

## Tesis de Posgrado

# Caracterización electrofisiológica y farmacológica de los canales de calcio voltaje dependientes de los terminales motores del ratón

Protti, Darío Alejandro

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Protti, Darío Alejandro. (1995). Caracterización electrofisiológica y farmacológica de los canales de calcio voltaje dependientes de los terminales motores del ratón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2699\\_Protti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2699_Protti.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Protti, Darío Alejandro. "Caracterización electrofisiológica y farmacológica de los canales de calcio voltaje dependientes de los terminales motores del ratón". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2699\\_Protti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2699_Protti.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

“Caracterización Electrofisiológica y Farmacológica de los Canales de Calcio  
Voltaje Dependientes de los Terminales Motores del Ratón”

Autor: Dario Alejandro Protti

Director: Osvaldo Daniel Uchitel

Lugar de Trabajo:  
Laboratorio de Electrofisiología,  
Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. Dr. Eduardo de Robertis”  
Facultad de Medicina. U.B.A.

Tesis para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1995

file  
2688  
Ej. 2

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que, tanto a nivel académico como personal, han colaborado y participado en partes de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme la posibilidad de realizar mis estudios de posgrado y el trabajo experimental presentado en esta Tesis, a través del financiamiento personal mediante las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento.

A las autoridades, investigadores y al personal no docente del Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. Eduardo de Robertis", por la buena disposición, más allá de las dificultades generales, para que el trabajo se pueda llevar adelante.

A mi director de tesis, el Dr. O. D. Uchitel, por haberme iniciado y guiado en las tareas de la investigación científica, por haberme apoyado e incentivado en la continuidad del trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, y a los que pasaron por él: Fabian Biali, Ariel Escobar, Verónica Alvarez, Fabiana Scornick, Viviana Sanchez, Leonardo Nicola Siri, Lidia Szczupak, Carlitos Sanchez Antelo, Pablo Ferro, Marcelo Rosato Siri, Eleonora Katz, Silvina Fratantoni, Susana Cuneo y Pablito.

A mis compañeros y amigos del Instituto y de otra procedencia: Daniel J. Calvo, Hugo Rios, Guillermo Gonzalez Burgos, Guillermo Perez, Arturo Hernandez Cruz, Pablo Schwarzbaum, Diego Golombek y Rudy Bernabeu.

A Eleonora Isovich, por acompañarme.

A mis hermanos y padres, por estar siempre a mi lado.

## INDICE

### INTRODUCCION

<b>ASPECTOS GENERALES DE LA TRANSMISION SINAPTICA</b>	<b>1</b>
<i>La liberacion de neurotransmisor es cuantica.</i>	2
<b>LOS MECANISMOS DE LIBERACION Y SU DEPENDENCIA CON EL ION <math>Ca^{2+}</math></b>	<b>4</b>
<b>SITIOS DE ENTRADA DEL <math>Ca^{2+}</math>. MORFOLOGIA Y CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA</b>	<b>6</b>
<b>CORRIENTES DE <math>Ca^{2+}</math></b>	<b>11</b>
<b>DIVERSIDAD DE CANALES DE CALCIO VOLTAJE DEPENDIENTES</b>	<b>11</b>
<b>USO DE TOXINAS COMO HERRAMIENTAS METODOLOGICAS PARA LA IDENTIFICACION DE CANALES</b>	<b>17</b>
<i>Toxinas derivadas del veneno de arañas.</i>	18
<i>Toxinas derivadas del veneno de caracoles marinos.</i>	21
<b>TIPOS DE CANALES DE <math>Ca^{2+}</math> Y TRANSMISION SINAPTICA</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>REGISTRO DE POTENCIALES SINAPTICOS</b>	<b>33</b>
<i>a) Preparacion.</i>	33
<i>b) Instrumentacion y registro electrofisiologico.</i>	33
Metodo de las fallas.	34
Metodo de la varianza.	35
<i>c) Analisis estadistico y Tratamiento de los datos.</i>	36
<b>ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SINAPTICA ESPONTANEA</b>	<b>38</b>
<b>CORRIENTES PRESINAPTICAS</b>	<b>40</b>
<i>a) Preparacion biologica.</i>	40
<i>b) Instrumentacion y registro electrofisiologico.</i>	40
<b>REACTIVOS, DROGAS Y TOXINAS</b>	<b>42</b>

## RESULTADOS

<b>ACCION DE LOS BLOQUEANTES DE LOS CCVD SOBRE LA CONTRACCION MUSCULAR</b>	<b>44</b>
<b>EFFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE LA TRANSMISION NEUROMUSCULAR</b>	<b>47</b>
<i>Efecto de la FTX y su analogo sintetico sFTX sobre el contenido cuantico de la transmision sinaptica.</i>	47
<i>Dependencia del contenido cuantico con la concentracion de <math>Ca^{2+}</math> extracelular.</i>	53
<i>Efecto de la <math>\omega</math>-Aga-IVA sobre el contenido cuantico de la transmision sinaptica.</i>	55
<b>EFFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISOR A ALTA FRECUENCIA DE ESTIMULACION</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>EFFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE LA LIBERACION CUANTICA NO EVOCADA POR ESTIMULACION ELECTRICA</b>	<b>68</b>
<i>Accion de la poliamina FTX y su analogo sintetico sFTX, sobre la liberacion cuantica basal.</i>	68
<i>Accion de la toxina peptidica <math>\omega</math>-Aga-IVA sobre la liberacion cuantica espontanea y estimulada por alto <math>K^{+}_{ext}</math>.</i>	70
<i>Efecto de la <math>\omega</math>-Aga-IVA sobre la liberacion cuantica estimulada por alto <math>K^{+}_{ext}</math>.</i>	71
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>CORRIENTES PRESINAPTICAS</b>	<b>76</b>
<i>Caracterizacion de las se\u00f1ales electricas originadas en los terminales motores.</i>	77
<b>EFFECTO DE LOS BLOQUEANTES DE LOS CCVD SOBRE LAS CORRIENTES DE <math>Ca^{2+}</math></b>	<b>78</b>
<i>Accion de la FTX y sFTX sobre las corrientes de <math>Ca^{2+}</math>.</i>	78
<i>Accion de la <math>\omega</math>-Aga-IVA sobre las corrientes de <math>Ca^{2+}</math>.</i>	79
<i>Accion de la <math>\omega</math>-CgTx sobre las corrientes de <math>Ca^{2+}</math>.</i>	84
<b>CONCLUSION</b>	<b>85</b>
<b>EFFECTO DE LOS BLOQUEANTES DE CCVD SOBRE LA CORRIENTE DE <math>K^{+}</math> ACTIVADA POR <math>Ca^{2+}</math></b>	<b>86</b>
<b>EFFECTO DE LOS QUELANTES DE <math>Ca^{2+}</math> INTRACELULAR EN LOS TERMINALES MOTORES</b>	<b>92</b>
<i>Efecto del quelante de <math>Ca^{2+}</math> intracelular BAPTA-AM, sobre la facilitacion en la transmision sinaptica.</i>	92
<i>Efecto de los quelantes de <math>Ca^{2+}</math> intracelular en las <math>I_{K(Ca)}</math></i>	93

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>98</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>120</b>



# *Introduccion*

## ASPECTOS GENERALES DE LA TRANSMISION SINAPTICA

La entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de calcio voltaje dependiente (CCVD) de la membrana plasmática sirve como un enlace entre la despolarización del terminal nervioso y la activación del mecanismo de liberación de neurotransmisor. El ion  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido identificado en numerosos sistemas biológicos como segundo mensajero, y se ha demostrado que tiene un rol fundamental en procesos tales como el acoplamiento excitación-contracción en los tejidos musculares esquelético, liso y cardíaco, la liberación de hormonas y neurotransmisores, la activación de genes, el funcionamiento del citoesqueleto, la proliferación celular y en algunos mecanismos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Hille, 1992; Kandel y col. 1991). Durante las últimas décadas se ha acumulado numerosa información acerca de las propiedades fisiológicas y bioquímicas por las cuales la despolarización de la membrana conduce a la liberación de neurotransmisor en las sinapsis de tipo químicas. Los aspectos fisiológicos de esta propiedad de los terminales nerviosos se conocen como "acoplamiento despolarización-secreción" y se ha probado que la secreción de neurotransmisor es una función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el comportamiento citosólico apropiado (Llinás y col. 1982).

En este contexto, las preparaciones de la placa neuromuscular de la rana y la sinapsis gigante del ganglio estrellado del calamar han desempeñado un papel fundamental en el estudio de la transmisión sináptica química y en la comprensión de los eventos que ocurren con la llegada del potencial de acción al terminal. Y, si bien pueden existir diferencias en las distintas sinapsis, la descripción de la secuencia de eventos que median el pasaje de información de una célula a la otra en estas preparaciones, probó ser un modelo muy útil para el entendimiento de los mecanismos sinápticos no solo en la transmisión neuromuscular, sino también para la transmisión sináptica química en todo el reino animal.



### *LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES CUANTICA.*

Los experimentos de H.H Dale hace más de cinco décadas atrás mostraron que la transferencia de señales eléctricas en la preparación nervio-músculo está mediada por un proceso especial de tipo químico (Dale y col., 1936). En ese trabajo se mostró que no había continuidad de conducción eléctrica entre el nervio y las fibras musculares y que el impulso nervioso causa la secreción de los terminales de una sustancia específica, la Acetilcolina (Ach), la cual difunde a través de un espacio, reacciona con moléculas receptoras en la fibra muscular y produce la excitación eléctrica en esta última.

En 1952 Paul Fatt y Bernard Katz, encontraron al insertar un microelectrodo en distintas zonas de una fibra muscular, que la región de la placa se encuentra en un estado de actividad espontánea. Estos saltos en el potencial mostraban una distribución espontánea y al azar en el tiempo, eran de una amplitud de 0,5-1 mV y todos presentaban el mismo patrón de curso temporal. Estos potenciales espontáneos fueron llamados potenciales de placa miniatura, y desde su primera descripción, como ruido de membrana (Fatt y Katz, 1950), se les atribuyeron diferentes orígenes hasta que fueron identificados como el producto de la exocitosis de una vesícula sináptica que contiene al neurotransmisor Acetilcolina.

Quedó establecido que la sustancia química es la Ach. debido a los efectos observados con los antagonistas específicos de la misma, como el curare, y por la acción de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, prostigmina y edroponium, sobre la aplicación iontoforética de Ach.. También se concluyó que estos potenciales espontáneos son el producto de la descarga sincrónica de un paquete multimolecular de Ach., también llamado "cuanto", dado que la aplicación iontoforética de Ach. en dosis graduadas originaba respuestas también graduadas en su amplitud y duración y que la respuesta a moléculas individuales estaba evidentemente por debajo del poder de resolución de los instrumentos de medición (Katz, 1978).

La frecuencia de los potenciales de placa miniatura puede variar considerablemente, ya sea por despolarización del terminal o por modificaciones de la concentración iónica del medio o de la fuerza osmótica, pero en ninguna de estas condiciones se observa modificación del "tamaño cuántico". La amplitud de los potenciales de placa miniatura puede ser modificada por antagonistas de la Ach. o por inhibidores de la colinesterasa, y también por alteración del metabolismo de la presinápsis (Elmqvist y Quastel, 1965), pero la modificación en la frecuencia de liberación en varios ordenes de magnitud, no la afecta en absoluto. La constancia en el tamaño cuántico, llevo a suponer la existencia de organelas citoplasmáticas en donde la Ach. estuviera altamente concentrada, como provisión de una cantidad discreta de Ach. para la secreción instantánea (del Castillo y Katz, 1955,1956). Finalmente, estudios del campo de la microscopía electrónica y la bioquímica, aportaron evidencia que sostuvo aún mas firmemente esta hipótesis. Los estudios de la ultraestructura del terminal sináptico realizados en forma casi simultánea por De Robertis y Palay, mostraron la existencia de organelas agrupadas en grandes cantidades en zonas contiguas a la membrana (De Robertis y Bennet, 1954; Palay, 1954). Estas organelas, de  $\cong 50$  nm de diámetro, no se encuentran distribuidas uniformemente en el terminal, y el análisis bioquímico de las fracciones subcelulares de terminales colinérgicos, mostró la mayor parte de la Ach. concentrada en estas vesículas (Israel y col, 1968), por lo cual se las denominó "vesículas sinápticas".

Por otro lado, del Castillo y Katz (1954) encontraron frente a la estimulación eléctrica del nervio, en un medio con bajo contenido de  $Ca^{2+}$  y alto  $Mg^{2+}$ , que se generan potenciales sinápticos, llamados potenciales de placa, cuya amplitud es un múltiplo entero de la amplitud de los potenciales miniatura. También observaron que la liberación de neurotransmisor aumentaba con la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular y disminuía al aumentar el  $Mg^{2+}$  externo. De aquí se desprendió que las vesículas sinápticas son la moneda unitaria en el proceso de secreción en los terminales nerviosos y que el  $Ca^{2+}$  tiene un efecto facilitatorio en la transmisión sináptica.

## LOS MECANISMOS DE LIBERACION Y SU DEPENDENCIA CON EL ION $\text{Ca}^{2+}$

La atención en el proceso de exocitosis se centró en el rol que desempeña el ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Katz y Miledi en 1967 demostraron elegantemente que es necesaria la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular durante la despolarización del terminal nervioso para que exista liberación de neurotransmisor, mientras que la aplicación iontoforética del mismo, posteriormente a la despolarización no producía liberación.

Asimismo, observaron que en la sinapsis gigante del calamar, con las conductancias al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$  bloqueadas (TTX y TEA en el medio), se producía un potencial regenerativo debido al flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este potencial fue llamado "potencial secretor" ya que esa corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  era la responsable de la liberación de neurotransmisor. Pero la demostración más contundente de que el  $\text{Ca}^{2+}$  dispara el mecanismo de liberación de neurotransmisor fue en 1973, cuando se inyectó iontoforéticamente en el terminal de la sinapsis gigante del calamar y se observó la correlación entre la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  inyectado y el consecuente cambio en el potencial de la membrana postsináptica (Miledi, 1973). La inyección de  $\text{Ca}^{2+}$  por presión en el terminal logró producir una liberación de neurotransmisor aún mayor. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su relación con la liberación de neurotransmisor fue también evidenciada y establecida en la sinapsis gigante del calamar mediante el empleo de colorantes sensibles (dyes) a  $\text{Ca}^{2+}$  y también por medición de corrientes en condiciones de fijación de voltaje (Llinás y col. 1972, 1976, 1981). En estos últimos estudios se observó que el retardo sináptico de aproximadamente un milisegundo, es debido en gran medida a la apertura lenta de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes (800  $\mu\text{seg}$ ) y los 200  $\mu\text{seg}$ . restantes se deberían a la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  desde su sitio de entrada hasta su/s molécula/s receptora/s, al mecanismo de exocitosis, la difusión del neurotransmisor a través de la brecha y la apertura de los receptores postsinápticos.

De esta forma, quedó claramente establecido el rol del ion  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero en la liberación de neurotransmisor y la dependencia de la entrada del mismo con el potencial de membrana.

## SITIOS DE ENTRADA DEL $\text{Ca}^{2+}$ . MORFOLOGIA Y CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA

Para entender la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel molecular, es importante considerar la morfología de los terminales sinápticos. Las vesículas se encuentran agrupadas alrededor de lo que en la microscopía electrónica aparece como un cuerpo denso que esta sujeto a la cara interna de la membrana (Couteaux, 1970). Estas regiones fueron denominadas "zonas activas" debido al descubrimiento de deformaciones en la membrana, que podrían considerarse como la fusión de vesículas sinápticas. Estudios posteriores a los de Couteaux, demostraron la existencia de grandes partículas transmembranales a lo largo de las zonas activas (Heuser y col., 1974). La estructura de las zonas activas comprende un área de membrana citoplasmática especializada, un ensamblado particular de vesículas sinápticas agrupadas y elementos del citoesqueleto y además estructuras responsables del reciclaje local de la membrana de las vesículas (Smith y Augustine, 1988).

En los terminales motores de anfibios, se demostró que la exocitosis de neurotransmisor, normalmente tiene lugar a lo largo de la doble fila de las grandes partículas intramembranales que demarcan los extremos de las zonas activas (Heuser y col., 1974; Heuser y col., 1979). Más aún, mediante estudios combinados de electrofisiología y morfología, Ceccarelli y col. (1988) demostraron que los sitios de exocitosis en condiciones de estimulación de la liberación cuántica por alta concentración de  $\text{K}^+$  ext. están localizados inicialmente alrededor de las zonas activas. Frente a periodos prolongados de exposición a  $\text{K}^+$  aparecen fusiones ectópicas, a distancias más grandes de las zonas activas, posiblemente originados por un desplazamiento tiempo-dependiente de los sitios de exocitosis (Ceccarelli y col., 1988).

Las partículas intramembranales de las zonas activas tienen una densidad de  $1500/\mu\text{m}^2$  en el terminal gigante del calamar, valor que podría coincidir con el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarios para la liberación de neurotransmisor

(Pumplin y col. 1981). De hecho, tal como había sido postulado, se pudo establecer la co-localización del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  con las partículas transmembranales en estos terminales mediante el empleo del marcador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  FURA-2, que mostró que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las zonas activas es al menos diez veces mayor que en el resto de la presinápsis (Smith y col., 1988). Como se verá más adelante, la localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en las zonas activas ha sido demostrada más fehacientemente mediante el uso de toxinas específicas contra canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y también por evidencias a partir de experimentos de electrofisiología y técnicas colorimétricas.

Dado que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  difunde muy lentamente en el citoplasma (Hodgkin y col., 1957; Albritton y col., 1992), los cambios que ocurren en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  están frecuentemente restringidos a regiones relativamente pequeñas y altamente localizadas dentro de las células (Connor, 1986). Como una consecuencia de esta compartimentalización, es lógico suponer que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  precisan estar cerca de sus blancos fisiológicos, principalmente en fenómenos rápidos, cruciales y tan finamente regulados como lo es la transmisión sináptica.

Mediante el empleo de sustancias fluorescentes sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  se pudo establecer que la entrada de este ion está localizada en las zonas activas. En la actualidad las posibilidades de conocer cuáles son los sitios de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y de estimar la magnitud del cambio en concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intr.}}$  debido a la estimulación han mejorado considerablemente debido a las innovaciones en las técnicas de microscopía y también a la disponibilidad de colorantes con un mayor rango dinámico para registrar los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

En la sinapsis gigante del calamar se ha visto que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los sitios activos es de al menos dos órdenes de magnitud mayor que en el resto del citoplasma (Smith y col., 1993).

Mediante el empleo de un colorante sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  de muy baja afinidad, la n-aequorin-J, Llinás y col (1992) demostraron que los sitios de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  coinciden en número y en la localización con las zonas activas del terminal

presináptico, a la vez que estimaron que la  $[Ca^{2+}]_{intr.}$  durante periodos de actividad eléctrica llegaba a valores de entre 200-300  $\mu M$ .

Recientemente, se ha obtenido la aproximación más exacta de la dependencia de la liberación de neurotransmisor con la concentración de  $Ca^{2+}_{intr.}$  en los terminales sinápticos gigantes de las células bipolares de retina del teleosteo *Carassius auratus*. Empleando en combinación la técnica de patch-clamp con mediciones de  $Ca^{2+}$  con colorantes y medición de los cambios en la capacitancia de membrana por exocitosis, von Gersdorff y Matthews (1994) han demostrado que la concentración de  $Ca^{2+}$  necesaria para provocar la exocitosis a una velocidad compatible con la que ocurre fisiológicamente es localmente superior a los 50  $\mu M$ , mientras que concentraciones de  $Ca^{2+} = 1,4$  o 20  $\mu M$  son incapaces de producir liberación de neurotransmisor. En la misma preparación, utilizando compuestos de  $Ca^{2+}$  enjaulado, que lo liberan frente a un flash de luz ultravioleta, se demostró que si el  $[Ca^{2+}]_{intr.}$  sube a niveles por encima de 100  $\mu M$ , la probabilidad de liberación dentro de unos pocos microsegundos es muy alta, lo cual es una condición necesaria para la transmisión en las sinapsis de tipo rápidas, y para los tiempos conocidos del retardo sináptico (del rango de tiempo inferior al milisegundo) (Heidelberger y col., 1994).

Además, en la sinapsis gigante del calamar, se ha visto que la liberación de neurotransmisor es afectada diferencialmente por agentes quelantes de  $Ca^{2+}$  con diferentes velocidades de asociación. La falta de efecto del EGTA (un quelante lento), y la capacidad inhibitoria del BAPTA (un quelante rápido) sobre la liberación de neurotransmisor indicaría que la distancia entre los sitios activos y las moléculas blanco del  $Ca^{2+}$  que disparan la liberación de neurotransmisor es de unos pocos nanometros (Adler y col., 1991).

Otra línea de evidencia experimental que indica que la entrada de  $Ca^{2+}$  es a nivel de las zonas activas proviene de los estudios realizados con inmunoglobulinas de pacientes con el Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton (LEMS). El suero de pacientes con LEMS contiene anticuerpos que reconocen CCVD marcados con  $\omega$ -CgTx (un bloqueante específico de los CCVD de tipo N) iodinada (Sher y col., 1989) y también a la sinaptotagmina, una proteína de vesículas sinápticas que está asociada a los CCVD (Leveque y col., 1992). La inyección de inmunoglobulinas de

LEMS en ratones reproduce un modelo de LEMS experimental que se caracteriza por una disminución en la liberación de neurotransmisor (Lang y col., 1984) y por la desorganización de las zonas activas del terminal presináptico (Fukunaga y col., 1983). En función de estos resultados se ha postulado que las inmunoglobulinas de LEMS reconocen a los CCVD, los cuales estarían localizados en las zonas activas de los terminales motores en humanos y dicha interacción produce la disfunción en la transmisión neuromuscular característica de LEMS.

Dos líneas que aportaron fuertes evidencias de la localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en las zonas activas provienen de los estudios realizados por Roberts y col. (1991) en las células receptoras sensoriales del oído interno, las "hair cells" y de los estudios con toxinas marcadas en la placa neuromuscular de anfibios.

Las "hair cells" reciben y hacen sinapsis de tipo químico con otras neuronas. Los estudios de microscopía electrónica en cortes seriados de estas células determinaron la existencia de  $18,6 \pm 2.3$  zonas activas por célula. Estos sitios están localizados a lo largo de la superficie baso-lateral de la célula. El registro extracelular focal con la técnica de "loose patch-clamp" mostró que en estas células los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran agrupados en una relación fija, en un promedio de 20 agregados ("clusters") por superficie de membrana basolateral. Estos resultados en forma conjunta indicarían que esos agregados de canales coinciden con las zonas activas. Además fue determinado que cada célula contiene 1800 canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y 700 canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , que si están distribuidos uniformemente cada agregado tendría 90 y 40, canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. Mediante microscopía electrónica por criofractura se demostró la presencia de un promedio de 133 grandes partículas transmembranales en cada zona activa, lo cual hace suponer que las mismas son los agregados de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Roberts y col., 1990; 1991). Los mismos autores utilizaron a los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  para estimar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se alcanza en las zonas activas y obtuvieron que la misma estaría en un rango de 10  $\mu\text{M}$  a 1 mM.



En la placa neuromuscular de la rana empleando doble marcación con un derivado biotinilado (que le confiere propiedades fluorescentes) de la  $\omega$ -CgTx y  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BugTx) fluorescente se comprobó que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran agrupados en las zonas activas y que están enfrentados a los receptores nicotínicos postsinápticos (Robitaille y col., 1990). Por evidencias electrofisiológicas se pudo establecer que la actividad de los CCVD en estos terminales se encuentran modulados por canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Robitaille y col., 1992). En la misma preparación se observó por experimentos de doble marcación con un derivado biotinilado de la Caribdotoxina (ChTx)(bloqueante de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ ) y  $\alpha$ -BugTx marcada, que ambas toxinas dan un patrón de bandas similares y que el sitio de "binding" de la ChTx es presináptico. Como refuerzo de esto, evidencias electrofisiológicas empleando en forma conjunta ChTx y quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  con distintas velocidades de asociación, indican que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran cercanamente asociados en las zonas activas (Robitaille y col., 1993).

Tanto en las células ciliares "hair cell" como en los terminales de anfibios esta asociación estrecha entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  permitiría controlar la cantidad de neurotransmisor que se libera por estímulo nervioso, siendo los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  en parte los responsables de la repolarización del terminal y por ende de la disminución de la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$ , que gatilla la liberación del neurotransmisor.

## **CORRIENTES DE Ca<sup>2+</sup>**

Hacia la década del '50 se registraron, identificaron y caracterizaron las primeras corrientes de Ca<sup>2+</sup> en preparaciones de músculo de artrópodos (Hille, 1984). Desde ese entonces se encontró evidencia de corrientes llevadas por este ion en diversos tipos celulares.

Durante la década pasada, mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana ("Patch-clamp"), se han caracterizado según criterios biofísicos y farmacológicos, diferentes canales de calcio dependientes de voltaje en células de tejidos excitables y no excitables. Más recientemente, la caracterización electrofisiológica empleada en forma conjunta con técnicas de biología molecular (clonado, secuenciación y expresión en sistemas biológicos), produjo una verdadera revolución en el conocimiento acerca de los CCVD.

## **DIVERSIDAD DE CANALES DE CALCIO VOLTAJE DEPENDIENTES**

La existencia de distintos tipos de CCVD fue en un principio establecida a través de estudios de la cinética de las corrientes (macroscópicas y de canal único), luego por distinciones farmacológicas y más tarde confirmada y ampliada por la clonación molecular.

Mediante experimentos de fijación de voltaje en diversas células no neuronales, tales como las de la línea tumoral de pituitaria GH3, células de corazón y huevos de invertebrados, se comprobó la coexistencia de múltiples corrientes de Ca<sup>2+</sup> (Tsien y col., 1988). En neuronas de sistema nervioso central de mamíferos, Llinás y Yarom en 1981 señalaron claramente la coexistencia de al menos dos clases de canales de Ca<sup>2+</sup>, unos de bajo umbral, LVA- low voltage activated- y otros de alto umbral, HVA- high voltage activated-. Hacia 1984, Carbone y Lux demostraron

la existencia de estas clases de corrientes en neuronas del ganglio de la raíz dorsal del pollo (DRG).

Las corrientes de tipo LVA son activadas por pequeñas despolarizaciones desde potenciales negativos (-90 a -80 mV) y decaen rápidamente luego de su activación. Mediante registros de canal único en las neuronas DRG fue posible confirmar la distinción entre los canales de clase LVA y HVA (Carbone y Lux, 1984, Nowicky y col., 1985).

Los canales de bajo umbral son conocidos como canales de tipo "T" debido a su activación transitoria. Los canales de tipo HVA requieren fuertes despolarizaciones para activarse, se activan desde potenciales de mantenimiento relativamente despolarizados y su inactivación es lenta. La clasificación de los canales se basa en varios criterios, que incluyen el voltaje de activación, la inactivación, la conductancia, la selectividad iónica y la sensibilidad farmacológica. Dentro de los canales activados por alto umbral fueron en principio descritos dos tipos de canales diferentes, llamados de tipo "L" y de tipo "N". Los canales de tipo "L" (por "long lasting") se inactivan muy lentamente y son sensibles a las dihidropiridinas (DHP). Dentro de las DHP existen agonistas y antagonistas, que pueden actuar bloqueando al canal (i.e. nitrendipina, nifendipina) o promoviendo un modo de apertura diferente, como el BayK 8644, que aumenta la aparición de aperturas de tiempos largos (Hess y col. 1984). Los canales de tipo "N" (llamados así en principio por ser "ni L ni T") son resistentes a las DHP pero son potentemente bloqueados por una toxina peptídica, la  $\omega$ -CgTx, purificada a partir del veneno de un caracol marino. Dos nuevas clases de canales de tipo HVA muy relacionados entre si han sido más recientemente descritos, los de tipo "P", inicialmente descritos en las neuronas de Purkinje (Llinás y col., 1989; Mintz y col., 1992) y los de tipo "Q", en las células grano del cerebelo (Randall y col. 1993). Los canales de tipo "P" son resistentes al bloqueo por DHP y  $\omega$ -CgTx, pero son bloqueados por dos toxinas extraídas del veneno de arañas americanas, una poliamina de bajo peso molecular, la FTX y por bajas concentraciones del rango nanomolar de un péptido, la  $\omega$ -Aga-IVA. Los canales de tipo "Q" difieren en que

tienen una sensibilidad menor a la  $\omega$ -Aga-IVA y son también bloqueados por la  $\omega$ -CTx-MVIIC.

La siguiente tabla resume las características biofísicas y farmacológicas de

**TABLA 1 Tipos de canales de  $Ca^{2+}$  neuronales**

	LVA T	HVA N	HVA L	HVA P y (Q <sup>1</sup> )
Activación a <sup>2</sup>	-70 mV	-20 mV	0 mV	-15 mV
Rango inactivación (mV)	-100 a -60	-120 a -30	-60 a -10	no tiene
Inactivación (decaimiento) <sup>3</sup>	t » 20-50 ms	t » 50-80 ms	t > 500 ms	no tiene
Conductancia canal único <sup>4</sup>	8 pS	13 pS	25 pS	9-14-19 pS (?)
Conductancia relativa	Ba <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>
Bloqueo por Cadmio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible
Bloqueo por	Amiloride	$\omega$ -CgTx-GVIA <sup>5</sup>	DHP	FTX <sup>6</sup> $\omega$ -AGA-IVA <sup>7</sup> ( $\omega$ -AGA-IVA y $\omega$ -CTx-MVIIC <sup>8</sup> )

los canales identificados en preparaciones "in situ".

Una neurona puede tener estos cuatro tipos de canales y también de tipo T, mientras que las células musculares sólo tienen de tipo "L" y ocasionalmente pueden tener de tipo "T". De todas formas, el empleo combinado de todos los agentes selectivos para los CCVD conocidos, en algunas neuronas no logra bloquear toda la

<sup>1</sup> Las características de canal único no se conocen, pero se asocia al producto de la expresión del gen de cerebro del clon  $\alpha 1A$ .

<sup>2</sup> En 110 mM Ba<sup>2+</sup>

<sup>3</sup> A 0 mV, 10 mM extracelular Ca<sup>2+</sup> o Ba<sup>2+</sup> (21 C)

<sup>4</sup> Conductancia Máxima en 110 mM Ba<sup>2+</sup> (21 C)

<sup>5</sup>  $\omega$ -CgTx GVIA de *Conus geographus*

<sup>6</sup> Funnel web Spider Toxin de *Agelenopsis aperta*

<sup>7</sup>  $\omega$ -Agatoxin IVA de *Agelenopsis aperta*

<sup>8</sup> El canal Q es completamente bloqueado por  $\omega$ -Aga-IVA a concentraciones de 1  $\mu$ M y por  $\omega$ -CTx-MVIIC = 1,5  $\mu$ M.

corriente de calcio, lo cual indica que existirían otros tipos de canales aun no identificados (Regan y col., 1991; Mintz y col, 1992).

En la siguiente tabla se muestran a modo de ejemplo de la diversidad, las proporciones de los componentes farmacológicos de las corrientes de  $Ca^{2+}$  de alto umbral en diferentes preparaciones.

COMPONENTES FARMACOLÓGICOS DE LAS CORRIENTES DE $Ca^{2+}$ DE ALTO UMBRAL.				
	Porcentaje de Corriente inhibida sobre el control			Remanente
	$\omega$ -Aga-IVA	$\omega$ -Conotoxin GVIA	Nitrendipina o Nimodipina	
Purkinje	92 ± 2	5 ± 1	5 ± 2	0
Hipocampo CA1	26 ± 4	37 ± 3	19 ± 3	Presente
Hipocampo CA3	14 ± 4	21 ± 2	36 ± 6	26 ± 6
Cortex visual	32 ± 4	32 ± 7	23 ± 6	Presente
Medula espinal	45 ± 6	34 ± 3	18 ± 5	Presente
Ganglio de la raíz dorsal	23 ± 4	43 ± 3	18 ± 2	18 ± 4
Ganglio simpático	0	93 ± 4	7 ± 4	2 ± 2

Tabla de Mintz y col (1992). Fracciones de corrientes de alto umbral, llevadas por canales de  $Ca^{2+}$  definidos en base a las propiedades farmacológicas, en diferentes tipos de neuronas.  $\omega$ -Aga-IVA (100-200 nM),  $\omega$ -CgTx GVIA (3-5  $\mu$ M) y DHP (2-5  $\mu$ M).

Por otro lado, otros estudios que aportaron fuertes evidencias sobre la diversidad de los tipos de CCVD son los provenientes del empleo de las técnicas de la biología molecular. El clonado de los canales, permitió a su vez conocer la estructura de los mismos. La purificación del canal de calcio de tipo "L" fue posible debido a la existencia de antagonistas de  $Ca^{2+}$  marcados de alta afinidad y al descubrimiento de que las membranas de los túbulos transversos de músculo esquelético son una fuente muy rica en este tipo de canales. Los estudios de muchos grupos pudieron establecer que estos canales constan de 5 subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). La principal subunidad de estas proteínas oligoméricas es la  $\alpha 1$ , que contiene al poro y al sensor de voltaje. Esta subunidad fue clonada por Tanabe y col. (1987), tiene aproximadamente 2000 aminoácidos y su estructura general es la misma que la de los canales de  $Na^+$  voltaje dependientes, es decir que contiene cuatro dominios, llamados "repeticiones", que son internamente homólogos entre sí

(Tsien y col., 1993). En cada uno de estos cuatro dominios se han predicho, por análisis de hidropatía, la presencia de seis segmentos transmembranales, el cuarto (S4) esta altamente cargado y actuaría como el sensor del campo eléctrico de membrana, mientras que el "loop" entre S5 y S6 formaría parte del poro del canal (Catteral, 1991). La subunidad  $\alpha 1$  sola reconstituida en bicapas lipídicas se comporta como un canal de  $Ca^{2+}$ , pero la expresión en oocitos de *Xenopus* de  $\alpha 1$  sola produce pocos canales funcionales, mientras que cuando es co-inyectada con otra subunidad (por ejemplo con la  $\beta$ ) las corrientes aumentan muy considerablemente. El clonado molecular de los canales de  $Ca^{2+}$  ha revelado un gran número de subunidades  $\alpha 1$ , que en una primera aproximación, están de acuerdo con las categorías establecidas por los estudios farmacológicos, biofísicos y funcionales (Snutch y col.). Por otro lado, también se ha visto que otros clones no se corresponden con las categorías ya mencionadas (Ellinor y col., 1993).

Las fuentes primarias para la clonación de estos genes han sido el músculo esquelético y el cardíaco, y cerebro de distintos animales. Los productos de estos genes si bien se pueden homologar por sus características a CCVD conocidos, no es posible definir totalmente para que tipos de canales purifican dichos genes. Esto se debe a que para su estudio no se co-expresan con todo el resto de las subunidades que forman parte del canal y recientemente se han reportado cambios en la cinética de apertura y cierre en las corrientes de  $Ca^{2+}$  por expresión  $\alpha 1$  con distintas subunidades  $\beta$  (Singer y col., 1991; Neely y col., 1993). Asimismo, estas proteínas expresadas en oocitos de *Xenopus*, muy posiblemente, no están glicosiladas y carecen de otros tipos de modificaciones postraduccionales que tendrían en las células de origen, lo cual hace que los datos provenientes de la expresión en dichas células no sean totalmente analogables al producto del mismo gen cuando se expresa en su célula de origen.

En la siguiente tabla se pueden observar las familias de subunidades  $\alpha 1$  de mamíferos que han sido clonadas y caracterizadas hasta el momento.

Relación Evolutiva	Nomenclatura	Nomenclatura	Sensibilidad a	Tejido	Refs.
	Sk/-/1	L	DHP	Músculo	9,10
	C/C/2	L	DHP	Cardíaco	11,12
	-/D/3	L	DHP	Cerebro	13
	BII/E/-(doe1)	T	Ni <sup>2+</sup>	Cerebro	14
	BI/A/4(doe 4)	P?	$\omega$ -Aga-IVA, FTX	Cerebro	15 <sup>7</sup> ,16
	BIII/B/5	N	$\omega$ -CgTx-GVIA	Cerebro	17,18

Tabla de McCleskey (1994). Los números en el árbol evolutivo indican el porcentaje de identidad en los aminoácidos de clones de  $\alpha 1$  de conejos, tal como lo reportado por Fujita y col.(1993). Las tres nomenclaturas diferentes separadas por la barra oblicua provienen respectivamente de los laboratorios de Numa, Snutch y Birnbaumer. Entre paréntesis se encuentran los nombres homólogos de las secuencias obtenidas en rayas marinas. Esta caracterización es tentativa, ya que, por ejemplo, los clones de clase A muestran menos sensibilidad a la  $\omega$ -Aga-IVA que la esperada para canales de tipo P.

<sup>9</sup> Tanabe y col., 1988.

<sup>10</sup> Tanabe y col., 1987.

<sup>11</sup> Mikami y col., 1989.

<sup>12</sup> Snutch y col., 1991.

<sup>13</sup> Williams y col., 1992-a.

<sup>14</sup> Soong y col., 1993.

<sup>15</sup> Mori y col., 1991.

<sup>16</sup> Sather y col., 1993.

<sup>17</sup> Dubel y col., 1992.

<sup>18</sup> Williams y col., 1992-b.

## USO DE TOXINAS COMO HERRAMIENTAS METODOLOGICAS PARA LA IDENTIFICACION DE CANALES

Desde hace más de tres décadas se conoce la utilidad de las toxinas como herramientas para identificar diferentes componentes de las corrientes voltaje dependientes en células excitables. Uno de los primeros ejemplos fue el uso de la tetrodotoxina (TTX), proveniente del pez "Fugu", para disecar las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del axon gigante del calamar. El hecho de contar con una toxina específica y de alta afinidad como la TTX permitió estudiar tanto el rol fisiológico del blanco de acción de dicha toxina, así como también estimar la densidad de canales en membranas de neuronas y purificar las proteínas canal para luego estudiar su estructura por métodos de secuenciación.

Muchos venenos de animales (tanto marinos como terrestres) ejercen sus efectos tóxicos interfiriendo con procesos fisiológicos claves para la sobrevivencia de su presa. A partir de la purificación de los componentes químicos presentes en estos venenos, se encontraron diferentes componentes con capacidad de bloquear específicamente distintos tipos de canales, tanto ligando como voltaje dependientes. Se han encontrado en un mismo veneno distintos compuestos que se comportarían como un verdadero arsenal químico, ya que tienen como blanco de su acción distintos componentes de un mismo proceso fisiológico (Olivera y col., 1985). Por lo tanto, la obtención de toxinas selectivas se volvió un verdadero desafío para los bioquímicos, dada la utilidad de las neurotoxinas para el diseño de fármacos, insecticidas así también para su uso como herramienta de diagnóstico. Las estructuras químicas de las toxinas son diversas y aquí la revisión se centrará sobre las de origen peptídico que actúan sobre los CCVD y otro grupo cuya estructura son compuestos derivados de poliaminas.

El grupo de toxinas peptídicas obtenidas a partir de venenos animales cuyo blanco de acción y sitio de unión son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes (CCVD) se conocen como las  $\omega$ -toxinas. Este grupo está principalmente formado



por fracciones peptídicas obtenidas del veneno de arañas americanas de la especie *Agelenopsis aperta* y de caracoles marinos del género *Comus*. Debido a su procedencia, las toxinas del primer grupo fueron llamadas  $\omega$ -agatoxinas mientras que las del segundo  $\omega$ -conotoxinas.

#### *TOXINAS DERIVADAS DEL VENENO DE ARAÑAS.*

Las arañas privan de la capacidad de moverse a sus presas mediante la inyección de un veneno que contiene varios tipos de toxinas específicas para canales iónicos. El veneno de las *Agelenopsis aperta* contiene compuestos que afectan canales iónicos localizados en la pre y en la postsinápsis de la placa neuromuscular de insectos. Se han descrito en este veneno tres tipos de toxinas: antagonistas de receptores postsinápticos sensibles a glutamato ( $\alpha$ -agatoxinas), activadores de canales de  $\text{Na}^+$  presinápticos ( $\mu$ -agatoxinas) y antagonistas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos. Dentro de estos últimos, se han descrito compuestos con distintas estructuras moleculares: una poliamina de bajo peso molecular, la funnel-web spider toxin (FTX) y varios polipéptidos, las  $\omega$ -agatoxinas. Las  $\alpha$ -agatoxinas son arilaminas y las  $\mu$ -agatoxinas son polipéptidos. En el veneno de diversos invertebrados se han encontrado muchas otras poliaminas cuyo blanco son receptores de tipo glutamatérgicos (revisado por Scott y col., 1993).

Existen distintos tipos de  $\omega$ -agatoxinas, todas ellas poseen una acción inhibitoria en la transmisión neuromuscular en insectos, por un efecto bloqueante a nivel de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al terminal sináptico, pero con diferentes propiedades como antagonistas del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en otras preparaciones biológicas. Así, por ejemplo se ha visto que las  $\omega$ -agatoxinas IA, IB y IIA bloquean la transmisión neuromuscular en insectos, pero difieren en su capacidad de desplazamiento del "binding" de  $\omega$ -CgTx iodada en sinaptosomas de pollo, siendo las de tipo I inefectivas y la de tipo IIA capaz de desplazar a la  $\omega$ -CgTx y de inhibir la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por estimulación con  $\text{K}^+$  en dicha preparación. En la siguiente tabla se

muestran los distintos tipos de  $\omega$ -agatoxinas y sus efectos en distintos mecanismos fisiológicos.

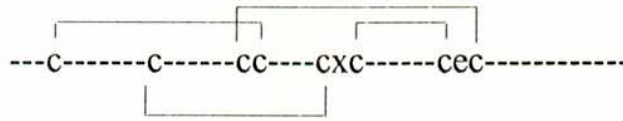
#### Acción de las diferentes $\omega$ -Agatoxinas en distintos bioensayos

$\omega$ -Agatoxina	Inhibición de :		
	Transmisión neuromuscular en insectos	Unión a $\omega$ -Conotoxina GVIA	Flujo de $^{45}\text{Ca}$ en sinaptosomas de cerebro
IA	+	-	-
IIA	+	+	+/-
IIIA	-	+	+/-
IVA	-	-	+/-

Para la purificación de las distintas  $\omega$ -agatoxinas se utilizaron ensayos biológicos como el desplazamiento del binding de  $\omega$ -CgTx y captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por sinaptosomas de aves y mamíferos. Mediante el empleo de esta última técnica fue posible aislar la fracción IVA, que se encontró como la única capaz de bloquear la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en sinaptosomas de rata y que no tiene efecto en otros ensayos sensibles a toxinas selectivas para otros canales previamente caracterizados. La  $\omega$ -Aga-IVA fue luego caracterizada como un bloqueante selectivo de las corrientes de tipo P, ya que bloqueó las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  insensibles a  $\omega$ -CgTx y a DHP en neuronas de Purkinje del cerebelo. La  $\omega$ -Aga-IVA es un polipéptido de 48 aminoácidos, el de menor longitud dentro de la familia de las  $\omega$ -agatoxinas. La secuencia de aminoácidos de  $\omega$ -Aga-IVA es la siguiente:

KKKCI AKDYGRCKWGGTPCCRGRGCICSIMGTNCECKPRLIMEGLGLA

Todas las  $\omega$ -Agatoxinas han sido sintetizadas químicamente como péptidos con actividad biológica y la configuración de uniones por puentes disulfuro para la  $\omega$ -Aga-IVA ha sido determinada, de lo cual se obtuvo que tiene la siguiente estructura:

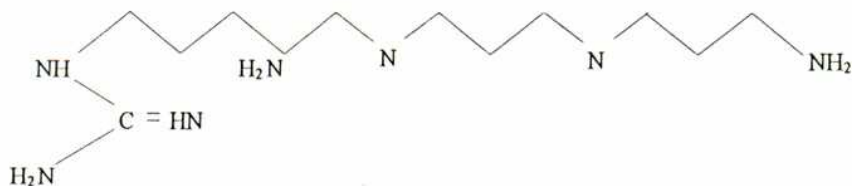


La poliamina FTX fue la primera toxina aislada del veneno de *Agelenopsis aperta* que se observó que tenía efectos bloqueantes sobre conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  insensibles a bloqueantes de canales de tipo L y N. Llinás y col. (1989) reportaron que la FTX bloquea la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal de la sinapsis gigante del calamar y en neuronas de Purkinje del cerebelo. La disponibilidad de un análogo sintético de esta poliamina con similar capacidad bloqueante de dichas corrientes, permitió la construcción de geles de afinidad que fueron utilizados para la purificación de proteínas de membrana de cerebro de mamíferos y de calamar. Mediante estos procedimientos fue aislada una proteína de un peso molecular entre 90.000 y 100.000 Da que presentó una actividad de canal similar a la de los  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P al ser incorporada a bicapas lipídicas (Llinás y col., 1989; Cherksey y col., 1991). La proteína así purificada fue inoculada en conejos para inducir la expresión de anticuerpos policlonales, los cuales en análisis de Western Blot reaccionaron con la proteína purificada y fueron utilizados para la localización de canales en el sistema nervioso central de mamíferos. El anticuerpo dio reacción positiva en áreas discretas, tales como el hipocampo, el neocortex, la corteza entorrinal, el bulbo olfatorio, el tálamo, el núcleo de la oliva inferior y en las dendritas y terminales axónicos de las células de Purkinje (Hillman y col. 1991).

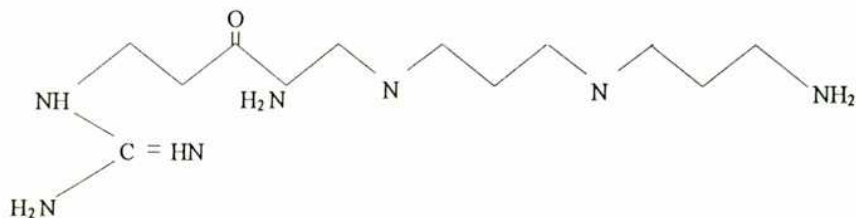
La estructura molecular de este compuesto ha sido estudiada por espectrofotometría de masa y “bombardeo atómico rápido” (FAB), a partir de lo cual se concluyó que es una poliamina de bajo peso molecular. A continuación se muestra la estructura putativa de la FTX natural obtenida de *Agelenopsis aperta* (estructura superior). La estructura de la FTX no ha podido ser determinada con exactitud, sin embargo sobre la base de la estructura putativa se han sintetizado productos similares en estructura. La que se muestra en la parte inferior es el análogo sintético sFTX (3:3), la poliamina sintética más similar en su estructura a la

natural, y que tiene efectos bloqueantes sobre los CCVD de tipo P, aún cuando difiere en un carbonilo oxígeno que no se le ha podido quitar en el proceso de síntesis. La sFTX es un aducto sintetizado a partir de espermidina y arginina.

FTX



sFXT



#### TOXINAS DERIVADAS DEL VENENO DE CARACOLESMARINOS.

Las  $\omega$ -conotoxinas son producidas por caracoles marinos predadores, que producen un conjunto de polipéptidos pequeños ricos en puentes disulfuro, cuyo blanco son los CCVD. Se han purificado distintas  $\omega$ -conotoxinas a partir del veneno de diferentes especies del género *Conus* ( $\omega$ -CgTx-GVIA y MVIIA) y aun del veneno de una única especie. La  $\omega$ -CgTx-GVIA es la de uso más difundido como bloqueante selectivo de los CCVD de tipo N. Otra metodología introducida más recientemente para la secuenciación y síntesis de  $\omega$ -conotoxinas ha sido empleando herramientas de la clonación molecular. Utilizando sondas con secuencias homólogas ya sea del péptido maduro como del precursor o de regiones conservadas no traducidas, ha sido posible identificar clones que codifican para  $\omega$ -conotoxinas a partir de una biblioteca genómica de cDNA del conducto de veneno. De esta forma algunas de las  $\omega$ -conotoxinas nunca han sido purificadas a partir del veneno y sus estructuras primarias fueron deducidas a partir de las secuencias del

cDNA ( $\omega$ -CTx-MVIIC y MVIID). En la siguiente tabla se pueden observar las distintas  $\omega$ -conotoxinas obtenidas por purificación y por clonación molecular.

<i>Conus geograus</i>	GVIA	CKSOGSSCSOTSYNCCR-SCNOYTKRCY*
	GVIIA	CKSOGTOCSRGMRDCCCT-SCLLYSNKCRRY*
<i>Conus magus</i>	MVIIA	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSC--RSGKC*
	MVIIB	CKGKGASCHRYSYDCCTGSC--NRGKC*
	MVIIC	CKGKGAPCRKTMVDCCSGSC-GRRGKC*
	MVIID	CQGRGASCRKTMYNCCSGSC--NRGRC*
<i>Conus striatus</i>	SVIA	CRSSGSOCGVTSI-CC-GRC--YRGKCT*
	SVIB	CKLKGQSCRKTSYDCCSGSC-GRSGKC*

Como puede verse en la tabla, las secuencias tienen una gran variación interespecies. Las  $\omega$ -conotoxinas de dos diferentes venenos pueden tener menos de 30% de identidad de secuencia (excluyendo los residuos Cis). Se ha visto en muchos casos que secuencias altamente divergentes de dos venenos de distintos *Conus*, las  $\omega$ -conotoxinas compiten en el "binding" por el mismo canal de  $Ca^{2+}$ . Tal es el caso de la  $\omega$ -CgTx GVIA y la MVIIA que comparten solo el 27% de los aminoácidos y compiten por el "binding" en la gran mayoría de los sitios de alta afinidad en el sistema nervioso central e incluso tienen similares efectos inhibitorios sobre los CCVD presinápticos de la placa neuromuscular de los peces.

La configuración estructural por uniones de puentes disulfuro mantiene la misma relación de 4 "loops" que las descritas para las  $\omega$ -Agatoxinas,

El conocimiento de las secuencias de estas distintas toxinas, hizo posible la síntesis química de péptidos. La disponibilidad de los péptidos sintéticos permitió la derivatización de las toxinas para distintos propósitos. Se han utilizado  $\omega$ -conotoxinas iodadas en Tirosina en estudios para ensayos de "binding", utilizada en ensayos autorradiográficos para investigar la localización de los subtipos de los CCVD así como también en estudios de "cross-linking" fotoactivable y químico para

identificar los blancos bioquímicos de estos péptidos(Cruz y col., 1987; Marqueze y col. 1988; Robitaille y col., 1990).

## TIPOS DE CANALES DE $\text{Ca}^{2+}$ Y TRANSMISION SINAPTICA

El conocimiento de la existencia de los distintos tipos de CCVD llevó a cuestionarse acerca de la función específica de cada uno de ellos y si alguno de ellos en particular era el responsable de la transmisión sináptica.

En este aspecto, la preparación de la placa neuromuscular de la rana tuvo nuevamente una gran trascendencia histórica. En el año 1984, Kerr y Yoshikami mostraron que la transmisión neuromuscular en los anfibios es bloqueada por la toxina peptídica  $\omega$ -CgTx, la cual ejercía su efecto a nivel de la presinápsis, más precisamente bloqueando el influjo del ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Los mismos resultados fueron reproducidos con éxito con el péptido sintético  $\omega$ -CgTx (Sano y col., 1987; Koyano y col., 1987). Los mismos autores reportaron la falta de efecto de  $\omega$ -CgTx en la transmisión neuromuscular de los mamíferos.

La transmisión neuromuscular en los mamíferos, en condiciones experimentales normales, es insensible a las DHP y a la  $\omega$ -CgTx. No obstante, se han reportado efectos antagónicos parciales de DHP y de  $\omega$ -CgTx en condiciones de aumento de la actividad sináptica por distintas sustancias químicas.

Se ha probado la efectividad en la disminución del contenido cuántico por algunas DHP antagonistas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L en condiciones de previa estimulación por el agonista BayK 8644 (DHP). Sin embargo, estos efectos han sido reportados en preparaciones de músculo cortado, no viéndose el mismo efecto cuando se evita la contracción empleando curare (Atchinson, 1989). El agonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo "L" también mostró aumentar la frecuencia de los potenciales de placa miniatura, pero este incremento no fue revertido por antagonistas DHP y fue observado aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Atchinson, 1989; Pancrazio y col. 1989). Esto último indicaría que el incremento producido por el Bay K 8644 en la frecuencia de potenciales miniatura sería debido a una movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares y no por un efecto al nivel de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio externo (Atchinson, 1989; Pancrazio y col. 1989).

Por otro lado, en mamíferos la  $\omega$ -CgTx no tiene efecto, en condiciones normales, sobre la liberación por estimulación eléctrica de [ $^3$ H] Ach. desde los terminales motores nerviosos. La  $\omega$ -CgTx no produce ningún efecto, aún a concentraciones superiores a las efectivas en otras preparaciones, ni en presencia de distintas frecuencias de estimulación (1, 3 y 10 Hz.) (Wessler y col., 1990,a). Sin embargo, la  $\omega$ -CgTx tendría un efecto inhibitorio sobre la acción facilitadora de algunos agonistas de los receptores  $\beta$ 1 sobre la liberación de [ $^3$ H]Ach. A su vez, la nifendipina inhibe el incremento de la liberación de [ $^3$ H]Ach producido por agonistas de receptores  $\alpha$ 1 (Wessler y col., 1990,b).

También se ha reportado un efecto de la  $\omega$ -CgTx sobre la transmisión sináptica en mamíferos en condiciones experimentales de bajo  $Ca^{2+}$  extracelular y tiempos de exposición prolongados a la toxina. Wessler y col. (1990,a) reportaron que la incubación con  $\omega$ -CgTx durante 45 minutos en  $[Ca^{2+}]_{ext.} = 0,9$  mM reduce un 47 % la liberación de [ $^3$ H]Ach, mientras que en esas condiciones la nifendipina no mostró tener efecto alguno.

Analizando en conjunto la información sobre la farmacología de la placa neuromuscular de anfibios y mamíferos, es posible apreciar que en condiciones normales, la liberación de neurotransmisor en los anfibios es mediada por CCVD de tipo N, mientras que en los mamíferos los mediadores del flujo de  $Ca^{2+}$  no serían ni de tipo N ni L. De esta forma quedó claramente establecida la no homogeneidad funcional de los canales de  $Ca^{2+}$ .

En la sinapsis colinérgica del ganglio bucal de *Aplysia californica* se ha visto que la liberación de neurotransmisor y las corrientes de  $Ca^{2+}$  del soma neuronal son sensibles a las toxinas FTX y  $\omega$ -CgTx. En estas neuronas si bien existe un componente de la corriente de  $Ca^{2+}$  de alto umbral sensible a las DHP, la liberación de neurotransmisor no es afectada por la nifendipina. La FTX no interfiere con la  $\omega$ -CgTx en el bloqueo de las corrientes ni de la liberación, y tampoco hay interferencia de la  $\omega$ -CgTx sobre los componentes sensibles a FTX. Por otro lado se ha observado que existe un remanente de corriente de  $Ca^{2+}$  de alto umbral y una



fracción de la liberación de neurotransmisor que no es sensible a ninguno de los bloqueantes conocidos de CCVD (Fossier y col., 1994).

En los últimos años ha habido un gran auge en el área de estudio de los CCVD que median la transmisión sináptica en el sistema nervioso central. La información obtenida por numerosos grupos de estudio señala que en distintas estructuras del SNC pueden ser diferentes los tipos de CCVD mediadores del flujo de  $Ca^{2+}$  y que los mismos pueden coexistir en un mismo terminal sináptico. La coexistencia de distintos tipos de canales de  $Ca^{2+}$  en una neurona había sido previamente reportada por estudios de corrientes en somas neuronales.

La medición de las corrientes responsables de la liberación de neurotransmisor presenta una gran problema, que es el difícil acceso al terminal sináptico y el pequeño tamaño del mismo. Una excepción dentro del sistema nervioso central son los terminales gigantes de la neurohipófisis que liberan péptidos. En los mismos es posible medir las corrientes de  $Ca^{2+}$ , así como también los cambios en la capacidad de membrana debido al incremento del área de membrana asociado a la exocitosis de las vesículas sinápticas. Lemos y Nowicky (1989) reportaron que en estos terminales sinápticos existen CCVD de tipo "L" y "N" y que ambos podrían mediar la transmisión sináptica.

Una preparación en la que se ha logrado una excelente caracterización de los CCVD responsables de la liberación de neurotransmisor es el ganglio ciliar del pollo. Mediante métodos colorimétricos y electrofisiológicos, se determinó que los CCVD asociados a la liberación de neurotransmisor en estas sinapsis son de tipo "N" (Yawo y col., 1993; Stanley, 1991). En esta misma preparación, Stanley (1993) logró registrar la actividad unitaria de canales de  $Ca^{2+}$  y observó que dicha actividad estaba asociada a eventos únicos de actividad exocitótica (liberación del neurotransmisor Ach.).

En el sistema nervioso central, otra forma de estudiar por medios electrofisiológicos la identidad de los CCVD relacionados con la liberación, dada la dificultad de registrar directamente las corrientes en terminales, es mediante registros de potenciales de campo, o bien de potenciales o corrientes postsinápticas.

Takahashi y col. (1993) vieron que en la transmisión sináptica en tres áreas diferentes del SNC, están involucrados en mayor o menor grado (dependiendo de las distintas estructuras) CCVD sensibles a  $\omega$ -CgTx y a  $\omega$ -Aga-IVA. La  $\omega$ -Aga-IVA tiene una dosis inhibitoria al 50 % sobre la transmisión sináptica de 10 nM. Dada la sensibilidad de los procesos de secreción de neurotransmisor por estas dos toxinas, se planteó que los CCVD en esos terminales sinápticos serían de tipo "N" y "P", respectivamente. A su vez, no observaron fenómenos sinápticos sensibles a las DHP, es decir mediados por canales de tipo "L". También se ha visto que en las sinapsis de hipocampo entre, las neuronas del área CA3 y CA1, que los responsables de la transmisión sináptica son los CCVD de tipo "N" y "Q", con distinto grado de compromiso de estos canales en la liberación, según las condiciones fisiológicas y estando los mismos sujetos a modulación en forma diferencial por neurotransmisores (Wheeler y col., 1994). Asimismo, en estos dos últimos estudios, se observó que si bien pueden existir distintos tipos de CCVD relacionados con la liberación en un terminal, los mismos están presentes en distintas proporciones o bien se encuentran acoplados con distinta eficacia a la maquinaria que controla la exocitosis de las vesículas sinápticas. No obstante, actualmente se está realizando una revisión sobre la asociación de los fenómenos de liberación sensibles a  $\omega$ -Aga-IVA con la presencia de CCVD de tipo P (ver pagina 29 y discusión).

La aproximación por métodos bioquímicos y colorimétricos, confirmó también la heterogeneidad de CCVD en los terminales sinápticos en distintas estructuras y de distintas especies del reino animal.

Se ha reportado que el péptido  $\omega$ -CgTx inhibe casi completamente la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  estimulada por alto  $\text{K}^+$  en sinaptosomas de aves. Asimismo, se ha visto que la FTX inhibe un  $36 \pm 6 \%$  la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en sinaptosomas de aves, mientras que la  $\omega$ -Aga-IVA solo bloquea el  $10 \pm 4 \%$  a 100 nM y un  $43 \pm 5$  a 5  $\mu\text{M}$  (Mintz y col., 1992, Alvarez y col., 1994).

En sinaptosomas de sistema nervioso central de mamíferos, la toxina  $\omega$ -Aga-IVA tiene un efecto bloqueante muy potente en la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ( $85 \pm 3 \%$  a una concentración de 3  $\mu\text{M}$ ). En esa misma preparación la FTX también bloquea

casi la totalidad del flujo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  estimulado por  $\text{K}^+$  ( $90 \pm 10 \%$ ), pero el bloqueante de los CCVD de tipo N, casi no afecta el influjo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en los terminales del SNC de mamíferos (Uchitel y col., 1992, Alvarez y col., 1994). Estos resultados, tomados en conjunto, indicarían una preponderancia de CCVD de tipo P en los terminales sinápticos de mamíferos, mientras que en los de aves habría mayormente CCVD de tipo N, y una población de características farmacológicas mixtas (Mintz y col., 1992, Lundy y col., 1994, Alvarez y col., 1994).

La liberación de glutamato evocada por alto  $\text{K}^+$  en sinaptosomas de SNC de mamíferos es potentemente bloqueada por  $\omega$ -Aga-IVA. (Turner y col., 1992).

En estudios de liberación de neurotransmisores evocada por  $\text{K}^+$  en rebanadas de tejido de SNC ("slices"), se vió también que en diferentes estructuras están involucrados distintos tipos de CCVD acoplados a la liberación de los diferentes neurotransmisores con variados grados de eficacia.  $\omega$ -Aga-IVA bloqueó casi completamente la liberación de glutamato y aspartato en rebanadas de hipocampo y estriado, así como también la liberación de serotonina en el hipocampo, mientras que la potencia para bloquear la liberación de serotonina y dopamina en rebanadas de estriado fue menor que en el hipocampo (Kimura y col., 1994). El bloqueante de los CCVD de tipo N,  $\omega$ -CgTx inhibe parcialmente la liberación de neurotransmisor, mientras que el antagonista de los CCVD de tipo L, nifendipina es totalmente inefectivo (Kimura y col., 1994).

Las células cromafines de la médula adrenal, son derivadas de la cresta neural y son células secretoras. Si bien sus mecanismos de secreción son diferentes y las vesículas también lo son, los estudios en esta preparación dan información acerca de los CCVD que median el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a la liberación. Recientemente, Artalejo y col. (1994) reportaron en estas células la coexistencia de tres tipos de CCVD de alto umbral (HVA), todos asociados a procesos exocitóticos. Mediante el empleo conjunto de registro de corrientes  $\text{Ca}^{2+}$  y de cambios en la capacidad de la membrana, encontraron diferencias en la eficacia del acoplamiento entre los CCVD y el aparato que controla el mecanismo de exocitosis. En las células cromafines, la

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de tipo "L" produce una mayor liberación de catecolaminas que cuando este ion entra a través de canales de tipo "N" o "P".

Como ha sido dicho previamente, la dificultad en la caracterización biofísica de los CCVD que median los procesos de liberación de neurotransmisor, hace que se utilice a la sensibilidad farmacológica de dichos procesos como el mayor criterio para la identificación de los subtipos de CCVD involucrados.

Sin embargo, el conocimiento de nueva información acerca de las características farmacológicas de los canales más recientemente descritos (P y Q), y teniendo en cuenta estudios sobre la difusión de las toxinas en los tejidos y las concentraciones reales de las toxinas en los terminales, actualmente se está realizando un replanteo y la revisión de la identidad de los tipos de CCVD previamente identificados como mediadores del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en algunas sinapsis (Wheeler y col., 1994; Dunlap y col., 1994).

Luego de la purificación y el empleo de la FTX y fundamentalmente de la  $\omega$ -Aga-IVA, los estudios realizados por diferentes grupos han concluido en identificar en gran cantidad de sinapsis a los CCVD involucrados en la liberación como de tipo P. Sin embargo, se han observado diferencias entre las concentraciones a las cuales se produce el bloqueo de la liberación y el  $K_d$  de  $\omega$ -Aga-IVA para las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas de Purkinje. Se ha reportado consistentemente que las concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA inhibitorias al 50% de la liberación son mayores que el  $K_d$ . Sin embargo de acuerdo a la relación de potencia que existe entre el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de neurotransmisor (Dodge y Rahamimoff, 1967) los procesos de secreción deberían ser bloqueados a menores concentraciones de toxina que las corrientes (Wheeler y col., 1994). En contrapartida, las diferencias podrían provenir de utilizar a un proceso tan complejo como la neurosecreción, como un ensayo para el estudio del bloqueo de los CCVD presinápticos, lo cual resultaría en una subestimación de la potencia bloqueante si es que en los terminales presinápticos existieran CCVD en exceso (Dunlap y col., 1994).

Como es posible apreciar, el amplio panorama de la farmacología de la transmisión sináptica y la diversidad conocida de los CCVD que median los flujos

de  $\text{Ca}^{2+}$  que gatillan la liberación de neurotransmisor en distintas áreas, plantean un campo interesante para dilucidar que tipo de canales esta presente en cada sinapsis.

El presente trabajo tiene como objetivos realizar la caracterización electrofisiológica y farmacológica de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, de los terminales sinápticos motores en el ratón. Esta caracterización se realizará en base al estudio del efecto de diferentes agentes bloqueantes de distintos tipos de CCVD sobre fenómenos sinápticos donde esta involucrada la actividad de los CCVD.

Los procesos fisiológicos y mediciones que se utilizaran para evaluar los efectos de drogas y/o toxinas sobre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del terminal son:

- Liberación de neurotransmisor evocada por estimulación eléctrica.
- Liberación de neurotransmisor espontánea y evocada por estimulación por depolarización con  $\text{K}^+$ .

- Corrientes preterminales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$

Asimismo, es propósito de este trabajo comparar el perfil farmacológico de estos fenómenos sinápticos dependientes del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , a fin de establecer una correlación entre los procesos de liberación y las corrientes de los terminales nerviosos.

Por otro lado, se realizará el estudio de la modulación de una conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del terminal, con el fin de investigar que tipo de relación funcional y espacial existe entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Debido al importante papel que tiene el ion  $\text{Ca}^{2+}$  en la fisiología celular, en especial en las células del sistema nervioso, es de gran utilidad conocer que tipos de CCVD están presentes en cada tipo neuronal. Existen diversas patologías en el sistema nervioso causadas por alteraciones en la transmisión sináptica, entre ellas, algunas propiamente originadas por alteraciones en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, es necesario tener conocimiento de la identidad de los CCVD a través de los cuales se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , para el desarrollo de drogas y fármacos que permitan modular y corregir la actividad sináptica.

Dada la diversidad de CCVD existentes y la no homogeneidad de los mismos para un mismo proceso en distintas estructuras, la aparición de bloqueantes selectivos para CCVD recientemente caracterizados, provee continuamente de

nuevas herramientas para la identificación de los mismos. Hasta el presente, los CCVD responsables de la transmisión sináptica en condiciones normales en los terminales motores de mamíferos no han sido identificados como de tipo T, L ni N.

Teniendo en consideración los estudios previamente realizados por otros autores, y mediante el uso de los agentes bloqueantes de los CCVD más recientemente identificados, este trabajo se propone identificar que tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes son los que controlan el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en los terminales motores del ratón y si los mismos son los que generan las corrientes que se registran en el perineuro.



# *Materiales y Metodos*



## REGISTRO DE POTENCIALES SINAPTICOS

### *A) PREPARACION.*

Se utilizaron ratones machos adultos, de 30-40 g de peso, de la cepa Suiza. Estos animales fueron mantenidos bajo un régimen de 12 horas luz-oscuridad, con agua y alimento balanceado disponible.

Los animales fueron sacrificados por dislocamiento cervical, se les removió el músculo diafragma con el nervio frénico, al cual se cuidó de dejarlo intacto con un cabo largo. Todas las disecciones fueron realizadas en una solución Ringer-Krebs ( en mM) NaCl: 137; KCl: 5; CaCl<sub>2</sub>: 2; MgSO<sub>4</sub>: 1; NaHCO<sub>3</sub>: 12; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1, glucosa: 11, manteniendo burbujeo constante con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), pH = 7,4.

La preparación fue luego transferida a una caja de Petri con base de Sylgard<sup>®</sup>, para su posterior disección. Esta consistió en un fragmento de músculo con la inserción del nervio. El mismo se montó sobre una base cuadrada de Sylgard<sup>®</sup> y se ubicó en una cámara de acrílico, la cual fue trasladada al microscopio del sistema para registros electrofisiológicos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (19-22 °C)

### *B) INSTRUMENTACION Y REGISTRO ELECTROFISIOLOGICO.*

Para el registro de los potenciales de placa evocados se utilizaron técnicas convencionales con microelectrodos intracelulares. Los mismos fueron construidos utilizando capilares de vidrio duro (borosilicato de aluminio, Corning #6030) con microfilamento, mediante un estirador marca David Kopf modelo 700 C; y se llenaron con una solución KCl (3 M). Los electrodos utilizados fueron de una resistencia de entre 10 y 20 MΩ. El microelectrodo de registro fue conectado al cabezal de un amplificador, mientras que, en la cámara de registro, un alambre grueso de plata clorurado servía como referencia. El cabezal estaba sujeto a un micromanipulador, mediante el cual era posible realizar movimientos finos del microelectrodo en los tres ejes del espacio. La salida del cabezal fue conectada a un amplificador Axoclamp 2-A y la señal de salida de este ( $V_m \cdot 10$ ) fue amplificada

100 veces en un amplificador Axon Instruments modelo AI 2020. La señal a la salida de este fue visualizada en un osciloscopio con memoria ( Tektronix 5113 ). Para la generación de los pulsos de estimulación y para la adquisición de las señales se utilizó un sistema de conversores analógico-digital y digital-analógico controlado por una computadora. Se utilizó un pulso generado por la computadora para disparar el estímulo en una unidad aisladora. Esta unidad de estimulación estaba acoplada a un electrodo de succión montado en un micromanipulador mediante el cual se succionó el nervio con una pipeta adecuada para su tamaño -a fin de evitar fuga de corriente - y se estimuló la preparación. Los potenciales de placa se generaron por estimulación eléctrica del nervio por medio de pulsos de 0.02-0.05 ms de duración y  $\cong$  3 volts de amplitud. En otros casos los registros fueron digitalizados por un sistema PCM ( de la firma Medical System Corp.) y grabados en una videograbadora Sony Betamax.

El microelectrodo de registro se insertó en las regiones de placas, identificadas mediante el seguimiento visual de las ramificaciones del nervio frénico. La correcta ubicación del microelectrodo respecto de la placa neuromuscular fue constatada en base al tiempo de subida de los potenciales evocados y miniatura. Los registros en que el tiempo de subida fuera mayor a 1 ms, fueron descartados, a fin de tener uniformidad en los mismos. Cada experimento se realizó como mínimo 2 veces y en cada músculo se registraron por lo menos 16 fibras.

#### **Metodo de las fallas.**

Para calcular el contenido cuántico mediante el método de las fallas se incubó al músculo durante 1 hora en una solución Ringer modificada, donde las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  eran de 1,2 y 6 mM respectivamente.

Con esta relación entre los cationes divalentes, la liberación de neurotransmisor sigue un modelo estadístico (Del Castillo y Katz, 1954) en el que la probabilidad de liberación (p) es muy baja siendo el número de vesículas disponibles (n) elevado, por lo cual la probabilidad de que se liberen x cuantos se aproxima a una distribución de Poisson.

Siendo  $p$  de muy bajo valor,  $x$  toma valores pequeños e incluso 0 (falla, no hay transmisión sináptica). Según la distribución de Poisson el contenido cuántico ( $m$ ) se puede calcular como:

$$m = \log n^{\circ} \text{ de impulsos} / n^{\circ} \text{ de fallas}$$

siendo además  $m = n \cdot p$

Se contabilizaron las fallas que ocurrían en un total de 100-200 estímulos, a una frecuencia de 0.5 Hz. Una vez obtenido el valor de contenido cuántico control, se estudió el contenido cuántico con dosis crecientes de los bloqueantes.

#### **Metodo de la varianza.**

Para el estudio del contenido cuántico por el método de la varianza los fragmentos del músculo diafragma con un cabo largo del nervio frénico, fueron dejados en incubación durante 30 minutos en solución Ringer carboxigenada. Luego fueron incubados durante una hora en 5-6 ml de solución Ringer más el agregado del antagonista colinérgico d-Tubocurarina (d-Tc). Para la obtención del valores control de contenido cuántico se trabajo con una concentración final de d-Tc entre 1,4 y 1,6  $\mu\text{g/ml}$ . Pasado el tiempo de incubación, la preparación fue montada en la cámara de registro y transferida al sistema de registro electrofisiologico para su estudio. Se registró la actividad sináptica en 12-16 fibras musculares en ausencia de toxina. Las toxinas bloqueantes de CCVD fueron agregadas directamente a la cámara de registro en concentraciones crecientes y 30 minutos después del agregado de los bloqueantes se realizó la medición del contenido cuántico. Se emplearon concentraciones decrecientes de curare a medida que se fue incrementando la concentración de los bloqueantes de CCVD.

El contenido cuántico fue calculado de acuerdo al método de la varianza, en la preparación nervio frénico-diafragma en presencia de curare, siendo:

$$m = \frac{\left( \overline{X_{\text{pot. placa}}} \right)^2}{\sigma^2 - \sigma_{\text{ruido}}^2}$$

donde  $m$  es el valor de contenido cuántico,  $\overline{X_{\text{pot. placa}}}$  es la amplitud media de entre 50 y 100 potenciales de placa elevada a la segunda potencia,  $\sigma^2$  es la varianza de los potenciales de placa y  $\sigma_{\text{ruido}}^2$  es la varianza originada por el ruido (contribución del ruido a la varianza). El promedio de los potenciales de placa fue tomado a una frecuencia de 0.5 Hz y para el mismo se descartaron los 30 primeros valores, a fin de evitar la varianza relacionada con la regresión del tamaño de los potenciales de placa, la cual esta dada por cambios en el  $m$  o bien en el tamaño cuántico. Dicha regresión tiene lugar durante la tetania.  $\sigma_{\text{ruido}}^2$  no fue considerada cuando su valor era muy pequeño en relación al  $\overline{X_{\text{pot. placa}}}$  y a  $\sigma^2$ .

Dado que en general las amplitudes de los potenciales de placa oscilaban entre 0,5 y un máximo de 4 mV., no fue necesario realizar correcciones por sumación no lineal (Mc. Lachlan y Martin, 1981).

Los potenciales de placa fueron registrados en fibras musculares cuyos valores de potenciales de membrana fue siempre inferior a -65 mV y se descartaron aquellas fibras en las que se produjo un cambio mayor de 3 mV a lo largo del registro. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (19-22 °C) y bajo burbujeo constante de gas carbónico.

#### *C) ANALISIS ESTADISTICO Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS.*

Los valores de  $m$  en ausencia de toxina fueron considerados como el 100 por ciento del contenido cuántico. Esto significa que es el máximo valor que puede tomar  $m$  para la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  que se esta empleando en esa preparación. El contenido cuántico obtenido a diferentes concentraciones de toxina fue expresado como porcentaje de su valor control.

Los valores experimentales de porcentaje de contenido cuántico en función de la concentración de toxina fueron ajustados mediante una adaptación de la ecuación de Hill.

$$y = \frac{\text{Maximo (100\%)}}{\left[ 1 + \left( \frac{x}{k} \right)^n \right]}$$

Para el ajuste, se dejaron libres los parametros k y n. Estos parametros representan la dosis inhibitoria al 50% y la estequiometría de la unión respectivamente.

## ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SINAPTICA ESPONTANEA

Para el estudio de la liberación espontanea de neurotransmisor se utilizó el músculo diafragma (Materiales y Métodos - 1-a)) en solución Ringer normal, en solución Ringer con  $\text{Ca}^{2+} = 0\text{mM}$ ,  $\text{Mg}^{2+} = 4\text{mM}$  y EGTA = 4 mM y solución Ringer con altas concentraciones de  $\text{K}^+$ .

Los potenciales de placa miniatura fueron registrados con la misma técnica e instrumental que el descrito en la sección 1-a), con excepción de la estimulación. La preparación fue dejada durante 30 minutos en reposo en un disco de Petri en solución Ringer normal o modificada, luego se la sujeto a una base de Sylgard<sup>®</sup>, fue transferida a la cámara de registro y ésta se instaló en el sistema de registro electrofisiológico. La preparación en la cámara de registro fue mantenida bajo burbujeo superficial continuo con gas carbógeno. Se estudió la actividad en por lo menos 16 placas por cada músculo y luego se recambió la solución por la misma solución en que se encontraba con el agregado de toxina. Concentraciones crecientes de toxina fueron directamente agregadas al baño o bien se recambió la solución por otra con la concentración deseada de toxina. Treinta minutos después del recambio de solución se midió la frecuencia y amplitud de los potenciales miniatura en las mismas regiones de placa. Se estudió la actividad sináptica espontanea solo en aquellas placas en que la velocidad de subida de los potenciales miniatura fuera inferior a 1 msec. La frecuencia y amplitud de los potenciales de placa miniatura fueron medidas directamente de la pantalla del osciloscopio o bien las señales fueron grabadas en video (previamente digitalizadas ) o almacenadas en una computadora para su posterior análisis. Cada experimento se realizó como mínimo 2 veces. Los valores de amplitud de los potenciales miniatura fueron corregidos a un potencial de membrana de -80 mV

Para el estudio del efecto de las toxinas sobre la liberación de Ach. evocada por  $\text{K}^+$ , la preparación fue preincubada durante 30 minutos en solución Ringer con  $\text{K}^+$  elevado antes de estudiarse la frecuencia de eventos espontáneos. Una vez tomados los valores en ausencia de toxina, se incubó durante 30 minutos con

diferentes concentraciones de toxina y se registró la ocurrencia de eventos espontáneos.

Se estudió la actividad sináptica espontánea medida en forma de corrientes utilizando la técnica de "fijación de voltaje" (voltage-clamp). La fijación de voltaje se realizó utilizando un amplificador Axoclamp 2A, en su configuración TEVC (fijación de voltaje mediante dos microelectrodos). Se insertaron en la placa dos microelectrodos, uno para la medición del potencial y el otro para la inyección de corriente, llenados con KCl (3M) y KAc (2M) respectivamente. El circuito se cerró a través de un electrodo de plata clorurado en el baño, que sirvió como electrodo de referencia. La actividad sináptica espontánea fue grabada (previa digitalización) para su posterior adquisición por computadora por un sistema disparado por el cruce de la señal a través de una ventana. Las corrientes miniatura fueron promediadas, y se midió la amplitud, el tiempo de subida, del 10 al 90 % del máximo de amplitud y el tiempo de decaimiento de la señal al 50 % mediante un programa adecuado para realizar esas mediciones. Luego de registrarse durante 2 minutos la actividad en por lo menos 9 placas en solución Ringer normal, se agregó toxina al baño y una hora después se registró la actividad en otras 9 placas.

Los valores obtenidos en presencia y ausencia de toxina fueron comparados utilizando un test de Student.

## CORRIENTES PRESINAPTICAS

### *A) PREPARACION BIOLOGICA.*

Se utilizaron ratones machos de la cepa suiza, de un peso entre 30 y 40 gramos mantenidos bajo el mismo régimen de bioterio que el descrito en 1-a).

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, más cercanamente a la región lumbar. Se realizó la disección del músculo Levator auris (Angaut-Petit y col., 1987), en solución Ringer normal, dejando al nervio motor que lo inerva intacto, a los efectos de succionarlo y estimular eléctricamente. Una vez disecado el músculo fue transferido a una cámara con base de Sylgard<sup>®</sup>, donde fue sujetado y estirado al máximo de su extensión a fin de obtener buena separación entre los fascículos. Este músculo se encuentra localizado muy superficialmente por debajo de la piel. El Levator auris está constituido en casi toda su extensión por una sola capa de fibras musculares, lo cual permite una excelente visualización de los detalles morfológicos de los terminales motores bajo una amplificación apropiada en el microscopio.

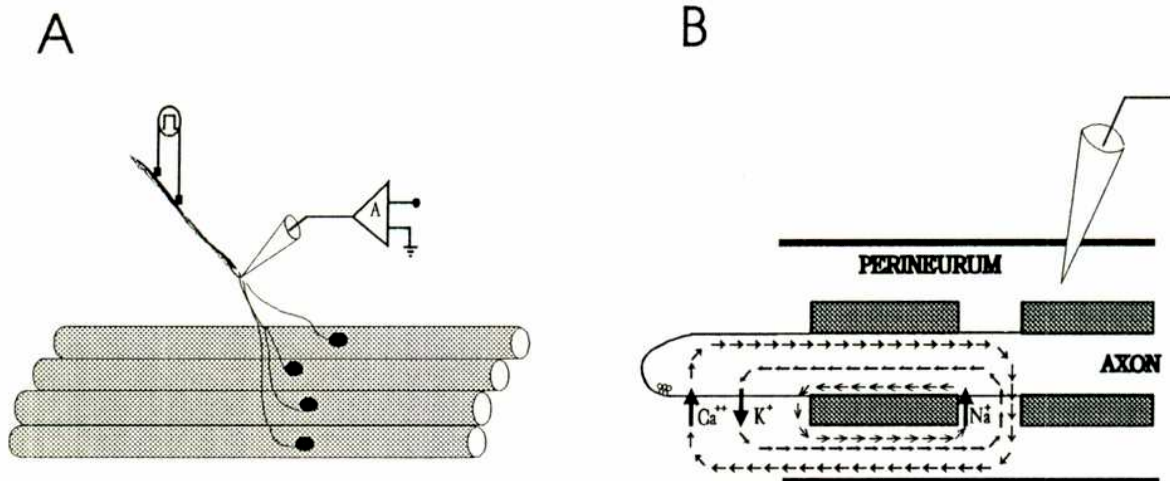
### *B) INSTRUMENTACION Y REGISTRO ELECTROFISIOLOGICO.*

Se utilizaron electrodos extracelulares situados en la vaina perineural, en la región cercana a los terminales motores, para registrar la actividad eléctrica promovida por la estimulación del nervio. Se construyeron microelectrodos de una resistencia entre 5 y 10 M $\Omega$  y se llenaron con NaCl = 2 M. Se estimuló a la preparación a través de una unidad aisladora de estímulos, mediante un pulso de voltaje (Ampl.  $\cong$  3 Volt, duración = 0.02-0.05 mseg), controlada por una computadora. La señal eléctrica, posterior a la estimulación del nervio, proveniente del perineuro fue digitalizada y almacenada en la computadora.

Esta técnica de registro introducida por Gundersen, Miledi y Katz (1980) y más adelante perfeccionada por Mallart (1982), permite registrar las corrientes originadas en el terminal como una caída de tensión a través de la resistencia del perineuro.



Mediante el empleo de agentes bloqueantes selectivos de canales, se han podido identificar los componentes de la señal relacionados con la corriente de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Asimismo se han caracterizado y descrito la procedencia de estas de diferentes regiones (Brigant y Mallart, 1982; Mallart, 1985; Penner y Dreyer, 1986). En la figura 1 están graficadas esquemáticamente la preparación y los sitios de registro (A) y un terminal presináptico de un nervio motor, donde se puede observar como son los sentidos de las corrientes que circulan en el perineuro (B).



Se ha descrito que la utilización de diferentes bloqueantes de las conductancias de  $\text{K}^+$ , o ciertas combinaciones de los mismos, permite evidenciar corrientes que se originan en el terminal y fluyen a través del perineuro y son el producto del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana.

Los registros de corrientes se realizaron 30-45 minutos después de incubar a la preparación en solución Ringer normal con los bloqueantes. Se utilizó siempre en la solución de registro d-Tc = 30  $\mu\text{M}$ , a fin de evitar la contracción del músculo con la consiguiente pérdida de la posición del electrodo de registro, y Procaina = 100  $\mu\text{M}$ , con el objeto de inhibir los disparos repetitivos en el nervio.

Para el registro de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  con el componente de larga duración, se bloquearon las conductancias voltaje dependientes y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de  $\text{K}^+$ , mediante el uso de tetraetilamonio (TEA) = 10 mM y 3,4-diaminopiridina (DAP) = 250  $\mu\text{M}$ .

Cuando se estudió la corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$  se bloquearon las conductancias de  $K^+$  dependientes de voltaje con 3-4, DAP = 1 mM.

El cargado de los terminales presinápticos con quelantes de  $Ca^{2+}$  se realizó incubando durante 2 horas a 37 °C en solución Ringer normal, o en Ringer sin  $Ca^{2+}$ , en presencia de 25  $\mu$ M de : BAPTA-AM, DM-BAPTA-AM Y EGTA-AM. Los compuestos de la familia acetoximetilester (-AM) son derivados de los quelantes, que tienen cuatro grupos éster ligados a los sitios de unión del  $Ca^{2+}$ , que le confieren la capacidad de difundir a través de la membrana y no unen  $Ca^{2+}$  en estas formas. Una vez que los compuestos atraviesan la membrana, las esterasas intracelulares remueven los grupos éster y las formas activas de los quelantes quedan atrapadas en el interior de la célula y actúan como buffers de  $Ca^{2+}$  (Tsien, R.Y., 1988, Robitaille y col., 1993).

Las toxinas fueron directamente agregadas al baño, luego de tener registros control de corrientes que se mantuvieran estables durante al menos 10 minutos. La frecuencia de estimulación fue de 0,0033 o 0,002 Hz en las corrientes de  $Ca^{2+}$ , mientras que para las corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$  fue de 0,5 Hz.

Las áreas debajo de las señales positivas llevadas por iones  $Ca^{2+}$ , fueron calculadas mediante computadora con un algoritmo de integración por el método de los trapecios.

## REACTIVOS, DROGAS Y TOXINAS

Todos los reactivos que se utilizaron fueron comprados a Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Las toxinas FTX y sFTX fueron purificadas y provistas por el Dr. R.R. Llinas y el Dr. B.D. Cherksey (Dept. of Physiology & Biophysics, New York University). La  $\omega$ -CgTx fue comprada a Peninsula Labs. y el péptido sintético  $\omega$ -Aga-IVA, fue comprado a Peptides Institute Inc. (Japon). La ChTx fue proporcionada por el Dr. R. Latorre (Universidad de Chile). Los quelantes de  $Ca^{2+}$  de la forma acetoximetilester BAPTA-AM, DM-BAPTA-AM y EGTA-AM fueron obtenidos de la compañía Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Debido a que la toxina FTX fue purificada del veneno de arañas y a que no se conoce con exactitud su estructura, las concentraciones que se emplearon están expresadas en forma de dilución ( $\mu\text{l/ml}$ ).

# *Resultados*

## ACCION DE LOS BLOQUEANTES DE LOS CCVD SOBRE LA CONTRACCION MUSCULAR

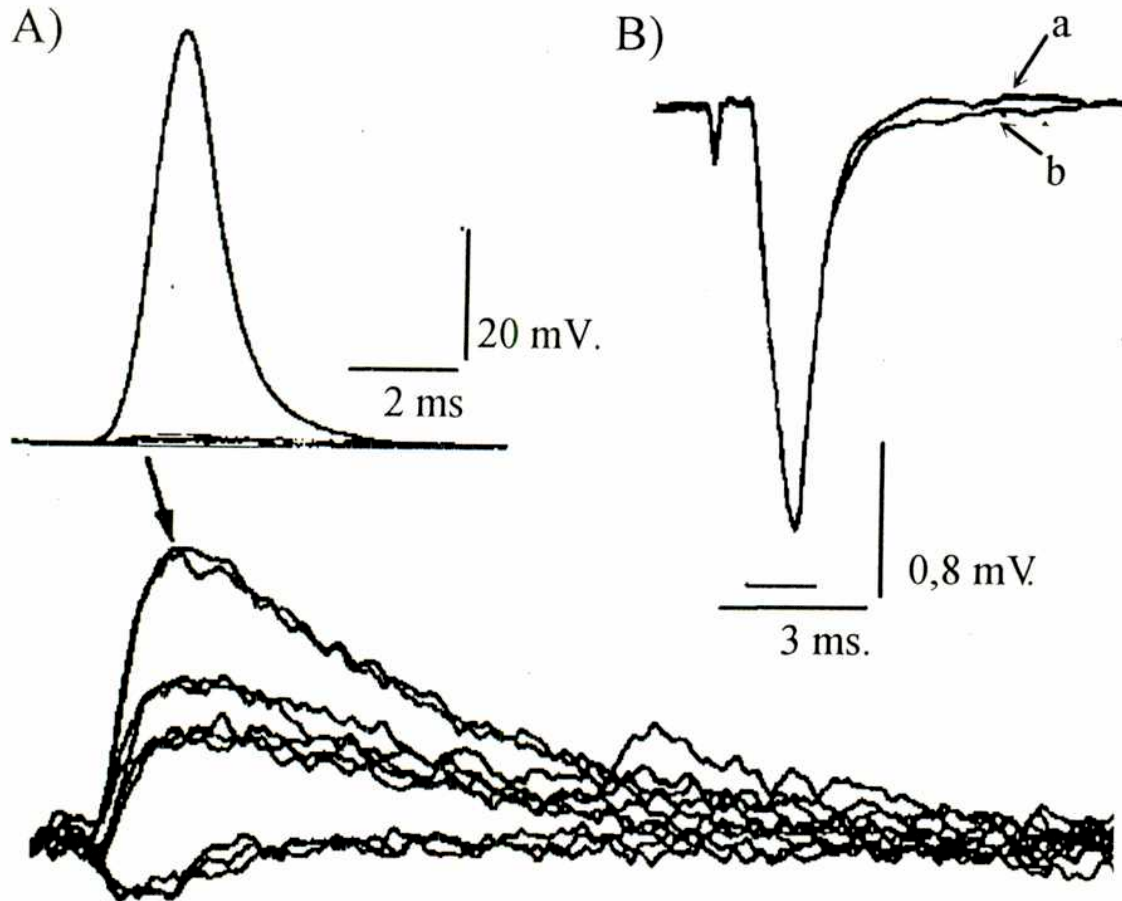
La estimulación eléctrica del nervio provoca la propagación del potencial de acción a lo largo del mismo. Con la llegada de la onda despolarizante al terminal nervioso se activan distintas conductancias dependientes de voltaje, entre ellas la del ion  $Ca^{2+}$ . La entrada de  $Ca^{2+}$  al terminal nervioso a través de canales de calcio voltaje dependientes produce la liberación del neurotransmisor acetilcolina. La Ach. liberada se une a los receptores nicotínicos colinérgicos, los cuales se abren y se produce un potencial sináptico que despolariza la placa. Este potencial sináptico se propaga al resto de la fibra muscular en forma de potencial de acción y se produce la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, el cual activa la maquinaria contráctil del músculo.

Cuando se estimuló el nervio frénico con un pulso de voltaje (Amplitud  $\cong$  9 volt, duración = 0,02-0,05 mseg) se observó la contracción del músculo diafragma y mediante la inserción de un microelectrodo fue posible registrar potenciales de acción en las fibras musculares. La adición del bloqueante de los CCVD de tipo P, [FTX] = 1  $\mu$ l/ml. a la preparación bloqueó la contracción muscular evocada por estimulación del nervio frénico. Los registros intracelulares en fibras musculares evidenciaron que la estimulación fallaba en producir la liberación de neurotransmisor en un alto porcentaje de eventos y en otros se pudo registrar potenciales de placa de baja amplitud. Las amplitudes de los potenciales de placa evocados por la estimulación eléctrica, eran de valor fluctuante y múltiplos de los potenciales de placa miniatura (Figura 1-A)). La contracción muscular fue recuperada luego del lavado durante 10 minutos con 20 ml. de solución Ringer normal.

Se estudió el efecto de la FTX en la propagación del potencial de acción del nervio mediante el registro de las corrientes presinápticas en el perineuro cerca de las zonas de placa. La señal negativa registrada esta asociada con la corriente entrante de  $Na^+$  de los últimos nodos de Ranvier y de los terminales no mielinizados

y con las corrientes salientes de  $K^+$  del terminal nervioso. La FTX no produjo ninguna modificación en estas señales, lo cual indica que su efecto sobre la transmisión neuromuscular no es a nivel de la propagación del potencial de acción presináptico (Figura 1.B)).

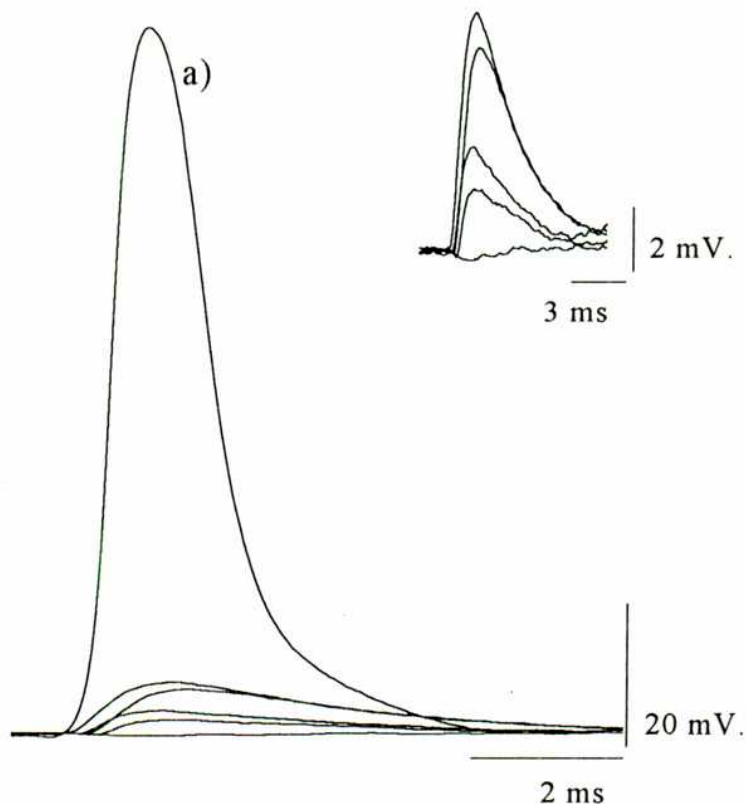
**Figura 1**



**Figura 1.** Efecto de la FTX sobre la transmisión neuromuscular en solución Ringer normal. A) En el trazo superior se observa el registro intracelular de un potencial de acción muscular producido por estimulación del nervio frénico. En los trazos inferiores se aprecia el efecto sobre la transmisión sináptica luego del agregado de FTX ( $1\mu\text{l/ml}$ ). Puede observarse que la amplitud de los potenciales sinápticos es discreta e incluso se observa un potencial miniatura, de igual amplitud al menor potencial de placa. B) Registro perineural de la corriente presináptica evocada por estimulación eléctrica del nervio en un músculo paralizado por d-TC ( $30\mu\text{M}$ ) antes (trazo a) y después (trazo b) de la aplicación de FTX ( $1\mu\text{l/ml}$ ) al medio extracelular.

Se estudió el efecto del péptido  $\omega$ -Aga-IVA, la otra toxina bloqueante de los CCVD de tipo P, sobre la transmisión neuromuscular. La incubación con  $\omega$ -Aga-IVA bloqueó la contracción muscular. La adición de  $\omega$ -Aga-IVA en una concentración de 300 nM bloqueó la contracción muscular luego de 20 minutos de agregada al baño (Figura 2). A concentraciones menores de  $\omega$ -Aga-IVA se requirió más tiempo para observarse el mismo efecto (50 nM  $\cong$  2 horas 30'; 100 nM  $\cong$  1 hora), pero en todas las fibras estudiadas los registros intracelulares mostraron en algunos casos fallas frente a la estimulación del nervio o potenciales de placa de amplitud variable y múltiplo de la amplitud de los potenciales miniatura.(Figura 2-inserto). En los músculos incubados con altas concentraciones de toxina, fue muy frecuente encontrar fibras musculares en las que estaba totalmente bloqueada la transmisión neuromuscular. En estos casos se observó la ausencia de potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica frente a más de 200 pulsos de estimulación, aun cuando era posible encontrar potenciales miniatura, cuya frecuencia y amplitud se correspondía con las de una preparación sin ningún tratamiento. Este bloqueo fue muy difícil de revertir lavando la preparación con solución Ringer normal y el restablecimiento de la transmisión sináptica y la contracción muscular fue favorecido mediante la estimulación a altas frecuencias durante el lavado.

**Figura 2**



**Figura 2.** Efecto de la  $\omega$ -Aga-IVA sobre la transmisión neuromuscular. Registros intracelulares en una fibra muscular en solución Ringer normal, antes (trazo a) y 30 minutos después (resto de los registros) de la aplicación de  $\omega$ -Aga-IVA = 300 nM. En el inserto se observan los potenciales de placa en una escala amplificada, donde se observa que la velocidad de subida de los mismos es normal y su amplitud tiene valores discretos.

## EFFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE LA TRANSMISION NEUROMUSCULAR.

### *EFFECTO DE LA FTX Y SU ANALOGO SINTETICO SFTX SOBRE EL CONTENIDO CUANTICO DE LA TRANSMISION SINAPTICA.*

A fin de caracterizar la acción bloqueante de estas toxinas sobre la transmisión neuromuscular se estudió el efecto de las mismas sobre el contenido cuántico de la liberación evocada por estimulación eléctrica.

Se estudió el efecto de la poliamina FTX, bloqueante de los CCVD de tipo P, sobre el contenido cuántico mediante el método de las fallas. Los músculos fueron incubados en una solución Ringer con bajo  $\text{Ca}^{2+}$  y alto  $\text{Mg}^{2+}$ , con el propósito de bloquear la transmisión neuromuscular y de disminuir la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Luego de obtenidos los valores control para el contenido cuántico,



se agregaron dosis crecientes de FTX. El agregado de FTX a distintas concentraciones no modificó los valores medios de potencial de reposo. Los valores medios control de contenido cuántico fueron entre 1.1 y 2.8; se calculó el contenido cuántico tras la incubación durante 30 minutos en presencia de diferentes concentraciones de FTX.

La FTX produjo una reducción dosis dependiente del contenido cuántico, referida como porcentaje del valor control previo al agregado de la toxina (Figura 3). Una dilución de 8 nl/ml. produjo una reducción al 50 % del contenido cuántico control. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Hill, y los parámetros obtenidos de este ajuste fueron  $k: 8 \text{ nl/ml}$  y  $n_{Hill} = 1,037$ .

La sFTX, aducto sintético de FTX, produjo una disminución dosis dependiente sobre el contenido cuántico. sFTX en una concentración de 500  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente el contenido cuántico, mientras que la poliamina espermidina no tuvo efecto significativo aun a altas concentraciones (3 mM) (Figura 3).

Considerando que en diferentes áreas del SNC se ha descrito que la transmisión sináptica es mediada por más de un tipo de CCVD, se estudió el efecto del bloqueante de los CCVD de tipo N,  $\omega\text{-CgTx}$ , en la transmisión neuromuscular en condiciones de baja probabilidad de liberación de neurotransmisor. En una solución Ringer modificada con  $\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$  y  $\text{Mg}^{2+} = 6 \text{ mM}$  el valor del contenido cuántico control  $m = 1,92 \pm 0,13$  no fue modificado por la incubación durante 30 minutos con  $\omega\text{-CgTx}$  5 $\mu\text{M}$ ,  $m = 1,93 \pm 0,2$  (2 experimentos, 32 fibras). La  $\omega\text{-CgTx}$  a esta concentración tiene un efecto bloqueante máximo en la transmisión neuromuscular de los anfibios y en corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en otras preparaciones de sistema nervioso (Sherr y Yoshikami, 1984; Mc.Cleskey y col, 1984; Katz y col., 1994)

Figura 3

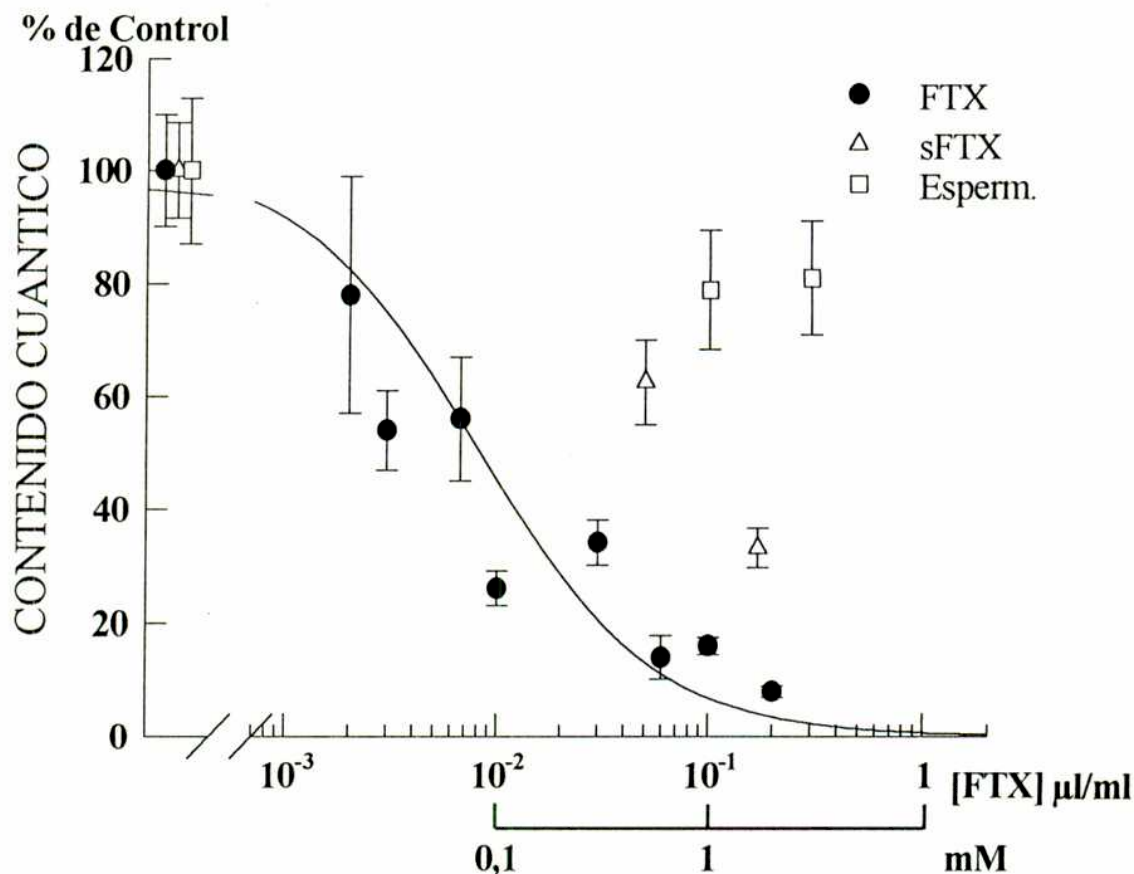


Figura 3. Efecto de la FTX, sFTX y espermidina sobre el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor evocada por estimulación eléctrica en el músculo diafragma incubado en una solución Ringer con bajo contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  y alto de  $\text{Mg}^{2+}$  (1,2 y 6 mM respectivamente). Cada punto es la media  $\pm$  e.s de al menos 18 fibras musculares. Los valores están expresados como porcentaje del contenido cuántico control antes del agregado de las diferentes concentraciones de toxina. La línea sólida corresponde al ajuste mediante la ecuación de Hill de los puntos experimentales en presencia de FTX. El  $\text{Ic}_{50}$  es 8 nl/ml el  $n_{\text{Hill}} = 1,0377$  y el  $R_{\text{squared}} = 0,948$ .

Sano y col. (1987) han descrito que el efecto bloqueante de la  $\omega$ -CgTx sobre la transmisión neuromuscular de anfibios es dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{ext}}$ . Esta toxina en presencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}} = 0,9$  mM tiene un fuerte efecto inhibitorio, mientras que a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}} = 10$  mM carece de efecto. Esto podría deberse a que el binding de toxinas a CCVD es antagonizado por altas concentraciones de iones divalentes y es inversamente proporcional a la concentración de iones

divalentes (Cruz y Olivera, 1986; Sher y col., 1988; Wagner y col. 1988). Por otro lado, se ha reportado que el ion  $Mg^{2+}$  en altas concentraciones tiene un efecto "per se" sobre la transmisión sináptica, ya que produce un aumento de la pendiente "n" (Andreu y Barret, 1980).

Teniendo en cuenta la influencia de los iones divalentes tanto sobre el "binding" de toxinas a los CCVD y sobre la liberación en sí, se decidió estudiar la acción de los bloqueantes de CCVD sobre la transmisión sináptica en soluciones que contuvieran concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . De esta forma se elimina la posible interferencia de estos iones en la unión toxina-CCVD, a la vez que se estudian los CCVD involucrados en la liberación de neurotransmisor en condiciones fisiológicas.

En solución Ringer normal, la estimación del contenido cuántico  $m$  debe realizarse por el método de la varianza. En estas condiciones el valor de  $m$  es mucho mayor que el obtenido por el método de las fallas, ya que la concentración de  $Ca^{2+}_{ext.}$  es mayor y no esta restringida su entrada por la alta concentración de  $Mg^{2+}$ . Para evitar la contracción muscular, se empleo el antagonista colinérgico d-Tubocurarina (d-Tc).

En este grupo de experimentos se partió de un valor de contenido cuántico control de  $m = 68,3 \pm 5,32$ . Los potenciales de reposo de las fibras musculares no fueron afectados a ninguna concentración de FTX. La FTX produjo una disminución dosis dependiente del contenido cuántico, bloqueando al 50 % del valor control a una dilución de 16 nl/ml. (Figura 4). El ajuste de los datos mediante la ecuación de Hill dio un  $k = 16$  nl/ml. y un  $n_{Hill} = 1.0032$ .

La sFTX, análogo sintético de la FTX, produjo una disminución dosis-dependiente del contenido cuántico en concentraciones desde 0,1 a 1 mM (Figura 4).

Figura 4

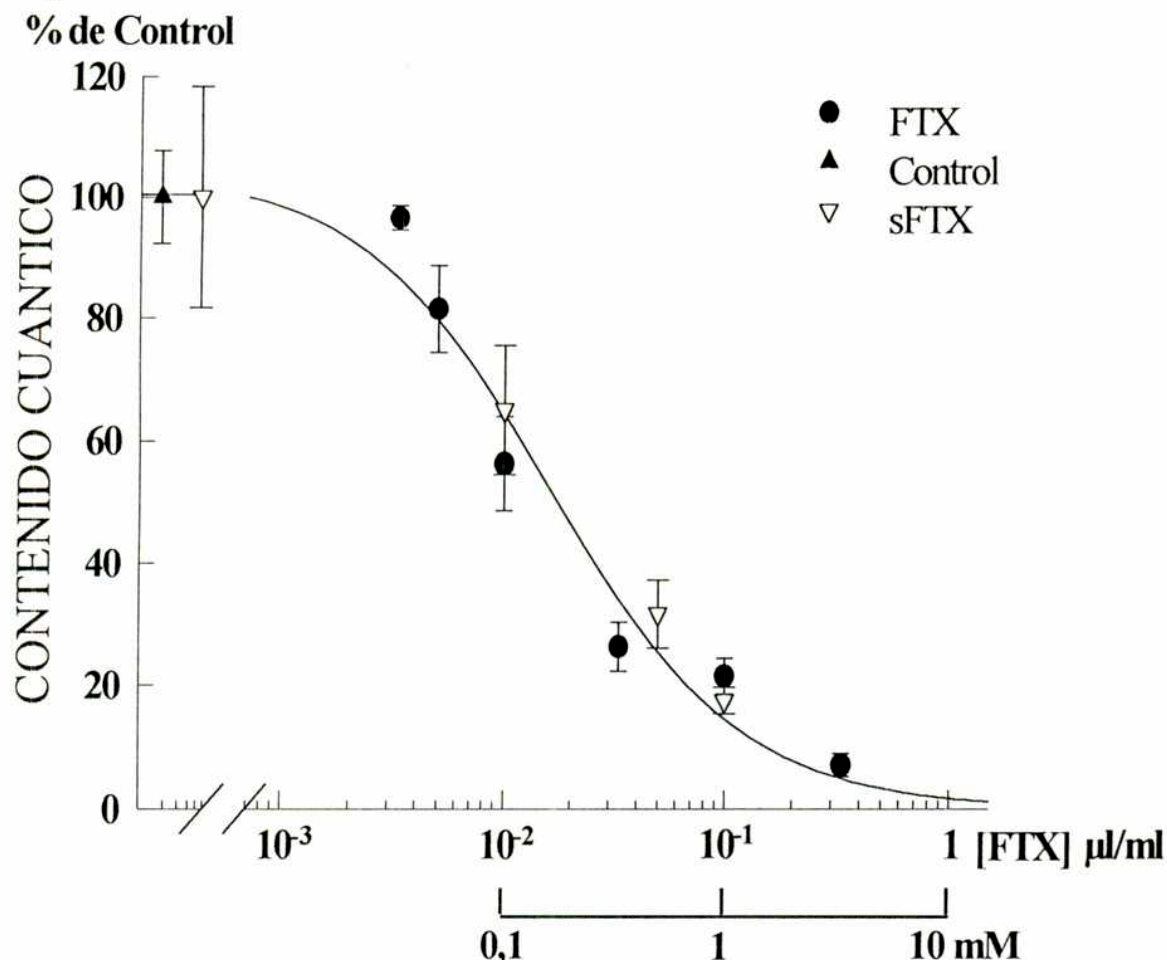


Figura 4. Efecto de la FTX sobre el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor en el músculo diafragma. El contenido cuántico fue calculado en presencia de curare, a fin de evitar la contracción muscular, en concentraciones que fueron decrecientes de 1,6 a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . o estando el mismo ausente, a medida que se emplearon concentraciones mayores de FTX. Cada punto es la media  $\pm$  e.s de al menos 18 fibras musculares. Los valores de contenido cuántico están expresados como porcentaje del control ( $m=68,3 \pm 5,32$ ). La línea sólida es el ajuste de los datos a la ecuación de Hill.  $Ic_{50} = 16 \text{ nl/ml}$ ,  $n_{Hill} = 1,0032$  y  $R_{\text{squared}} = 0,9794$ .

El efecto bloqueante de la FTX y la sFTX sobre la transmisión sináptica se evidenció porque produjeron una disminución en la amplitud de los potenciales de placa y un aumento en la varianza de los mismos (Figuras 5 y 6). A medida que se emplearon mayores concentraciones de FTX y sFTX, la concentración de d-Tc empleada para bloquear la respuesta postsináptica debió ser disminuida.

Figura 5

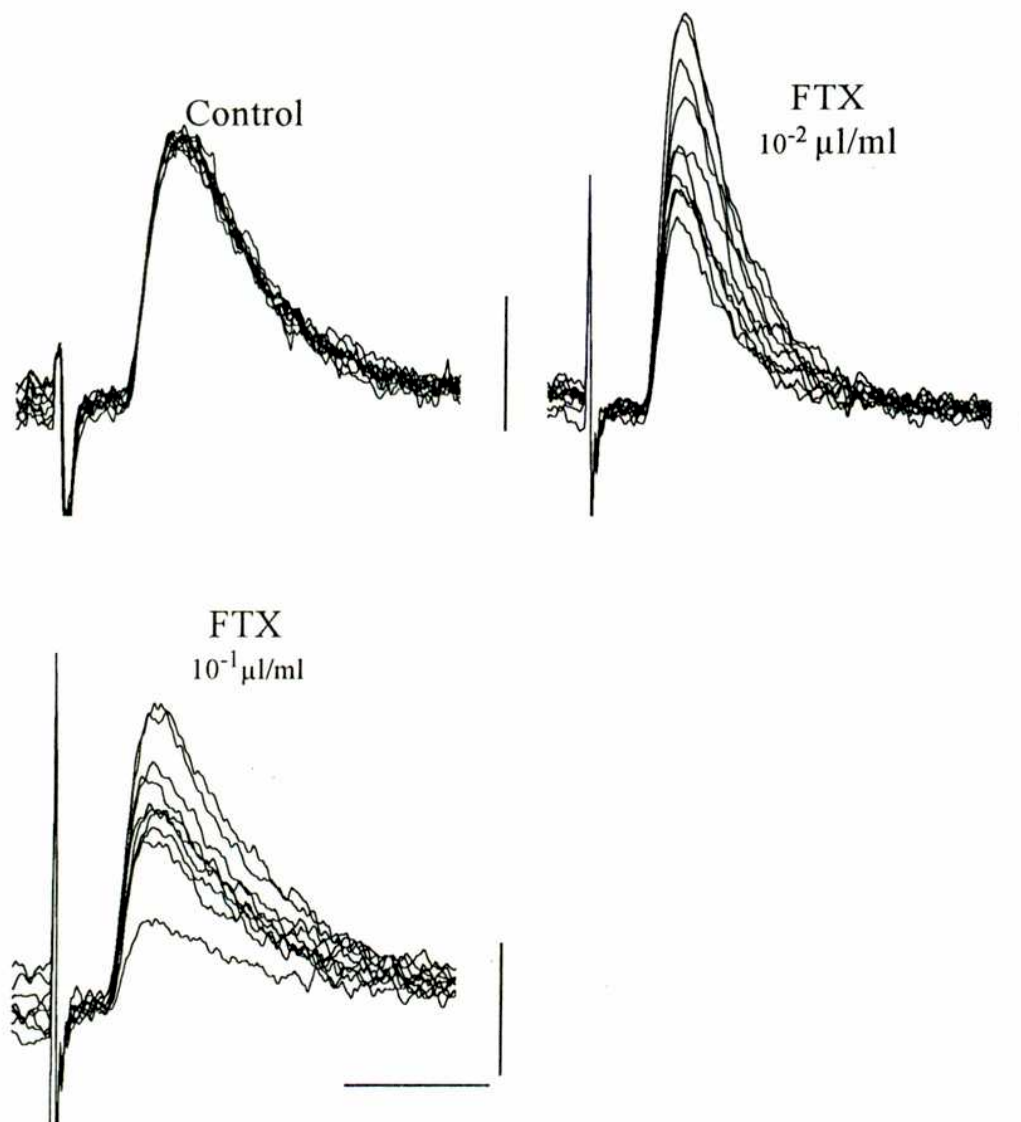


Figura 5. Trazos representativos de potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica del nervio frénico en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de FTX. Los registros fueron obtenidos en solución Ringer normal conteniendo d-Tc. Para los registros control se utilizó d-Tc = 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , para FTX ( $10^{-2}$   $\mu\text{l/ml}$ ) se usó d-Tc = 1,1  $\mu\text{g/ml}$  y para FTX ( $10^{-1}$   $\mu\text{l/ml}$ ) d-Tc = 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Se muestran 10 registros tomados al azar del total de los estímulos que se dieron para calcular el contenido cuántico por el método de la varianza. Las barras verticales representan 1 mV. y la horizontal: 5 mseg.

Figura 6

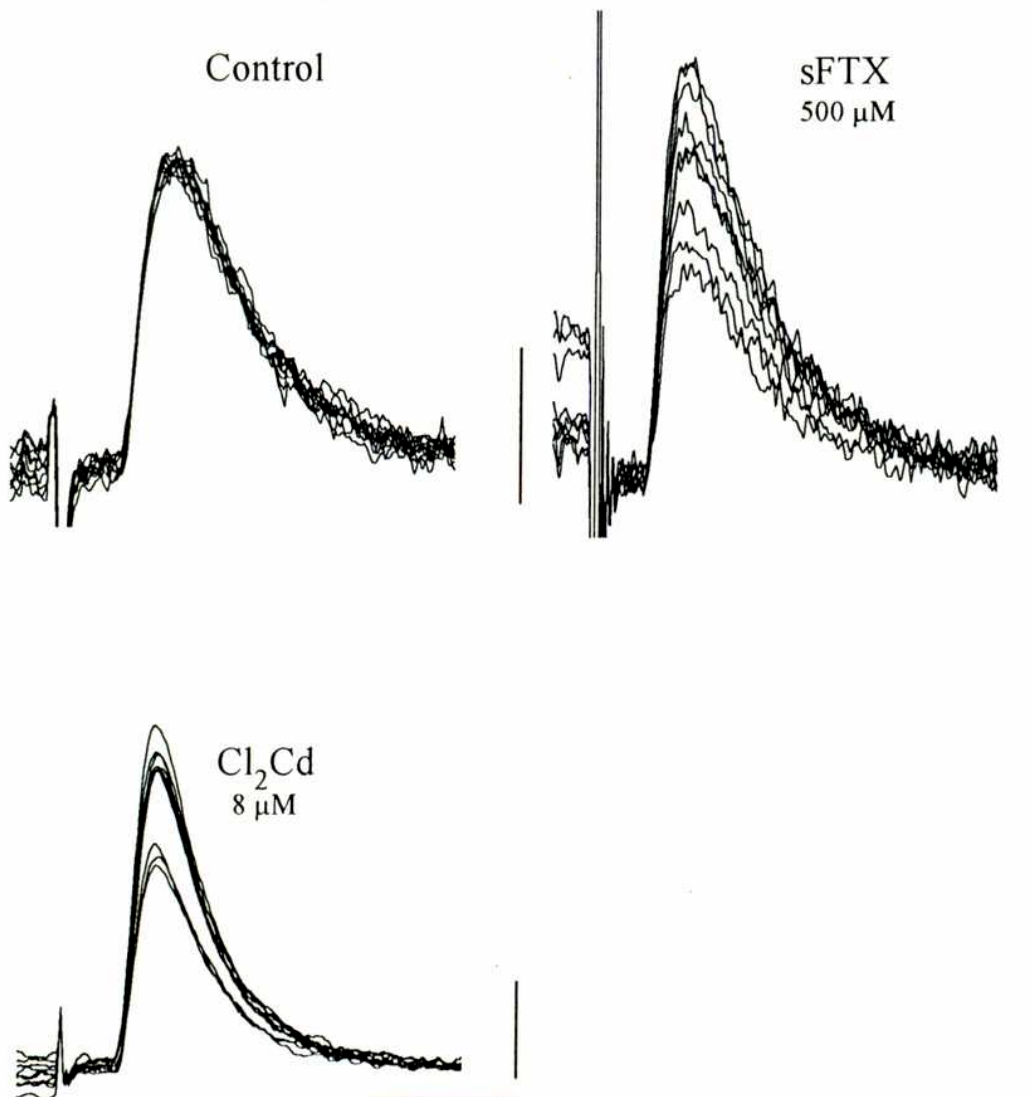


Figura 6. Trazos representativos de potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica del nervio frénico en ausencia y en presencia de sFTX y  $\text{Cl}_2\text{Cd} = 8 \mu\text{M}$ . Los registros fueron obtenidos en solución Ringer normal conteniendo d-Tc. Para los registros control se utilizó d-Tc =  $1,5 \mu\text{g/ml}$ , para sFTX ( $500 \mu\text{M}$ ) se uso d-Tc =  $0,5 \mu\text{g/ml}$  y para  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  la respuesta postsináptica fue bloqueada con d-Tc =  $0,75 \mu\text{g/ml}$ . Se muestran 10 registros tomados al azar del total de los estímulos que se dieron para calcular el contenido cuántico por el método de la varianza. Las barras verticales representan 1 mV. y la horizontal: 5 msec.

*DEPENDENCIA DEL CONTENIDO CUANTICO CON LA CONCENTRACION DE  $\text{Ca}^{2+}$  EXTRACELULAR.*

La liberación de neurotransmisor en condiciones de baja probabilidad de liberación tiene una dependencia no lineal con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y

depende, según del Castillo y Katz (1954-b) de la cantidad formada del complejo activo [CaX]

Dodge y Rahamimoff (1967) propusieron que esta relación esta definida como:

$$m = K \left( [Ca^{2+}]_{ext.} \right)^n$$

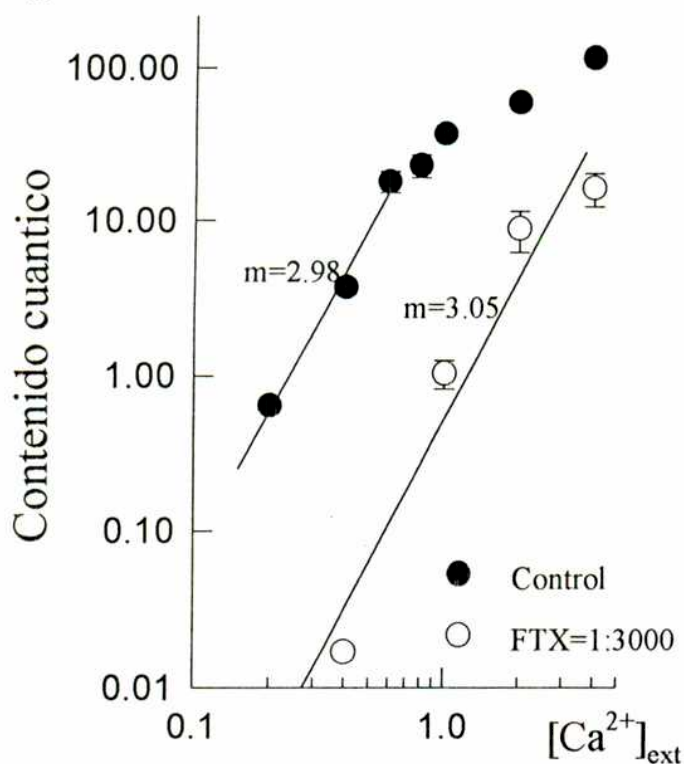
donde K es una constante de proporcionalidad y n representa el número de iones  $Ca^{2+}$  que cooperan para generar la liberación de un cuanto. El parámetro n es la pendiente de la recta que se obtiene al graficar esta relación en una escala doble logarítmica.

Se estudió la dependencia del contenido cuántico con la  $[Ca^{2+}]_{ext.}$  en solución Ringer conteniendo d-Tc, en presencia y en ausencia de una concentración fija de FTX ( $3,3 \cdot 10^{-1}$   $\mu$ l/ml). Se calculó el contenido cuántico en preparaciones incubadas con bajas  $[Ca^{2+}]_{ext.}$  y la  $[Ca^{2+}]_{ext.}$  fue incrementada en las preparaciones control y en músculos tratados con FTX.

En la Figura 7 puede observarse que en un gráfico con coordenadas doble logarítmicas, la relación contenido cuántico vs.  $[Ca^{2+}]_{ext.}$  es de tipo lineal en la zona de valores bajos de contenido cuántico y esa linealidad se pierde para valores altos de contenido cuántico. La FTX produjo un desplazamiento en la línea, como consecuencia de su efecto inhibitorio sobre el contenido cuántico y no modificó la pendiente, n, de la relación *m* vs.  $[Ca^{2+}]_{ext.}$ :

$$n_{control} = 2,98 \text{ vs. } n_{FTX} = 3.05.$$

**Figura 7**



**Figura 7** Contenido cuántico a distintas concentraciones de  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . El contenido cuántico fue calculado por el método de la varianza. Los experimentos fueron realizados partiendo de concentraciones bajas de  $Ca^{2+}$  y se estudio el contenido cuántico a tres  $[Ca^{2+}]_{ext}$  diferentes por músculo. Las líneas representan el ajuste de los 4 últimos puntos para los valores control y todos los puntos obtenidos en presencia de FTX 1:3000, mediante cuadrados mínimos.  $R_{sq}=0.99$  y  $0.9623$  respectivamente. Los ejes están en escala logarítmica.

*EFEECTO DE LA  $\omega$ -AGA-IVA SOBRE EL CONTENIDO CUANTICO DE LA TRANSMISION SINAPTICA.*

Se investigó el efecto del bloqueante de CCVD de tipo P  $\omega$ -Aga-IVA, sobre el contenido cuántico de la transmisión sináptica por el método de la varianza. La toxina  $\omega$ -Aga-IVA no afectó el valor del potencial de membrana a ninguna de las concentraciones empleadas. El valor control de contenido cuántico fue  $m = 83,34 \pm 3,56$ . La  $\omega$ -Aga-IVA produjo una disminución concentración dependiente del contenido cuántico, con una concentración inhibitoria al 50% de 10 nM (Figura 8). La toxina disminuyó el contenido cuántico a bajas concentraciones del rango nanomolar. El porcentaje de contenido cuántico control en presencia de  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM fue de 4%. El ajuste de los datos mediante la ecuación de Hill dio los siguientes parámetros  $k = 9,8$  nM, y  $n_{Hill} = 1,0032$ .



Figura 8

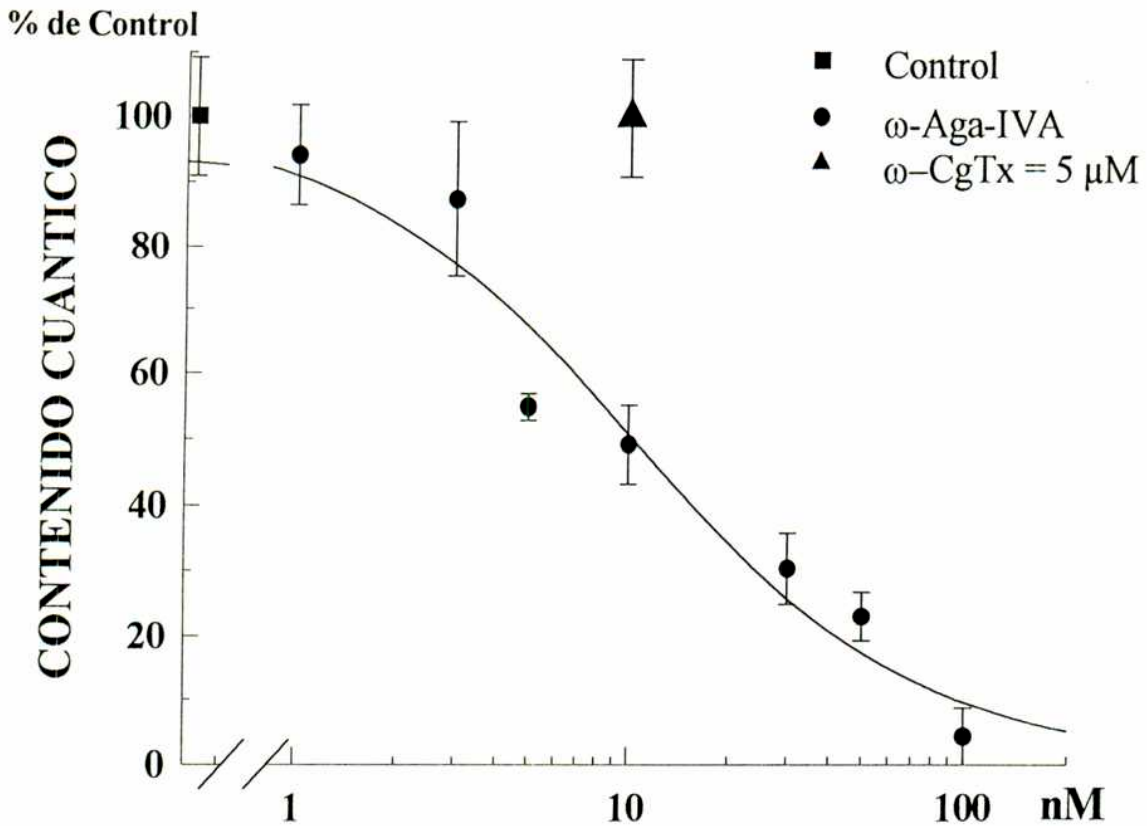
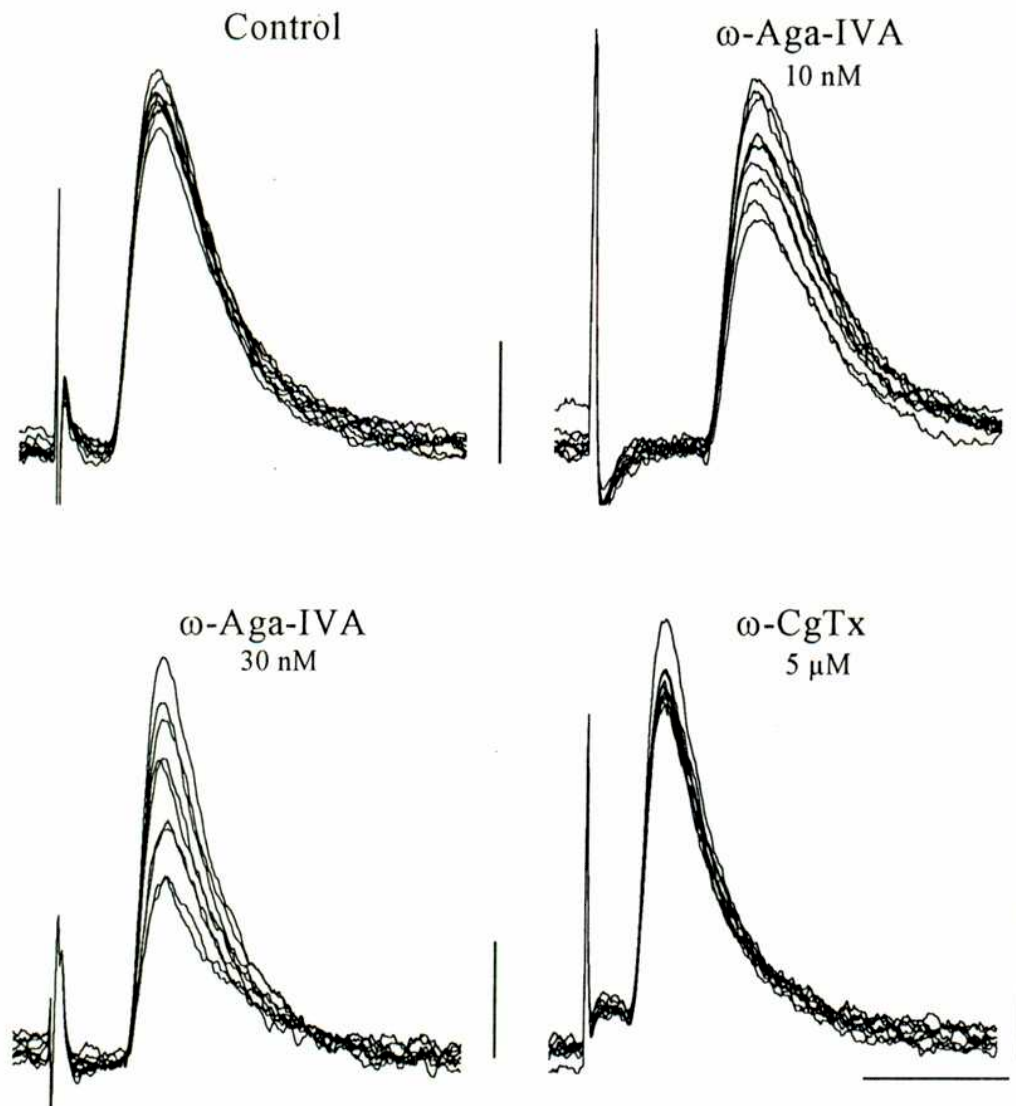


Figura 8. Efecto de la  $\omega$ -Aga-IVA y  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu$ M, sobre el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor en el músculo diafragma en presencia de diferentes concentraciones de d-Tc. El contenido cuántico fue calculado por el método de la varianza. Cada punto representa la media  $\pm$  e.s. de un mínimo de 18 fibras musculares, expresados como porcentaje del control de contenido cuántico ( $m=83,38 \pm 3,56$ ). La línea fue obtenida por el ajuste de los datos a la ecuación de Hill.  $Ic_{50} = 9,8$  nM,  $n_{Hill} = 1,003$  y  $R_{squared} = 0,9893$ .

El bloqueante de los CCVD de tipo P,  $\omega$ -Aga-IVA, disminuyó la amplitud y aumentó la varianza de los potenciales de placa a una frecuencia de estimulación de 0.5 Hz (Figura 9). Si bien las amplitudes de los potenciales de placa en condiciones control y tratados con toxina son similares, se debe considerar que las concentraciones de curare empleadas para bloquear la respuesta postsináptica fueron

disminuidas a medida que se incrementaba la concentración de  $\omega$ -Aga-IVA y a la máxima concentración de  $\omega$ -Aga-IVA utilizada (100 nM) no fue necesario el uso de d-Tc para prevenir la contracción.

**Figura 9**



**Figura 9.** Potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica del nervio frénico. Los trazos control fueron obtenidos en presencia de d-Tc = 1,5  $\mu$ g/ml. Al agregar  $\omega$ -Aga-IVA 10 nM se disminuyó a [d-Tc] = 1,1  $\mu$ g/ml y en 30 nM de  $\omega$ -Aga-IVA se trabajó con [d-Tc] = 0,75  $\mu$ g/ml. En presencia de  $\omega$ -CgTx no fue necesario disminuir [d-Tc] ya que no afectó la amplitud de los potenciales de placa. Cada uno de los registros son potenciales de placa de una fibra muscular y fueron tomados la azar de un total de 50. La frecuencia de estimulación fue de 0,5 Hz. Las barras verticales representan 1 mV. y la horizontal: 5 msec.

Se estudió el efecto del bloqueante de los CCVD de tipo N,  $\omega$ -CgTx sobre el contenido cuántico por el método de la varianza. La incubación durante 30 minutos con  $\omega$ -CgTx = 5 $\mu$ M no modificó el contenido cuántico. La adición de  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu$ M no afectó la amplitud ni la varianza de los potenciales de placa (Figura 9).

## **EFFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE LA LIBERACION DE NEUROTRANSMISOR A ALTA FRECUENCIA DE ESTIMULACION**

Diferentes fenómenos de plasticidad han sido descriptos en las sinapsis tanto centrales como periféricas en respuesta a distintos patrones de estimulación. En la placa neuromuscular, en condiciones de baja probabilidad de liberación, en respuesta a trenes de estimulación de alta frecuencia se producen los fenómenos de facilitación, aumentación y potenciación. Cada uno de éstos posee distintas constantes de tiempo, por las cuales se diferencian entre sí. Todos estos fenómenos dependen de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al terminal, y se ha propuesto que estas formas de plasticidad neuronal dependen del  $\text{Ca}^{2+}$  residual en el terminal luego de la estimulación a alta frecuencia (Zucker, 1989 y Magleby y Zengel, 1982).

Por el contrario, cuando se trabaja en condiciones de liberación fisiológicas, la respuesta a la estimulación repetitiva es usualmente un decaimiento del contenido cuántico y en consecuencia en la amplitud de los potenciales de placa, originado posiblemente por agotamiento del reservorio de neurotransmisor fácilmente disponible para la liberación.

Se estudió la acción de bloqueantes de CCVD sobre la liberación de neurotransmisor, a alta frecuencia de estimulación, en condiciones de liberación fisiológicas.

En las preparaciones tratadas con FTX, se observó que el contenido cuántico inicial fue decreciendo a medida que se emplearon concentraciones crecientes de FTX, lo cual está de acuerdo con el efecto inhibitorio de la FTX sobre la transmisión sináptica. El contenido cuántico a lo largo de un tren de estimulación a 40 Hz. durante 250 mseg. se mantuvo casi constante a partir de concentraciones de FTX superiores a  $10^{-2}$   $\mu\text{l/ml.}$ , e incluso se produjo una leve facilitación en el contenido cuántico de los primeros estímulos. Por el contrario, en ausencia de toxina, la estimulación a 40 Hz. produjo una reducción paulatina en el contenido cuántico a lo largo del tren de estimulación (Figura 10).

Figura 10

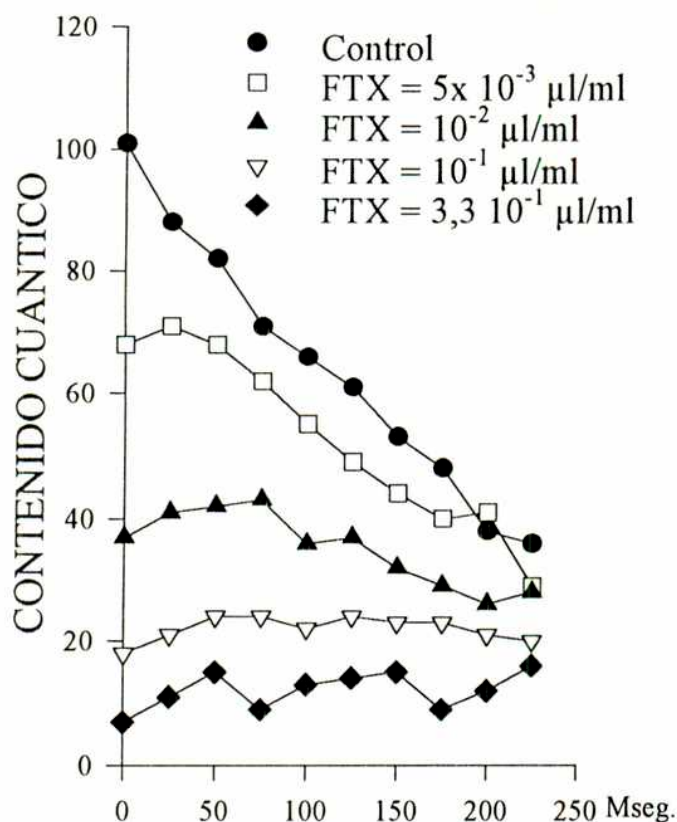


Figura 10. Valores promedio de contenido cuántico registrados durante un tren de estimulación a 40 Hz en presencia de FTX. El contenido cuántico para cada potencial de placa en el tren de 40 Hz. fue calculado de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Ampl. pot. placa, 40 Hz.}}{\text{Ampl. pot. placa, 0,5 Hz.}} \times (\text{Contenido cuántico, 0,5 Hz.})$$

Cada punto es el promedio de al menos 10 fibras musculares en dos preparaciones.

En la Figura 11 se muestran trazos representativos de los potenciales de placa durante un tren de estimulación a 40 Hz., donde se observa el decaimiento en la amplitud en ausencia de toxina y el mantenimiento o facilitación temprana en la amplitud de los potenciales de placa en presencia de FTX = 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-1</sup> μl/ml.

Figura 11

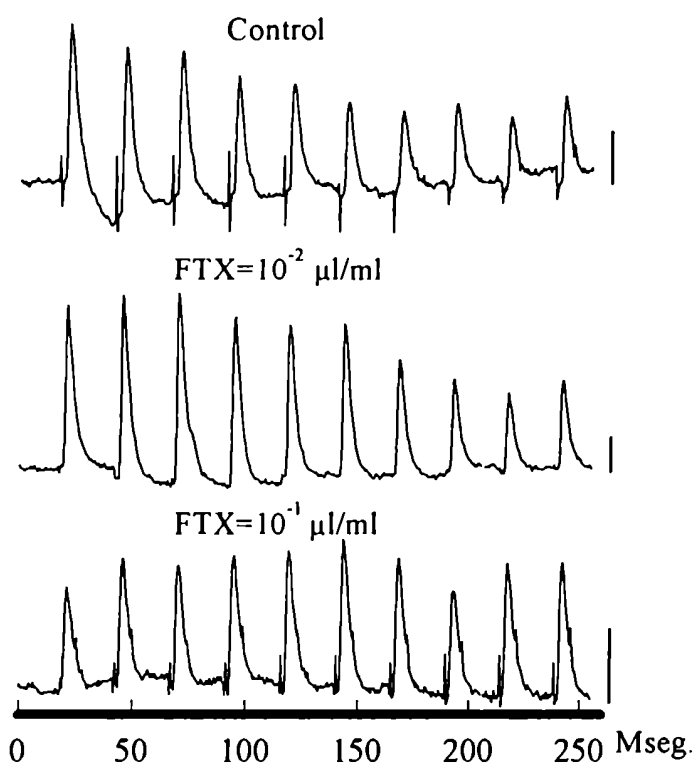


Figura 11. Trazos representativos de potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica a una frecuencia de estimulación de 40 Hz. en solución Ringer con curare, en ausencia y en presencia de dos concentraciones de FTX. La similitud observada en las amplitudes de los potenciales de placa, es debido a que se utilizó menor concentración de curare para paralizar los músculos tratados con bloqueantes. Concentración de d-Tc (µg/ml):  
Control = 1,6  
FTX (10<sup>-2</sup> µl/ml) = 1,1  
FTX (10<sup>-1</sup> µl/ml) = 0,5  
Las barras verticales representan 1 mV.

En las preparaciones tratadas con sFTX = 0,5 y 1 mM se observó también una facilitación temprana en el contenido cuántico (Figura 12). Un efecto similar fue observado cuando se empleo Cd<sup>2+</sup>, un bloqueante inespecífico de los CCVD de alto umbral. En la Figura 13 se observan trazos representativos de los potenciales de placa durante un tren de estimulación de 250 mseg. a 40 Hz. en solución Ringer + d-Tc y en la misma solución más el agregado de sFTX = 0,5 mM y Cd<sup>2+</sup> = 8 µM.

Figura 12

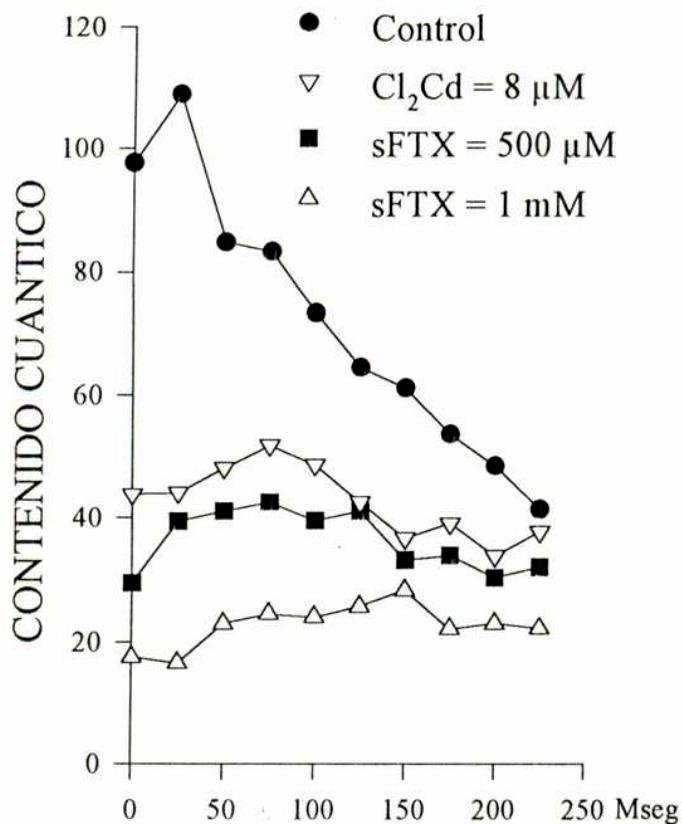


Figura 12. Valores promedio de contenido cuántico registrados durante un tren de estimulación a 40 Hz en presencia de sFTX = 0,5 y 1 mM y Cl<sub>2</sub>Cd = 8 μM. El contenido cuántico para cada potencial de placa en el tren de 40 Hz. fue calculado de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Ampl. por placa, 40Hz}}{\text{Ampl. por placa, 0,5Hz}} \times (\text{Contenido cuántico, 0,5Hz.})$$

Cada punto es el promedio de al menos 12 fibras musculares en dos preparaciones.

Figura 13

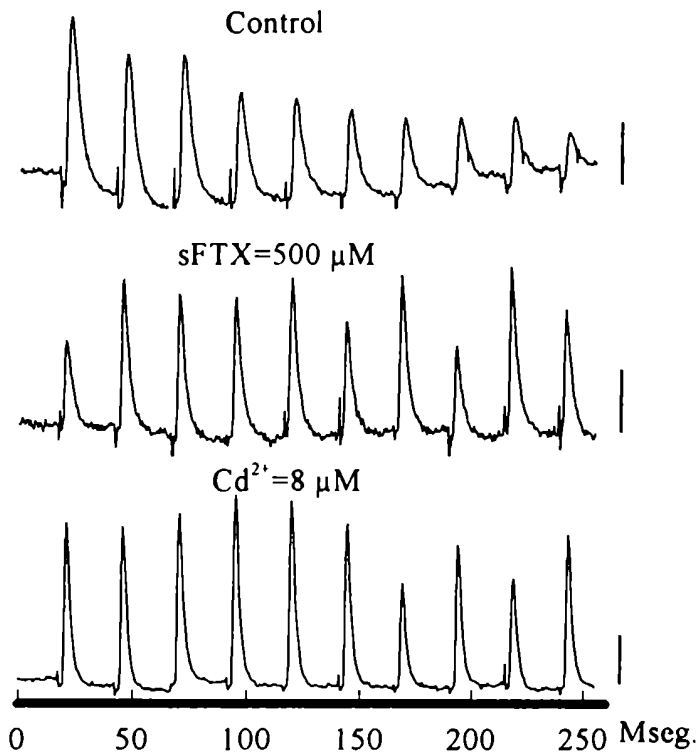


Figura 13. Trazos representativos de potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica a una frecuencia de estimulación de 40 Hz. en solución Ringer con curare, y en presencia de sFTX = 500  $\mu$ M y de Cl<sub>2</sub>Cd = 8  $\mu$ M. La similitud observada en las amplitudes de los potenciales de placa, es debido a que menor cantidad de curare fue utilizada para paralizar los músculos tratados con bloqueantes.

Concentración de d-Tc ( $\mu$ g/ml):

Control = 1,2

sFTX = 0,5

Cl<sub>2</sub>Cd = 0,75

Las barras verticales representan 1 mV.

El contenido cuántico durante un tren de estimulación a 40 Hz. en presencia de  $\omega$ -Aga-IVA (30 y 50 nM) se mantuvo casi constante a lo largo del tren y no sufrió el decaimiento que ocurre en condiciones normales (Figura 14).



Figura 14

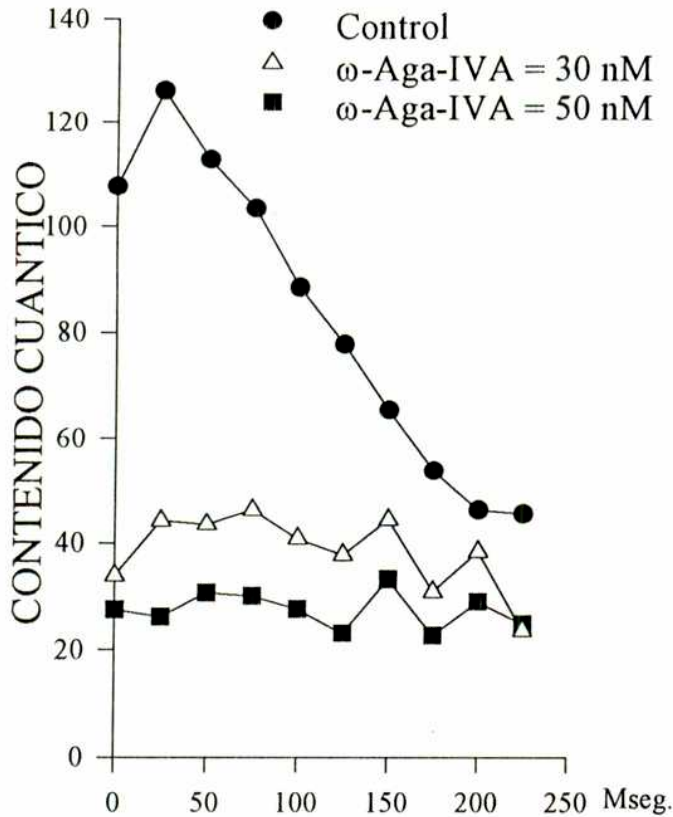


Figura 14. Valores promedio de contenido cuántico registrados durante un tren de estimulación a 40 Hz en presencia de  $\omega$ -Aga-IVA. El contenido cuántico para cada potencial de placa en el tren de 40 Hz. fue calculado como:

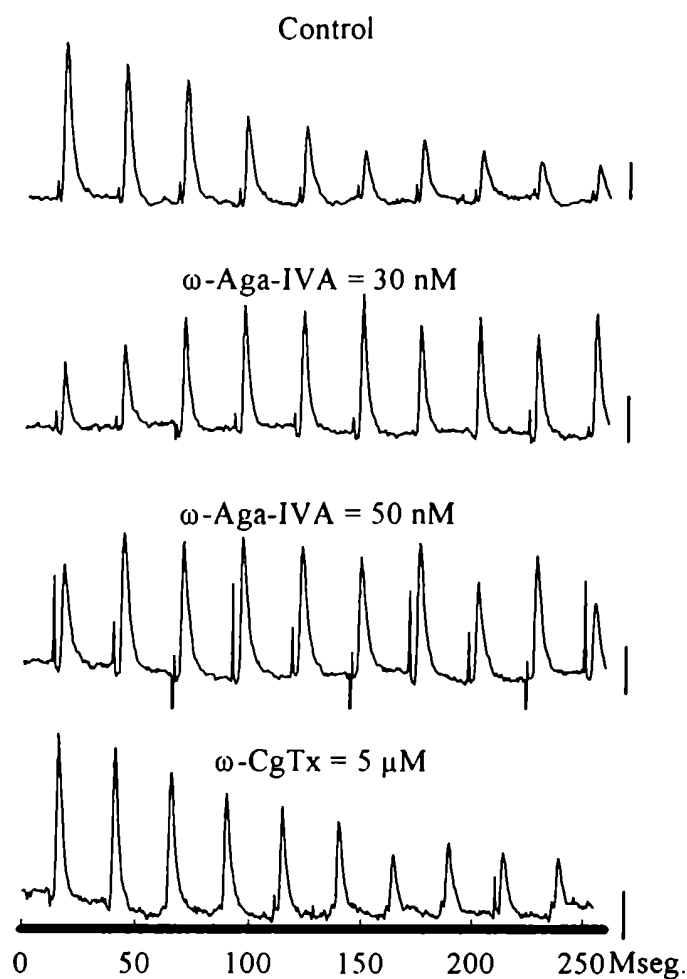
$$\frac{\text{Ampl. pot. placa, 40 Hz.}}{\text{Ampl. pot. placa, 0,5 Hz.}} \times (\text{Contenido cuántico, 0,5 Hz.})$$

Cada punto es el promedio de al menos 8 fibras musculares en dos preparaciones.

En la Figura 15 se observan registros representativos de la amplitud de los potenciales de placa en un tren a alta frecuencia de estimulación.

Por el contrario, en los músculos tratados con  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu$ M, cuando se estimuló con un tren de alta frecuencia se observó un decaimiento en la amplitud de los potenciales de placa, al igual que lo observado en los músculos control (Figura 15).

**Figura 15**



**Figura 15.** Trazos representativos de potenciales de placa evocados por estimulación eléctrica a una frecuencia de estimulación de 40 Hz. en solución Ringer con curare, en presencia de dos concentraciones diferentes del bloqueante de CCVD de tipo P:  $\omega$ -Aga-IVA y en presencia de bloqueante de CCVD de tipo N:  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu$ M. La amplitud de los potenciales de placa es similar en los registros ya que se utilizaron menores concentraciones de curare para paralizar los músculos tratados con  $\omega$ -Aga-IVA.

Concentración de d-Tc ( $\mu$ g/ml):

Control = 1,5

$\omega$ -Aga-IVA = 0,9

$\omega$ -Aga-IVA = 0,35

$\omega$ -CgTx = 1,5

Las barras verticales representan 1 mV.

## CONCLUSIONES

En relación a los resultados descritos en esta sección pueden extraerse las siguientes conclusiones.

Tanto la poliamina FTX, como el polipéptido  $\omega$ -Aga-IVA muestran un efecto bloqueante sobre la contracción muscular evocada por estimulación del nervio. La capacidad inhibitoria de estas toxinas podría estar originada por un efecto de las mismas a nivel presináptico. Esto se puede inferir por la persistente presencia de potenciales de placa miniatura, aun en condiciones de bloqueo total de la transmisión sináptica evocada por actividad del nervio. Otra observación que indica que la FTX estaría actuando sobre algún mecanismo posterior a la llegada del potencial de acción nervioso al terminal sináptico es que las señales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  registradas en el perineuro no fueron afectadas por la FTX.

El efecto bloqueante de las toxinas FTX y  $\omega$ -Aga-IVA sobre el transmisión neuromuscular fue investigado mediante la acción de estas toxinas sobre el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor. Tanto la FTX como la  $\omega$ -Aga-IVA produjeron un decremento dosis dependiente del contenido cuántico. La reducción en el contenido cuántico causada por la FTX fue observada cuando éste fue estimado tanto por el método de las fallas como por el de la varianza en un rango de concentraciones similares.

La dosis inhibitoria al 50% de FTX sobre el contenido cuántico fue de 8 y 16 nl/ml cuando éste fue estudiado por los dos métodos diferentes.

El polipéptido  $\omega$ -Aga-IVA disminuyó el contenido cuántico en forma dosis dependiente, la concentración inhibitoria al 50% ( $\text{Ic}_{50}$ ) sobre el contenido cuántico fue de 10 nM

En contraste, el bloqueante de los CCVD de tipo N,  $\omega$ -CgTx no produjo ningún efecto sobre el contenido cuántico, cuando éste fue estimado por el método de las fallas y por la varianza.

El efecto inhibitorio de los bloqueantes de CCVD de tipo P, FTX y  $\omega$ -Aga-IVA sobre el contenido cuántico, y la falta de efecto del bloqueante  $\omega$ -CgTx observada muestran un perfil farmacológico similar al de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes de tipo P.

## EFFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE LA LIBERACION CUANTICA NO EVOCADA POR ESTIMULACION ELECTRICA

Con el objeto de establecer la relación entre la liberación de neurotransmisor no acoplada con la estimulación eléctrica del nervio y la actividad de los CCVD, se decidió estudiar el efecto de los bloqueantes de los CCVD de tipo P sobre la liberación cuántica espontánea. Se estudió también la acción de los bloqueantes en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y en condiciones de estimulación de la liberación con altas concentraciones de  $\text{K}^+$  extracelular.

### ACCION DE LA POLIAMINA FTX Y SU ANALOGO SINTETICO SFTX, SOBRE LA LIBERACION CUANTICA BASAL.

Se estudió el efecto de la FTX sobre la frecuencia de potenciales de placa miniatura en solución Ringer normal y en solución libre de calcio extracelular. La frecuencia fue medida antes y una hora después del agregado de FTX.

En solución Ringer normal,  $\text{FTX} = 10^{-1} \mu\text{l/ml}$  y  $2 \cdot 10^{-1} \mu\text{l/ml}$  aumentó significativamente la frecuencia de potenciales miniatura. El aumento en la frecuencia fue de 63% y 81% respectivamente. Este cambio en la frecuencia fue revertido al quitar la toxina del medio externo y lavar con solución sin FTX (Figura 16).

Figura 16.

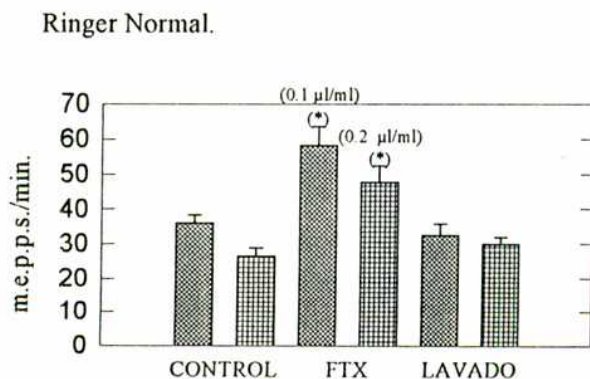
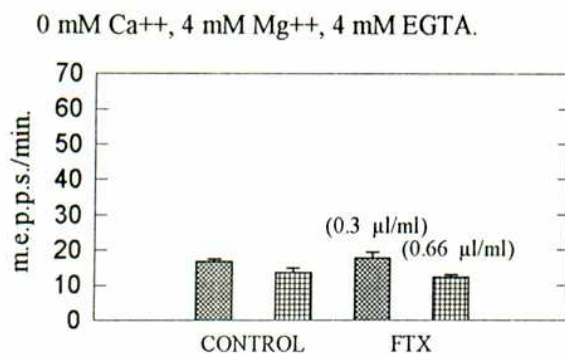


Figura 16. Efecto de la FTX sobre la frecuencia de potenciales de placa miniatura. La frecuencia fue medida en ausencia y 30' después del agregado de FTX. El lavado se efectuó durante 20' con 30 ml. de Ringer. Los distintos rellenos de las barras representan preparaciones diferentes y en cada caso se estudiaron 20 fibras por músculo en cada condición diferente. Entre paréntesis se indican las concentraciones finales. (\*) indica diferencia significativa respecto al control,  $p < 0,001$ , test de Student.

En solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$  se observó una frecuencia de liberación espontánea menor que la observada en Ringer normal. Esta disminución esta originada por la dependencia de la frecuencia de los potenciales miniatura con la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ . (Hubbard y col., 1968). En estas condiciones tras incubar durante una hora con FTX, la frecuencia de potenciales miniatura no fue modificada, aun a  $[\text{FTX}] = 3 \cdot 10^{-1} \mu\text{l/ml}$  y  $6 \cdot 10^{-1} \mu\text{l/ml}$ , siendo estas concentraciones de toxina mayores que las utilizadas en solución Ringer normal, donde si mostraron tener un efecto sobre la frecuencia de potenciales miniatura (Figura 17).

**Figura 17**



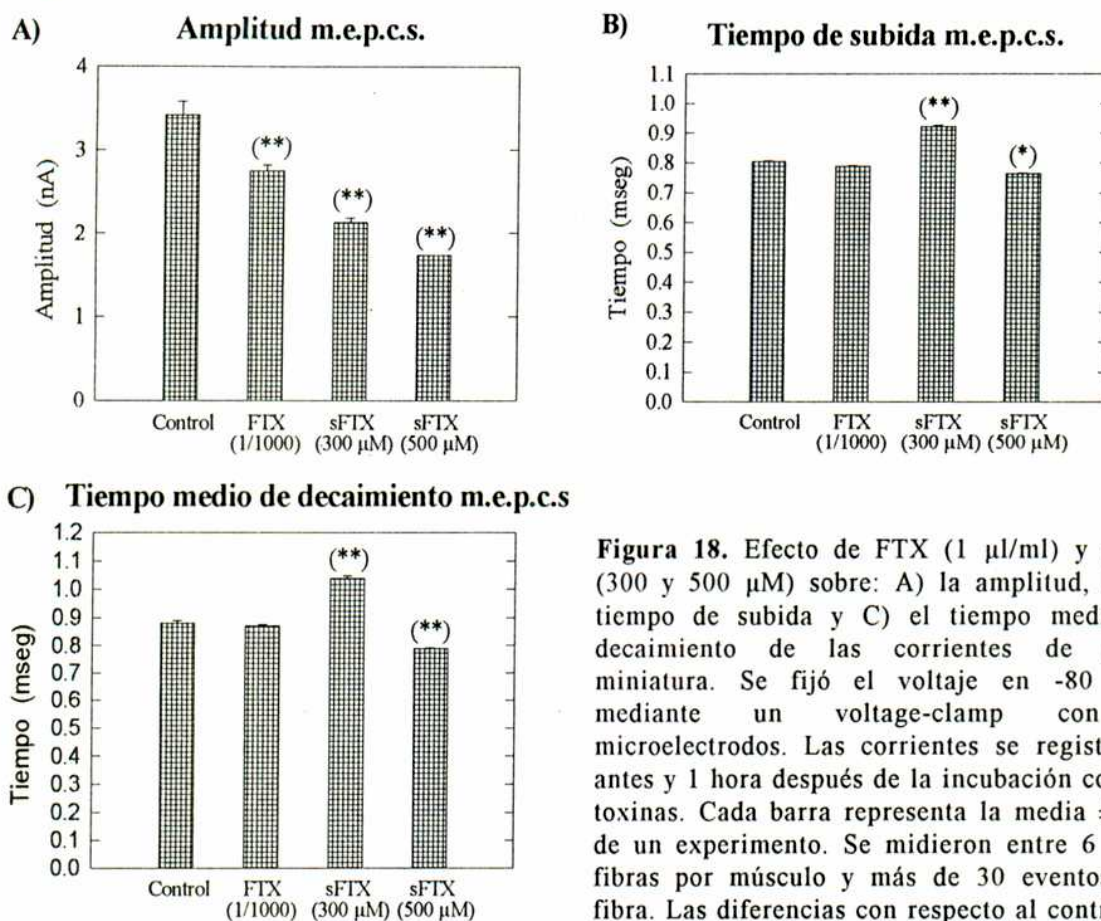
**Figura 17.** Efecto de la FTX sobre la frecuencia de potenciales de placa miniatura en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{ext}}$ . Luego de la disección, los músculos fueron incubados 2 horas en solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . La frecuencia fue medida antes y 30' después del agregado de la toxina.

En solución Ringer normal, la FTX produjo también un efecto reductor sobre la amplitud de los potenciales miniatura. A fin de estudiar esta reducción, se realizaron experimentos de fijación de voltaje en la placa neuromuscular. Con esta técnica se registra la corriente generada en la postsinapsis por la liberación de un cuanto (paquete de neurotransmisor). La fijación de voltaje permite una medición más exacta de la amplitud de los eventos miniatura, ya que el potencial se fijó siempre en  $-80 \text{ mV}$ , así como también del tiempo de subida, dado que se registra directamente la corriente, independizándose de la capacitancia de la célula. El empleo de esta técnica también brinda información acerca del comportamiento cinético de los receptores colinérgicos.

La  $[\text{FTX}] = 1 \mu\text{l/ml}$ , así como también la  $[\text{sFTX}] = 300$  y  $500 \mu\text{M}$ , disminuyeron significativamente la amplitud de las corrientes miniatura de placa. La

amplitud de la corriente fue reducida en forma dosis dependiente cuando se incubó 1 hora en sFTX (Figura 18-a). La FTX no produjo modificaciones sobre el tiempo de subida y el tiempo medio de decaimiento de las corrientes miniatura, mientras que las diferencias observadas con sFTX no fueron consistentes (Figura 18 b y c).

**Figura 18**



**Figura 18.** Efecto de FTX (1 μl/ml) y sFTX (300 y 500 μM) sobre: A) la amplitud, B) el tiempo de subida y C) el tiempo medio de decaimiento de las corrientes de placa miniatura. Se fijó el voltaje en -80 mV, mediante un voltage-clamp con 2 microelectrodos. Las corrientes se registraron antes y 1 hora después de la incubación con las toxinas. Cada barra representa la media ± e.s. de un experimento. Se midieron entre 6 y 10 fibras por músculo y más de 30 eventos por fibra. Las diferencias con respecto al control se indican con: (\*) =  $p < 0,05$  y (\*\*) =  $p < 0,001$ , test de Student.

*ACCION DE LA TOXINA PEPTIDICA ω-AGA-IVA SOBRE LA LIBERACION CUANTICA ESPONTANEA Y ESTIMULADA POR ALTO  $K^+_{EXT}$ .*

Se estudió el efecto de la toxina ω-Aga-IVA sobre la liberación espontánea de neurotransmisor. La frecuencia de potenciales miniatura en estas condiciones ( $25 \pm 3,3$  miniaturas/min.) luego de 30 minutos de incubación en presencia de 100 y 300 nM de ω-Aga-IVA, concentraciones a las que ejerce un potente efecto inhibitorio sobre el contenido cuántico, no fue modificada ( $22 \pm 3,8$  miniaturas/min.). ω-Aga-

IVA, aun a las concentraciones máximas empleadas, tampoco produjo ningún cambio significativo en la amplitud de los potenciales miniatura ni en el potencial de membrana de las fibras musculares.

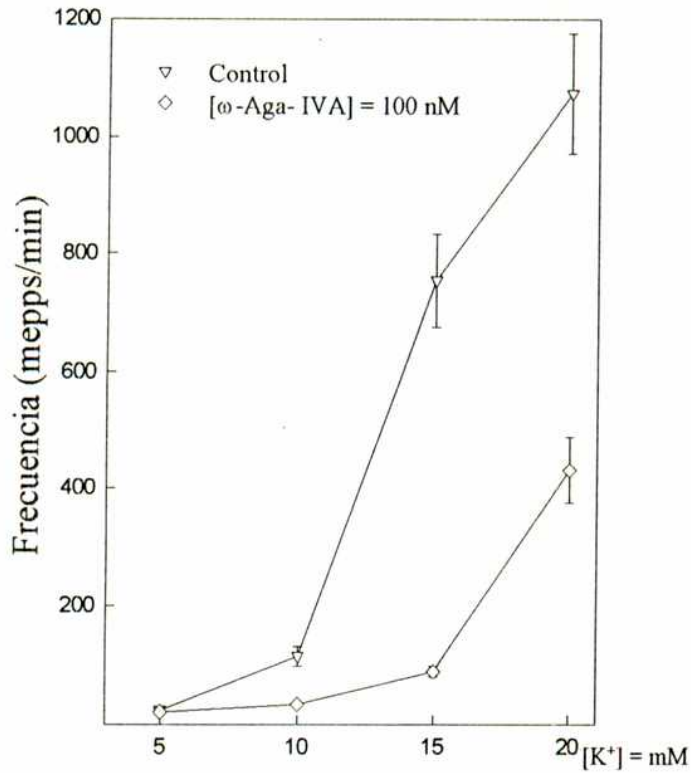
*EFECTO DE LA  $\omega$ -AGA-IVA SOBRE LA LIBERACION CUANTICA ESTIMULADA POR ALTO  $K^+_{EXT}$ .*

El aumento de la concentración de  $K^+_{EXT}$  produce un incremento en la frecuencia de potenciales miniatura. Este incremento podría deberse a un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico por mayor actividad de los CCVD, originada por la despolarización del terminal debido al cambio del potencial de equilibrio para el  $K^+$ .

La  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM disminuyó la frecuencia de los potenciales miniatura a distintas concentraciones de  $K^+$  por encima de 5 mM. El efecto bloqueante de la  $\omega$ -Aga-IVA sobre el aumento en la frecuencia de potenciales de placa miniatura por  $K^+_{EXT} = 10$  mM se pudo evidenciar minutos después de adicionar la toxina al medio, así como también cuando la preparación fue preincubada con  $\omega$ -Aga-IVA y luego se elevó la concentración de  $K^+$  extracelular. La Figura 19 muestra el efecto de 100 nM de  $\omega$ -Aga-IVA sobre la frecuencia de potenciales miniatura a distintas concentraciones de  $K^+_{EXT}$ . El incremento en la frecuencia de potenciales miniatura por el aumento de  $K^+$  fue bloqueado por  $\omega$ -Aga-IVA a partir de  $K^+_{EXT} = 10$  mM. Dado que la frecuencia de potenciales miniatura a concentraciones mayores de 15 mM en ausencia de toxina alcanza valores de gran magnitud, se hizo difícil su estimación por mediciones directas y se requeriría efectuar el análisis del ruido del potencial de membrana en la placa para calcular la frecuencia. Datos de la literatura señalan que la frecuencia de potenciales miniatura a  $K^+_{EXT} = 20$  mM es 1100 por minuto, valor que esta muy por encima de la frecuencia medida en presencia de  $\omega$ -Aga-IVA.



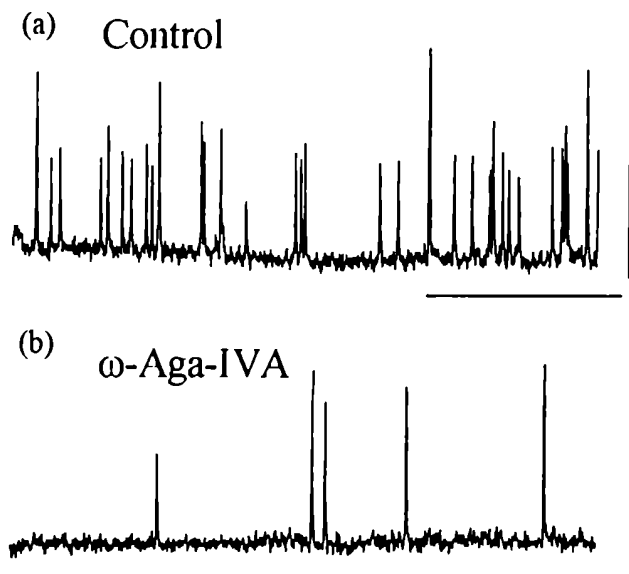
**Figura 19**



**Figura 19.** Efecto de  $\omega$ -Aga-IVA sobre la frecuencia de liberación cuántica de neurotransmisor a diferentes concentraciones de  $K^+_{ext}$ . El valor control para  $K^+ = 20$  mM fue obtenido de la literatura (Bowersox y col., 1994)..

En la Figura 20 se muestran registros del potencial de membrana en solución Ringer con KCl = 15 mM antes (a) y después (b) de  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM.

**Figura 20**

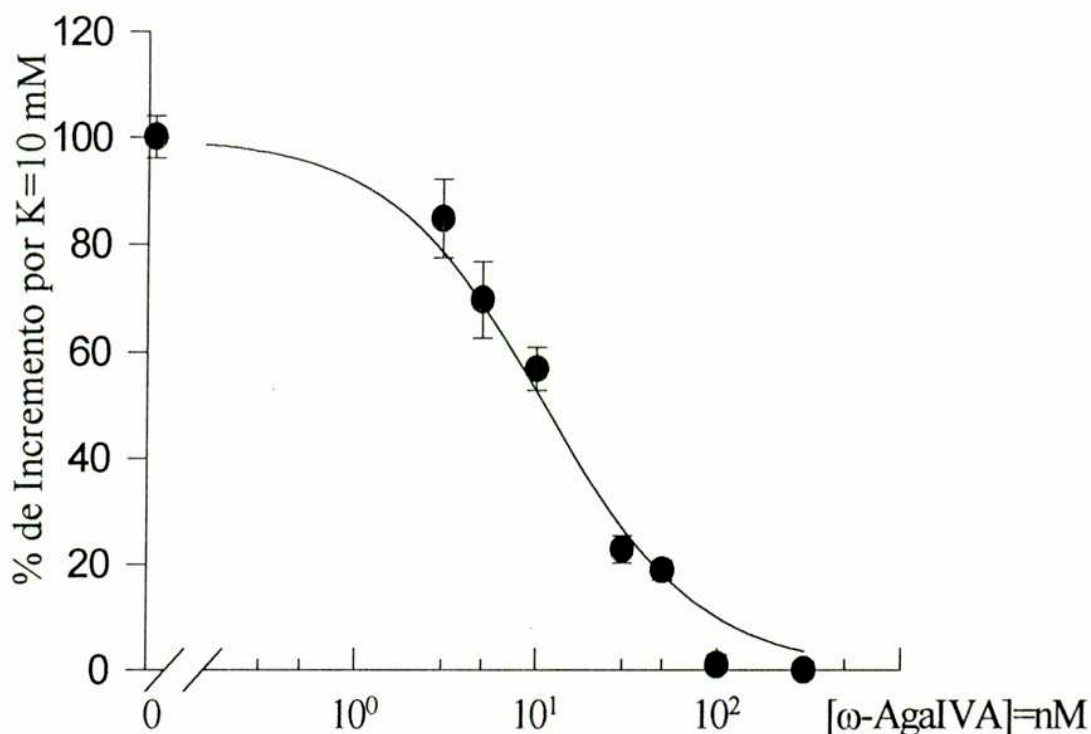


**Figura 20.** Trazos representativos mostrando la ocurrencia de potenciales de placa miniatura en un músculo diafragma incubado en solución Ringer con 15 nM de  $K^+$  antes (trazo superior) y 20 minutos después (trazo inferior) del agregado de  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM al baño. Las barras verticales representan 1 mV. y las horizontales 500 msec.

En vista del efecto bloqueante de la toxina  $\omega$ -Aga-IVA sobre la liberación cuántica estimulada por  $K^+$ , se decidió estudiar la sensibilidad del aumento en la frecuencia de potenciales miniatura a diferentes concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA. Para esto se trabajó con  $[K^+]_{ext.} = 10$  mM, condición en la que se había observado que la frecuencia de potenciales miniatura estaba aumentada aproximadamente un 400 %. Tanto la amplitud de los potenciales miniatura como el potencial de reposo de las fibras musculares no fueron afectados en sus valores medios por diferentes concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA. Se observó que  $\omega$ -Aga-IVA bloqueó el aumento en la frecuencia de potenciales miniatura producido por alto potasio, en forma dosis dependiente en el rango de 3-300 nM. La Figura 21 muestra el porcentaje de aumento de la frecuencia de potenciales miniatura por  $K^+_{ext.} = 10$  mM en presencia de distintas concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA. En cada experimento la toxina fue agregada en dosis crecientes y se partió de diferentes concentraciones iniciales en los distintos experimentos, en los cuales se realizaron entre dos y tres puntos de la curva. La frecuencia en presencia de 100 y 300 nM de  $\omega$ -Aga-IVA fue del mismo orden que en condiciones de  $K^+_{ext.}$  normal, por lo cual se infiere que a estas

concentraciones el exceso de liberación por alto  $K^+$  fue completamente bloqueado. Los puntos experimentales fueron ajustados mediante la ecuación de Hill modificada, y se obtuvo una inhibición al 50% del aumento producido por  $K^+$  a una concentración de  $\omega$ -Aga-IVA = 11,69 nM y un  $n_{Hill} = 1,22$ .

**Figura 21**



**Figura 21.** Efecto de la  $\omega$ -Aga-IVA sobre el incremento en la frecuencia de potenciales miniatura inducido por  $KCl = 10$  mM. Los datos representan la media  $\pm$  e.s. de un mínimo de 18 fibras musculares para cada punto. La línea es el resultado del ajuste a la ecuación modificada de Hill

$$[y=(100-\text{min})/(1+(x/k)^{n_{Hill}})+\text{min}.$$

Donde min es la frecuencia control, que no fue modificada aun por las concentraciones máximas de  $\omega$ -Aga-IVA.  $Ic_{50} = 11,69$ ;  $n_{Hill} = 1,22$  y  $R_{\text{squared}} = 0,9970$

## CONCLUSIONES

El bloqueante de los CCVD de tipo P, FTX produjo un aumento en la frecuencia de liberación espontánea de neurotransmisor en solución Ringer normal. Este incremento sería dependiente de  $[Ca^{2+}]_{ext.}$ , ya que en medio libre de  $Ca^{2+}$  no se observó modificación en la frecuencia de los mismos.

En relación a esta acción, la FTX disminuyó la amplitud de las corrientes sinápticas miniatura sin modificar el curso temporal de las mismas. Asimismo se observó que la FTX no modifica la sensibilidad de los receptores colinérgicos frente a la aplicación iontoforética de Ach. Los resultados con sFTX sobre el tiempo medio de decaimiento no son consistentes en mostrar si estaría actuando sobre la postsinapsis.

La  $\omega$ -Aga-IVA no produjo ninguna modificación sobre la liberación espontánea basal. Sin embargo, cuando se estimuló la liberación en medio con alto  $K^+$ , se observó que produjoun potente efecto bloqueante sobre la liberación.

La  $\omega$ -Aga-IVA produjo una inhibición dosis dependiente del aumento en la frecuencia de potenciales de placa miniatura producido por  $K^+ = 10$  mM. La dosis inhibitoria al 50 % del incremento de la estimulación por  $K^+$  fue de 11,69 nM, y el  $n_{Hill}$  obtenido por el ajuste a la ecuación de Hill modificada fue 1,22.

## CORRIENTES PRESINAPTICAS

En las secciones previas se han descrito los efectos producidos por los bloqueantes de CCVD de tipo P, FTX y  $\omega$ -Aga-IVA sobre fenómenos dependientes del influjo de calcio en los terminales nerviosos. Si bien está demostrado que tanto el contenido cuántico como la frecuencia de potenciales de placa miniatura reflejan el grado de actividad de los canales de  $Ca^{2+}$ , los mismos no son una medida directa del influjo de  $Ca^{2+}$  en el terminal sináptico.

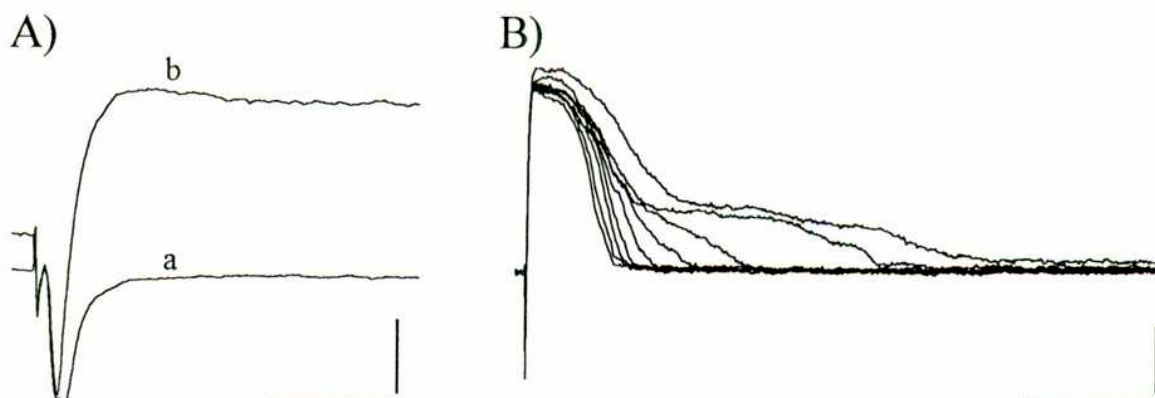
Con el advenimiento de las técnicas de fijación de voltaje en microareas de membrana (-"Patch-clamp"- Hamill y col., 1981), se logró identificar a los canales involucrados en la actividad eléctrica en numerosas preparaciones. Sin embargo, dado el reducido tamaño de los terminales nerviosos motores, no ha sido posible realizar en los mismos registros de actividad de canales de tipo unitaria, ni de tipo "whole-cell recording" en los botones sinápticos.

Mediante la técnica de registros perineurales es posible observar los cambios de conductancia en el terminal. Al insertar un microelectrodo en el perineuro, se registra un potencial que puede oscilar entre -3 y -9 mV. y tras la estimulación del nervio se observan cambios en el potencial debidos al flujo de las corrientes transmembranales a través de la resistencia del perineuro. Es, por tanto, éste, un registro indirecto de la corriente, ya que, si bien no hay fijación de voltaje, refleja el flujo de iones a través de la membrana. En este tipo de registros se observa la suma de la actividad eléctrica simultánea de varios botones sinápticos cercanos al sitio de inserción del electrodo.

#### *CARACTERIZACION DE LAS SEÑALES ELECTRICAS ORIGINADAS EN LOS TERMINALES MOTORES.*

La inserción de un microelectrodo en el perineuro permite registrar la actividad eléctrica promovida por la estimulación del nervio. En una solución Ringer normal en presencia de d-Tc = 30  $\mu$ M, para evitar contribuciones postsinápticas que contaminen la señal del nervio, se observa una deflexión negativa como resultado de la estimulación del nervio. Esta señal es debida a la descarga capacitiva de la despolarización debida a la entrada de  $\text{Na}^+$  en los nodos preterminales y a la salida de  $\text{K}^+$  en el terminal (Mallart, 1985). La adición de los bloqueantes TEA y 3,4-DAP suprime el componente tardío de la deflexión negativa de la respuesta preterminal. En la Figura 22-A) se observa el efecto de los bloqueantes de los canales de  $\text{K}^+$  voltaje y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes sobre una corriente registrada en presencia de d-Tc. El bloqueo de las conductancias de  $\text{K}^+$  hace que se evidencie la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que tiene sentido contrario, a la vez que la despolarización sostenida hace que la misma se prolongue, generándose, de esta forma un fenómeno de tipo regenerativo. El componente positivo de la señal que estaría llevado por  $\text{Ca}^{2+}$  sufre una reducción tanto en la amplitud como en la duración por la estimulación a alta frecuencia (Figura 22-B)), tal como fue descrito por Penner y Dreyer (1986), la cual posiblemente está originada por inactivación de los CCVD por acumulación de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{intr.}}$  o por voltaje.

**Figura 22**



**Figura 22.** Corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$ . A) Señal registrada en el perineuro tras la estimulación eléctrica del nervio en presencia de d-Tc = 30  $\mu\text{M}$  (trazo a) y luego de agregar al baño los bloqueantes de  $\text{K}^+$ , TEA = 30 mM y 3,4-DAP = 1 mM (trazo b). B) Bloqueo de las corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$  por estimulación a alta frecuencia (1 Hz.). Las señales disminuyen en amplitud y duración con los sucesivos estímulos (10 estímulos). Las barras verticales son 1 mV, y las horizontales: en A) 5 msec. y en B) 100 msec.

## **EFFECTO DE LOS BLOQUEANTES DE LOS DE CCVD SOBRE LAS CORRIENTES DE $\text{Ca}^{2+}$**

En base a la sensibilidad farmacológica del fenómeno de liberación de neurotransmisor en la placa motora, los canales que median el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal nervioso serían del tipo P. Penner y Dreyer (1986) observaron que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de larga duración son insensibles a los bloqueantes de CCVD de tipo L nitrendipina y nifendipina. Como un mayor acercamiento a la caracterización de estos canales, se estudió el efecto de los bloqueantes de CCVD de tipo P y N sobre las corrientes perineurales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Otro aspecto interesante de este estudio, fue analizar la existencia de un correlato en el perfil farmacológico entre las corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación evocada por estimulación eléctrica.

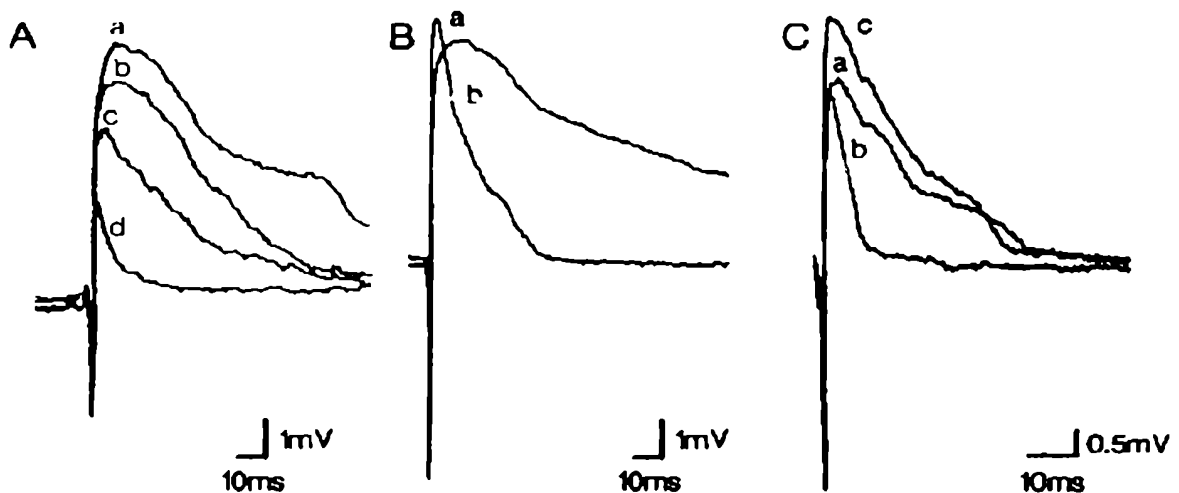
### *ACCION DE LA FTX Y SFTX SOBRE LAS CORRIENTES DE $\text{Ca}^{2+}$ .*

La poliamina FTX tuvo un efecto bloqueante sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de larga duración, reduciendo tanto la amplitud como la duración de las mismas. Se observó una disminución de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  desde diluciones  $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{l/ml}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$

$\mu\text{l/ml}$  hasta  $1 \mu\text{l/ml}$ . La potencia del bloqueo fue dosis dependiente y a concentraciones mayores se observó el bloqueo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en menos tiempo.

En la Figura 23-A) se observa la sensibilidad del componente positivo al bloqueante inorgánico de CCVD,  $\text{Cd}^{2+} = 500 \mu\text{M}$ . En la parte B) se observa la reducción sobre la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  causada por la adición de FTX a una señal control. En la Figura 23-C (a) puede observarse una corriente presináptica control y en (b) la reducción en la fase positiva de la corriente que se produce después de la adición de sFTX =  $300 \mu\text{M}$ , el bloqueo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  fue revertido al aumentar a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}} = 6 \text{ mM}$  (c). A concentraciones mayores de FTX ( $1 \mu\text{l/ml}$ ) solo un breve pico positivo permaneció, el cual no fue bloqueado por  $\text{Cd}^{2+} = 15 \text{ mM}$ , lo que indica que esa parte de la señal no dependería de  $\text{Ca}^{2+}$ . De acuerdo con Konishi (1985) esa breve señal positiva podría ser un remanente de la señal de  $\text{Na}^+$ .

**Figura 23**



**Figura 23.** Efecto de  $\text{Cd}^{2+}$ , FTX y sFTX en las corrientes presinápticas. Los registros fueron en solución Ringer normal más d-Tc =  $30 \mu\text{M}$ , TEA =  $10 \text{ mM}$ , 3,4-DAP =  $250 \mu\text{M}$  y procaina =  $100 \mu\text{M}$ . A) Antes (a) y 30, 60 y 90 seg. después (trazos b-d) de la adición de  $\text{Cd}^{2+} = 500 \mu\text{M}$ . B) Antes y 3 min. después de la adición de FTX =  $0,5 \mu\text{l/ml}$ . C) Antes (trazo a) y después (trazo b) de la adición de sFTX =  $300 \mu\text{M}$ . En el trazo c, se elevó  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$  a  $6 \text{ mM}$  en presencia de sFTX.

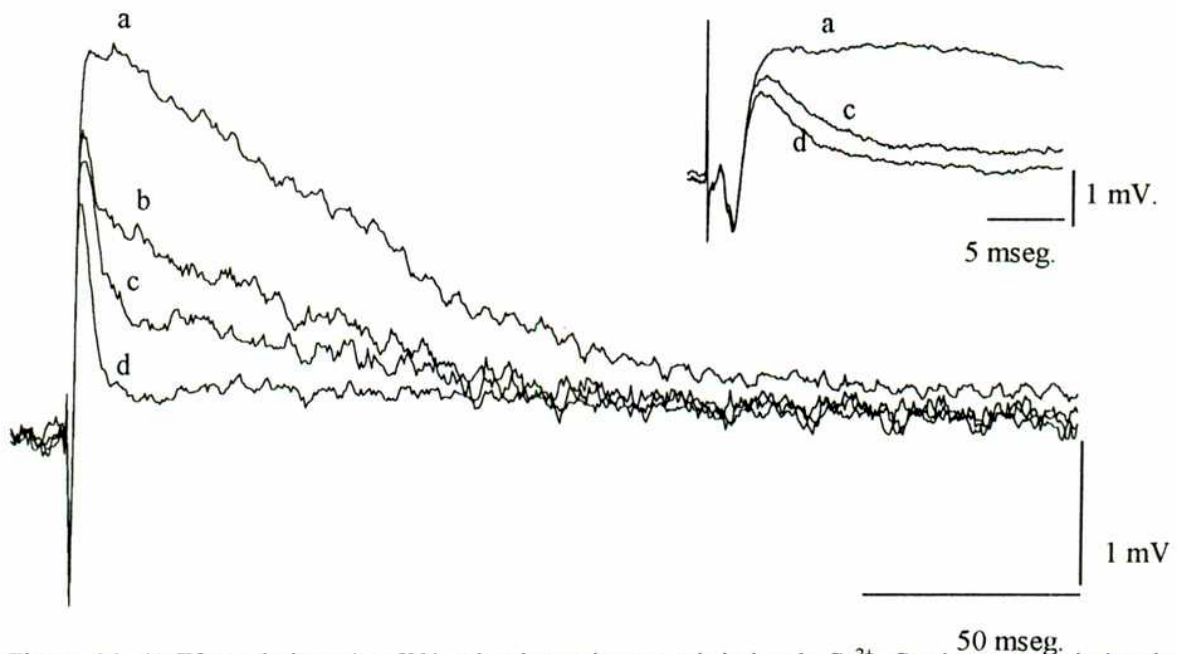
*ACCION DE LA  $\omega$ -AGA-IVA. SOBRE LAS CORRIENTES DE  $\text{Ca}^{2+}$ .*

Se estudió el efecto del polipéptido  $\omega$ -Aga-IVA, sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de los terminales motores. Cuando se probó la acción de la toxina  $\omega$ -Aga-IVA sobre



las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  del preterminal nervioso, se observó un bloqueo de las mismas, que consistió en una disminución de la amplitud y duración de la señal positiva. A una concentración de  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM, a los tres minutos de agregada la toxina se observó una reducción de la corriente, este bloqueo fue mayor a medida que paso el tiempo (Figura 24, a,b,c,d).  $\omega$ -Aga-IVA no modificó la señal negativa temprana (Figura 24-inserto). El bloqueo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM, fue sólo parcialmente revertido aumentando el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a 6 mM y lavando la toxina del baño con solución de registro durante 48 minutos (Figura 25). Este tratamiento logró recuperar hasta  $\cong$  18% de la señal control, partiendo de un bloqueo del 91% de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Figura 24**



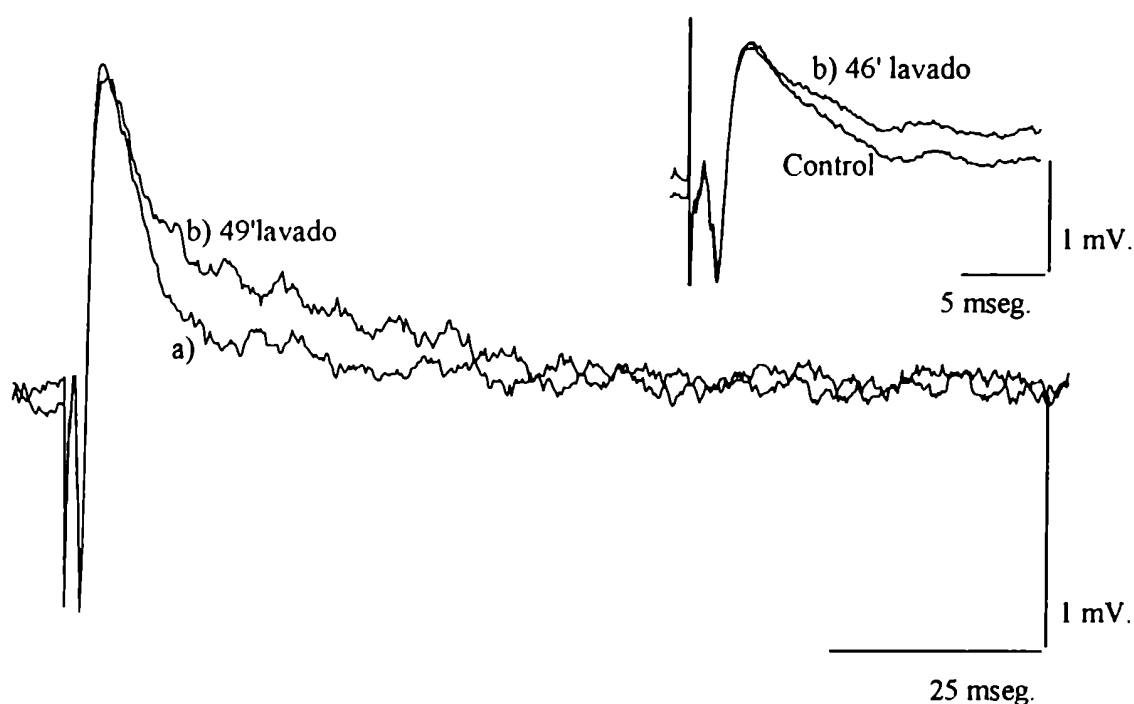
**Figura 24.** A) Efecto de la  $\omega$ -Aga-IVA sobre la corriente presináptica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Corriente presináptica de  $\text{Ca}^{2+}$  antes (trazo a) y 3, 6 y 9 minutos después del agregado de  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM (trazo b, c y d). En el inserto se observan las mismas corrientes ( a y c) a una escala de tiempo expandida, donde se puede observar la reducción del componente positivo (originado por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ ), mientras que la señal negativa ( corriente de  $\text{Na}^+$ ) no fue afectada. En todos los casos se muestran registros de corrientes únicas.

En la siguiente Tabla se muestra el porcentaje de la señal positiva llevada por  $\text{Ca}^{2+}$  antes y a distintos tiempos después de agregar  $\omega$ -Aga-IVA = 100 nM.

**Tabla 1**

Control	100%
$\omega$ -Aga-IVA (100 nM)	
3 minutos	52,35
6 " "	37,23
9 " "	11%

**Figura 25**

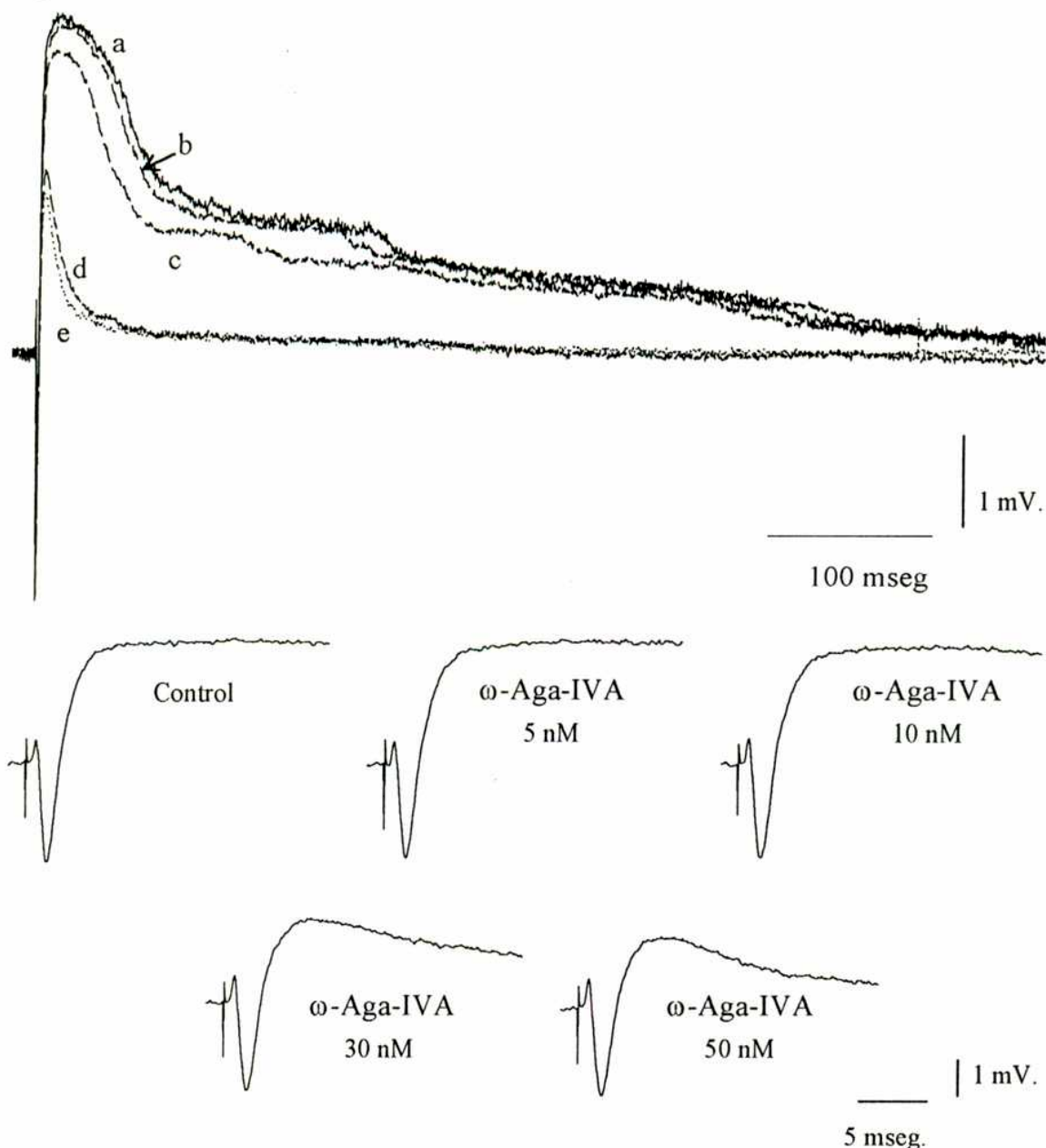


**Figura 25.** El trazo a muestra una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  bloqueada por 100 nM de  $\omega$ -Aga-IVA y en b) se puede observar la recuperación parcial de la misma luego de aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a 6 mM y lavar la toxina del baño con solución de registro durante 48 minutos. En el inserto se observan las mismas corrientes a una escala de tiempo expandida, donde se puede apreciar que casi no hubo modificación en la corriente de  $\text{Na}^+$ , durante el periodo de lavado. En todos los casos se muestran registros de corrientes únicas.

Se estudió el efecto de distintas concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . En una preparación no se observó modificación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración de 3 nM, luego de 20 minutos de incubación. El incremento de la concentración de toxina a 5 nM produjo una pequeña disminución de la señal positiva llevada por iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentraciones de 10, 30 y 50 nM redujeron progresivamente la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la Figura 26 puede observarse el bloqueo de la

corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por concentraciones crecientes de  $\omega$ -Aga-IVA, mientras que no hubo modificación en la señal de  $\text{Na}^+$ .

**Figura 26**



**Figura 26.** Efecto de dosis crecientes de  $\omega$ -Aga-IVA sobre la corriente presináptica de  $\text{Ca}^{2+}$  de los terminales motores. Parte superior: Registros obtenidos en presencia de distintas concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA (5, 10, 30 y 50 nM). En el bloque inferior se muestran en escala de tiempo expandida la señal control y los registros correspondientes luego de al menos 20 minutos después de la aplicación de 5, 25 minutos luego de aumentar a 10 nM, 25 minutos tras llevar a 30 nM y 15 minutos luego de incrementar hasta 50 nM de  $\omega$ -Aga-IVA. Puede observarse que la fase negativa de la corriente permaneció casi constante a lo largo de todos los cambios de concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA (1 hora 20 minutos).

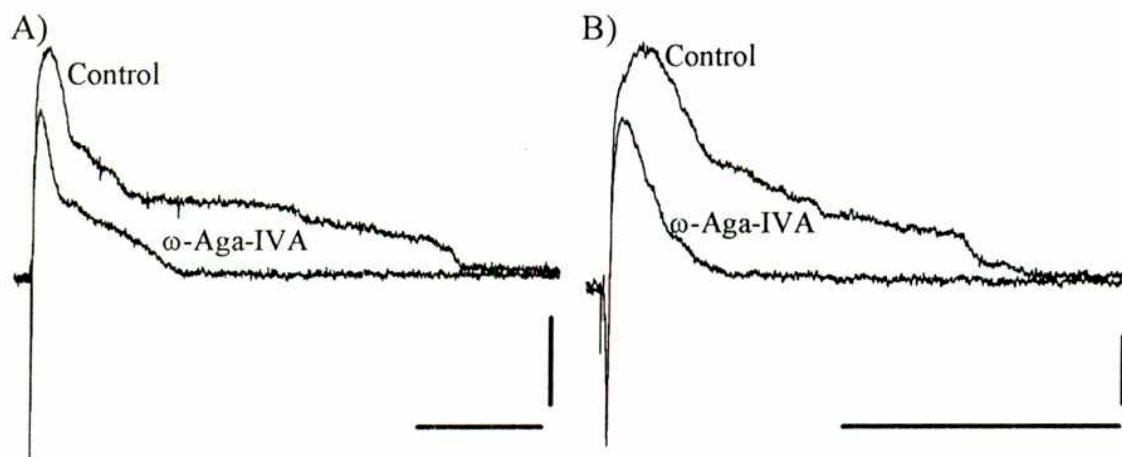
En la Tabla 2 se observa el porcentaje del área de la señal control de  $\text{Ca}^{2+}$ , luego del agregado de las distintas concentraciones de toxina.

**Tabla 2**

	Área (mV x mseg.)	% del Control
Control	707	100
$\omega$ -Aga-IVA (nM)		
5	696	98
10	573	81
30	86	12,16
50	82	11,6

En otros dos experimentos la incubación con  $[\omega\text{-Aga-IVA}] = 3 \text{ nM}$ , tampoco produjo modificaciones en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que a una concentración de 10 nM se observó un efecto bloqueante muy potente (Figura 27). En estos otros dos experimentos el área remanente de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  luego del agregado de toxina fue de 17,8 y 23,55 % respectivamente.

**Figura 27**



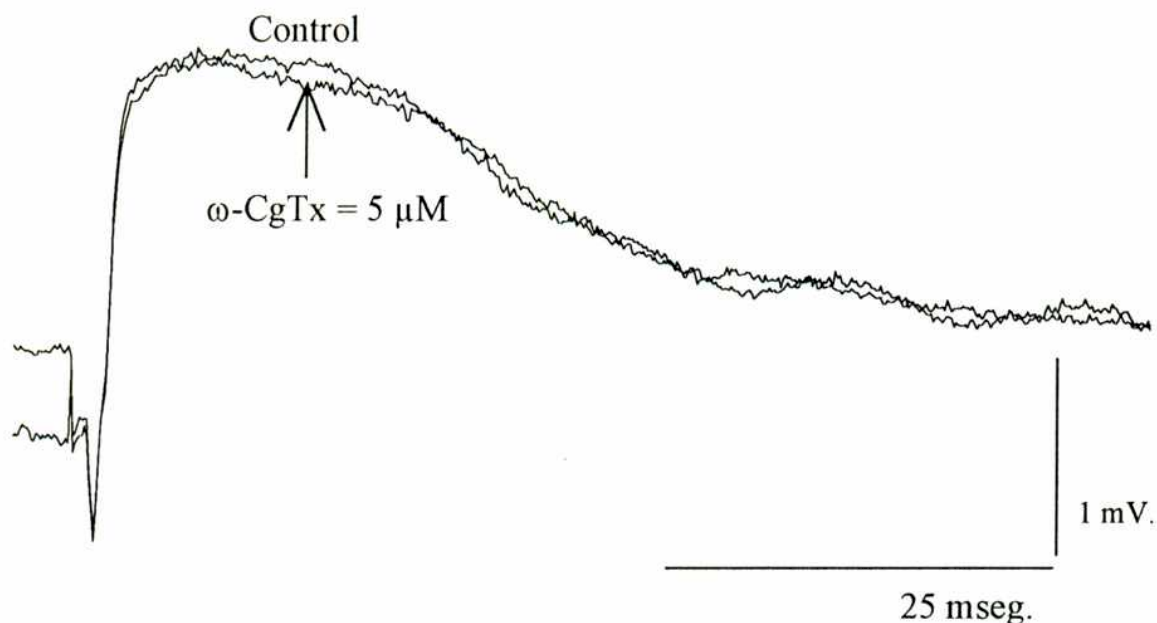
**Figura 27.** Efecto de la toxina  $\omega\text{-Aga-IVA} = 10 \text{ nM}$ , sobre las corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$  de los terminales motores. A) Se obtuvo una señal control, a la cual se le agregó  $\omega\text{-Aga-IVA} = 3 \text{ nM}$  y durante 20 minutos no modificó la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , luego se llevo a una concentración final de 10 nM. El trazo de menor amplitud y duración fue tomado 24 minutos después de llevar a  $\omega\text{-Aga-IVA} = 10 \text{ nM}$ . B) Luego de tener una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  estable durante 25', se llevo a  $\omega\text{-Aga-IVA} = 3 \text{ nM}$ , concentración a la que no se vió efecto alguno. La corriente de menor amplitud y duración se obtuvo 16' después de llevar a  $\omega\text{-Aga-IVA} = 10 \text{ nM}$ . Los registros son trazos únicos de corrientes. La frecuencia de estimulación fue de 0,002 Hz. Las barras verticales representan 1 mV, las horizontales: 100 mseg.

Tomando en conjunto los valores obtenidos para  $\omega$ -Aga-IVA = 10 nM, en el bloqueo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , se obtuvo un promedio de  $40,8 \pm 20$  (n = 3).

*ACCION DE LA  $\omega$ -CGTX. SOBRE LAS CORRIENTES DE  $\text{Ca}^{2+}$ .*

El agregado del bloqueante de CCVD de tipo N,  $\omega$ -CgTx al baño en una concentración de 5  $\mu\text{M}$  durante más de 20 minutos no tuvo ningún efecto sobre la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 28), ni sobre el componente negativo de corriente debido a la entrada de  $\text{Na}^+$ .

**Figura 28**



**Figura 28.** Efecto del bloqueante de CCVD  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$  del perineuro. Los registros fueron realizados en presencia de d-Tc = 30  $\mu\text{M}$ , TEA = 10 mM y 3,4-DAP = 250  $\mu\text{M}$ . Se muestra una señal control y el registro de la corriente en el mismo sitio en presencia de  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu\text{M}$  luego de 35 minutos de incubación con dicha toxina.

## CONCLUSION

Se observó que las toxinas bloqueantes de CCVD de tipo P, FTX y  $\omega$ -Aga-IVA bloquean las corrientes de  $Ca^{2+}$  del terminal nervioso evocadas por estimulación nerviosa. Tanto la FTX (y su análogo sintético, sFTX) como la  $\omega$ -Aga-IVA redujeron la fase positiva de las señales que se registran en el perineuro en respuesta a la estimulación eléctrica, sin modificar el componente negativo de la señal. Esto indica que las toxinas están actuando a nivel de la entrada de  $Ca^{2+}$  en el terminal sináptico, sin modificar la propagación del potencial de acción.

Si bien existe dispersión en los valores obtenidos con  $\omega$ -Aga-IVA = 10 nM, el porcentaje del área sobre la señal control fue de aproximadamente  $40 \pm 20 \%$ .

De acuerdo con la falta de efecto de la  $\omega$ -CgTx sobre los fenómenos de liberación dependientes del influjo de  $Ca^{2+}$  en los terminales nerviosos, no se observó ningún efecto de esta toxina sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  de los terminales motores.

## EFECTO DE LOS BLOQUEANTES DE CCVD SOBRE LA CORRIENTE DE K<sup>+</sup> ACTIVADA POR Ca<sup>2+</sup>

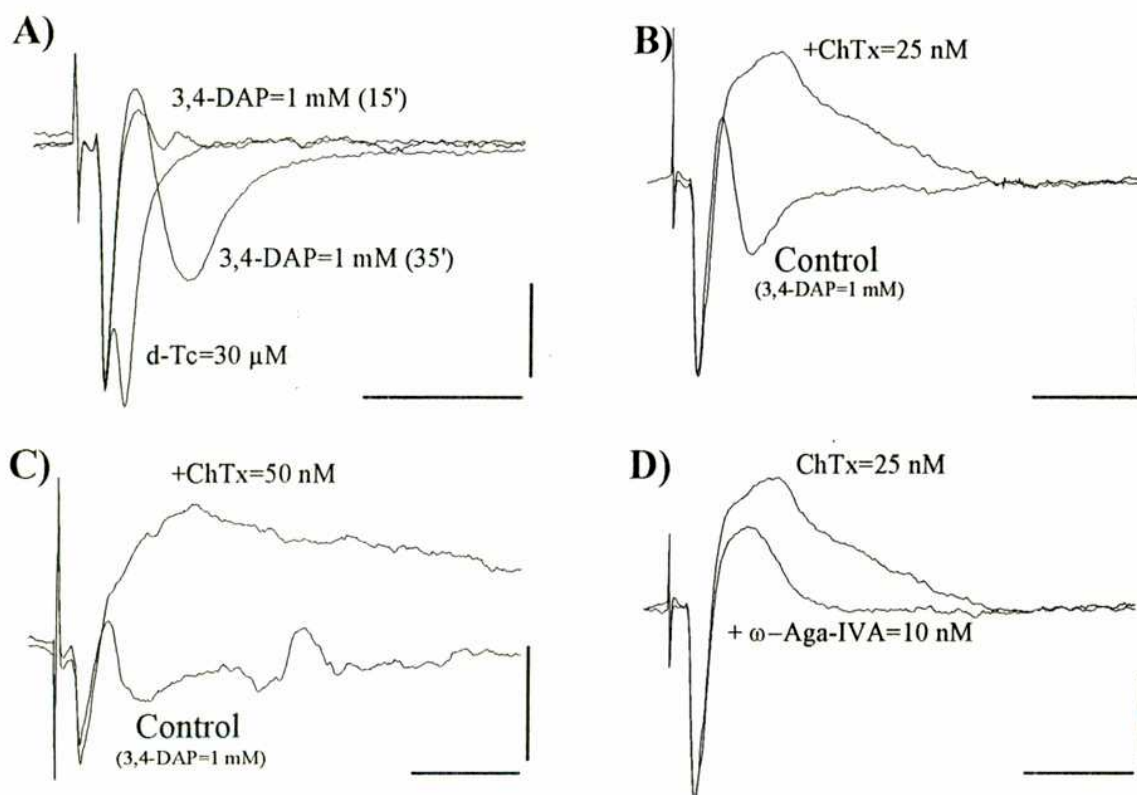
La corriente de K<sup>+</sup> en los terminales nerviosos esta generada por la activación de al menos dos poblaciones de canales de membrana, con diferente cinética de activación y sensibilidad diferencial a TEA y 3,4-DAP. El componente temprano de la I<sub>K</sub> corresponde a una corriente de K<sup>+</sup> activada por voltaje, mientras que el segundo a la corriente de K<sup>+</sup> activada por Ca<sup>2+</sup> y modulada por voltaje (I<sub>K(Ca)</sub>) (Mallart, 1984). Esta última ha sido caracterizada y se encontró que su amplitud depende de la concentración de Ca<sup>2+</sup> del medio extracelular así como también de la concentración de K<sup>+</sup> externa y es bloqueada por TEA, Ba<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> (Mallart, 1985, 1984). A su vez, esta I<sub>K(Ca)</sub> es bloqueada por la Caribdotoxina (ChTx), una toxina peptídica purificada a partir del veneno del escorpión israelí, *Leiurus Quinquestriatus hebraeus*, un bloqueante de los canales de K<sup>+</sup> activados por calcio de alta conductancia; y es insensible a la Apamina, una toxina peptídica extraída del veneno de abejas, que bloquea los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de baja conductancia (Anderson 1988, Harvey, 1989).

Los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> pueden ser activados por iones Ca<sup>2+</sup> que se liberan de reservorios intracelulares (Trautmann y Marty, 1984), pero en la mayoría de las situaciones experimentales, los aumentos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> se logra por inyección de Ca<sup>2+</sup> o bien por un influjo a través de CCVD. La dificultad de acceder a los terminales presinápticos, hace que no hayan numerosos reportes de este tipo de canales en dichas preparaciones.

La presencia de esta conductancia de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup> en los terminales motores y la dependencia de la misma con la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ext.</sub>, nos llevaron a estudiar si la activación de esta conductancia era debida al incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>int</sub> por entrada a través de los CCVD y a la vez a intentar caracterizar desde un punto de vista farmacológico esos CCVD.

Los registros en el perineuro de la actividad eléctrica en respuesta a la estimulación nerviosa en condiciones de bloqueo de la respuesta postsináptica, muestran una señal negativa con un doble pico, donde el primero corresponde a  $\text{Na}^+$  y el segundo a  $\text{K}^+$ . Al agregar 3,4-DAP = 1 mM es posible observar la reducción en amplitud de la corriente de  $\text{K}^+$  original a la vez que aparece un componente de corriente negativa más tardía y con un tiempo de decaimiento más prolongado. Esta corriente tardía es bloqueada por la ChTx (Figura 29) y su bloqueo produce la aparición de una fase positiva en las corrientes. La fase positiva originada por el bloqueo de la conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  es parcialmente reducida al agregar  $\omega$ -Aga-IVA = 10 nM (Figura 29).

**Figura 29**

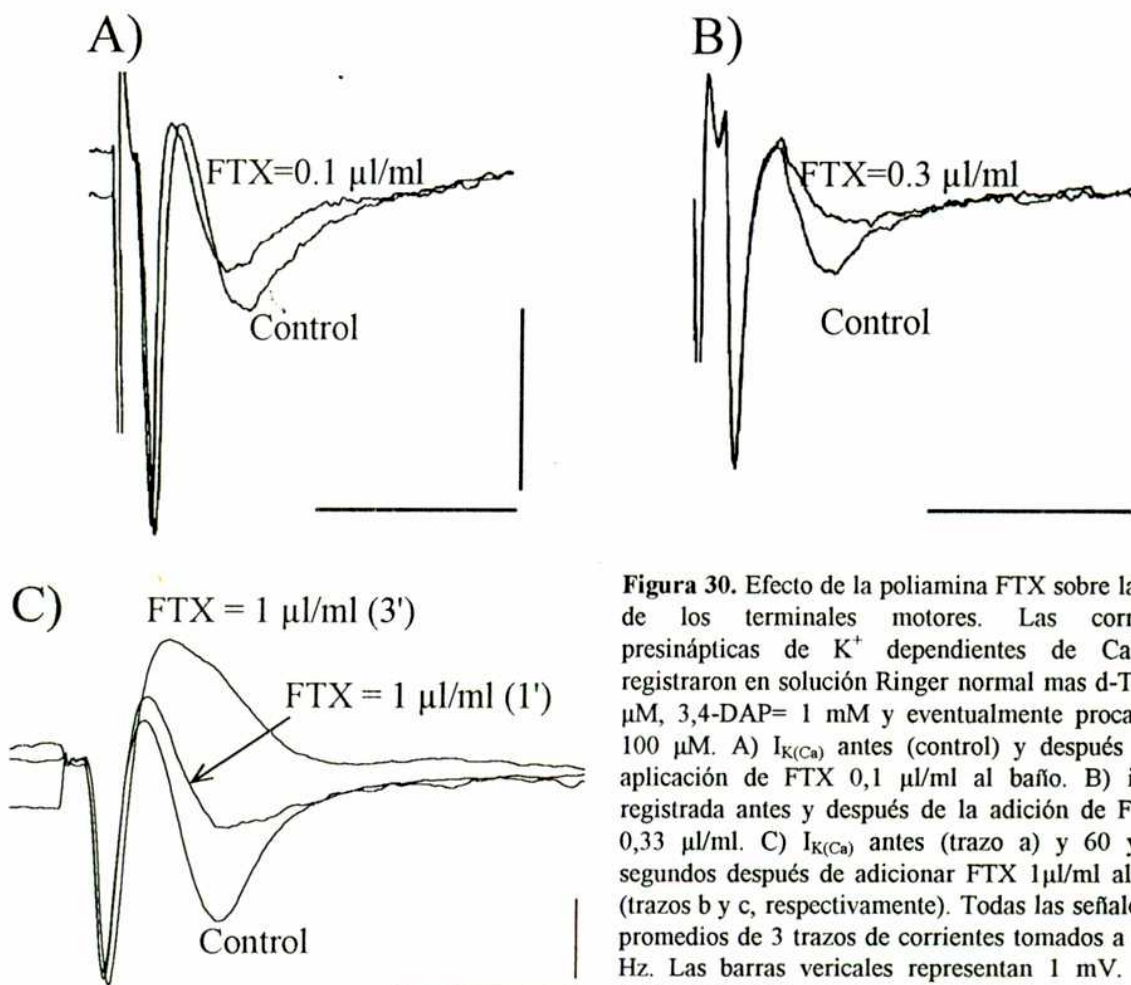


**Figura 29.** Generación de la  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  y sensibilidad a la ChTx. A) Se puede observar la corriente registrada en presencia de d-Tc = 30  $\mu\text{M}$  (trazo a) 15 y 35 minutos después de adicionar al medio el bloqueante de los canales de  $\text{K}^+$  voltaje dependientes 3,4-DAP = 1 mM. B) Bloqueo de la  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  por ChTx = 25  $\mu\text{M}$ . C) ChTx = 50  $\mu\text{M}$  produce un bloqueo aun mayor. En ambos casos (B y C), luego del agregado de ChTx se observa la aparición de una corriente de sentido contrario a las de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . D) La fase positiva que aparece luego de bloquear la  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  es reducida por  $\omega$ -Aga-IVA = 10 nm (15 minutos). Barras verticales: 1 mV., barras horizontales: 5 msec.

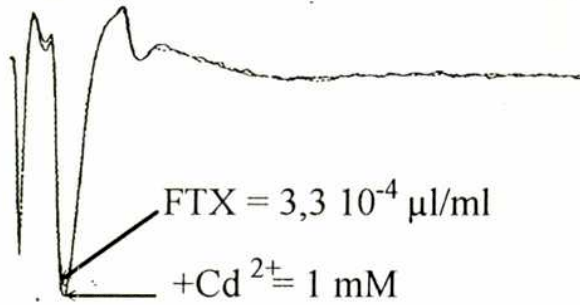


En base a las características descritas en la Figura 29 y a la detallada caracterización realizada por Mallart (1985), se puede concluir que en presencia de 3,4-DAP = 1 mM, la deflexión negativa tardía que se observa corresponde a la corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$  ( $I_{K(Ca)}$ ). Se encontró que la poliamina FTX bloqueó la corriente de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  a concentraciones  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $3,33 \cdot 10^{-4}$  y  $1 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{l/ml}$  (Figura 30 a,b,c). El bloqueo de la  $I_{K(Ca)}$  por FTX =  $3,3 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{l/ml}$  fue total, dado que la posterior adición de  $Cd^{2+}$  no produjo ninguna modificación en la señal (Figura 31).

**Figura 30**

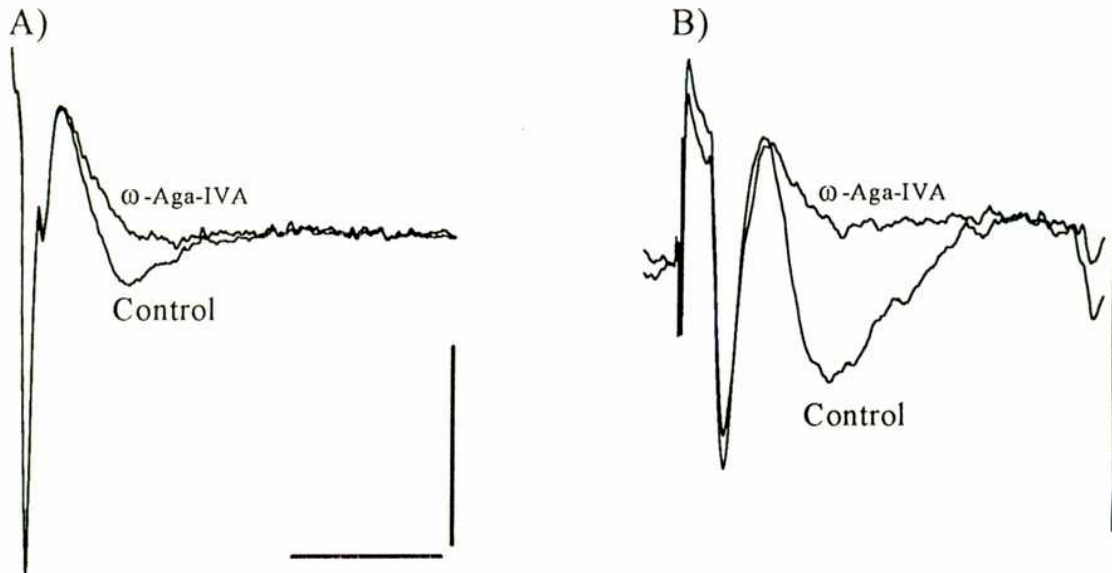


**Figura 30.** Efecto de la poliamina FTX sobre la  $I_{K(Ca)}$  de los terminales motores. Las corrientes presinápticas de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  se registraron en solución Ringer normal mas d-Tc= 30  $\mu\text{M}$ , 3,4-DAP= 1 mM y eventualmente procaina = 100  $\mu\text{M}$ . A)  $I_{K(Ca)}$  antes (control) y después de la aplicación de FTX 0,1  $\mu\text{l/ml}$  al baño. B)  $i)I_{K(Ca)}$  registrada antes y después de la adición de FTX = 0,33  $\mu\text{l/ml}$ . C)  $I_{K(Ca)}$  antes (trazo a) y 60 y 180 segundos después de adicionar FTX 1 $\mu\text{l/ml}$  al baño (trazos b y c, respectivamente). Todas las señales son promedios de 3 trazos de corrientes tomados a 0,033 Hz. Las barras vericales representan 1 mV. y las horizontales 5 mseg.

**Figura****31**

**Figura 31.** Efecto del Cd<sup>2+</sup> bloqueante inórganico inespecífico para CCVD sobre una corriente de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup> previamente bloqueada con FTX =  $3,3 \cdot 10^{-4}$  µl/ml. Los trazos son el promedio de 3 corrientes tomadas a 0,033 Hz.

Se estudió el efecto de la toxina peptídica ω-Aga-IVA sobre las corrientes perineurales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Se observó que ω-Aga-IVA disminuyó la segunda deflexión negativa, producida por la actividad de los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> en una concentración 10 nM (Figura 32-A)) y produjo una mayor reducción cuando se incremento su concentración a 30 nM. A una concentración de 50 nM de ω-Aga-IVA la I<sub>K(Ca)</sub> fue completamente bloqueada luego de pocos minutos de incubación en presencia de toxina (Figura 32-B)).

**Figura 32**

**Figura 32.** Efecto de la toxina bloqueante de CCVD de tipo P sobre las corrientes de K<sup>+</sup> activadas por Ca<sup>2+</sup>. Las corrientes presinápticas de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> se registraron en solución Ringer normal mas d-Tc= 30 µM, 3,4-DAP= 1 mM y eventualmente procaína = 100 µM. A) Corriente control y después del agregado de ω-Aga-IVA = 10 nM. B) Corriente control y luego del agregado de ω-Aga-IVA = 50 nM. Los trazos son el promedio de 3 señales a una frecuencia de 0,033 Hz. Las barras vericales representan 1 mV. y las horizontales 5 msec.

El bloqueante de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N,  $\omega\text{-CgTx} = 5 \mu\text{M}$ , durante 50 minutos, no tuvo ningún efecto sobre las corrientes de  $\text{K}^+$  activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 33-A).

Hong y Chang (1990) describieron que la 3,4-DAP produce un incremento en la amplitud de los potenciales de placa postsinápticos y la aparición de un "plateau" en la respuesta postsináptica (despolarización de larga duración) y que este fenómeno es inhibido por nifendipina, verapamil,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Por estas razones se postuló que este incremento en la respuesta postsináptica causado por 3,4-DAP estaría originado por un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal nervioso a través de CCVD de tipo L. En base a estos antecedentes, se estudió el efecto de una DHP sobre las conductancias de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que se observan en presencia de 3,4-DAP, a fin de establecer si en estas condiciones de bloqueo se manifiesta la actividad de CCVD de tipo L. El bloqueante de CCVD de tipo L, nitrendipina  $10 \mu\text{M}$  no produjo ningún efecto sobre la corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  tras 50 minutos de incubación (Figura 33-B).

Figura 33

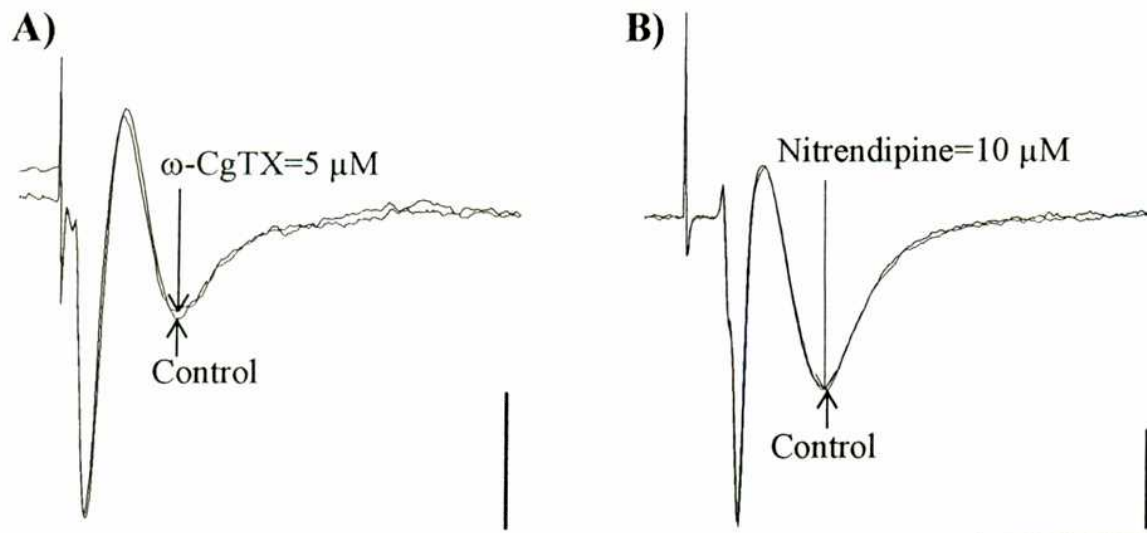


Figura 33. Efecto de bloqueantes de CCVD de tipo N y L sobre las corrientes presinápticas de K activadas por  $Ca^{2+}$ . Las  $I_{K(Ca)}$  se registraron en solución Ringer mas el agregado de d-Tc = 30  $\mu$ M y 3,4-DAP= 1 mM. A) Antes y 20 minutos después (\*) del agregado de  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu$ M. B) Efecto del bloqueante de CCVD de tipo L, nitrendipina sobre las corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$ . Las señales en presencia de la DHP fueron registradas en oscuridad. Registros obtenidos en solución Ringer normal + d-Tc (30  $\mu$ M) + 3,4-DAP (1mM) antes y 12 minutos después de la aplicación del bloqueante de nitrendipina= 10  $\mu$ M. Los trazos son el promedio de 3 corrientes evocadas cada 30 seg. Las barras vericales representan 1 mV. y las horizontales 5 msec.

## EFFECTO DE LOS QUELANTES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR EN LOS TERMINALES MOTORES

### *EFFECTO DEL QUELANTE DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR BAPTA-AM, SOBRE LA FACILITACION EN LA TRANSMISION SINAPTICA.*

Con el propósito de verificar la captación y la metabolización del compuesto BAPTA-AM, (acetoximetilester, un derivado permeable del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA), se estudió la facilitación en la liberación de neurotransmisor. Se estudió el efecto de la incubación con el agente quelante sobre el índice de facilitación (If). El If fue medido antes y 2 horas después de incubar a 37 °C en solución Ringer sin  $\text{Ca}^{2+}$  y conteniendo 4 ó 10  $\mu\text{M}$  de BAPTA-AM. La preparación fue estimulada mediante 15 trenes de 100 msec. de duración a 100 Hz., separados cada 10 segundos entre sí. El If fue estimado como :

$$\text{If} = \left[ \frac{\left( \frac{\text{Ampl.9} + \text{Ampl.10}}{2} \right)}{\text{Ampl.1}} \right]$$

donde Ampl.9 y Ampl.10 son el promedio de las amplitudes del noveno y el décimo potencial de placa respectivamente, y Ampl.1 es la media de la amplitud del primer potencial de placa.

El agente quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular BAPTA disminuyó el índice de facilitación. En la Tabla 3 se observan los valores del If antes y después de las incubación con BAPTA-AM.

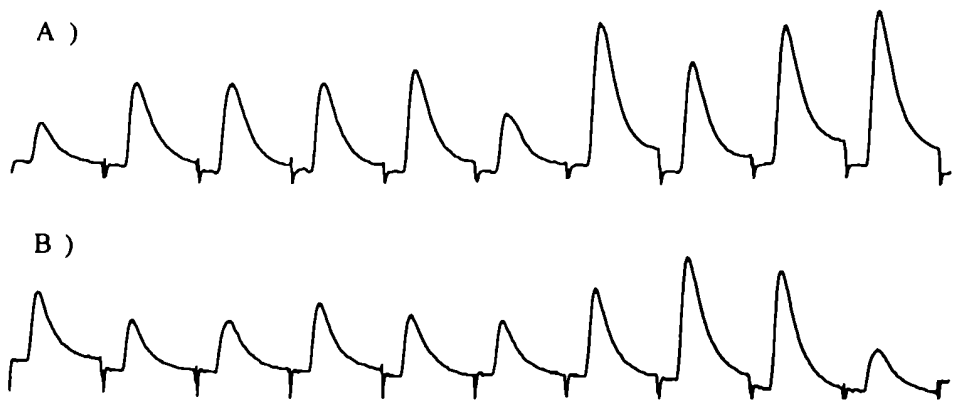
En la Figura 34 se muestran registros representativos de 15 trenes de estimulación promediados, antes y después de la incubación con BAPTA-AM. Como se puede observar, en el trazo superior (control), hay un incremento progresivo en la

amplitud de los potenciales de placa, mientras que en el cargado con BAPTA-AM, no es consistente el aumento en la amplitud de los potenciales de placa.

**Tabla 3**

I <sub>f</sub>		
Control	Incubado con BAPTA-AM (4 μM)	
3,174 ± 0,33 (n=12)	1,735 ± 0,24 *(n=12)	* p < 0,005
	(10 μM)	
2.374 ± 0,25(n=12)	1,356 ± 0,09 **(n=12)	** p < 0,0006

**Figura 34**



**Figura 34.** Efecto del quelante de  $Ca^{2+}_{intr}$  BAPTA sobre la facilitación de la transmisión sináptica. Trazos representativos de 15 trenes de estimulación a 100 Hz., cada 10 seg., A) antes y B) dos horas después de incubar en presencia de BAPTA-AM = 10 μM. Barra vertical = 1 mV, barra horizontal = 20 msec.

#### *EFFECTO DE LOS QUELANTES DE $Ca^{2+}$ INTRACELULAR EN LAS $I_{K(CA)}$*

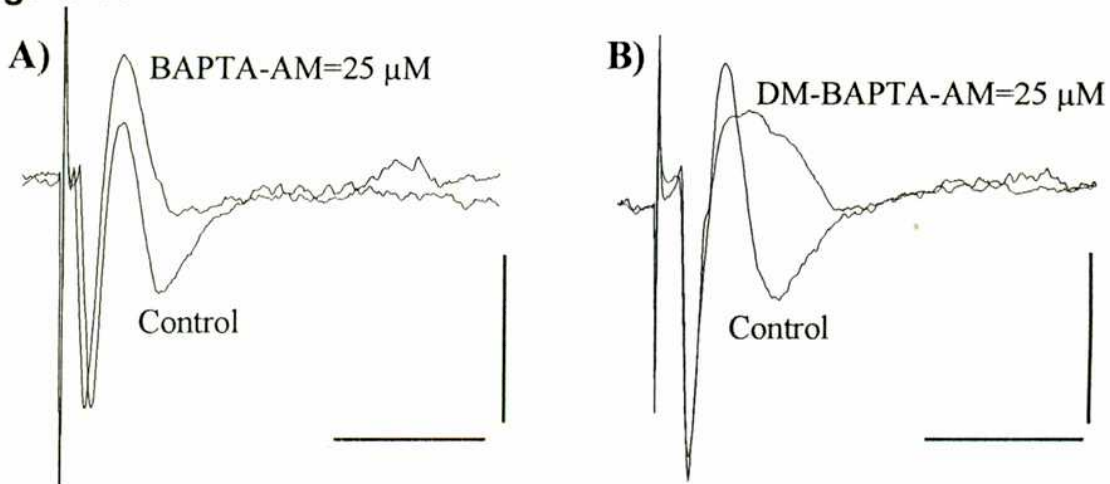
Tras haber establecido que la activación de la conductancia de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  de los terminales motores es debida a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCVD sensibles a FTX y a  $\omega$ -Aga-IVA; y teniendo en cuenta la baja afinidad por el ion  $Ca^{2+}$  reportada para estos canales en otras preparaciones, ya que se requiere aproximadamente 100 μM de  $[Ca^{2+}]_{intr}$ . para que el canal esté abierto el 50 % del tiempo a valores de potencial dentro del rango en que opera en la célula (Roberts y

col., 1990, 1991), se estudió la modulación de esta conductancia por quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares con distinta cinética de asociación.

Se registró en el perineuro la actividad eléctrica en respuesta a la estimulación nerviosa, en condiciones de bloqueo de la respuesta postsináptica y de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a voltaje, a fin de registrar la  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ . Luego de registrar en 5-6 zonas por músculo las respuestas a la estimulación, la preparación fue retirada de la cámara de registro e incubada durante dos horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en presencia de los diferentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Después de lavar con solución Ringer normal durante 30 minutos e incubar 40 minutos en presencia de los bloqueantes (d-Tc y 3,4-DAP), se montó la preparación en el sistema de registro electrofisiológico y se estudió la actividad eléctrica en las zonas donde se había registrado previamente. Los quelantes empleados tienen el  $K_d$  en el mismo rango ( $\cong 100\text{ nM}$ ), pero difieren en las velocidades de asociación, siendo el  $K_{on}$  para el EGTA del orden de  $10^6\text{ M}^{-1}\text{ seg}^{-1}$  mientras que para el BAPTA y el DM-BAPTA es del orden de  $10^8\text{ M}^{-1}\text{ seg}^{-1}$ .

La incubación con los quelantes rápidos de  $\text{Ca}^{2+}$  dimetil BAPTA y BAPTA inhibió la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 35 -a y b).

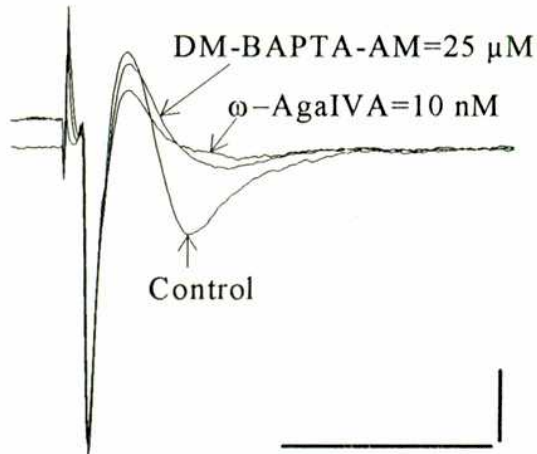
**Figura 35**



**Figura 35.** Efecto de los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  con cinética de asociación rápida sobre la activación de la  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ . Se tomaron registros control en zonas identificadas de la preparación y luego se incubó durante dos horas en presencia de los compuestos quelantes en la forma acetoximetilester. A) Control y luego de la incubación con BAPTA-AM =  $25\text{ }\mu\text{M}$ . B) Control y luego de la incubación con DM-BAPTA-AM =  $25\text{ }\mu\text{M}$ . Barras verticales:  $1\text{ mV}$ ., barras horizontales:  $5\text{ msec}$ .

La adición de  $\omega$ -Aga-IVA 10 y 30 nM en una preparación tratada con DM-BAPTA-AM, disminuyó la fase positiva de la señal (Figura 36), y el mínimo de actividad de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  remanente, por lo cual se puede inferir que si bien había entrada de  $Ca^{2+}$ , el mismo no alcanzaba a activar a los canales de  $K^+$ .

**Figura 36**



**Figura 36.** Acción del bloqueante de CCVD de tipo P sobre una corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$  luego de la incubación con DM-BAPTA-AM = 25  $\mu$ M. Barra vertical: 1 mV., barra horizontal: 5 mseg.

El quelante de  $Ca^{2+}$  EGTA, que tiene una cinética de "binding" 100 veces más lenta que el BAPTA y el DM-BAPTA, no modificó la  $I_{K(Ca)}$ , (Figura 37). En estas condiciones ChTx 10 nM, bloqueó la  $I_{K(Ca)}$ , así como también  $\omega$ -Aga-IVA (30 nM) bloqueó esta corriente (Figura 38).



Figura 37

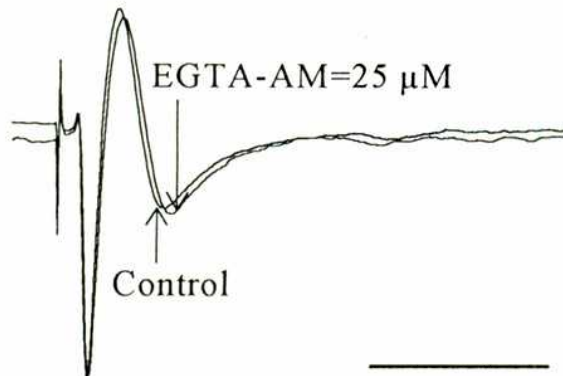


Figura 37. Efecto del quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de cinética de asociación lenta sobre la activación de la  $I_{K(\text{Ca})}$ . Se tomaron registros control en zonas identificadas de la preparación y luego se incubó durante dos horas en presencia del compuesto quelante en la forma acetoximetilester. Control y luego de la incubación con EGTA-AM = 25  $\mu\text{M}$ . Barra vertical: 1 mV., barra horizontal: 5 mseg.

Figura 38

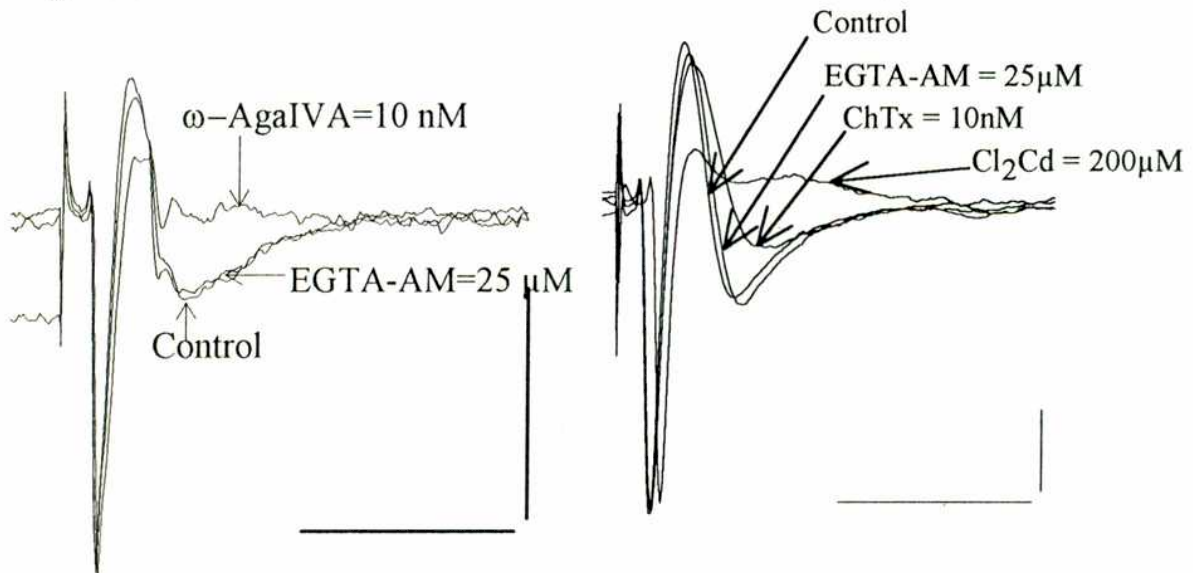


Figura 38. Efecto de los bloqueantes de CCVD y de la conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las  $I_{K(\text{Ca})}$  en preparaciones incubadas con EGTA-AM = 25  $\mu\text{M}$ . Izquierda: acción del bloqueante de CCVD de tipo P,  $\omega\text{-Aga-IVA}$  = 10 nM sobre una corriente de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Derecha: Efecto de la ChTx = 10 nM, 10 min. después de agregada sobre la  $I_{K(\text{Ca})}$  luego de la incubación con EGTA-AM = 25  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se agregó  $\text{Cd}^{2+}$  = 200  $\mu\text{M}$ , que bloqueó completamente la  $I_{K(\text{Ca})}$ . Barras verticales: 1 mV., barras horizontales: 5 mseg.

## CONCLUSIONES

Como otra forma de investigar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana del terminal nervioso, se estudiaron las corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Si bien es una observación indirecta del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , permite realizar la caracterización farmacológica de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la activación de la de  $\text{K}^+$ . Se encontró que las corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de los terminales motores son sensibles a los bloqueantes de CCVD FTX y  $\omega$ -Aga-IVA e insensibles a la  $\omega$ -CgTx y a la nitrendipina.

EL cargado de los terminales motores con los quelantes rápidos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular DM-BAPTA-AM y BAPTA-AM logró evitar la activación de la  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  mientras que el EGTA-AM no tuvo ningún efecto sobre la misma. En base a estos resultados, es posible inferir que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  estarían localizados cerca unos de otros, al igual que lo que ocurre en otros sistemas.



# *Discussion*

En este trabajo se ha realizado la caracterización, en base a la sensibilidad farmacológica, de los CCVD responsables de la liberación de neurotransmisor en la placa motora de mamíferos. Esta caracterización ha sido abordada mediante el empleo de distintas técnicas electrofisiológicas que permiten investigar la actividad de los CCVD de los terminales nerviosos. Se investigó el efecto de diferentes compuestos sobre los fenómenos de liberación evocada por estimulación eléctrica, liberación cuántica espontánea y evocada por estimulación por despolarización con  $K^+$  ext.. También se estudió la acción de los mismos sobre las corrientes perineurales de  $Ca^{2+}$  y de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$ .

La toxina de estructura poliamínica FTX y su análogo sintético, sFTX, disminuyeron el contenido cuántico cuando este fue estudiado por el método de las fallas y de la varianza. Este efecto es, presumiblemente, por reducción del influjo de  $Ca^{2+}$  al terminal nervioso dado que aumentó el número de fallas frente a la estimulación nerviosa y produjo una disminución de la amplitud media y un incremento de la varianza de la amplitud, lo que es indicativo de una disminución en el contenido cuántico.

Para la FTX, las dosis bloqueantes al 50% obtenidas por estos dos métodos diferentes fueron de 8 nl/ml y 16 nl/ml, respectivamente. La diferencia podría ser debida al hecho de que las concentraciones de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  empleadas en ambos procedimientos fueron diferentes, ya que ha sido demostrado en ensayos de binding para otras toxinas con CCVD, que la afinidad de la unión toxina-CCVD depende de la concentración de iones divalentes y que el  $Ca^{2+}$  compite con las toxinas por el sitio de unión (Kerr y col., 1984; Cruz y Olivera, 1986; Wagner y col., 1988). En los ajustes de las relaciones dosis-respuesta mediante la ecuación de Hill, el parámetro  $n_{Hill}$  fue: 1,037 y 1,0032, para el método de las fallas y de la varianza respectivamente. Estos valores indican que la interacción toxina-canal tiene una estequiometría 1:1. La capacidad de la FTX de disminuir el contenido cuántico en casi un 100 %, implicaría que la totalidad del influjo de  $Ca^{2+}$  responsable de la liberación de neurotransmisor estaría mediado por canales sensibles a esta toxina.

El efecto bloqueante de la toxina de origen peptídico,  $\omega$ -Aga-IVA fue evidente debido a la reducción de la amplitud media y al incremento de la varianza de los potenciales de placa. La  $\omega$ -Aga-IVA disminuyó el contenido cuántico a un 50% de su valor a una concentración de 10 nM. Esta concentración está en un rango similar a la capacidad de bloqueo de esta toxina sobre las corrientes de tipo P en neuronas de Purkinje ( $K_d = 2$  nM, Mintz y col., 1992). El ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Hill dio un  $n_{Hill} = 1,0032$ , lo cual indica que existiría una relación estequiométrica toxina-canal de 1:1 Esta misma relación fue encontrada para la interacción de la  $\omega$ -Aga-IVA con los CCVD de tipo P en las neuronas de Purkinje del cerebelo (Mintz y col., 1992), y para el bloqueo de las corrientes sinápticas inhibitorias en las células del núcleo del cerebelo (Takahashi y col., 1993). El valor de  $Ic_{50}$  obtenido sobre el contenido cuántico es igual al reportado por Takahashi y Momiyama (1993) sobre las corrientes sinápticas inhibitorias del cerebelo, en base a esto dichos autores postulan que los principales mediadores del influjo de  $Ca^{2+}$  en dicha estructura serían los canales de tipo P. Las diferencias en el valor obtenido para el  $Ic_{50}$  con los valores de  $K_d$  reportados por Mintz y col. (1992 a y b) podrían en parte explicarse por los resultados hallados por los mismos. Se observó que el  $K_d$  es 2 nM (con un límite superior de 10 nM) a valores de potencial de membrana de -80 mV, mientras que a +130 mV el  $K_d$  es 10  $\mu$ M (Mintz y col., 1992-b). Dado que el potencial del terminal, si fuera igual al de las fibras musculares, estaría entre -70 y -60 mV, y el  $K_d$  presenta dependencia con el voltaje, sería posible que el potencial produzca un corrimiento en el  $Ic_{50}$  que lo haga diferir del valor del  $K_d$ .

En contraste, el bloqueante de los CCVD de tipo N,  $\omega$ -CgTx no produjo ningún efecto sobre el contenido cuántico, cuando este fue estimado por el método de las fallas y por la varianza. La falta de efecto de la  $\omega$ -CgTx sobre el contenido cuántico confirma que en las condiciones estudiadas, los CCVD de tipo N no están involucrados en la liberación de neurotransmisor. Este resultado está de acuerdo con las evidencias previas (Sano y col., 1987, Protti y col., 1991) y difiere con el efecto

bloqueante de la  $\omega$ -CgTx sobre la liberación de [ $^3$ H]Ach. reportado por Wessler y col. (1990-a) en condiciones de bajo  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . Por otro lado está de acuerdo con la falta de acción de la  $\omega$ -CgTx en ratones, a diferencia del efecto paralizante que produce sobre la musculatura de los anfibios cuando la misma es inyectada intraperitonealmente (Olivera y col., 1985).

En resumen, el estudio del efecto de los bloqueantes sobre el contenido cuántico permitió identificar como blanco de la acción de la FTX y la  $\omega$ -Aga-IVA a los CCVD del terminal sináptico, dada la reducción observada en el contenido cuántico. Por otro lado, la disminución en el contenido cuántico y la facilitación observada en presencia de FTX y  $\omega$ -Aga-IVA frente a alta frecuencia de estimulación, fue también reportada en animales tratados con inmunoglobulinas de pacientes con el Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton. En esta neuropatía autoinmune se han reconocido como posibles antígenos a la subunidad  $\beta$  del CCVD de tipo N y también a la sinaptotagmina, una proteína integral de las vesículas sinápticas (Newsom-Davis y col. 1982, Leveque y col., 1992). Esto refuerza las evidencias de que los efectos inhibitorios de las toxinas son debidos a la interacción con las vías de permeabilidad del  $Ca^{2+}$ .

Otra evidencia que indica que la acción de la FTX es a nivel del influjo de  $Ca^{2+}$  es que no modificó la sensibilidad del proceso de liberación por el  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . El valor obtenido para la pendiente de la relación  $m$  vs  $[Ca^{2+}]_{ext}$  en presencia de FTX es comparable a los descritos en la literatura ( $n = 2,5-4$ , Cohen y van der Kloot, 1985) y no presenta diferencia significativa con el control. El efecto reductor de la FTX sobre el contenido cuántico es analogable al producido por el ion  $Mg^{2+}$ , ya que disminuyó el  $m$  sin modificar la pendiente de la relación  $m$  vs.  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . Por lo tanto esta toxina estaría actuando como antagonista del influjo de  $Ca^{2+}$ , a diferencia de los efectos producidos por las toxinas botulínica y tetánica, que disminuyen el contenido cuántico ((Cull-Candy y col., 1976; Kaeser y col., 1968) y causan una disminución del "n". Se propuso que estas toxinas disminuyen la efectividad del  $Ca^{2+}$  intracelular

para producir la liberación de neurotransmisor (Cull-Candy y col., 1976, Bevan y Wendon, 1984). Recientemente esto ha sido confirmado, ya que se ha identificado al blanco de las toxinas botulínica y tetánica. Estas toxinas actuarían como  $Zn^{2+}$  endopeptidasas sobre la sinaptobrevina, que es una proteína integral de las vesículas sinápticas, que está involucrada en el reciclaje de las vesículas.

Considerando el efecto inhibitorio de los bloqueantes de CCVD de tipo P, FTX y  $\omega$ -Aga-IVA sobre el contenido cuántico, la falta de efecto del bloqueante  $\omega$ -CgTx observada y teniendo en cuenta los antecedentes de la ineffectividad de las DHP para modificar la liberación de neurotransmisor en condiciones normales (Penner y Dreyer, 1986), el perfil farmacológico de los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje dependientes del terminal sináptico responsables de la liberación de neurotransmisor por estimulación eléctrica coincide con los CCVD de tipo P.

La acción de la FTX y la sFTX sobre la liberación espontánea de neurotransmisor no es clara. El incremento en la frecuencia no es consistente con el conocido efecto bloqueante de la FTX sobre el contenido cuántico. Por otro lado, estas toxinas también disminuyeron la amplitud de los potenciales miniatura y de las corrientes miniatura, lo cual podría indicar la posibilidad de un efecto a nivel de la postsinapsis. La disminución de las corrientes miniatura estaría de acuerdo con lo hallado por Fossier y col. (1994), quienes han reportado que la sFTX disminuye la respuesta postsináptica en la sinapsis colinérgica del ganglio bucal de *Aplysia*. Sin embargo, aún cuando habría un efecto a nivel de la postsinapsis, no se conoce ningún mecanismo postsináptico que permita explicar el aumento observado en la frecuencia. Los experimentos realizados tampoco permiten descartar la posibilidad de que esta toxina atravesara la membrana y ejerza algún efecto directamente sobre el mecanismo de exocitosis.

Una posibilidad que permitiría explicar el incremento en la frecuencia por un efecto a nivel presináptico es que la FTX podría estar ejerciendo una acción sobre las cargas de superficie en la membrana plasmática, ya que es una molécula altamente

cargada. Si se comportara de esta manera, su efecto sería similar al de los iones divalentes  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  que si bien son bloqueantes de los CCVD, producen un aumento en la frecuencia de potenciales. miniatura, posiblemente por movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular o por apantallamiento de las cargas fijas de la superficie de la membrana (Kita y col., 1981).

A diferencia de los efectos de la FTX y sFTX, la  $\omega$ -Aga-IVA en condiciones de liberación basal no tuvo ningún efecto sobre la liberación espontánea de neurotransmisor. Sin embargo, mostró ser un potente bloqueante de la liberación cuántica estimulada por  $K^{+}_{ext.}$ , dado que a una concentración de 100 nM bloqueó completamente el aumento de liberación producido por  $K^{+}_{ext.} = 10$  mM. El  $Ic_{50}$  de la  $\omega$ -Aga-IVA en el bloqueo de la liberación cuántica evocada por  $K^{+}$  es 11 nM. El  $n_{Hill}$  para la inhibición del incremento en la frecuencia por  $K^{+}_{ext.} = 10$  mM fue de 1,22; lo que indica que la relación estequiométrica toxina-canal obtenida por la inhibición de este fenómeno de liberación es cercana a 1. Tanto el  $n_{Hill}$  como el  $Ic_{50}$  de la liberación cuántica evocada por  $K^{+}$ , son de la misma magnitud que los valores obtenidos para la inhibición del contenido cuántico, lo que hace suponer que las vías de permeabilidad al  $Ca^{2+}$  involucradas en ambos mecanismos de liberación serían las mismas, es decir CCVD de tipo P.

La capacidad de la [ $\omega$ -Aga-IVA] = 100 nM de bloquear por completo el incremento en la liberación producido por  $K^{+}_{ext.} = 10$  mM, hace pensar el aumento en la frecuencia de potenciales miniatura sería debido a una mayor actividad de CCVD de tipo P inducida por la despolarización. Sin embargo, existen evidencias que  $\omega$ -CgTx = 5  $\mu$ M, produce una disminución del 30 % en la frecuencia de potenciales miniatura evocada por  $K^{+}_{ext.} = 10$  mM, además de que los mismos son de menor amplitud en estas condiciones (Protti y col., 1991). Por esa razón se había postulado previamente que en estas condiciones de estimulación con  $K^{+}$ , podrían estar involucrados CCVD de tipo N, que liberarían vesículas desde sitios más alejados de las zonas activas. Experimentos preliminares empleando concentraciones de  $K^{+}$



mayores que 10 mM, muestran que  $\omega$ -CgTx no es capaz de bloquear el incremento remanente de liberación producido por  $K^+$  en presencia de  $[\omega\text{-Aga-IVA}] = 100 \text{ nM}$ . Sería interesante estudiar más en detalle el efecto combinado de ambas toxinas en altas concentraciones de  $K^+$ .

Las toxinas FTX, sFTX y  $\omega$ -Aga-IVA mostraron ejercer un efecto bloqueante sobre la fase positiva de las corrientes del perineuro en respuesta a la estimulación eléctrica en presencia de los bloqueantes de las conductancias de  $K^+$ . Este componente de la corriente es producto del influjo de iones  $Ca^{2+}$  en el terminal nervioso. El efecto de estas toxinas y la falta de efecto de la  $\omega$ -CgTx y de las DHP nitrendipina y nifendipina (Penner y Dreyer, 1986) indican que los mediadores de ese influjo de  $Ca^{2+}$  serían CCVD de tipo P.

La acción bloqueante de la FTX y la sFTX sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  fue revertida al lavar las toxinas del baño, es decir que estos bloqueantes tienen una unión de tipo reversible. La reversibilidad de la unión, se observó también en la inhibición del contenido cuántico y en el aumento de la frecuencia de potenciales de placa miniatura por estas toxinas.

El bloqueo de las corrientes de  $Ca^{2+}$  por  $\omega$ -Aga-IVA fue casi total, dependiendo del tiempo de exposición a la toxina y de la concentración. Sin embargo, en diferentes preparaciones se encontró que 10 nM de  $\omega$ -Aga-IVA bloqueó distintos porcentajes de la corriente de  $Ca^{2+}$ . Esas diferencias podrían deberse a que la concentración real de toxina en los distintos experimentos fuera diferente, por problemas de difusión de la toxina al agregarla al baño. Otra posibilidad es que, siendo la corriente de  $Ca^{2+}$  una onda de tipo regenerativa, que depende del potencial del terminal, el umbral para la activación de esa corriente varíe de una preparación a otra, y un bloqueo parcial de la corriente inicial se traduce en un bloqueo importante de la onda regenerativa. Asimismo, siendo que el  $K_d$  de la  $\omega$ -Aga-IVA depende del potencial (Mintz y col., 1992), es posible que en los diferentes experimentos el

porcentaje de bloqueo varíe, por diferencias en el potencial de membrana de las distintas preparaciones.

No obstante, en todos los experimentos se observó un bloqueo importante de las corrientes en concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA inferiores a 30 nM, que es un valor cercano al  $I_{c50}$  sobre la transmisión sináptica en esta preparación. En adición a la capacidad de la FTX y de la  $\omega$ -Aga-IVA para bloquear la casi totalidad de la corriente de  $Ca^{2+}$ , debe considerarse que sobre la misma los bloqueantes de tipo N y L no tienen ningún efecto.

Otra forma de caracterizar desde un punto de vista farmacológico las corrientes de  $Ca^{2+}$  de los terminales motores, fue mediante el estudio de la activación de la corriente de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ . La FTX y la  $\omega$ -Aga-IVA bloquearon las  $I_{K(Ca)}$ . Esto muestra que las corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  son activadas por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCVD de tipo P. El bloqueo total que producen los bloqueantes de CCVD de tipo P sobre estas corrientes, dado que la adición del bloqueante inorgánico  $Cd^{2+}$  no modifica la señal y la falta de efecto de los bloqueantes de otros tipos de CCVD, indican que los únicos canales involucrados en la activación de la  $I_{K(Ca)}$  son los de tipo P.

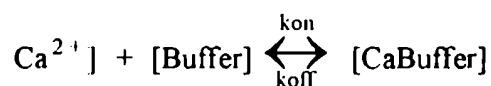
La similitud en el perfil farmacológico de los fenómenos de liberación con las corrientes de  $Ca^{2+}$  nos lleva a concluir que estas corrientes son las mediadoras de la entrada de  $Ca^{2+}$  responsable de la liberación de neurotransmisor, que se encuentran aumentadas en magnitud y duración debido al empleo de bloqueantes de las conductancias de  $K^+$ .

Por otro lado se estudió el efecto de quelantes de  $Ca^{2+}$  con distintas cinéticas de asociación sobre la activación de la  $I_{K(Ca)}$ . Los resultados obtenidos fueron que los agentes quelante de asociación rápida, BAPTA y DM-BAPTA son capaces de prevenir la activación de la  $I_{K(Ca)}$ , mientras que el quelante lento EGTA no lo es. Estos resultados son consistentes con la noción de que el EGTA no podría prevenir

la activación de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  si los canales de  $Ca^{2+}$  estuvieran cercanamente asociados a los  $I_{K(Ca)}$ , dado que el tiempo de difusión del  $Ca^{2+}$  para llegar a estos canales sería demasiado corto. Por el contrario, el BAPTA y su derivado unen  $Ca^{2+}$  tan rápidamente que lo interceptan antes que este pueda activar a los  $I_{K(Ca)}$ .

Según Mallart la activación de la  $I_{K(Ca)}$  ocurre tan pronto como la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  llega a un determinado nivel, y el  $Ca^{2+}$  necesario para activar la  $I_{K(Ca)}$  entraría en el retardo entre el comienzo de la  $I_K$  y el de la  $I_{K(Ca)}$ , lo cual puede ser tan corto como 250-300  $\mu$ seg (Mallart, 1985).

Los efectos diferenciales de los quelantes intracelulares pueden explicarse considerando las velocidades relativas de equilibrio de los buffers con el ion  $Ca^{2+}$ . La reacción



tendrá un equilibrio a una constante de tiempo dada por

$$1/\tau = k_{on} \cdot [Buffer\ total] + k_{off}$$

donde  $\tau$  define el tiempo de relajación de la reacción.

Las constantes de velocidad hacia adelante y atrás para la reacción EGTA/calcio son  $1,5 \cdot 10^6 M^{-1} seg^{-1}$  y  $0,3 seg^{-1}$  respectivamente (a pH = 7, 25 °C y fuerza iónica 0,1 M; Smith y col. 1984). Para la reacción BAPTA/calcio las constantes valen  $6,02 \cdot 10^8 M^{-1} seg^{-1}$  y  $96,7 seg^{-1}$  respectivamente (a pH = 7,4-8,4, 20 °C y fuerza iónica 0,14 M; Kao y Tsien, 1988).

Considerando que mediante el cargado con las formas acetoximetilester de los quelantes, se pudieran alcanzar concentraciones intracelulares de entre 10 y 100 veces las del quelante durante la incubación, el  $\tau$  para la reacción del BAPTA puede variar entre 2 y 20  $\mu$ seg, mientras que para la reacción del EGTA tendría un

valor entre 0,8 y 8 mseg. En las condiciones iónicas del citoplasma ambas reacciones serían enlentecidas debido a diversos factores tales como la fuerza iónica y la viscosidad. Aplicando un límite superior de enlentecimiento de 6 veces (Adler y col., 1991) la velocidad de la reacción BAPTA/Ca estaría cerca del equilibrio entre 12 y 120  $\mu$ seg. y la reacción EGTA/Ca entre 4,8 y 48 mseg.

Estos tiempos obtenidos para la asociación del  $\text{Ca}^{2+}$  con los diferentes quelantes justifican el efecto inhibitorio de los quelantes rápidos sobre la  $I_{K(\text{Ca})}$  y la falta de efecto del EGTA sobre la misma, ya que el límite inferior para la reacción EGTA/ $\text{Ca}^{2+}$  es 4,8 mseg., tiempo que excede ampliamente el estimado por Mallart (1985) = 250-300  $\mu$ seg.

Tomando el conjunto de los resultados presentados se puede concluir que en la transmisión sináptica en la unión neuromuscular de los mamíferos están involucrados CCVD de tipo P, debido a la sensibilidad que presentan los fenómenos de liberación y las corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a las toxinas FTX, sFTX y  $\omega$ -Aga-IVA; y a la falta de efecto de los bloqueantes de los canales de tipo L y N sobre estos mismos indicadores de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La dosis inhibitoria al 50% de  $\omega$ -Aga-IVA sobre la liberación evocada por actividad eléctrica así como también por despolarización con  $\text{K}^+$ , fue de  $\cong 10$  nM. A esta misma concentración se encontró las corrientes presinápticas de  $\text{Ca}^{2+}$  son bloqueadas  $\cong 60\%$ . Por otro lado, también a  $\omega$ -Aga-IVA = 10 nM se observó un bloqueo importante de las corrientes de  $\text{K}^+$  activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sin embargo, la asociación de los procesos de liberación sensibles a la  $\omega$ -Aga-IVA con los CCVD de tipo P ha sido cuestionada. Recientemente se ha descrito que los CCVD de tipo Q, que presentan una sensibilidad menor a la  $\omega$ -Aga-IVA, median la liberación de neurotransmisor en las sinapsis entre las regiones CA3-CA1 del hipocampo (Wheeler y col., 1994-a). Según Wheeler y col. (1994-b), dada la dependencia de la liberación con la potencia de orden 3 ó 4 del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dodge y Rahamimoff, 1967; Wu y Saggau, 1994). En el caso que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$

fuera a través de CCVD de tipo P, las dosis inhibitorias al 50% de los fenómenos de liberación deberían ser del orden subnanomolar ( $\cong 0,3$  nM), mientras que si fuera vía CCVD de tipo Q, el  $Ic_{50}$  predicho por la dependencia de la potencia sería de aproximadamente 20 nM. Este último valor es más cercano al que se encontró en el presente trabajo que 0,3 nM. Sin embargo, el  $Ic_{50}$  de  $\omega$ -Aga-IVA para el bloqueo de los canales de tipo Q es 89 nM (Wheeler y col. 1994-b), y en el presente trabajo se encontró que  $\omega$ -Aga-IVA = 10 nM deja solo el  $40 \pm 20$  % ( $n = 3$ ) de las corrientes de  $Ca^{2+}$  que se registran en el perineuro. Si bien este valor tiene mucha dispersión, en los valores individuales de dos experimentos dieron que el bloqueo por 10 nM fue de 82 y 76 %, mientras que en otro experimento 30 nM de  $\omega$ -Aga-IVA bloqueo un 88%, por lo cual es posible apreciar que la potencia de bloqueo de  $\omega$ -Aga-IVA sobre las corrientes presinápticas de  $Ca^{2+}$ , es mayor que la que tiene sobre los CCVD de tipo Q.

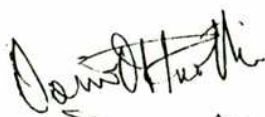
Además, en contraposición las estimaciones en base a la potencia de orden 3-4, Dunlap y col. (1994) sostienen que los procesos de liberación sensibles a concentraciones de  $\omega$ -Aga-IVA superiores que el  $K_d$  de la misma sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  en células de Purkinje, son en efecto mediados por CCVD de tipo P, pero que se requieren altas concentraciones dado que en los terminales sinápticos existen "canales sobrantes" (spare channels). Este concepto de "canales sobrantes" implica que es necesario bloquear un porcentaje muy importante de la corriente, para que se produzca un efecto sobre la liberación.

En consecuencia, si bien los valores de  $Ic_{50}$  hallados para  $\omega$ -Aga-IVA sobre los fenómenos de liberación y sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  son mayores que el  $K_d$  de la misma sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  en células de Purkinje del cerebelo, es posible suponer que los flujos de  $Ca^{2+}$  en los terminales motores del raton son en efecto a través de CCVD de tipo P y no Q.

Los tiempos estimados para la reacción BAPTA- $Ca^{2+}$  están comprendidos entre 12 y 120  $\mu$ seg, mientras que para la reacción EGTA- $Ca^{2+}$  son entre 4,8 y 48

mseg. Esto implica que para la activación de la  $I_{K(Ca)}$ , el ion  $Ca^{2+}$  debe difundir hasta una distancia que estaría determinada por su coeficiente de difusión en un tiempo comprendido entre el límite superior para la reacción BAPTA- $Ca^{2+}$  (120  $\mu$ seg) y el tiempo determinado por Mallart (1985) (250-300  $\mu$ seg.). En función del bajo coeficiente de difusión del  $Ca^{2+}$  (Albritton y col., 1992), en ese tiempo solo podría difundir una corta distancia. El hecho de no conocer la concentración de  $Ca^{2+}$  que se alcanza durante la despolarización (y en presencia de 3,4-DAP) y la concentración de  $Ca^{2+}$  que activa a la  $I_{K(Ca)}$  hace que no sea posible estimar dicha distancia.

Sin embargo, la capacidad de los quelantes rápidos de  $Ca^{2+}$  intracelular para prevenir la activación de la  $I_{K(Ca)}$ , y la falta de efecto sobre la misma del quelante lento EGTA sugiere que en los terminales motores, los CCVD de tipo P, están cercanamente asociados a los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . Esta asociación estrecha entre canales de  $Ca^{2+}$  y canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ha sido demostrada también en la placa neuromuscular de los anfibios y en las células ciliadas (Robitaille y col., 1993; Roberts y col., 1991), y se postula que estos últimos tendrían un rol importante en la regulación de la transmisión sináptica, ya que al repolarizar el terminal cesa la entrada de  $Ca^{2+}$  y la liberación de neurotransmisor.



DARÍO ALEJANDRO PRETTI



Dr. OSVALDO D. UCHITEL  
Prof. Ordinario Adjunto  
Dep. Biología e Histología  
Fac. de Medicina - U.B.A.



# *Summary*

## INTRODUCTION

Calcium has been identified in a wide variety of biological systems as a second messenger. It has been demonstrated that it has a key role in different processes such as excitation-contraction coupling, neurotransmitter and hormone release, gene activation, some mechanisms associated with learning and memory and many other physiological processes.

According to the vesicular hypothesis,  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the presynaptic nerve terminals is a pre-requisite for transmitter release. It has been shown that  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes are activated by depolarization and that the amount of transmitter release is dependent on the level of intracellular calcium concentration. This increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is achieved by the opening of voltage dependent calcium channels (VDCC) after the arrival of the action potential to the nerve terminal.

The neuromuscular junction and the squid giant synapse have proved to be excellent preparations to study the sequence of events that take place during synaptic transmission and are a model for understanding the synaptic mechanisms involved in chemical synapses throughout the animal kingdom.

Different types of calcium channels have been described, according to their biophysical and pharmacological properties. Llinas y Yarom (1981) demonstrated the coexistence of at least two different types of calcium channels, being one of them of low threshold, LVA - low voltage activated- and the other of high threshold HVA - high voltage activated. Later, the presence of these different calcium currents were shown in chicken DRG (dorsal root ganglion) neurones. LVA currents are activated by weak depolarizations from negative potentials and decay rapidly after their activation. HVA currents are activated from more positive holding potentials, and inactivate slowly.

The LVA channels are known as T-type calcium channels due to their transient activation.

The HVA channels include a great number of subtypes. At least four different types of HVA channels have been distinguished at nerve cells. The L-type calcium channel is sensitive to a family of organic compounds, the dihydropyridines (DHP). There are different DHP, some of them are agonists and others antagonists of the calcium channels. The N-type calcium channels were first described as sensitive to a toxin derived from a marine snail, omega-conotoxin GVIA ( $\omega$ -CgTx GVIA). There are many other polipeptides obtained from snail and spider venoms which block N-type calcium channels, however,  $\omega$ -CgTx GVIA is the most widely used. The P-type calcium channel, was initially described in cerebellar Purkinje cells, it was found to be insensitive to DHP and  $\omega$ -CgTx GVIA, but was potently blocked by a low molecular weight fraction (FTX) and a polypeptide ( $\omega$ -Aga-IVA), both toxins purified from the venom of the funnel-web spider *Agelenopsis aperta*. More recently the Q-type calcium channel was described in cerebellar granule cells. This new type of channel is insensitive to DHP and  $\omega$ -CgTx GVIA, but sensitive to high concentrations of  $\omega$ -Aga-IVA (hundreds of nanomolar), and also blocked by a polypeptide purified from the snail venom,  $\omega$ -CgTx M $\overline{\text{V}}$ IIC.



All these different channels, may coexist at a neuronal soma and also at the nerve terminals. However, in some preparations the combined use of all the calcium channel blockers, cannot suppress  $\text{Ca}^{2+}$  currents completely, indicating the existence of still unidentified VDCC.

Increasing information about VDCC is coming from the field of molecular biology. Molecular cloning of genes which code for the  $\alpha 1$  subunit of VDCC, provided information about the structure of this transmembrane proteins, and the expression of its products in *Xenopus* oocytes made their biophysical and pharmacological characterization possible. Although it is possible to establish a relationship between the product of the genes and calcium channels characterized 'in situ', in many cases there is no good correlation between the properties of the expressed calcium channels and those studied in situ.

The existence of different VDCC, made it interesting to explore about their specific function and whether a particular type was responsible for synaptic transmission.

Electrophysiological recording is the most confident technique to study the channels which take part in synaptic transmission. In 1984, Kerr and Yoshikami showed that frog neuromuscular transmission was abolished by  $\omega$ -CgTx GVIA, which acted by blocking  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the presynaptic terminal. In contrast,  $\omega$ -CgTx GVIA does not produce any effect in mammalian synaptic transmission electrically evoked in normal conditions.

In the central nervous system (CNS), depending on the structure, it was shown that different VDCC subtypes are involved. At the neurosecretory terminals of the neurohypophysis it seems that both L- and N- type VDCC mediate neurosecretion (Lemos and Nowicky, 1989). Takahashi and Momiyama (1993) showed that in three different areas of the CNS, P-like and N-type VDCC are involved to varying degrees in synaptic transmission, while L-type seems not to be related with transmitter release. In the synapse between hippocampal CA3 and CA1 neurons, transmitter release is mediated by N-type calcium channels and other type of channels, whose pharmacology resembles Q-type calcium channels. Stanley (1991) determined that transmitter release at the calyx synapse of chicken ciliary ganglion is due to  $\text{Ca}^{2+}$  flux through N-type calcium channels

It is also possible to have an approach about the VDCC involved in transmitter release, by means of colorimetric and biochemical techniques. Yawoo et al. showed that  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was diminished in the presence of  $\omega$ -CgTx GVIA, from what derives that N-type calcium channels mediate calcium entry at the chick ciliary ganglion synapse. Many groups showed that  $\text{K}^+$  evoked neurotransmitter release in CNS slices, is inhibited by  $\omega$ -CgTx GVIA as well as by  $\omega$ -Aga-IVA, depending on the neurotransmitter and the area studied (Turner et al., 1992; Kimura et al., 1994).

At the mammalian neuromuscular junction, under normal conditions, transmitter release is resistant to DHP and to  $\omega$ -CgTx GVIA, indicating that neither L nor N-type VDCC are mediating transmitter release. However, in cut muscle fibres it was reported that L-type channels antagonists diminish quantal content, when release is previously stimulated by the L-type channel agonist BayK 8644 (Atchinson, 1987). It was also reported that  $\omega$ -CgTx GVIA prevents the facilitatory effects of noradrenaline on the evoked release of [ $^3\text{H}$ ]Acetylcholine from mammalian motor nerve terminals (Wessler et al., 1990)

## OBJECTIVE

The purpose of the present work is:

1) to characterize, from a pharmacological point of view, by means of electrophysiological techniques the voltage dependent calcium channels which mediate transmitter secretion at the mouse neuromuscular junction.

2) to test whether there is a correlation in the pharmacological profile of the different processes in which  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the nerve terminals is involved.

3) to analyze the effects of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  calcium chelators with different kinetics of association on the activation of the presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  current.

## MATERIALS AND METHODS

All experiments were performed in the nerve-muscle junction of Swiss male mouse. End plate potentials and miniature end plate potentials were studied in the phrenic diaphragm preparation while presynaptic currents were studied in the Levator auris muscle. Muscles were removed after cervical dislocation and pinned out in a Sylgard<sup>®</sup> coated chamber containing 1-2 ml of Ringer solution consisting of (mM) NaCl, 135; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 2; Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; NaHCO<sub>3</sub>, 12; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; d-glucose, 11; pH 7.4 kept at room temperature. The solution was continuously oxygenated with a mixture of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>. Intracellular recordings of evoked endplate potentials (e.p.p.'s) and miniature endplate potentials (m.e.p.p.'s) were performed with glass microelectrodes filled with 2M KCl of 5 to 15 MΩ resistance. The electrodes were inserted into the muscle fibres near the end-plate regions, which were located visually by the ends of intramuscular branches of the phrenic nerve. Signals from the electrode were amplified (x 100) by an Axoclamp 2-A and fed into a computer previous digitalization. Evoked endplate potentials, were elicited by nerve stimulation by an isolation unit. The stimulus was triggered by a computer at a frequency of 0,5 Hz. Quantal content was estimated by the failure (low Ca<sup>2+</sup>/high Mg<sup>2+</sup> medium) and the variance (partially block of postsynaptic response with d-tubocurarine) methods. Only those muscle fibres whose membrane potential was lower than -65 mV were considered to estimate the quantal content, and a change no greater than 3 mV during the recording period was allowed.

Miniature end-plate potentials frequency and amplitude were measured for 1-3 minutes/fibre, and a minimum of 16 fibres/muscle were studied. Control values were taken and 30' after having added different toxin concentrations, frequency and amplitude were studied again. M.e.p.p.'s were measured in different external ionic concentrations.

Dose response curves were fitted to an adaptation of the Hill equation, with the parameters n and k variables. Data were compared by Student t-test.

The presynaptic currents were recorded with glass microelectrodes filled with 2M NaCl of 5 to 15 MΩ resistance placed inside the perineurial sheath of small nerve branches near the endplate areas, after nerve stimulation. To study presynaptic Ca<sup>2+</sup> currents (I<sub>Ca</sub>), muscle contraction was blocked by d-Tc = 30 μM and K<sup>+</sup> conductance were blocked by tetraethylammonium (TEA) = 10 mM and 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) = 250 μM, procaine = 100 μM was added to avoid repetitive firing. In these experiments, the preparation was stimulated at a frequency between 0,0033 and 0,002 Hz, in order to avoid autoinhibition of Ca<sup>2+</sup> currents. The areas under the positive signals carried by Ca<sup>2+</sup> ions were integrated by computer by means of an algorithm using the trapezoidal rule.

Presynaptic Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> currents (I<sub>K(Ca)</sub>) were recorded in the presence of d-Tc and after blocking the voltage dependent K<sup>+</sup> channels with 3,4-DAP = 1 mM. The effect of intracellular Ca<sup>2+</sup> buffers with different rates of association was tested by incubating the preparation (after having obtained recordings of the I<sub>K(Ca)</sub> in 5-6 different zones/muscle) for two hours at 37 °C in the presence of either BAPTA-AM, DM-BAPTA-AM or EGTA-AM. Then, the preparation was washed with normal Ringer solution for 40' incubated in recording solution (30') and currents

were measured at the previously studied areas. The nerve was stimulated at a frequency of 0.03 Hz.

Toxins were added after having obtained stable recordings for at least 10'.

## RESULTS

### Effect of FTX, sFTX and $\omega$ -Aga-IVA on electrically evoked transmitter release.

In normal conditions, neurotransmitter release at the mammalian neuromuscular junction is resistant to DHP and  $\omega$ -CgTx GVIA. In order to evaluate whether P-type VDCC are involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  influx coupled to transmitter release at the mouse neuromuscular synapse, the effect of FTX, sFTX and  $\omega$ -Aga-IVA on quantal content was studied.

The low molecular weight fraction purified from funnel web spider venom, FTX, was tested on the quantal content of transmitter release by the failure method in a solution containing  $\text{Ca}^{2+} = 1,2 \text{ mM}$  and  $\text{Mg}^{2+} = 6 \text{ mM}$ . FTX did not produce any effect on membrane potential. It was found that FTX produced a dose-dependent inhibition of quantal content, with a  $\text{Ic}_{50} = 8 \text{ nl/ml}$  and  $n_{\text{Hill}} = 1.037$  (Figure 3).

sFTX, a synthetic analogue of FTX (an adduct of spermidine and arginine) also produced a significant decrease of quantal content at  $300 \text{ }\mu\text{M}$ , while spermidine  $= 3 \text{ mM}$  produced no effect. The N-type calcium channel blocker,  $\omega$ -CgTx GVIA  $= 5 \text{ }\mu\text{M}$  had no effect on quantal content, as previously reported by Sano et al. (1987) and Protti et al. (1991) (Figure 3).

The action of FTX and sFTX on quantal content of transmitter release was also studied by the variance method, in normal Ringer solution containing d-Tc. Neither FTX nor sFTX produced any effect on membrane potential. FTX was found to block quantal content of transmitter release in a dose-dependent manner, with an  $\text{Ic}_{50} = 16 \text{ nl/ml}$  and  $n_{\text{Hill}} = 1.0037$ . sFTX also produced a dose-dependent inhibition of quantal content in the range of  $0.1\text{-}1 \text{ mM}$  (Figure 4).

The dependence of quantal content on the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was studied in the absence and presence of a fixed FTX concentration. The power relation of quantal content with external  $\text{Ca}^{2+}$  was not affected by FTX. The slope  $n$  in a log-log plot, had a value of 2.98 in control muscles and 3.05 in muscles incubated with  $\text{FTX} = 3.3 \cdot 10^{-1} \text{ }\mu\text{l/ml}$ . However, FTX produced a shift to the right of the line, as expected for its blocking effect on  $\text{Ca}^{2+}$  entry to the nerve terminal (Figure 7).

The action of  $\omega$ -Aga-IVA on synaptic transmission was characterized by studying the effect of different concentrations of the toxin on quantal content of evoked release. The muscles were incubated in Ringer solution with a curare concentration adjusted to avoid muscle contraction.  $\omega$ -Aga-IVA showed a dose dependent inhibitory effect on the quantal content, with an  $\text{Ic}_{50} = 9.8 \text{ nM}$  and a  $n_{\text{Hill}} = 1.0032$  (Figure 8). Under similar conditions, transmitter release from nerve muscle preparations treated with  $\omega$ -CgTx ( $5 \text{ }\mu\text{M}$ ) was not affected.

In muscles treated with FTX, sFTX and  $\omega$ -Aga-IVA, during a train of high frequency stimulation ( $40 \text{ Hz}$  during  $250 \text{ msec.}$ ) an early facilitation of quantal content and e.p.p's amplitude was observed. In contrast, in normal solution a decline in e.p.p's amplitudes was observed during the train. In muscles incubated with  $\omega$ -CgTx  $= 5 \text{ }\mu\text{M}$  high frequency

stimulation produced a run-down in quantal content, as in non-treated muscles (Figure 10 to 15).

#### **P-type channel blockers effect on spontaneous and $K^+$ evoked transmitter release.**

In order to investigate the identity of the VDCC that contribute to the calcium influx necessary for spontaneous and  $K^+$  induced quantal release, the effects of P-type VDCC blockers effect were tested on these processes.

The effect of FTX was studied on spontaneous transmitter release. This toxin was found to produce an increase of m.e.p.p's frequency. M.e.p.p's frequency increased 63 % and 81 % at FTX =  $2 \cdot 10^{-2}$  and  $10^{-1}$   $\mu$ l/ml respectively. This effect was reverted by washing the toxin from the external medium (Figure 16). In contrast, FTX had no effect on spontaneous release in the absence of external calcium (Figure 17)

It was also observed that FTX produced a reduction in m.e.p.p's amplitude. In order to test if FTX was exerting any effect on the postsynaptic acetylcholine receptors, miniature end plate currents (m.e.p.c's) were measured by voltage clamping the end-plate area with two microelectrodes. FTX = 1  $\mu$ l/ml and sFTX = 300 and 500  $\mu$ M produced a significant reduction on mepc's. FTX produced no effect on the rise time and half time decay of mepc's, while the effects observed with sFTX were not consistent (Figure 18).

The effect of  $\omega$ -Aga-IVA was tested on spontaneous transmitter release. The toxin  $\omega$ -Aga-IVA did not produce any effect on m.e.p.p's frequency even at a concentration of 100 and 300 nM. M.e.p.p's amplitude and membrane potential were not affected either. However,  $\omega$ -Aga-IVA had a strong blocking effect on the augmentation of m.e.p.p's frequency induced by  $K^+_{ext} = 10$  mM (Figure 19). The blocking effect was dose-dependent and at a concentration of 100 and 300 nM,  $\omega$ -Aga-IVA completely reduced m.e.p.p's frequency to basal levels.  $\omega$ -Aga-IVA had an  $Ic_{50} = 11.69$  nM ( $n_{Hill} = 1.22$ ) on the increase of m.e.p.p's frequency induced by  $K^+_{ext} = 10$  mM (Figure 20, 21).

#### **Effect of FTX, sFTX and $\omega$ -Aga-IVA on presynaptic $Ca^{2+}$ currents ( $I_{Ca}$ ).**

Even though quantal content of transmitter release depends on  $Ca^{2+}$  entry into the nerve terminal, it is not a direct measure of the calcium influx. Motor nerve terminals are not accessible to electrophysiological methods such as patch-clamp techniques. However, it is possible to identify and localize ionic currents in nerve endings by means of perineurial recordings (Gundersen et al., 1982; Brigant and Mallart, 1982; Mallart, 1985)

On the basis of the blocking effect of FTX, sFTX and  $\omega$ -Aga-IVA on electrically evoked transmitter release, the effect of these toxins on the presynaptic  $Ca^{2+}$  currents was studied. Whether  $I_{Ca}$  presents the same pharmacological profile than transmitter release is another central issue of this study.

Perineurial recordings were done in the small axon bundles of levator auris muscle. Calcium currents were measured in the presence of d-Tc = 30  $\mu$ M, TEA = 10 mM, 3,4-DAP = 250  $\mu$ M and Procaine = 100  $\mu$ M.

FTX (from a dilution of  $2.5 \cdot 10^{-2}$  to  $1 \mu\text{l/ml}$ ) and sFTX ( $300 \mu\text{l/ml}$ ) blocked the positive wave carried by calcium ions. This blockade was shown to be reversible. Both toxins reduced the amplitude and the duration of the positive component of the perineurial currents (Figure 23).

Different concentrations of the polypeptide  $\omega$ -Aga-IVA produced a reduction on the calcium signal recorded, after nerve stimulation, in the perineurium. After 9 minutes of the addition of  $\omega$ -Aga-IVA =  $100 \text{ nM}$ , the area under the positive current component was reduced to 11% of the control (Figure 24). The blocking effect could not be reverted by washing the toxin and raising  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$  to  $6 \text{ mM}$  (Figure 25). The percentage of blockade varied at different nerve-muscle preparations. However, it was found a dose dependent relation between the area under the calcium wave and  $\omega$ -Aga-IVA concentration (Figure 26, 27; Table 2, 3).

#### **Effect of FTX, sFTX and $\omega$ -Aga-IVA on presynaptic $\text{Ca}^{2+}$ activated $\text{K}^+$ current ( $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ ).**

Transmitter release is commonly shortened by the repolarization of the membrane, due to the onset of diverse potassium currents. At the mammalian motor nerve terminals, two main potassium conductances have been described, a voltage dependent  $\text{K}^+$  current, blocked by 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) and a calcium activated potassium current ( $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ ) sensitive to TEA and to Charibdotoxin.  $\text{Ca}^{2+}$  dependent  $\text{K}^+$  channels are sometimes activated either by  $\text{Ca}^{2+}$  ions released from intracellular stores or by  $\text{Ca}^{2+}$  entry through membrane channels. Mallart (1985) showed that  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  in presynaptic motor nerve terminals of the mouse is activated by calcium influx through voltage dependent calcium channels. Because of this, it was decided to characterize the type of VDCC which mediates the activation of the  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  at the presynaptic motor nerve terminals.

The activation of the  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  on the levator auris muscle-nerve preparation of the mouse was studied by means of perineurial recordings. It was found that this  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  disappears in the presence of FTX. FTX had a dose dependent blocking effect on the activation of the  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ . The  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  was effectively blocked by FTX =  $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $3,33 \cdot 10^{-1}$  and  $1 \mu\text{l/ml}$  (Figure 30). The addition of the inespecific calcium channel blocker  $\text{Cd}^{2+}$  in the presence of FTX =  $3,33 \cdot 10^{-1} \mu\text{l/ml}$ . did not produce further blockade, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  entry was completely blocked (Figure 31).

The P-type calcium channel blocker  $\omega$ -Aga-IVA ( $10 \text{ nM}$ ) diminished the second negative wave of perineurial currents produced by the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels (Figure 32-A). A greater reduction was seen when  $\omega$ -Aga-IVA was raised to  $30 \text{ nM}$ . The activation of the  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  was completely blocked by  $\omega$ -Aga-IVA =  $50 \text{ nM}$  (Figure 32-B).

#### **Effect of calcium chelators with different kinetic properties on the activation of the $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ .**

Calcium buffers with distinct kinetics of association were shown to exert differential effects on transmitter release when injected or loaded into nerve terminals. The fast calcium buffer BAPTA and others derived from it, inhibit transmitter release at the squid giant synapse while the slow calcium buffer EGTA has no effect on it (Adler et al., 1991). Furthermore, at the frog neuromuscular junction, it was found that the cell permeant fast

calcium buffers but not the slow ones, inhibit the increase in transmitter release caused by blocking the potassium conductance activated by  $\text{Ca}^{2+}$  with ChTx, (Robitaille et al., 1993).

Considering the differential effects of these  $\text{Ca}^{2+}$  buffers, it was decided to analyze the effects of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelators with different kinetics of association on the activation of the  $I_{K(\text{Ca})}$ .

The  $I_{K(\text{Ca})}$  was inhibited when the nerve terminals were loaded with the fast calcium buffers BAPTA-AM and DM-BAPTA-AM (25  $\mu\text{M}$ ) (Figure 35) but not when EGTA-AM (25  $\mu\text{M}$ ), a slow calcium buffer, was loaded in the nerve (Figure 37). The addition of  $\omega$ -Aga-IVA (10 nM) to a preparation loaded with DM-BAPTA-AM (25  $\mu\text{M}$ ) blocked the first positive peak, and reduced the small second negative deflection (Figure 36). In the preparations loaded with EGTA-AM (25  $\mu\text{M}$ ), where no change in  $I_{K(\text{Ca})}$  was observed, [ $\omega$ -Aga-IVA] = 10 nM completely blocked the second negative component of the current. In this condition,  $I_{K(\text{Ca})}$  was also blocked by ChTx (Figure 38).



## DISCUSSION

Evoked release of transmitter by nerve stimulation at the mammalian neuromuscular junction is not affected by DHP or by  $\omega$ -CgTx (Atchinson, 1989; Protti et al., 1991). Accordingly, presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  currents recorded with microelectrodes inserted in the perineurium, are also not affected by these  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists (Penner and Dreyer, 1986; Anderson and Harvey, 1987). This suggested that neither L nor N type VDCC's mediate transmitter release during the depolarization wave produced by the nerve action potential.

In the present work, it is demonstrated that FTX and  $\omega$ -Aga-IVA, two toxins that block P-type calcium currents, effectively inhibit transmitter release and presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Moreover,  $\omega$ -Aga-IVA and FTX inhibited the activation of the  $I_{K(\text{Ca})}$ , suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  influx through  $\omega$ -Aga-IVA and FTX sensitive channels is responsible for the activation of the calcium dependent  $\text{K}^+$  channels.

$\omega$ -Aga-IVA strongly reduced quantal content, showing a dose dependent inhibitory effect, with an  $\text{Ic}_{50} = 9.8 \text{ nM}$  and  $n_{\text{Hill}} = 1.003$ . The  $n_{\text{Hill}}$  value estimated from the fitted curve is consistent with a one-to-one toxin to channel stoichiometry. The  $\text{Ic}_{50}$  value is similar to that obtained by Takahashi and Momiyama (1993), but differs from the  $\text{Kd}$  value for the block of P-type calcium currents in cerebellar Purkinje neurons (2 nM with an upper limit of 10 nM) (Mintz et al., 1992).

The polypeptide  $\omega$ -Aga-IVA was found to block  $\text{K}^+$  induced transmitter release with  $\text{Ic}_{50}$  and  $n_{\text{Hill}}$  values similar to those found for its action in electrically evoked transmitter release. This suggests that the permeability pathways involved in both processes could be the same.

Presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  currents were potently blocked by  $\omega$ -Aga-IVA in a range from 10 to 30 nM. Although this value is higher than the  $\text{Kd}$  for P-type calcium currents in cerebellar Purkinje neurons, it must be considered the dependence of  $\text{Kd}$  with voltage. Mintz et al. (1992), found that at -80 mV  $\text{Kd}$  is equal to 2 nM while at +130 mV its value is 10  $\mu\text{M}$ . Considering this, as nerve terminals are depolarized due to the presence of  $\text{K}^+$  channel blockers, the affinity of  $\omega$ -Aga-IVA for blocking  $\text{Ca}^{2+}$  currents may not necessarily be equal to the expected value of 2 nM.

The effect of the polyamine FTX on spontaneous release of neurotransmitter was not consistent with its blocking inhibitory effect on quantal content and presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  currents. One possible explanation for this contradictory action is that FTX, being a very charged molecule, may act like  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ , which are  $\text{Ca}^{2+}$  channels blockers but increase m.e.p.p.'s frequency possibly due to a charge effect on membrane potential.

The similarity of the pharmacological profile of the evoked and spontaneous transmitter release with that of the  $I_{\text{Ca}}$  and the  $I_{K(\text{Ca})}$  indicates that calcium currents recorded at the perineurium are directly involved in transmitter release mechanisms.

It was also shown that rapid calcium buffers loaded into nerve terminals prevent the activation of the  $I_{K(\text{Ca})}$ , while the slow calcium chelator EGTA did not affect the activation of the  $I_{K(\text{Ca})}$ . This result suggest that EGTA binds  $\text{Ca}^{2+}$  so slowly that it can diffuse from its

entry site to the  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels. In contrast, BAPTA and DM-BAPTA bind calcium very fast, preventing it from activating the  $\text{I}_{\text{K}(\text{Ca})}$ . It is suggested that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels should be close due to the lack of effect of the slow calcium buffer, as occurs in other synapses (Robitaille et al., 1993, Roberts et al., 1991).

All these evidence suggest that transmitter release at the mammalian neuromuscular junction is mediated by P-type voltage dependent calcium channels.

However, Q-type VDCC were recently found to mediate transmitter release at hippocampal CA3-CA1 synapses (Wheeler et al., 1994). At this sinapse  $\omega$ -Aga-IVA blocks in a range of concentration similar to the one effective at the neuromuscular junction. As stated by Wheeler et al. (1994), if P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are responsible for transmitter release,  $\omega$ -Aga-IVA should be able to reduce transmitter release at subnanomolar concentrations, due to the power-law relationship of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and electrically evoked transmitter release. In contrast, if Q-type channels are the mediators of the  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes involved, the  $\text{Ic}_{50}$  value predicted from the power-law relationship is near 20 nM (Wheeler et al., 1994). This value is closer to that found in the present work.

On the other hand, Dunlap et al. (1994) argue that  $\omega$ -Aga-IVA concentrations higher than the  $\text{Kd}$  for cerebellar P-type currents, would be required to block transmitter release mediated by P-type VDCC if there are spare channels at the active zones. If  $\text{Ca}^{2+}$  channels are present at a density that exceeds the necessary to produce maximal secretion, it would lead to underestimates of the potency of  $\omega$ -Aga-IVA at the nerve terminals (Dunlap et al.).

In view of this discrepancy, although the evidences found in the present work seems to point to the VDCC present in motor nerve terminals as P-type, a more precise identification of  $\text{Ca}^{2+}$  channels involved in secretion will be obtained as more specific toxin are purified and developed.

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	45
FIGURA 2	47
FIGURA 3	49
FIGURA 4	51
FIGURA 5	52
FIGURA 6	53
FIGURA 7	55
FIGURA 8	56
FIGURA 9	57
FIGURA 10	60
FIGURA 11	61
FIGURA 12	62
FIGURA 13	63
FIGURA 14	64
FIGURA 15	65
FIGURA 16	68
FIGURA 17	69
FIGURA 18	70
FIGURA 19	72
FIGURA 20	73
FIGURA 21	74
FIGURA 22	78
FIGURA 23	79
FIGURA 24	80

<b>FIGURA 25</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 26</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA 27</b>	<b>83</b>
<b>FIGURA 28</b>	<b>84</b>
<b>FIGURA 29</b>	<b>87</b>
<b>FIGURA 30</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 31</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 32</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 33</b>	<b>91</b>
<b>FIGURA 34</b>	<b>93</b>
<b>FIGURA 35</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 36</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA 37</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA 38</b>	<b>96</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

[<sup>3</sup>H] Ach = acetilcolina tritiada  
°C = grados centigrados  
μM = micromolar  
μm<sup>2</sup> = micrometro cuadrado  
μseg. = microsegundo  
3,4-DAP = 3,4-diaminopiridina  
<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> = calcio marcado  
α-BugTx = alfa-bungarotoxina  
Ach. = acetilcolina  
BAPTA-AM = BAPTA acetoximetilester  
CCVD = canales de calcio voltaje dependientes  
ChTx = Caribdotoxina  
DHP = dihidropiridina  
DM-BAPTA-AM = dimetil BAPTA acetoximetilester  
e.s = error estandar  
EGTA-AM = EGTA acetoximetilester  
ext. = externo  
FTX = funnel web spider toxin  
HVA = high voltage activated  
Hz = hertz  
I<sub>K</sub> = corriente de Potasio  
I<sub>K(Ca)</sub> = corriente de Calcio activada por Potasio  
intr. = intracelular  
Kd = constante de disociación  
LEMS = Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton  
LVA = low voltage activated  
MΩ. = megaohm  
ml = mililitro  
mM = milimolar  
mseg. = milisegundo  
mV = milivolt  
nA. = nanoamper  
nl = nanolitro  
nm = nanometro  
pS = picosiemens  
sFTX = synthetic funnel web spider toxin  
SNC = sistema nervioso central  
TEA = tetraetilamonio  
TTX = tetrodotoxina  
V<sub>m</sub> = potencial de membrana  
ω-Aga-IVA = omega-Agatoxina IVA  
ω-CgTx = omega-Conotoxina



# *Bibliografia*

## BIBLIOGRAFIA

- Adler, E.M., Augustine, G.J., Duffy, S.N. and Charlton, M.P. Alien intracellular chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Journal of Neuroscience* (1991) 11, 1496-1507.
- Albritton, M., Meyer, T. and Stryer, L. Range of messenger action of calcium ions and Inositol 1,4,5 Triphosphate. *Science* (1992) 258, 1812-1815.
- Alvarez Maubecin, V.A., Sanchez, V.N., Rosato Siri, M.D., Cherksey, B.D., Sugimori, M., Llinas, R.R. and Uchitel, O.D. Pharmacological characterization of the voltage dependent  $Ca^{2+}$  channels present in synaptosomes from rat and chicken Central Nervous System. *J. Neurochemistry*. en prensa.
- Anderson, A.J. and Harvey, A.L.  $\omega$ -Conotoxin does not block the verapamil-sensitive calcium channels at mouse motor nerve terminals. *Neurosci. Lett.* (1987) 82: 177-180.
- Andreu, R., Barret, E.F. Calcium dependence of evoked transmitter release at very low quantal contents at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* (1980) 308, 79-97.
- Angaut-Petit, D., Molgo, J., Conold, A.L. and Faille, L. The levator auris muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci. Lett.* (1987) 82: 83-88.
- Atchinson, W.D. Dihydropyridine-sensitive and insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1989) 251:672-678.
- Augustine, G.J., Charlton, M.P., Smith, S.J., Calcium action in synaptic transmitter release, *Ann. Rev. Neurosc.*, 10 (1987) 633-693.
- Bevan, S. and Wendon, L.M.B. A study of the action of tetanus toxin at rat soleus neuromuscular junction. *J. Physiol. (Lond.)* (1984) 348:1-17.
- Brigant, J.L. and Mallart, A. Presynaptic currents in mouse motor endings. *J. Physiol. (Lond.)* (1982) 333: 619-636.
- Carbone, E. and Lux, H.D., A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons, *Nature*, 310 (1984) 501-502.
- Catterall, W.A. Functional subunit expression of voltage gated calcium channels. *Science* (1991) 253:1499-1500.
- Ceccarelli, B., Fesce, R., Grohovaz, F and Haimann, C. The effect of Potassium on exocytosis of transmitter at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (Lond.)* (1988) 401:163-183.
- Cherksey, B.D., Sugimori, M. and Llinas, R.R. Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. *Ann. NY Acad. Sci.* (1991) 635, 80-89.
- Cohen, I. and van der Kloot, W. Calcium and transmitter release. *International review of Neurobiology.* (1985) 27:299-335.
- Cruz, L.J., Johnson, D.S and Olivera, B.M. Characterization of the omega-conotoxin target. Evidence for tissue-specific heterogeneity in calcium channel types. *Biochemistry* (1987) 26: 820-824.

- Cruz, L.J. and Olivera, B.M. Calcium channels antagonists. *J. Biol. Chem.* 261, 6230.
- Cull-Candy, S.G., Lundh, H. and Thesleff, S. Effects of botulinum toxin in neuromuscular transmission in the rat. *J. Physiol. (Lond.)* (1976) 269:177-203.
- Dale, H.H., Feldbreg, W. and Vogt, M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* (1936) 86:353-380.
- Del Castillo, J. and Katz, B. The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* (1954) 278:501-511.
- Del Castillo, J. and Katz, B. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J. Physiol. (Lond.)* (1954 b) 124:574-585.
- Del Castillo, J. and Katz, B. Local activity at a depolarized nerve-muscle junction. *J. Physiol. (Lond.)* (1955) 128:396-411.
- Del Castillo, J. and Katz, B. Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Prog. Biophys. biophys. Chem.* (1956) 6:121-170.
- De Robertis, E.D.P. and Bennet, H.S. Submicroscopic vesicular component in the synapse. *Fedn. Proc. Am. Soc. exp. Biol.* (1954) 13, 35.
- Dubel, S.J., Starr, T.V., Ahlijanian, M.K., Enyeart, J.J., Catterall, W.A. and Snutch, T.P. Molecular cloning of the Alpha 1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1992) 89: 5058-5062.
- Dunlap, K., Luebke, J.I. and Turner, T.I. Identification of calcium channels that control neurosecretion. *Science* (1994) 226: 828-830.
- Ellinor, P.T., Zhang, J-F., Randall, A.D., Zhou, M., Schwarz, T.L., Tsien, R.W. and Horne, W.A. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* (1993) 363:455-458.
- Elmqvist, D. and Quastel, D.M.J. Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction. *J. Physiol. (Lond.)* (1965) 177:463-482.
- Fatt, P. and Katz, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* (1952) 117: 109-128.
- Fatt, P. and Katz, B. Some observations on biological noise. *Nature* (1950) 166:597-598.
- Fossier, P., Baux, G. and Tauc, L. N- and P-type  $Ca^{2+}$  channels are involved in acetylcholine release at a neuron-neuronal synapse: only the N-type is the target of the neuromodulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1994) 91:4771-4775.
- Fujita, Y., Mynlieff, M., Dirksen, R.T., Kim, M-S, Niidome, T., Nakai, J., Friedrich, T., Iwabe, N., Miyata, T., Furiuchi, T. et al., Primary structure and functional expression of the  $\omega$ -Conotoxin-Sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron* (1993) 10: 585-598.
- Fukunaga, H., Engel, A.G., Lang, B., Newsom-Davis, J. and Vincent, A. Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with IgI from man to mouse depletes the presynaptic membrane active zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1983) 80: 7636-7640.



- Gundersen, C.B., Katz, B. and Miledi, R. The antagonism between botulinum toxin and calcium in motor nerve terminals. *Proc. of the Royal Society B.* (1982) 216: 369-376.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* (1981) 391: 85-100.
- Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. and Matthews, G. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* (1994) 371: 513-515.
- Hess, P., Lansman, J.B. and Tsien, R.W. Different modes of  $Ca^{2+}$  channel gating behaviour favoured by dihydropyridine  $Ca$  agonists and antagonists. *Nature* (1984) ?
- Heuser, J.E., Reese, T.S. and Landis, D.M. Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze fracture. *Journal of Neurocytology* (1974) 40: 109-131.
- Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M., Jan, L. and Evans, L. *Journal of Cell Biology* (1979) 81: 275-300.
- Hillman, D., Chen, S., Aung, T.T., Cherksey, B.D., Sugimori, M. and Llinas, R.R. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1991) 88:7076-7080.
- Hille, B., *Ionic channels of excitable membranes.* Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
- Hong, S.J. and Chang, C.C. Facilitation by 3,4-diaminopyridine of regenerative acetylcholine release from mouse motor nerve. *Br. J. Pharmacol.* (1990) 101: 793-798.
- Hubbard, J.I., Jones, S.J. and Landau, E.M. On the mechanism by which calcium and magnesium affect the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)* (1968) 194: 355-380.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.h. and Jessel, T.M. *Principles of neural sciences.* (1991) Elsevier. Sci. Publ. p: 209.
- Kao, J.P.Y. and Tsien, R.Y.  $Ca^{2+}$  binding kinetics of Fura-2 and Azo-1 from temperature jump relaxations measurements. *Biophys. J.* (1988) 53:635-639.
- Katz, B. *The release of the neuromuscular transmitter and the present state of the vesicular hypothesis.* Cambridge University Press 1978.**
- Katz, E., Ferro, P.A., Cherksey, B.D., Sugimori, M, Llinas, R.R. and Uchitel, O.D. Effects of  $Ca^{2+}$  channel blockers on transmitter release and presynaptic currents at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (en prensa)*.
- Kerr, L.M. and Yoshikami, D., A venom peptide with a novel presynaptic blocking action, *Nature*, 308 (1984) 282-284.
- Kimura, M. Yamanishi, Y., Hanada, T., Kagaya, T., Kuwada, M., Watanabe, T., Katashama, K. and Nishizawa, Y. Involvement of P-type calcium channels in high potassium elicited release of neurotransmitters from rat brain slices. *En prensa. Neuroscience.*
- Kita, H., Narita, K. and van der Kloot, W. *Brain. Res.* (1981) 205:111-121.
- Konishi, T. Electrical excitability of motor nerve terminals in the mouse. *J. Physiol.* (1985) 366: 411-421.

- Koyano, K., Abe, T., Nishiuchi, Y. and Sakakibara, S., Effects of syntetic  $\omega$ -conotoxin on synaptic transmission, *Eur. Jour. Pharm.*, 135 (1987) 337-343.
- Lang, B., Molenaar, P.C., Newsom-Davis, J and Vincent, A. Passive transfer of LEMS in mice: decreased rate of resting and evoked release of acetylcholine from skeletal muscle. *J. Neurochem.* (1984) 42: 658-662.
- Leveque, C., Hoshino, T., Pascale, D., Shoki-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., El Far, O., Martin-Moutot, M., Newsom-Davis, J., Takahashi, M. and Seagar, M.J. The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myastenic syndrome antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1992) 89: 3625-3629.
- Llinas, R.R., Blinks, J.R. and Nicholson, C. Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. *Science* (1972) 176:1127.
- Llinas, R.R., Steinberg, I.Z. and Walton, K., Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: A voltage clamp study in squid giant synapse and a theoretical model for the calcium gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1976) 73:2918-2922.
- Llinas, R.R., Steinberg, I.Z. and Walton, K., Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophys. J.* (1981 a) 33:289-322.
- Llinas, R.R., Steinberg, I.Z. and Walton, K., Relationship between presynaptic calcium currents and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys. J.* (1981 b) 33:323-352.
- Llinas, R.R., Sugimori, M. and Simon, S.M. Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:2415-2419.
- Llinas, R.R., Sugimori, M., Lin, J.W. and Cherksey, B.D. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammalian and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1989) 86:1689-1693.
- Llinas, R.R., Sugimori, M., Hillman, D.E. and Cherksey, B.D. Distribution and functional significance of the P-type, voltage dependent  $Ca^{2+}$  channels in the mammalian central nervous system. *Trends in Neurosciences*, 15 (1992) 351-355.
- Llinas, R.R., Sugimori, M. and Silver, R.B. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* (1992) 256:677-679.
- Magleby, K.L and Zengel, J.E. A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* (1982) 80: 613-638.
- Mallart, A. Presynaptic current in frog motor endings. *Pflügers Arch.* (1984) 400: 441-455.
- Mallart, A. Electric current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves. *J. Physiol. (Lond.)* (1985) 368: 577-591.
- Marqueze, B., Martin-Moutot, N., Leveque, c. and Courad, F. Characterization of the omega-conotoxin-binding molecule in rat brain synaptosomes and cultured neurons. *Mol. Pharmacol.* (1988) 34: 87-90.

- McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W. and Yoshikami, D.  $\omega$ -Conotoxin direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1987) 84:4327-4331.
- McCleskey, E.W. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Op. Neurobiology* (1994) 4: 304-312.
- McLachlan, E.M. and Martin, A.R. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J. Physiol.* (1981) 311: 307-324.
- Mikami, A., Imoto, T., Tanabe, T., Nidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. and Numa, S. Primary structure and functional expression of cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* (1989) 340: 230-233.
- Miledi, R. transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. B.* (1973) 183:421-425.
- Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P. and Adams, M.E. P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature* (1992) 355:827-829.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakani, J., Ruth, P., Boose, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., and col. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* (1991) 350: 398-402.
- Neely, A., Wei, X., Olcese, R., Birnbaumer, L. and Stefani, E. Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* (1993) 262:575-578.
- Neher, E. and Sakmann, B., Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature*, 260 (1976) 779-802.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity, *Nature*, 316 (1985) 440-443.
- Olivera, B.M., Gray, W.R., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Varga, J., de Santos, J.R.V., Cruz, L.J., Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails, *Science*, 230 (1985) 1338-1343.
- Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Luque, F.A. and Gray, W.R., Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geograhus* venom, *Biochem.*, 23 (1984) 5087-5090.
- Pancrazio, J.J., Viglione, M.P. and Kim, Y.I. Effect of BAY K 8644 on spontaneous and evoked transmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* (1989) 30, 1, 215-221.
- Penner, R. and Dreyer, F. Two different presynaptic calcium currents in motor nerve terminals of the mouse. *Pflugers Arch.* (1986) 406: 190-197.
- Protti, D.A., Szczupak, L., Scornik, F.S. and Uchitel, O.D. Effect of  $\omega$ -conotoxin GVIA on the transmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Research* (1991) 557: 336-339.
- Randall, A.D., Wendland, B., Schweizer, F., Mmiljanich, G., Adams, M.E. and Tsien, R.W. Five pharmacologically distinct high voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels in cerebellar granule cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* (1993) 19, 1478.

- Regan, L.J., Sah, D.W.Y. and Bean, B.P.  $Ca^{2+}$  channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and  $\omega$ -conotoxin. *Neuron* (1991) 6: 269-280.
- Roberts, W.M., Jacobs, R.A. and Hudspeth, A.J. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at the presynaptic active zones of hair cells. *Journal of Neuroscience* (1990) 10, 3664-3684.
- Roberts, W.M., Jacobs, R.A. and Hudspeth, A.J. The hair cell as a presynaptic terminal. *Ann. NY Acad. Sci.* (1991) 635, 221-233.
- Robitaille, R., Adler, E.M. and Charlton, M.P. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* (1990) 5, 773-779.
- Robitaille, R. and Charlton, M.P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *Journal of Neuroscience* (1992) 12, 297-375.
- Robitaille, R., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J. and Charlton, M.P. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* (1993) 11, 645-655.
- Sano, K., Enomoto, K. and Maeno, T., Effects of synthetic  $\omega$ -conotoxin, a new type  $Ca^{2+}$  antagonist, on frog and mouse neuromuscular transmission. *Eur. Jour. Pharm.*, 141 (1987) 235-241.
- Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E. and Tsien, R.W. Distinctive Biophysical and pharmacological properties of Class A (BI) calcium channel Alpha 1 subunits. *Neuron* (1993) 11: 291-303.
- Scott, R.H., Sutton, K.G. and Dolphin, A.C. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends in Neurosciences* (1993) 16, 4:153-160.
- Sher, E., Gotti, C., Canal, N., Scopetta, C., Piccolo, G., Evoli, A. and Clementi, F. Specificity of calcium channels autoantibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Lancet* (1989) 2: 640-643.
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F. and Dascal, N. The role of the subunits in the function of the calcium channels. *Science* (1991) 253:1553-1557.
- Smith, S.J. and Augustine, G.J., Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release, *Trends in Neurosciences*, 11 (1988) 458-464.
- Smith, S.J., Osses, L.R. and Augustine, G.J., in *Calcium and Ion Channel Modulation* (editado por Grinnel, A., Armstrong, D. and Jackson, M.) pags.:147-156. Plenum Press.
- Snutch, T.P., Tomlinson, W.J., Leonard, J.P. and Gilbert, M.M. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* (1991) 7: 45-57.
- Snutch, T.P. and Reiner, P.B.  $Ca^{2+}$  channels: diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* (1992) 2:247-253.

- Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.T., Vincent, S.R. and Snutch, T.P. Structure and functional expression of a member of the Low-voltage-activated calcium channel family. *Science* (1993) 260: 1133-1136.
- Stanley, E.F. single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron* (1993) 11:1007-1011.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A. and Numa, S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by Dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* (1988) 336: 134-139.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. and Numa, S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscles. *Nature* (1987) 328:313-318.
- Trautmann, A. and Marty, A. Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K channels by carbamoylcholine in rat lacrimal glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:611-615.
- Tsien, R.W., Ellinor, P.T., Horne, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol. Sci.* (1991) 12:349-354.
- Turner, T.J., Adams, M.E. and Dunlap, K. Calcium channels coupled to glutamate release identified by  $\omega$ -Aga-IVA. *Science* (1992) 258:310-313.
- von Gersdorff, H. and Matthews, G. Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* (1994) 367: 735-739.
- Wessler, I., Dooley, D.J., Osswald, H. and Schlemmer, F. Differential effects of  $\omega$ -conotoxin (CT) on acetylcholine release from the central and peripheral nervous system. *Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*(1989) 339 :R89.
- Wessler, I., Dooley, D.J., Osswald, H. and Schlemmer, F. Differential blockade by nifedipine and  $\omega$ -conotoxin GVIA of alpha 1 and beta 1 adrenoreceptor-controlled calcium channels on motor nerve terminals of the rat. *Neurosci. Lett.* (1990) 108: 173-178.
- Wessler, I., Dooley, D.J., Werhand, J. and Schlemmer, F. Differential effects of calcium channel antagonists (omega-conotoxin GVIA, nifedipine, verapamil) on the electrically-evoked release of [3H]acetylcholine from myenteric plexus, phrenic nerve and neocortex of rats. *Naunym-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (1990), 341: 288-294.
- Wheeler, D.B., Randall, A. and Tsien, R.W. Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* (1994) 264:107-111.
- Wheeler, D.B., Tsien, R.W. and Randall, A. Identification of calcium channels that control neurosecretion. *Science* (1994) 226: 830-831.
- Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B. and Harpold, M.M. Structure and functional expression of Alpha 1, Alpha 2, and Beta subunits of novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* (1992) 8: 71-84.
- Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B. and Harpold, M.M. Structure and functional expression of *an* omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* (1992) 257: 389-395.

Yawo, H. and Momiyama, A. Preferential inhibition of  $\omega$ -CgTx sensitive presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adenosine autoreceptors. *Nature* (1993) 365:256-258.

Yawo, H. and Momiyama, A. Re-evaluation of calcium currents in pre- and postsynaptic neurons of the chick ciliary ganglion *J. Physiol. (Lond.)* (1993) 460:153-172.

Zucker, R.S. Short term synaptic plasticity. *Ann. Review of Neuroscience.* (1989) 12: 13-32.