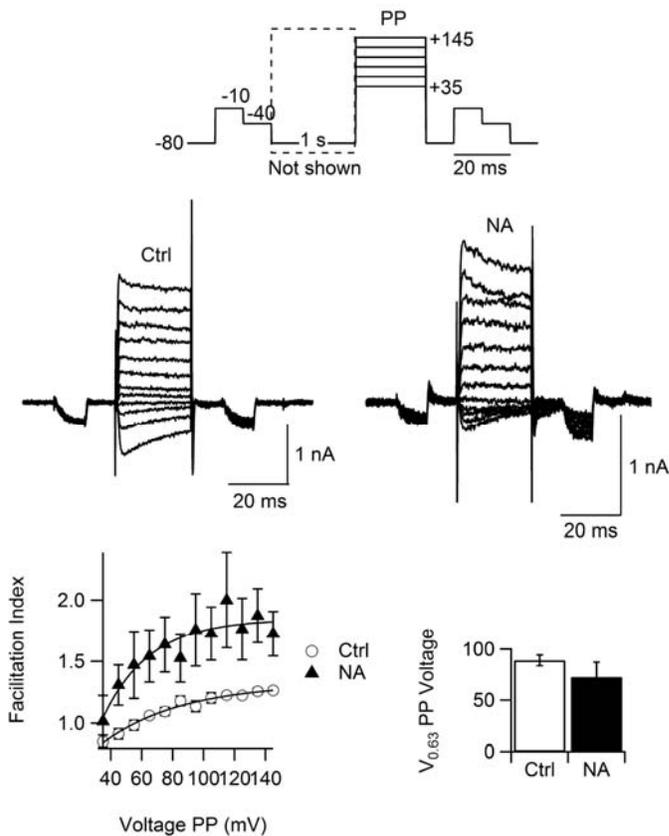


Figura 11. Efecto de la variación en la magnitud del pulso condicionante (PP) sobre el índice de facilitación de la inhibición tónica (Ctrl) y de la inhibición dependiente al voltaje inducida por noradrenalina (NA).

La remoción del mecanismo que subyace a la inhibición dependiente del voltaje no solo depende de la magnitud del pulso condicionante sino también de su duración. En el siguiente experimento nosotros evaluamos el efecto de la variación en la duración del pulso condicionante sobre el índice de facilitación. La Figura 12 muestra que a mayor duración del pulso condicionante mayor índice de facilitación, lo que se puede interpretar como un mayor número de

proteínas G separadas del canal. En este experimento se varió la duración del pulso condicionante desde 5 ms hasta 50 ms con incrementos de 5 ms. El pulso condicionante se dio a +125 mV y precedió al P2 por 5 ms. Bajo estas condiciones el 63% del índice de facilitación se obtuvo con un pulso condicionante de 22 ± 2 ms ($n = 6$) de duración para la regulación tónica y de 21 ± 2 ms ($n = 6$) de duración para la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina. El índice de facilitación máximo obtenido con una duración de 50 ms bajo la aplicación de noradrenalina fue de 3.43 ± 0.19 , mientras que el índice de facilitación máximo obtenido con una duración de 50 ms en condiciones control fue de 1.46 ± 0.04 .

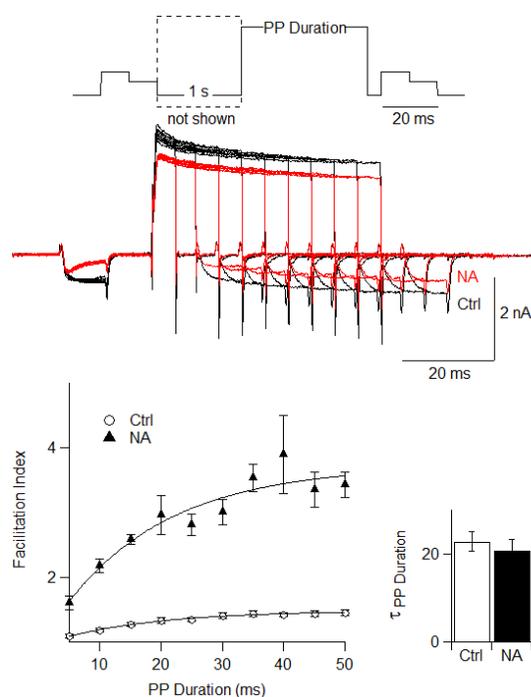


Figura 12. Efecto de la variación en la duración del pulso condicionante (PP) sobre el índice de facilitación de la inhibición tónica (Ctrl) y de la inhibición dependiente al voltaje inducida por noradrenalina (NA).

Los experimentos anteriores mostraron que al aplicar un pulso condicionante de igual magnitud y duración (+125 mV, 25 ms) pero con diferente tiempo de separación a P2 se indujo un aumento en el índice máximo de facilitación. Cuando el pulso condicionante precedió a P2 por 10 ms se obtuvo un índice de 1.8 mientras que cuando lo precedió por solo 5 ms, el índice fue de 3.5. Esta diferencia probablemente se debe a que los 5 ms adicionales pueden ser suficientes para que se dé un porcentaje de re-inhibición del canal. De acuerdo con Elmslie, el 63% de la re-inhibición ocurre en 100 ms, por lo que es de esperarse que a un intervalo de 10 ms la inhibición dependiente del voltaje se haya reinstalado en, aproximadamente, un 10%. Debido a estas observaciones, decidimos realizar un experimento variando el intervalo entre el pulso condicionante y el P2 para estudiar su efecto sobre el índice de facilitación (Figura 13). El intervalo entre el P2 y el pulso condicionante se varió entre 2 ms y 80 ms con incrementos de 4 ms. Si bien los valores del índice de facilitación obtenidos en estos experimentos difirieron de los valores previamente obtenidos para los intervalos de 5 ms y 10 ms, los resultados mostraron claramente que a mayores intervalos de tiempo entre el P2 y el pulso condicionante menor es el índice de facilitación. Para la regulación tónica el índice de facilitación se redujo en un 63% a un intervalo de 10 ± 1 ms ($n = 10$), mientras que para la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina se redujo en un 63% a un intervalo de 20 ± 4 ms ($n = 10$). La disminución del índice de facilitación se debe a la re-inhibición de la corriente durante el intervalo que precede al P2. Como se puede observar la re-inhibición de la corriente por el mecanismo de la regulación tónica es significativamente más rápida que la re-inhibición de la corriente por el mecanismo de inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina. Este resultado sugiere que dos subunidades $G\beta\gamma$ con sensibilidad diferente al pulso condicionante subyacen a estos dos mecanismos. Además, el índice de facilitación máximo, obtenido a los 2 ms de intervalo en presencia de

noradrenalina, fue de 4.5 ± 0.7 , lo que resalta la importancia de analizar las corrientes producidas por el P2 inmediatamente después del pulso condicionante.

En resumen, estos resultados sugieren que hay una fuerte relación entre el porcentaje de inhibición dependiente del voltaje liberado tras el pulso condicionante y las características de este pulso, incluyendo su magnitud, duración y el intervalo que lo separa del P2. Estos experimentos permitieron la caracterización del protocolo de doble pulso bajo nuestras condiciones experimentales. La magnitud y la duración del pulso tienen efectos similares sobre el índice de facilitación, por lo que para lograr un mismo valor de facilitación se pueden aplicar pulsos altamente despolarizados con corta duración ó pulsos menos despolarizados con mayor duración. Concluimos que para garantizar una máxima remoción de la inhibición dependiente al voltaje que permita estudiar la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$, debe emplearse un protocolo de doble pulso en el cual el pulso condicionante tenga una magnitud de +125 mV y una duración de 25 ms ó una magnitud de +80 mV y una duración de 50 ms. Para cualquiera de los dos casos el intervalo entre el pulso condicionante y el P2 debe ser el menor posible (≤ 10 ms). Estos resultados concuerdan con los reportes que han caracterizado el protocolo de doble pulso para estudiar la característica de la facilitación de la corriente de calcio, la cual es inducida por la unión de proteínas G. Sin embargo no hay datos en la literatura del cambio en el porcentaje de inhibición resistente al voltaje en función de los parámetros del protocolo de doble pulso, lo que consideramos un primer paso para el estudio de este tipo de inhibición.

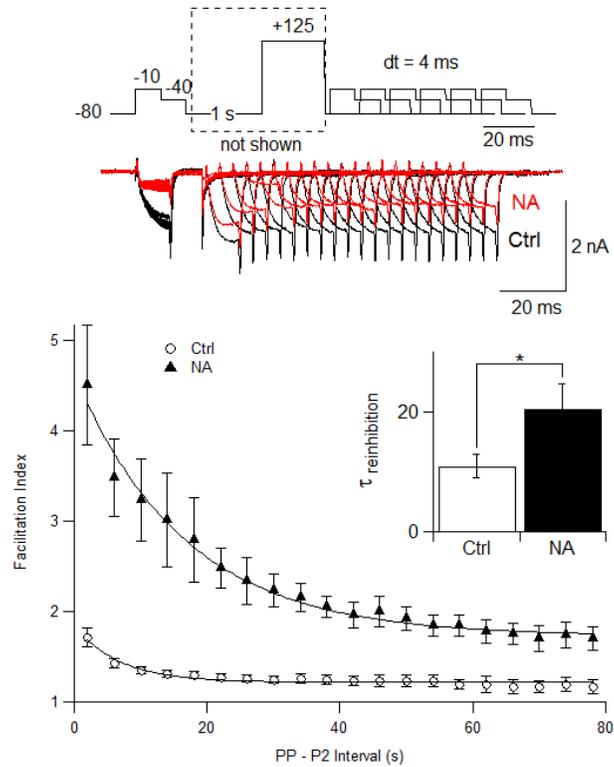


Figura 13. Efecto de la variación en el intervalo de tiempo entre el pulso condicionante (PP) y el P2 sobre el índice de facilitación de la inhibición tónica (Ctrl) y de la inhibición dependiente al voltaje inducida por noradrenalina (NA).

Como se observa en la Figura 10, las corrientes obtenidas mediante el protocolo de doble pulso tienen tres componentes: la inhibición tónica, la inhibición dependiente del voltaje y la inhibición resistente al voltaje. El porcentaje de cada uno de estos componentes puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\% Inh\ tónica = \frac{(ICa\ P2\ (Ctrl) - ICa\ P1\ (Ctrl))}{ICa\ P2\ (Ctrl)} \times 100$$

$$\% Inh\ DV = \left(\frac{(ICa\ P2\ (NA) - ICa\ P1\ (NA))}{ICa\ P2\ (NA)} - \% Inh\ tónica \right) \times 100$$

$$\% Inh\ RV = \frac{(ICa\ P2\ (Ctrl) - ICa\ P2\ (NA))}{ICa\ P2\ (Ctrl)} \times 100$$

En donde, DV corresponde a la inhibición dependiente del voltaje, RV a la inhibición resistente al voltaje, ICa a la amplitud de la corriente de calcio en el pulso 1 (P1) ó en el pulso 2 (P2) en condiciones control (Ctrl) o bajo la aplicación de noradrenalina (NA).

El análisis del porcentaje de inhibición para los tres componentes de regulación en función del voltaje, duración e intervalo de tiempo entre el pulso condicionante y el P2 es mostrado en la Figura 14. Ya que anteriormente se mostró que el porcentaje de inhibición dependiente del voltaje liberado tras el pulso condicionante depende de estos tres parámetros, la no completa remoción de esta inhibición puede llevar a una sobreestimación de la inhibición resistente al voltaje. Como se observa en la Figura 14, el porcentaje de inhibición resistente al voltaje pareciera ser mayor cuando el pulso condicionante es menos despolarizado, lo cual en realidad corresponde a una remoción incompleta de la inhibición dependiente del voltaje. El mismo fenómeno se observa al analizar la duración del pulso condicionante, en este caso el porcentaje de inhibición resistente al voltaje también parece ser mayor cuanto más corta es la duración del pulso. Por consiguiente, una medición más precisa del porcentaje de inhibición resistente al voltaje se obtiene cuando el pulso condicionante tiene

una magnitud mayor a +80 mV y una duración de mínimo 25 ms. La gráfica del porcentaje de inhibición versus el intervalo entre el pulso condicionante y el P2 muestra claramente que las mediciones realizadas inmediatamente después del pulso condicionante corresponden a una inhibición resistente al voltaje completamente aislada, mientras que las mediciones a intervalos mayores a 10 ms se ven afectadas por la reinstalación de la inhibición dependiente del voltaje. Estos resultados concuerdan con las características del pulso que se habían discutido anteriormente.

Estos análisis también permiten observar la remoción y recuperación de los dos componentes de inhibición dependiente del voltaje presentes: la inhibición tónica y la inhibición dependiente del voltaje inducida por el neurotransmisor (noradrenalina). Es interesante que estas dos inhibiciones no se comportan de la misma manera, lo que se esperaría ya que ambas dependen del voltaje y se ha planteado que emplean el mismo mecanismo de inhibición [73, 74]. Se observa que hay una diferencia en el voltaje del pulso condicionante necesario para remover la inhibición tónica y para remover la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina. La inhibición tónica se libera a voltajes menos despolarizados (+70 mV) comparada con la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina (+100 mV). También se observaron diferencias en la duración del pulso condicionante requerida para remover los dos tipos de inhibición, la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina puede ser removida con pulsos más cortos (10 ms) comparada con la remoción de la inhibición tónica la cual requiere tiempos mayores (30 ms). Finalmente, la cinética de re-inhibición fue claramente diferente para los dos tipos de inhibición. En conjunto estos resultados sugieren que la inhibición tónica y la inhibición dependiente del voltaje inducida por noradrenalina en los canales $Ca_v2.2$ están mediadas por mecanismos diferentes, con diferente

sensibilidad al pulso condicionante. Esto abre las puertas a la búsqueda de estrategias experimentales que permitan esclarecer las diferencias entre estos dos mecanismos.

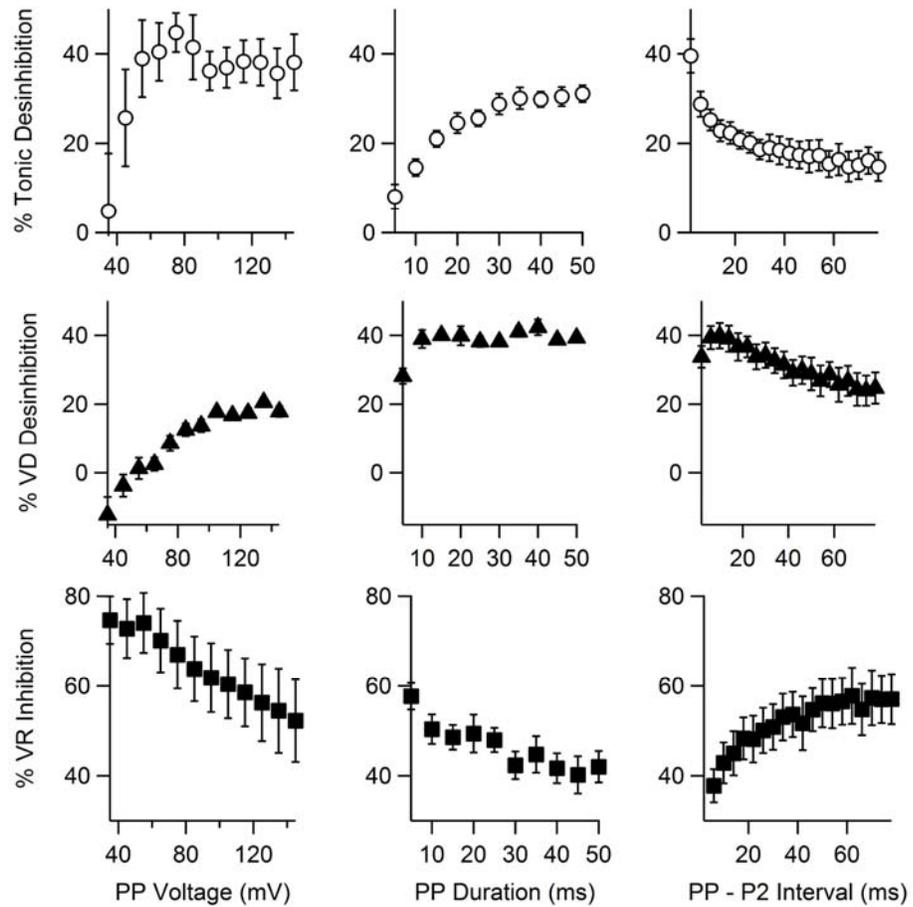


Figura 14. Variación del porcentaje de los tres componentes de inhibición en función de las propiedades del pulso condicionante.

7.2. Determinación de la relación entre la inhibición resistente al voltaje y el voltaje de activación de los canales

Muchos agonistas ejercen una inhibición resistente al voltaje sobre los canales de calcio $Ca_v2.2$, incluyendo la angiotensina II, la substancia P, los agonistas muscarínicos y la noradrenalina [45, 48, 51, 70, 78]. Ha sido sugerido que la inhibición resistente al voltaje es constante sin importar el voltaje al cual se activen los canales, siendo esta una de las razones por la que fue denominada “resistente” al voltaje. Hay evidencia que muestra que, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de embriones de pollo, la noradrenalina reduce la corriente de calcio por una vía resistente al voltaje en un 30% cuando los canales se activan tanto a 0 mV como a +110 mV [80]. Además, la inhibición inducida por oxotremorina (oxo-M), un agonista muscarínico, reduce la amplitud de la corriente de calcio en 90% de una manera resistente al voltaje cuando los canales se activan a 0 mV ó a +140 mV en neuronas del ganglio cervical superior de rata [37]. Sin embargo algo en común de estas dos evidencias es que emplean voltajes fuera del rango fisiológico para evaluar el porcentaje de inhibición resistente al voltaje. Debido a que la relación entre la inhibición resistente al voltaje y el voltaje de activación de los canales es una propiedad biofísica básica de esta regulación, la cual no ha sido estudiada cabalmente, y que podría dar indicios acerca de las características de la molécula que subyace a ésta regulación, nosotros evaluamos el porcentaje de inhibición resistente al voltaje en canales $Ca_v2.2$ activando los canales a voltajes fisiológicos entre -40 mV y +40 mV usando el protocolo de doble pulso.

Las neuronas del ganglio cervical superior de rata (SCG) se estimularon con el protocolo de doble pulso en presencia de 10 μ M de noradrenalina. Durante el

P1 la noradrenalina redujo la amplitud de la corriente en un 50%, de 32 ± 3 pA/pF en condiciones control se redujo a 16 ± 2 pA/pF en presencia de noradrenalina. La aplicación de un pulso condicionante a +80 mV por 50 ms llevó a la recuperación (en presencia de noradrenalina), del 80% de la corriente medida en el P2 (27 ± 3 pA/pF) comparado con las células control (35 ± 3 pA/pF). El 20% de la corriente que no se recuperó corresponde a la inhibición resistente al voltaje inducida por noradrenalina en estas neuronas.

En el capítulo anterior mostramos que con un pulso condicionante a +80 mV y de una duración de 50 ms, la inhibición remanente en el P2 corresponde a la inhibición resistente al voltaje. Sin embargo, nos propusimos confirmar que las corrientes inhibidas durante el P2 no presentaran características correspondientes a la inhibición dependiente del voltaje y por consecuencia que este 20% de inhibición remanente inducida por noradrenalina se debiera en efecto a un mecanismo resistente al voltaje. Para ello analizamos el efecto de la noradrenalina sobre las curvas I-V y sobre la cinética de activación durante el P1 y el P2 en un rango entre -40 mV y +40 mV. La sobre posición de las curvas I-V en ausencia y presencia de NA durante el P1 y el P2 ilustran que este agonista solamente reduce la amplitud de la corriente en ambos pulsos, sin causar un corrimiento de la curva (Figura 15). Nótese que no hay cambios en el potencial de reversión. Para analizar el efecto que tiene la noradrenalina sobre la cinética de activación se ajustaron funciones exponenciales con una constante de tiempo simple (τ_{act}) a la fase de subida de la corriente, de acuerdo con Ikeda [77]. Nuestros resultados muestran que las τ_{act} de las corrientes observadas durante el P2 en presencia de noradrenalina son indistinguibles de las corrientes en ausencia del agonista. Este resultado contrasta con el efecto de la noradrenalina durante el P1, ya que la τ_{act} de la fase de activación de las corrientes fue reducida para todos los voltajes a los que se activaron los canales, lo que concuerda con

una regulación dependiente del voltaje que induce enlentecimiento cinético [77]. Estos resultados soportan que la inhibición durante el P2 producida por la aplicación de noradrenalina, bajo el protocolo utilizado, no induce cambios cinéticos en la corriente ni altera la relación I-V de los canales, tal y como se espera para una regulación resistente al voltaje.

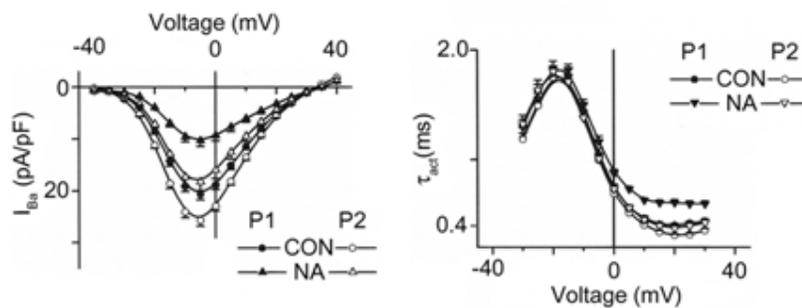


Figura 15. Relación I-V y análisis de las constantes de activación para la regulación inducida por noradrenalina (NA) durante el P1 y el P2 comparadas con las condiciones control (CON).

Posteriormente caracterizamos el efecto de diferentes voltajes de activación del canal sobre la inhibición resistente al voltaje. Con este propósito aplicamos un protocolo con incrementos de voltaje de 5 mV. La Figura 16 muestra las corrientes promedio sobrepuestas en condiciones control ($n = 16$) y bajo el efecto de la noradrenalina ($n = 14$) a voltajes de -20, -10, 0 y +20 mV. Es notorio que la porción de inhibición resistente al voltaje, mostrada en gris, fue mayor cuando los canales se activaron a -10 mV que cuando se activaron a potenciales más negativos o positivos. Esto sugiere que el porcentaje de inhibición resistente al voltaje varía con el potencial al cual los canales son activados. Al graficar este porcentaje de inhibición en función del voltaje de activación de los canales observamos la región del voltaje en la cual la

noradrenalina induce la inhibición resistente al voltaje y su porcentaje con respecto a la inhibición total (Figura 16C). La inhibición por noradrenalina en P2 fue máxima (25%) cuando los canales se activaron a -15 mV, mientras que cuando se activaron a -30 mV ó a +70 mV la inhibición fue del 10%. La inhibición total (en P1) fue del 55% a -15 mV, del 40% a -30 mV y de menos del 15% a +70 mV. El porcentaje de inhibición dependiente del voltaje fue calculado como la substracción de la inhibición resistente al voltaje de la inhibición total. La región del voltaje a la cual la noradrenalina induce la inhibición dependiente y resistente al voltaje se compara en la Figura 16D. Al igual que lo reportado anteriormente para este agonista, la inhibición dependiente del voltaje fue mayor que la inhibición resistente al voltaje en todos los voltajes evaluados. Además, los dos tipos de inhibición ocurren en una región del voltaje similar. Contrario a lo que se esperaba para la inhibición resistente al voltaje de los canales $Cav2.2$, nosotros reportamos que esta inhibición ocurre en una región específica del voltaje entre -30 mV y 0 mV y que su magnitud depende del voltaje de activación de los canales.

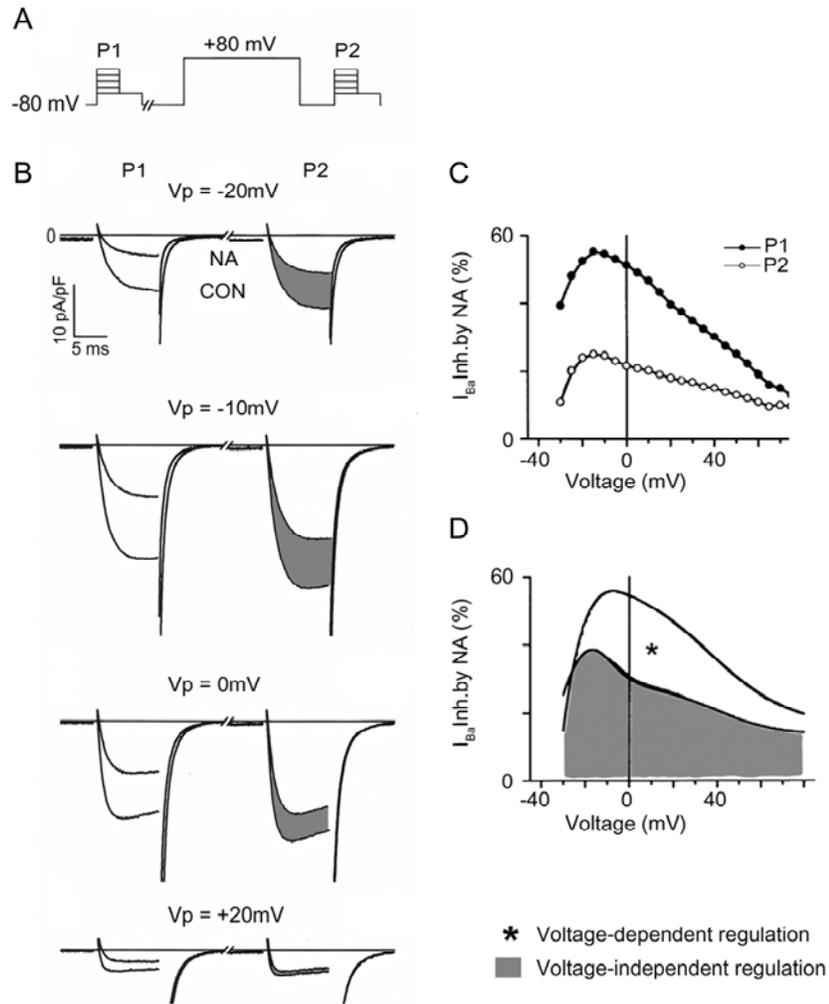


Figura 16. Relación entre el porcentaje de inhibición resistente al voltaje inducida por noradrenalina y el voltaje de activación de los canales $\text{Ca}_v2.2$. A. Protocolo de doble pulso con incrementos de 5 mV. B. Trazos representativos sobre puestos en condiciones control (CON) y bajo la aplicación de noradrenalina (NA) para diferentes voltajes de activación de los canales (V_p). C. Porcentaje de inhibición calculado en P1 o P2 en función del voltaje de activación. D. Porcentaje de inhibición dependiente y resistente al voltaje en función al voltaje de activación de los canales.

Para descartar la posibilidad de que esta variación en la inhibición resistente al voltaje se debiera a un efecto inespecífico de este agonista, analizamos la inhibición resistente al voltaje inducida por un agonista muscarínico, la oxo-M. Este agonista activa a una familia de GPCRs diferente a la activada por la noradrenalina y actúa preferencialmente por la vía resistente al voltaje [45]. Esto último puede ser evidenciado por el hecho de que la aplicación de la oxo-M inhibió a los canales $Ca_v2.2$ en igual magnitud en el P1 y en el P2 (Figura 17).

Similar a lo observado para la noradrenalina, la magnitud de la inhibición resistente al voltaje inducida por oxo-M varió con el voltaje de activación de los canales (Figura 17). En la Figura 17C se observa que la inhibición resistente al voltaje inducida por oxo-M fue máxima a 0 mV y que fue menor a potenciales más negativos o positivos. Este resultado apoya que la inhibición resistente al voltaje cambia con el voltaje de activación de los canales. Ya que esta inhibición ha sido comúnmente llamada inhibición “independiente” del voltaje, nosotros consideramos que el termino resistente al voltaje, el cual ha sido acuñado en este trabajo, describe mejor la característica de que esta inhibición no sea removida ante el pulso condicionante sin que se vea involucrada la dependencia, aquí demostrada, entre el porcentaje de inhibición resistente al voltaje y el voltaje de activación de los canales.

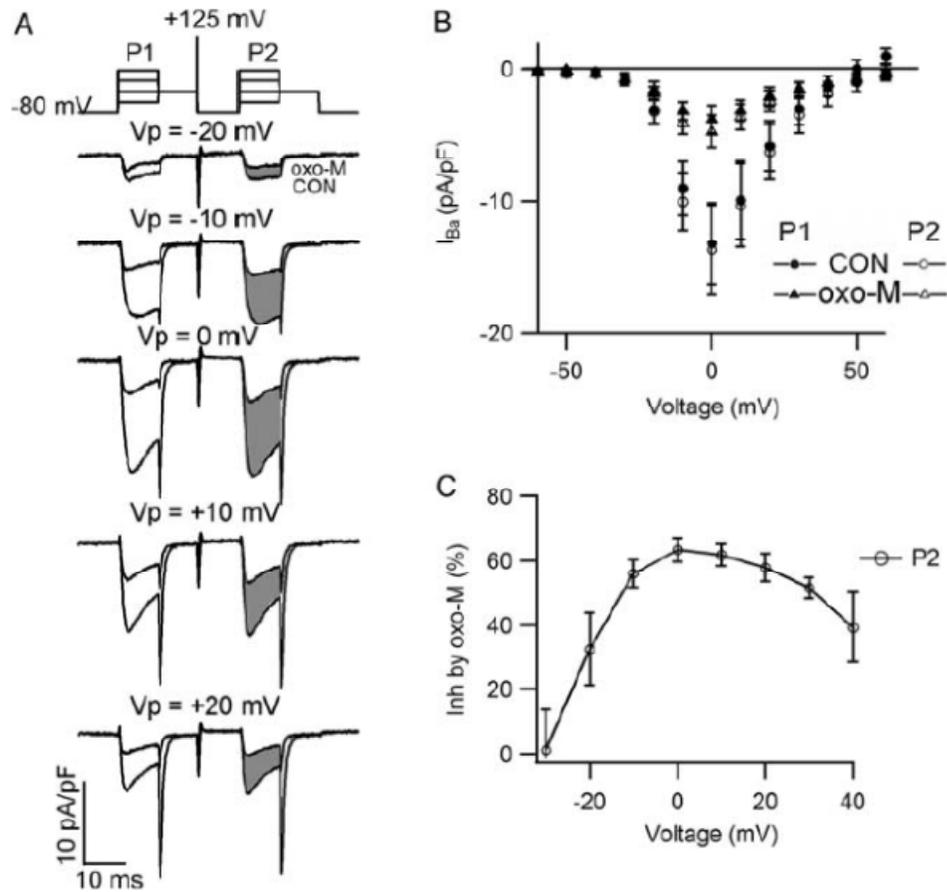


Figura 17. Relación entre el porcentaje de inhibición resistente al voltaje inducida por oxo-M y el voltaje de activación de los canales $Ca_v2.2$. A. Trazos representativos sobre puestos en condiciones control (CON) y bajo la aplicación de oxo-M para diferentes voltajes de activación de los canales (V_p). Arriba se muestra el protocolo de doble pulso con incrementos de 5 mV. B. Relación I-V obtenida en condiciones control o bajo la aplicación de oxo-M durante el P1 y el P2. C. Porcentaje de inhibición calculado en el P2 en función del voltaje de activación.

7.3. Evaluación del PIP₂ como la molécula que subyace a la inhibición resistente al voltaje

La oposición de la inhibición resistente al voltaje a ser removida por el pulso despolarizante sugiere que un mecanismo molecular diferente a las subunidades G $\beta\gamma$, las cuales median la inhibición dependiente del voltaje, está involucrado en este tipo de modulación. Como se mencionó anteriormente los agonistas muscarínicos reducen las corrientes de calcio principalmente por una vía que es lenta, insensible a PTX y dependiente del calcio [27]. Esta inhibición muscarínica ha sido mejor estudiada en los canales KCNQ 2/3, para los cuales se ha determinado que es la hidrólisis del PIP₂ el mecanismo que media dicha inhibición [102, 104, 113, 117]. Ya que esta inhibición comparte varias características con la inhibición resistente al pulso condicionante, estudiada en este trabajo, nosotros nos interesamos en el PIP₂ como posible molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje en los canales Ca_v2.2 y planteamos su estudio empleando la inhibición muscarínica y el protocolo de doble pulso. Para esto utilizamos un pulso condicionante de 25 ms de duración y +125 mV de magnitud. La Figura 18 muestra el efecto de la aplicación de 10 μ M de oxo-M sobre la corriente Ca_v2.2 en el P1 y en el P2 (n = 9). La inhibición en el P1 (76 ± 7 %) fue similar a la inhibición en el P2 (69 ± 5 %), lo que sugiere que el mecanismo que subyace a este agonista no fue liberado por el pulso condicionante y, por consiguiente, la inhibición por oxo-M es principalmente resistente al voltaje. La diferencia de la inhibición entre el P1 y el P2 puede ser explicada por la regulación tónica, ya que en ausencia de la oxo-M se observa una diferencia similar entre el P1 y el P2. Así, la inhibición de los Ca_v2.2 por oxo-M parece ser un buen modelo para el estudio del mecanismo que subyace a la inhibición resistente al voltaje.

La oxo-M inhibe la corriente de calcio en neuronas SCG a través de la activación de subunidades $G\alpha_{q/11}$ sin involucrar subunidades $G\beta\gamma$. Ya que la familia de subunidades $G\alpha_{q/11}$ activan a la fosfolipasa C (PLC) nosotros evaluamos el efecto del U73122, un inhibidor de esta enzima, sobre la inhibición resistente al voltaje. Las neuronas fueron incubadas con 5 μ M de U73122 o de U73343 como control negativo, ya que este último es un análogo inactivo de este fármaco. Ambos compuestos fueron diluidos en DMSO cuya concentración final no excedió el 0.2 % v/v. En presencia del U73122, las corrientes $Ca_v2.2$ no fueron inhibidas por oxo-M. Mientras que el U73343 no impidió la inhibición de la corriente $Ca_v2.2$ ante la aplicación de oxo-M. La Figura 18C compara el porcentaje de inhibición resistente al voltaje en presencia de U73343 (58 ± 6 %, $n = 8$) o de U73122 (13 ± 6 %, $n = 6$). Por consiguiente el U73122 reduce la inhibición de la corriente $Ca_v2.2$ inducida por oxo-M, sugiriendo que se requiere de la activación de la PLC para que ocurra la inhibición resistente al voltaje.

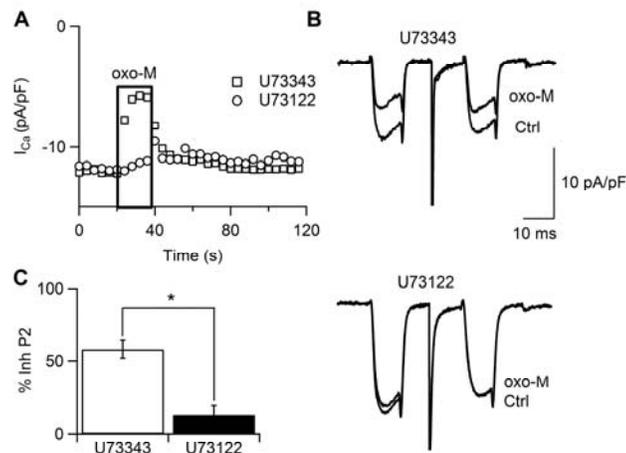


Figura 18. La activación de la PLC es requerida para la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$.

La PLC activada hidroliza al PIP₂, produciendo IP₃ y DAG. El PIP₂ es un cofactor necesario para la activación de varios canales iónicos, entre los cuales el canal KCNQ 2/3 es el más estudiado, y la hidrólisis del PIP₂ lleva a la inhibición de estos canales [102, 104, 113, 115, 117]. Nosotros probamos si la hidrólisis del PIP₂ es la responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales de calcio Ca_v2.2 endógenos en neuronas simpáticas. Con este propósito 100 μM de diC8-PIP₂ fue introducido en las neuronas a través de la pipeta de registro. Este análogo del PIP₂ nativo es soluble en agua a concentraciones de 1 mg/ml. El racionamiento en el cual se basó este experimento fue que una fuente extra e inagotable de PIP₂, impediría la hidrólisis del PIP₂ nativo por la PLC, y por consiguiente la oxo-M no podría inducir la inhibición de la corriente de calcio.

Primero realizamos una serie de experimentos control sobre la corriente de los canales KCNQ 2/3 para validar nuestra estrategia experimental. El primer paso fue comprobar el requerimiento de la hidrólisis de PIP₂ para la inhibición de los canales KCNQ 2/3, el cual está bien documentado (revisado en [132]). Para esto se transfectaron plásmidos que contenían el ADN para los canales KCNQ 2 y KCNQ 3 humano en células TsA-201. Al mismo tiempo se cotransfectó una fosfatasa sensible al voltaje (VSP) para disminuir la concentración del PIP₂ disponible en la membrana plasmática. Esta herramienta molecular permite estudiar la regulación del canal por PIP₂ eliminando efectos secundarios de la hidrólisis, ya que la VSP solo remueve el grupo fosfato de la posición 5 del anillo inositol sin producir IP₃ ni DAG. La VSP fue activada con un pulso de voltaje de +120 mV por 2 s. La corriente KCNQ 2/3 fue registrada durante un pulso despolarizante de -60 mV a -20 mV por 30 s. Después de 500 ms de registro a -20 mV se aplicó el pulso para activar la VSP. La inhibición de la corriente KCNQ 2/3 fue observada durante la activación de la VSP, como la

disminución en la corriente durante el pulso a +120 mV, y también como la diferencia entre la amplitud de la corriente antes y después de este pulso (Figura 19). Esto coincide con lo que ha sido reportado previamente [115]. Posteriormente dializamos 100 μM de diC8-PIP₂ a través de la pipeta de registro para validar nuestra estrategia experimental en este modelo. En presencia de diC8-PIP₂, la corriente KCNQ 2/3 no fue inhibida tras la activación de la VSP. Este resultado sugiere que el diC8-PIP₂ dializado actúo como una fuente inagotable para la VSP impidiendo la hidrólisis del PIP₂ nativo, y por consiguiente esta estrategia parece ser útil para evaluar el papel del PIP₂ en la inhibición resistente al voltaje de los canales Ca_v2.2 en neuronas SCG.

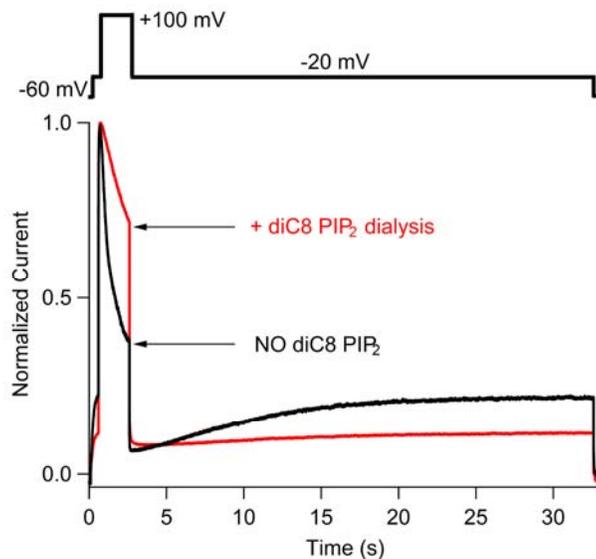


Figura 19. La diálisis de PIP₂ impide la inhibición de los canales KCNQ 2/3 tras la activación de la VSP.

Al dializar diC8-PIP₂ en las neuronas SCG se observó una disminución mayor al 50% en la inhibición resistente al voltaje de las corrientes Ca_v2.2 inducida por

oxo-M ($22 \pm 5\%$, $n = 9$), comparado con las neuronas no dializadas ($55 \pm 4\%$, $n = 9$) (Figura 20). Estos resultados sugieren que la regulación resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$ está mediada por la hidrólisis del PIP_2 .

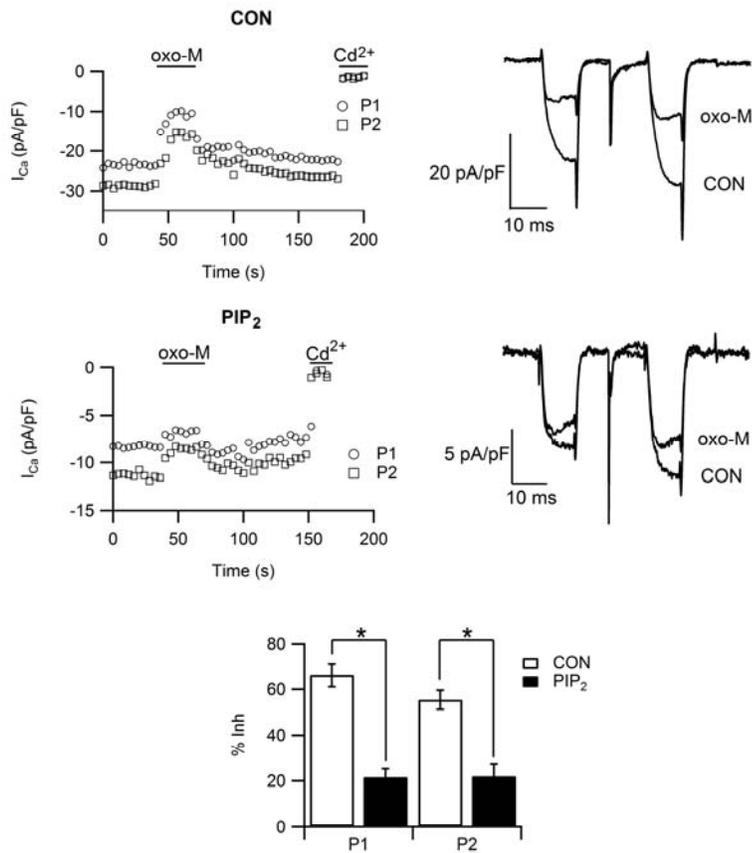


Figura 20. La diálisis de PIP_2 evita la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$.

Si la hidrólisis del PIP_2 es la responsable de la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$ entonces la recuperación de la corriente requerirá de la re-síntesis del PIP_2 . Las enzimas encargadas de esta re-síntesis son la

fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K) y la fosfatidilinositol-4-fosfato-5-cinasa (PI4P5K), las cuales fosforilan al fosfatidilinositol (PI) convirtiéndolo en fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) y luego en PIP₂. Nosotros utilizamos la wortmannina, un compuesto que inhibe la PI4K y la PI3K (una cinasa involucrada en la síntesis de otros fosfoinositidos tales como el fosfatidilinositol-3-fosfato y el fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato), y como control utilizamos el LY294002, el cual sólo inhibe la PI3K [133]. En presencia de 10 µM de wortmannina observamos que, tras la aplicación de oxo-M, la corriente Ca_v2.2 se inhibió de manera similar a las neuronas sin tratamiento. Sin embargo, se observó en estas neuronas que al lavar la oxo-M la corriente Ca_v2.2 sólo se recuperó en un 5% (n = 7) (Figura 21). El LY294002 no afectó la recuperación de la corriente (40 ± 5%, n = 10). Por consiguiente, la activación de la PI4K es necesaria para que la corriente Ca_v2.2 inhibida de manera resistente al voltaje se recupere, lo que permite sugerir que la recuperación desde la inhibición resistente al voltaje requiere de la re-síntesis del PIP₂. Este resultado soporta la idea de que la hidrólisis del PIP₂ es la responsable de la inhibición resistente al voltaje en canales Ca_v2.2.

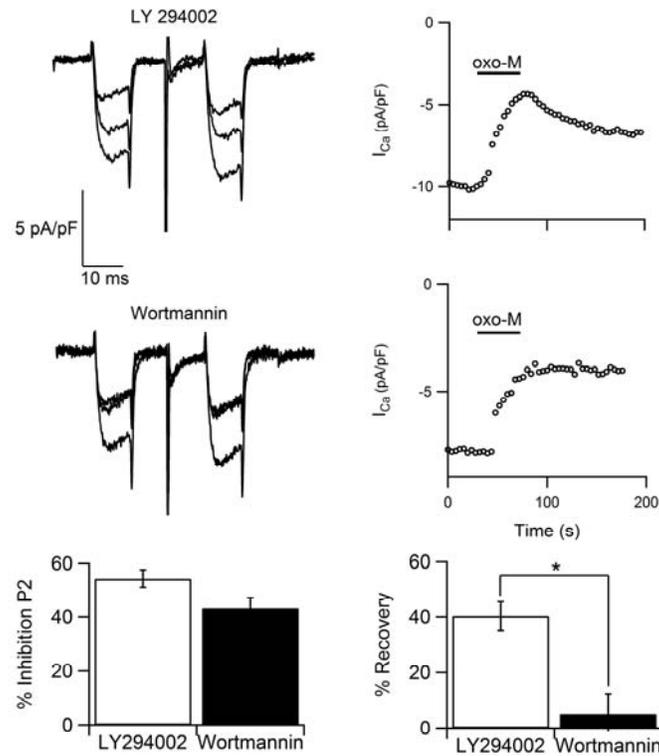


Figura 21. La re-síntesis del PIP_2 es necesaria para la recuperación de la corriente $Ca_v2.2$ desde la inhibición resistente al voltaje inducida por oxo-M.

8. DISCUSIÓN

La caracterización de las propiedades biofísicas y moleculares de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$ es necesaria para poder analizar y comprender de manera global la regulación de la transmisión sináptica a través de receptores acoplados a proteínas G. Para ello es necesario encontrar aproximaciones que nos permitan separar los dos tipos de inhibición inducidos por agonistas de los GPCRs: la inhibición dependiente del voltaje y la inhibición resistente al voltaje. Aunque el protocolo de doble pulso fue diseñado originalmente para estudiar la inhibición dependiente del voltaje, nuestros resultados permitieron establecer que este protocolo de doble pulso también permite aislar la inhibición resistente al voltaje y estudiar sus propiedades biofísicas y moleculares.

8.1. Propiedades biofísicas de la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$

8.1.1. Sensibilidad al pulso condicionante

A partir de los experimentos en los cuales se modificaron los parámetros del pulso condicionante, establecimos el voltaje, la duración y el intervalo entre el pulso condicionante y el P2 óptimos para aislar la inhibición resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$ que es inducida por la activación de GPCRs. Observamos que entre mayor sea el voltaje aplicado o la duración del pulso condicionante mayor es el porcentaje removido de la inhibición dependiente del voltaje, y por consiguiente mejor aislada es la inhibición resistente al voltaje. Así, con el propósito de estudiar la inhibición resistente al voltaje sin la influencia de ninguna inhibición dependiente del voltaje, el pulso condicionante debe

aplicarse a voltajes superiores a +100 mV con una duración mayor a 25 ms. La inhibición resistente al voltaje fue observada incluso a potenciales extremadamente despolarizados (+145 mV), lo cual confirma que la inhibición resistente al voltaje no puede ser removida por cambios en el potencial de membrana que ocurren bajo condiciones fisiológicas. Aunque estos resultados no pueden ser usados para señalar posibles mecanismos, sugieren que la unión de la molécula responsable de esta inhibición al canal no puede ser removida por cambios en el potencial de membrana. Esta observación se discutirá más adelante cuando hablemos acerca del posible mecanismo involucrado.

Por otro lado, observamos que cambios en el potencial de membrana inducen una remoción transitoria de la inhibición dependiente del voltaje, tal y como se ha descrito previamente en la literatura [50, 57, 78, 80]. El análisis de los dos componentes de inhibición dependiente del voltaje, el tónico y el inducido por el agonista, mostró que la sensibilidad al voltaje de la regulación tónica es diferente a la sensibilidad al voltaje de la inhibición dependiente al voltaje inducida por el agonista. La inhibición dependiente del voltaje inducida por el agonista se remueve con cambios menores en el voltaje y con pulsos de menor duración y se reinstala más lento que la regulación tónica. Esto sugiere que las moléculas involucradas en cada componente son diferentes; una posibilidad es que subunidades $G\beta\gamma$ diferentes subyacen a estos dos procesos. Nosotros sugerimos que en experimentos futuros deben evaluarse las diferencias en la sensibilidad al voltaje que cada subunidad $G\beta$ presenta ante el protocolo de doble pulso. Esto permitirá identificar la relación entre subunidades específicas y el tipo de inhibición dependiente del voltaje.

8.1.2. Dependencia del voltaje de la activación de los canales

El hecho de que la inhibición resistente al voltaje no puede ser removida por cambios extremos del potencial de membrana [80] no sugiere que esta inhibición no varíe con el voltaje de activación de los canales. En contraste con reportes previos [37, 80], nuestros resultados muestran que la inhibición resistente al voltaje cambia con el voltaje de activación de los canales. Esta característica es completamente diferente a la resistencia al pulso condicionante que presenta esta inhibición. Primero porque en los protocolos para evaluar la resistencia al voltaje se varió el voltaje del pulso condicionante mientras que para evaluar la dependencia al voltaje de activación de los canales se varió el voltaje del P1 y del P2. Segundo porque el voltaje de activación de los canales se evaluó entre -40 y +40 mV mientras que el voltaje del pulso condicionante se probó entre +35 y +145 mV. Esta característica de dependencia al voltaje de activación de los canales es observada cuando la inhibición resistente al voltaje es inducida tanto por un agonista muscarínico como por uno adrenérgico, descartando la posibilidad de que se deba a un efecto específico del agonista. Por el contrario parece ser una característica de la inhibición resistente al voltaje inducida tras la activación de las proteínas G. Además, nosotros determinamos que la inhibición resistente al voltaje ocurre en una región delimitada entre -20 mV y +10 mV, una región en la cual también ocurren procesos fisiológicos que gobiernan el disparo del potencial de acción y la liberación de neurotransmisores. Esto sugiere que la inhibición resistente al voltaje juega un papel importante en la regulación de dichos procesos fundamentales en la comunicación neuronal.

8.2. Propiedades moleculares de la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$

8.2.1. El PIP_2 como molécula responsable de la inhibición resistente al voltaje

Los VGCCs son regulados tras la activación de los GPCR por dos vías diferentes: la inhibición dependiente del voltaje y la inhibición resistente al voltaje, las cuales actúan por mecanismos diferentes. La inhibición resistente al voltaje difiere de la dependiente en que, por un lado, no puede ser removida tras la aplicación de pulsos despolarizantes [80], y por otro, que bioquímicamente está relacionada a una familia diferente de subunidades $G\alpha$ [27]. La inhibición dependiente del voltaje activada por GPCRs es mediada por subunidades $G\alpha_i/o$ [37] mientras la inhibición resistente al voltaje es activada por subunidades $G\alpha_q$ [71]. El efector de la inhibición dependiente del voltaje es la subunidad $G\beta\gamma$, mientras que el efector de la inhibición resistente al voltaje no se conoce. En los experimentos presentados en esta tesis mostramos evidencia que sugiere que el efector de la inhibición resistente al voltaje es la hidrólisis del PIP_2 . La evidencia que mostramos y que apoya esta hipótesis es que al prevenir la activación de la PLC, una enzima que hidroliza el PIP_2 , la inhibición resistente al voltaje es evitada. Además, al dializar PIP_2 dentro de las neuronas SCG la inhibición resistente al voltaje no ocurre. Y por último, al bloquear la activación de la PI4K, una enzima necesaria en la re-síntesis del PIP_2 , la recuperación desde la inhibición resistente al voltaje no ocurre. Esta hipótesis concuerda con el papel de la $G\alpha_q$ en esta regulación, ya que esta subunidad activa la PLC y por tanto induce la hidrólisis del PIP_2 . Dentro de los candidatos moleculares para explicar la inhibición resistente al voltaje se encontraban las subunidades $G\beta\gamma$, la PKC, la proteína neuronal censora de calcio 1 (NCS-1) y subproductos de la

hidrólisis del PIP₂. Nuestros resultados descartan las tres primeras opciones como posibles efectores de esta inhibición. Sin embargo, nuestros experimentos no permiten descartar que subproductos de la hidrólisis del PIP₂, particularmente el AA, puedan estar participando en la inhibición resistente al voltaje de los canales Ca_v2.2. El papel del PIP₂ en otras formas de regulación que no dependen de subunidades *Gai/o* ha sido soportada previamente en experimentos en los cuales las células son pre-incubadas con PTX [85]. Nuestros experimentos definen claramente que la inhibición resistente al voltaje, aislada por un protocolo de doble pulso, es mediada por la hidrólisis del PIP₂ o sus derivados.

¿Cuál es el mecanismo molecular por el cual el PIP₂ causa la inhibición de la corriente de calcio? Es una pregunta que aún no tiene respuesta. En estos últimos años, numerosos estudios han arrojado evidencia de que el PIP₂ regula diversos canales iónicos [134], lo que lo ha posicionado como un componente integral de la señalización eléctrica de las células excitables. Sin embargo, hay muy poca evidencia sobre la forma en la que el PIP₂ ejerce esta acción sobre los canales y sobre la existencia de un mecanismo generalizado de acción. Recientemente el grupo de MacKinnon presentó la estructura cristalográfica del canal de potasio rectificador de entrada Kir 2.2 unido al PIP₂ [135]. Estos estudios muestran que el PIP₂ se une al canal con una estequiometría de 1 molécula de PIP₂ por cada subunidad del canal (4PIP₂/canal), además, que cada PIP₂ se une en una región límite entre el dominio transmembranal y el dominio C-terminal de la subunidad, y que esta unión está mediada por una interacción directa con aminoácidos ubicados en diferentes hélices de estos dos dominios. Las colas hidrofóbicas del PIP₂ y el esqueleto de glicerol se unen a dos residuos de arginina y un triptófano ubicados en el dominio transmembranal, mientras que los fosfatos 4 y 5 del grupo inositol se unen con 3 lisinas y 1 arginina

localizadas en el C-terminal, esta unión del grupo inositol parece ser la que otorga la especificidad por el PIP₂. La unión del PIP₂ causa que el dominio C-terminal del canal se aproxime al dominio transmembranal y se ancle llevando a un cambio conformacional que conduce a la iniciación de la apertura del canal. Cuando el PIP₂ no está unido, este estado conformacional se desestabiliza y el canal se cierra lo cual lleva a la inhibición de la corriente. Para los VGCC no se ha determinado cual es el mecanismo de acción del PIP₂, aunque ha sido reportado que estos canales no tienen ningún dominio canónico de unión a PIP₂, se debe tener en cuenta que el mecanismo propuesto para los canales Kir 2.2 involucra residuos localizados en hélices diferentes que forman una estructura tridimensional que sirve de sitio de unión para el PIP₂. Para determinar cómo el PIP₂ ejerce la inhibición en los canales Ca_v2.2 se requerirá mayor investigación y el desarrollo de nuevas técnicas que permitan resolver la estructura de estos canales.

8.2.2. *Significado funcional de la acción del PIP₂*

Actualmente se reconoce que el PIP₂ es cofactor de una gran variedad de canales iónicos [132, 134, 136-140]. Éste es necesario para el funcionamiento de canales KCNQ 2/3 [102, 104, 113, 115, 117], canales de potasio rectificadores de entrada [141], canales de potasio rectificadores tardíos [142], canales de calcio [85, 111, 119, 143], canales TRP [144] y canales de sodio epiteliales ([145-147] entre otros. Esta gran variedad de canales que son regulados por PIP₂ refleja la importancia de este fosfoinositido en células excitables como las neuronas. La ubicación y el momento en el cual el PIP₂ se encuentra cercano a un canal deben ser regulados de manera precisa. Para el caso de los canales de calcio Ca_v2.2, el ajuste fino de la concentración del PIP₂ puede ser un mecanismo básico para regular la transmisión sináptica. Los canales Ca_v2.2 se

ubican principalmente en las terminales sinápticas [8] donde cumplen con la función de activar la fusión de las vesículas, que contienen los neurotransmisores, con la membrana plasmática. En esta zona de fusión de las vesículas el PIP_2 se localiza en micro-dominios y colocaliza con cúmulos de la proteína syntaxina [148] y probablemente con los canales $\text{Ca}_v2.2$. Así, la hidrólisis del PIP_2 es un evento importante en la regulación de liberación del neurotransmisor en las sinapsis [149]. Futuros estudios deben enfocarse en determinar funcionalmente el efecto de agonistas de receptores acoplados a proteínas del tipo $\text{G}\alpha_q$ sobre la secreción de neurotransmisores y si este efecto ocurre por la inhibición resistente al voltaje de los canales $\text{Ca}_v2.2$ o por la desorganización del sitio funcional necesario para la fusión vesicular.

Ya que los canales de calcio son centros integradores en las terminales sinápticas que determinan la liberación de los neurotransmisores su regulación es fundamental [150, 151]. En las terminales sinápticas los canales de calcio son regulados por proteínas G, proteínas de la fusión vesicular y el ion calcio. Con los resultados presentados en esta tesis proponemos que los canales de calcio también son regulados por el PIP_2 . Este representa otro mecanismo de regulación de la homeostasis, y posiblemente un mecanismo de adaptabilidad, de la transmisión sináptica. Siendo la transmisión sináptica un evento tan relevante en el funcionamiento del organismo es comprensible que exista redundancia en su regulación. La hidrólisis del PIP_2 permite reducir la corriente de calcio y por consiguiente la liberación del neurotransmisor. La magnitud y tiempo de regulación resistente al voltaje de los canales de calcio dependerá del tipo de agonista y del tiempo que permanezca cercano a los receptores. Además, el incremento o disminución en la expresión de proteínas requeridas para la síntesis e hidrólisis del PIP_2 pueden representar mecanismos de regulación de la transmisión sináptica a largo plazo. De ser demostrado, los niveles de PIP_2

podrían explicar cambios en la eficiencia sináptica y por consiguiente depresión o potenciación a corto y largo plazo.

9. PERSPECTIVAS

Los canales de calcio $Ca_v2.2$ son importantes en la transmisión sináptica y por lo tanto su regulación es un proceso de relevancia fisiológica.

En este trabajo presentamos evidencia de que la hidrólisis del PIP_2 es un mecanismo que permite explicar la regulación resistente al voltaje de los canales $Ca_v2.2$. Además, mostramos que esta regulación varía con el voltaje de activación de los canales. Sugerimos la necesidad de realizar trabajos que permitan establecer la relación entre el PIP_2 y la variación en el voltaje de esta regulación, a través de la evaluación de la dependencia del voltaje de la regulación a diferentes concentraciones del PIP_2 en la membrana.

Nuestros resultados descartaron a las subunidades $G\beta\gamma$ y a la PKC como responsables de la regulación resistente al voltaje, sin embargo, queda por establecer si el AA, como componente del PIP_2 , juega un papel en la regulación resistente al voltaje. Para ello es necesario el planteamiento de estrategias experimentales que permitan responder a esta pregunta.

Además sugerimos que se realicen estudios de la regulación de la transmisión sináptica a diferentes concentraciones del PIP_2 a partir de registros de corrientes post-sinápticas. Estos experimentos ayudaran a determinar la función fisiológica de la regulación resistente al voltaje y su relevancia en la comunicación neuronal.

10. REFERENCIAS

1. Hodgkin AL, Huxley AF. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol*, 116, 473-96.
2. Hodgkin AL, Huxley AF. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*, 116, 449-72.
3. Hagiwara S. (1966) Membrane properties of the barnacle muscle fiber. *Ann N Y Acad Sci*, 137, 1015-24.
4. Hagiwara S, Nakajima S. (1966) Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle. *J Gen Physiol*, 49, 807-18.
5. Hagiwara S, Nakajima S. (1966) Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and manganese ions. *J Gen Physiol*, 49, 793-806.
6. Katz B, Miledi R. (1965) The Measurement of Synaptic Delay, and the Time Course of Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 161, 483-95.
7. Katz B, Miledi R. (1965) The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 161, 496-503.
8. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. (1994) Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science*, 264, 107-11.
9. Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P. (2012) Nanodomain coupling between Ca²⁺(+) channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci*, 13, 7-21.
10. Allen TG. (1999) The role of N-, Q- and R-type Ca²⁺ channels in feedback inhibition of ACh release from rat basal forebrain neurones. *J Physiol*, 515 (Pt 1), 93-107.
11. Koh DS, Hille B. (1997) Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1506-11.
12. Pfrieger FW, Gottmann K, Lux HD. (1994) Kinetics of GABAB receptor-mediated inhibition of calcium currents and excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons in vitro. *Neuron*, 12, 97-107.
13. Toth PT, Bindokas VP, Bleakman D, Colmers WF, Miller RJ. (1993) Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals. *Nature*, 364, 635-9.
14. Umemiya M, Berger AJ. (1994) Activation of adenosine A1 and A2 receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron*, 13, 1439-46.
15. Yawo H, Chuhma N. (1993) Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca²⁺ channels by adenosine autoreceptors. *Nature*, 365, 256-8.
16. Harkins AB, Fox AP. (2000) Activation of purinergic receptors by ATP inhibits secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Brain Res*, 885, 231-9.
17. Hertzting G, Wurster S, Allgaier C. (1990) Regulatory proteins in presynaptic function. *Ann N Y Acad Sci*, 604, 289-304.
18. Atlas D. (2010) Signaling role of the voltage-gated calcium channel as the molecular on/off-switch of secretion. *Cell Signal*, 22, 1597-603.
19. Llinas R, Sugimori M, Silver RB. (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*, 256, 677-9.
20. Spitzer NC, Lautermilch NJ, Smith RD, Gomez TM. (2000) Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays*, 22, 811-7.
21. Gomez TM, Spitzer NC. (2000) Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J Neurobiol*, 44, 174-83.
22. Bengtson CP, Bading H. (2012) Nuclear calcium signaling. *Adv Exp Med Biol*, 970, 377-405.

23. De Laet A, Adriaensen D, Van Bogaert PP, Scheuermann DW, Timmermans JP. (2002) Immunohistochemical localization of voltage-activated calcium channels in the rat oesophagus. *Neurogastroenterol Motil*, 14, 173-81.
24. Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA. (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci*, 18, 6319-30.
25. Catterall WA. (1999) Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 144-59.
26. Berkefeld H, Fakler B. (2008) Repolarizing responses of BKCa-Cav complexes are distinctly shaped by their Cav subunits. *J Neurosci*, 28, 8238-45.
27. Hille B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci*, 17, 531-6.
28. Rajagopal S, Fang H, Oronce CI, Jhaveri S, Taneja S, Dehlin EM, Snyder SL, Sando JJ, Kamatchi GL. (2009) Site-specific regulation of CA(V)_{2.2} channels by protein kinase C isozymes betaII and epsilon. *Neuroscience*, 159, 618-28.
29. Jiang X, Lautermilch NJ, Watari H, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. (2008) Modulation of CaV_{2.1} channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 341-6.
30. Brehm P, Eckert R. (1978) Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science*, 202, 1203-6.
31. Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T, Catterall WA. (1999) Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature*, 399, 155-9.
32. Goo YS, Lim W, Elmslie KS. (2006) Ca²⁺ enhances U-type inactivation of N-type (CaV_{2.2}) calcium current in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol*, 96, 1075-83.
33. Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*, 2, 1-7.
34. Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schiöth HB. (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88, 263-73.
35. Wettschureck N, Offermanns S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85, 1159-204.
36. Bean BP. (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature*, 340, 153-6.
37. Beech DJ, Bernheim L, Hille B. (1992) Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron*, 8, 97-106.
38. Schofield GG. (1990) Norepinephrine blocks a calcium current of adult rat sympathetic neurons via an alpha 2-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol*, 180, 37-47.
39. Schofield GG. (1991) Norepinephrine inhibits a Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons via a G-protein. *Eur J Pharmacol*, 207, 195-207.
40. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP. (1991) A study of the mechanism of Ca²⁺ current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *J Neurosci*, 11, 3594-609.
41. Bayliss DA, Umemiya M, Berger AJ. (1995) Inhibition of N- and P-type calcium currents and the after-hyperpolarization in rat motoneurons by serotonin. *J Physiol*, 485 (Pt 3), 635-47.
42. Zhu Y, Ikeda SR. (1993) Adenosine modulates voltage-gated Ca²⁺ channels in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol*, 70, 610-20.
43. Mynlieff M, Beam KG. (1994) Adenosine acting at an A₁ receptor decreases N-type calcium current in mouse motoneurons. *J Neurosci*, 14, 3628-34.

44. Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J. (1987) Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 4313-7.
45. Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Hille B. (1991) Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 652-6.
46. Bernheim L, Beech DJ, Hille B. (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron*, 6, 859-67.
47. Zhu Y, Ikeda SR. (1994) VIP inhibits N-type Ca²⁺ channels of sympathetic neurons via a pertussis toxin-insensitive but cholera toxin-sensitive pathway. *Neuron*, 13, 657-69.
48. Shapiro MS, Hille B. (1993) Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron*, 10, 11-20.
49. Boland LM, Bean BP. (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci*, 13, 516-33.
50. Elmslie KS, Zhou W, Jones SW. (1990) LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*, 5, 75-80.
51. Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B. (1994) Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron*, 12, 1319-29.
52. Hille B. (1992) G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron*, 9, 187-95.
53. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.
54. Dunlap K, Fischbach GD. (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol*, 317, 519-35.
55. Marchetti C, Carbone E, Lux HD. (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch*, 406, 104-11.
56. Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT. (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J*, 71, 2509-21.
57. Grassi F, Lux HD. (1989) Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neurosci Lett*, 105, 113-9.
58. Brody DL, Yue DT. (2000) Relief of G-protein inhibition of calcium channels and short-term synaptic facilitation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 20, 889-98.
59. Brody DL, Patil PG, Mulle JG, Snutch TP, Yue DT. (1997) Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type Ca²⁺ channels in HEK 293 cells. *J Physiol*, 499 (Pt 3), 637-44.
60. Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Garcia DE. (2001) Modulation of N-type Ca²⁺ channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflugers Arch*, 442, 848-58.
61. McDavid S, Currie KP. (2006) G-proteins modulate cumulative inactivation of N-type (Cav2.2) calcium channels. *J Neurosci*, 26, 13373-83.
62. Holz GG, Rane SG, Dunlap K. (1986) GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 319, 670-2.
63. Scott RH, Dolphin AC. (1986) Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-baclofen-mediated inhibition. *Neurosci Lett*, 69, 59-64.
64. Toselli M, Lang J, Costa T, Lux HD. (1989) Direct modulation of voltage-dependent calcium channels by muscarinic activation of a pertussis toxin-sensitive G-protein in hippocampal neurons. *Pflugers Arch*, 415, 255-61.
65. Toselli M, Lux HD. (1989) GTP-binding proteins mediate acetylcholine inhibition of voltage dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Pflugers Arch*, 413, 319-21.
66. Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B. (1994) Modulation of Ca²⁺ channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci*, 14, 7109-16.

67. Goldsmith P, Backlund PS, Jr., Rossiter K, Carter A, Milligan G, Unson CG, Spiegel A. (1988) Purification of heterotrimeric GTP-binding proteins from brain: identification of a novel form of Go. *Biochemistry*, 27, 7085-90.
68. Milligan G, Mullaney I, Unson CG, Marshall L, Spiegel AM, McArdle H. (1988) GTP analogues promote release of the alpha subunit of the guanine nucleotide binding protein, Gi2, from membranes of rat glioma C6 BU1 cells. *Biochem J*, 254, 391-6.
69. Mitchell FM, Griffiths SL, Saggerson ED, Houslay MD, Knowler JT, Milligan G. (1989) Guanine-nucleotide-binding proteins expressed in rat white adipose tissue. Identification of both mRNAs and proteins corresponding to Gi1, Gi2 and Gi3. *Biochem J*, 262, 403-8.
70. Delmas P, Abogadie FC, Milligan G, Buckley NJ, Brown DA. (1999) betagamma dimers derived from Go and Gi proteins contribute different components of adrenergic inhibition of Ca2+ channels in rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 518 (Pt 1), 23-36.
71. Delmas P, Abogadie FC, Dayrell M, Haley JE, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA, Buckley NJ. (1998) G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-type calcium currents in sympathetic neurons. *Eur J Neurosci*, 10, 1654-66.
72. Forscher P, Oxford GS, Schulz D. (1986) Noradrenaline modulates calcium channels in avian dorsal root ganglion cells through tight receptor-channel coupling. *J Physiol*, 379, 131-44.
73. Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. (1996) Modulation of Ca2+ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 380, 258-62.
74. Ikeda SR. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 380, 255-8.
75. Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B. (1998) G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca2+ channels. *J Neurosci*, 18, 9163-70.
76. Elmslie KS. (2003) Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, 35, 477-89.
77. Ikeda SR. (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 439, 181-214.
78. Formenti A, Arrigoni E, Mancina M. (1993) Two distinct modulatory effects on calcium channels in adult rat sensory neurons. *Biophys J*, 64, 1029-37.
79. Kasai H, Aosaki T. (1989) Modulation of Ca-channel current by an adenosine analog mediated by a GTP-binding protein in chick sensory neurons. *Pflugers Arch*, 414, 145-9.
80. Luebke JI, Dunlap K. (1994) Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Arch*, 428, 499-507.
81. Diverse-Pierluissi M, Dunlap K. (1993) Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron*, 10, 753-60.
82. Wollmuth LP, Shapiro MS, Hille B. (1995) Pancreatic polypeptide inhibits calcium channels in rat sympathetic neurons via two signaling pathways. *J Neurophysiol*, 73, 1323-8.
83. Rane SG, Walsh MP, McDonald JR, Dunlap K. (1989) Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current. *Neuron*, 3, 239-45.
84. Rane SG, Dunlap K. (1986) Kinase C activator 1,2-oleoylacetyl glycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 184-8.
85. Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS. (2004) Phosphatidylinositol [correction] 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type Ca2+ channels. *J Neurosci*, 24, 10980-92.
86. Liu L, Heneghan JF, Mitra-Ganguli T, Roberts-Crowley ML, Rittenhouse AR. (2007) Role of PIP2 in regulating versus modulating Ca2+ channel activity. *J Physiol*, 583, 1165-6; author reply 1167.

87. Diverse-Pierluissi M, Dunlap K. (1995) Interaction of convergent pathways that inhibit N-type calcium currents in sensory neurons. *Neuroscience*, 65, 477-83.
88. Diverse-Pierluissi M, McIntire WE, Myung CS, Lindorfer MA, Garrison JC, Goy MF, Dunlap K. (2000) Selective coupling of G protein beta gamma complexes to inhibition of Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, 275, 28380-5.
89. Dolphin AC, McGuirk SM, Scott RH. (1989) An investigation into the mechanisms of inhibition of calcium channel currents in cultured sensory neurones of the rat by guanine nucleotide analogues and (-)-baclofen. *Br J Pharmacol*, 97, 263-73.
90. Bley KR, Tsien RW. (1990) Inhibition of Ca²⁺ and K⁺ channels in sympathetic neurons by neuropeptides and other ganglionic transmitters. *Neuron*, 4, 379-91.
91. Doering CJ, Kisilevsky AE, Feng ZP, Arnot MI, Peloquin J, Hamid J, Barr W, Nirdosh A, Simms B, Winkfein RJ, Zamponi GW. (2004) A single Gbeta subunit locus controls cross-talk between protein kinase C and G protein regulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem*, 279, 29709-17.
92. Yang J, Tsien RW. (1993) Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron*, 10, 127-36.
93. Bernheim L, Mathie A, 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, 9544-8.
94. Caulfield MP, Jones S, Vallis Y, Buckley NJ, Kim GD, Milligan G, Brown DA. (1994) Muscarinic M-current inhibition via G_αq/11 and alpha-adrenoceptor inhibition of Ca²⁺ current via G_αo in rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 477 (Pt 3), 415-22.
95. Haley JE, Delmas P, Offermanns S, Abogadie FC, Simon MI, Buckley NJ, Brown DA. (2000) Muscarinic inhibition of calcium current and M current in G_αq-deficient mice. *J Neurosci*, 20, 3973-9.
96. Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. (1998) Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7151-6.
97. Haley JE, Abogadie FC, Fernandez-Fernandez JM, Dayrell M, Vallis Y, Buckley NJ, Brown DA. (2000) Bradykinin, but not muscarinic, inhibition of M-current in rat sympathetic ganglion neurons involves phospholipase C-beta 4. *J Neurosci*, 20, RC105.
98. Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. (2005) Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol*, 126, 243-62.
99. Falkenburger BH, Jensen JB, Dickson EJ, Suh BC, Hille B. (2010) Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J Physiol*, 588, 3179-85.
100. Suh BC, Hille B. (2007) Electrostatic interaction of internal Mg²⁺ with membrane PIP₂ Seen with KCNQ K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 130, 241-56.
101. Suh BC, Hille B. (2007) Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. *J Physiol*, 582, 911-6.
102. Suh BC, Inoue T, Meyer T, Hille B. (2006) Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science*, 314, 1454-7.
103. Suh BC, Horowitz LF, Hirdes W, Mackie K, Hille B. (2004) Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by G_q. *J Gen Physiol*, 123, 663-83.
104. Suh BC, Hille B. (2002) Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron*, 35, 507-20.
105. Jensen JB, Lyssand JS, Hague C, Hille B. (2009) Fluorescence changes reveal kinetic steps of muscarinic receptor-mediated modulation of phosphoinositides and Kv7.2/7.3 K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 133, 347-59.
106. Liu L, Roberts ML, Rittenhouse AR. (2004) Phospholipid metabolism is required for M1 muscarinic inhibition of N-type calcium current in sympathetic neurons. *Eur Biophys J*, 33, 255-64.
107. Liu L, Rittenhouse AR. (2003) Arachidonic acid mediates muscarinic inhibition and enhancement of N-type Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 295-300.

108. Liu L, Barrett CF, Rittenhouse AR. (2001) Arachidonic acid both inhibits and enhances whole cell calcium currents in rat sympathetic neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C1293-305.
109. Liu L, Heneghan JF, Michael GJ, Stanish LF, Egertova M, Rittenhouse AR. (2008) L- and N-current but not M-current inhibition by M1 muscarinic receptors requires DAG lipase activity. *J Cell Physiol*, 216, 91-100.
110. Lechner SG, Hussl S, Schicker KW, Drobny H, Boehm S. (2005) Presynaptic inhibition via a phospholipase C- and phosphatidylinositol biphosphate-dependent regulation of neuronal Ca²⁺ channels. *Mol Pharmacol*, 68, 1387-96.
111. Wu L, Bauer CS, Zhen XG, Xie C, Yang J. (2002) Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature*, 419, 947-52.
112. Marrion NV. (1997) Control of M-current. *Annu Rev Physiol*, 59, 483-504.
113. Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Logothetis DE. (2003) PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*, 37, 963-75.
114. Constanti A, Brown DA. (1981) M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neurosci Lett*, 24, 289-94.
115. Falkenburger BH, Jensen JB, Hille B. (2010) Kinetics of PIP₂ metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *J Gen Physiol*, 135, 99-114.
116. Falkenburger BH, Jensen JB, Hille B. (2010) Kinetics of M1 muscarinic receptor and G protein signaling to phospholipase C in living cells. *J Gen Physiol*, 135, 81-97.
117. Winks JS, Hughes S, Filippov AK, Tatulian L, Abogadie FC, Brown DA, Marsh SJ. (2005) Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci*, 25, 3400-13.
118. Suh BC, Kim DI, Falkenburger BH, Hille B. (2012) Membrane-localized beta-subunits alter the PIP₂ regulation of high-voltage activated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 3161-6.
119. Suh BC, Leal K, Hille B. (2010) Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron*, 67, 224-38.
120. Banker G, Goslin K. (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature*, 336, 185-6.
121. Higgins D, Iacovitti L, Joh TH, Burton H. (1981) The immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase within rat sympathetic neurons that release acetylcholine in culture. *J Neurosci*, 1, 126-31.
122. Johnson MI, Iacovitti L, Higgins D, Bunge RP, Burton H. (1981) Growth and development of sympathetic neurons in tissue culture. *Ciba Found Symp*, 83, 108-22.
123. Schofield GG, Ikeda SR. (1988) Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflugers Arch*, 411, 481-90.
124. Wakshull E, Johnson MI, Burton H. (1979) Postnatal rat sympathetic neurons in culture. I. A comparison with embryonic neurons. *J Neurophysiol*, 42, 1410-25.
125. Galvan M, Adams PR. (1982) Control of calcium current in rat sympathetic neurons by norepinephrine. *Brain Res*, 244, 135-44.
126. Nerbonne JM, Gurney AM, Rayburn HB. (1986) Development of the fast, transient outward K⁺ current in embryonic sympathetic neurones. *Brain Res*, 378, 197-202.
127. Zareen N, Greene LA. (2009) Protocol for culturing sympathetic neurons from rat superior cervical ganglia (SCG). *J Vis Exp*.
128. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*, 9, 85-95.
129. Plummer MR, Logothetis DE, Hess P. (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, 2, 1453-63.
130. Regan LJ, Sah DW, Bean BP. (1991) Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron*, 6, 269-80.

131. Marrion NV, Smart TG, Brown DA. (1987) Membrane currents in adult rat superior cervical ganglia in dissociated tissue culture. *Neurosci Lett*, 77, 55-60.
132. Suh BC, Hille B. (2008) PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys*, 37, 175-95.
133. Willars GB, Nahorski SR, Challiss RA. (1998) Differential regulation of muscarinic acetylcholine receptor-sensitive polyphosphoinositide pools and consequences for signaling in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 273, 5037-46.
134. Gamper N, Rohacs T. (2012) Phosphoinositide sensitivity of ion channels, a functional perspective. *Subcell Biochem*, 59, 289-333.
135. Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. (2011) Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*, 477, 495-8.
136. Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. (2001) The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE*, 2001, re19.
137. Gamper N, Shapiro MS. (2007) Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat Rev Neurosci*, 8, 921-34.
138. Gamper N, Shapiro MS. (2007) Target-specific PIP(2) signalling: how might it work? *J Physiol*, 582, 967-75.
139. Logothetis DE, Petrou VI, Adney SK, Mahajan R. (2010) Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflugers Arch*, 460, 321-41.
140. Suh BC, Hille B. (2005) Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 370-8.
141. Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. (2007) Activation of inwardly rectifying potassium (Kir) channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2): interaction with other regulatory ligands. *Prog Biophys Mol Biol*, 94, 320-35.
142. Bian JS, McDonald TV. (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions with the HERG K(+) channel. *Pflugers Arch*, 455, 105-13.
143. Perez-Burgos A, Prieto GA, Galarraga E, Bargas J. (2010) CaV2.1 channels are modulated by muscarinic M1 receptors through phosphoinositide hydrolysis in neostriatal neurons. *Neuroscience*, 165, 293-9.
144. Rohacs T. (2009) Phosphoinositide regulation of non-canonical transient receptor potential channels. *Cell Calcium*, 45, 554-65.
145. Pochynyuk O, Bugaj V, Vandewalle A, Stockand JD. (2008) Purinergic control of apical plasma membrane PI(4,5)P2 levels sets ENaC activity in principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, F38-46.
146. Pochynyuk O, Tong Q, Medina J, Vandewalle A, Staruschenko A, Bugaj V, Stockand JD. (2007) Molecular determinants of PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 regulation of the epithelial Na⁺ channel. *J Gen Physiol*, 130, 399-413.
147. Pochynyuk O, Tong Q, Staruschenko A, Stockand JD. (2007) Binding and direct activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by phosphatidylinositides. *J Physiol*, 580, 365-72.
148. Aoyagi K, Sugaya T, Umeda M, Yamamoto S, Terakawa S, Takahashi M. (2005) The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J Biol Chem*, 280, 17346-52.
149. Prieto GA, Perez-Burgos A, Palomero-Rivero M, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J. (2011) Upregulation of D2-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D3 receptors acting on Ca V 2.1 channels via PIP2 depletion. *J Neurophysiol*, 105, 2260-74.
150. Tedford HW, Zamponi GW. (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev*, 58, 837-62.
151. Catterall WA, Few AP. (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59, 882-901.