

Tesis de Posgrado

Caracterización farmacológica y modulación de los canales de calcio voltaje-dependientes de terminales sinápticos

Alvarez Maubecin, Verónica

1996

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alvarez Maubecin, Verónica. (1996). Caracterización farmacológica y modulación de los canales de calcio voltaje-dependientes de terminales sinápticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2897_AlvarezMaubecin.pdf

Cita tipo Chicago:

Alvarez Maubecin, Verónica. "Caracterización farmacológica y modulación de los canales de calcio voltaje-dependientes de terminales sinápticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2897_AlvarezMaubecin.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

“Caracterización farmacológica y modulación de los canales de calcio voltaje-dependientes de terminales sinápticos”

Autor: Lic. Verónica Alvarez Maubecin

Director: Dr. Osvaldo Daniel Uchitel

Lugar de trabajo: 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”

Diciembre de 1996

Agradezco

al *Dr. Osvaldo Uchitel*, por su enorme contribución a mi formación y por la posibilidad de realizar este trabajo.

a todos mis compañeros del laboratorio por su gran colaboración y porque es una alegría trabajar junto a ellos. En particular:

a *Fabi Scornick*, porque es la principal responsable de mis siete años en el laboratorio y quien se ha transformado en mi consejera
a *Ramiro Pisnoy*, por su colaboración en los experimentos del capítulo 2 y 3, por no aburrirse trabajando conmigo y porque es un placer aprender junto con él
a *Silvina Fratantoni*, por haberme corregido eternamente mis cartas y por su alegría
a *Marce Rosato Siri*, por su colaboración en los experimentos del primer capítulo y por su compañerismo
a *Eleo Katz*, por todo lo que me enseñó y espero seguir aprendiendo de ella
a *Gise Weisz*, por su afectuosos compañerismo

a *Dany Calvo, Guille Perez, Manel y Charly Fitzsimons*, por las nutritivas discusiones de mediodía y por el apoyo

a los ex-integrantes del lab:

Vivi Sanchez y Carlitos Sanchez Antelo por su colaboración en los experimentos del capítulo 1 y porque uptakear con ellos era un lujo
el *Negro Pablo Ferro* por los salvadores servios técnicos y por estar siempre presente
y a *Dario Protti* por su consejos y apoyo, aún desde la distancia

a la *Dra. Elena Girardi* y al *Dr. Marcelo Vatta*, por su colaboración en los experimentos del capítulo 2 y 3, respectivamente

a mis amigos:

Ceci Pozzo, por su incondicional apoyo y compañía en todos los momentos
Vale Tekiel, por el acrobático empuje que me contagia
Hernán Alperin, por ayudarme en la impresión y compaginación de este trabajo
y a los tres, por sobre todo, por su amistad

a *Marcelika*, por el trabajo de corrección de la tesis y el electrónico aliento durante preparación del manuscrito

a *Esther*, mi madre, por el trabajo de corrección y a mi hermano *Sebastian*, por su colaboración en el diseño de los gráficos

a *Fernando*, mi compañero de aventuras, por su paciencia, y su amor

y finalmente, agradezco a *mis padres y mis hermanos* por confiar en mí.

Para Fernando

Que el cerebro sea una flor.
El cerebro debe ser una flor, petalosa, insospechada.
Sus estudios son estudios del caliz, pueden ser de terciopelo y vino, de estragos y gusanos.
Puede también que la sagrada esponja sea un pleamar, un decibel, un coraje tortuoso, una defidez de siglos.
Puede que lo sintamos fruta para abarcarlo de modo conocido, con los ganchos del saber.
Y puede que se desponje en Occidente atacado de Zen y también.
Puede que sea zurcido por ciencias verónica que gozan caer la codicia de la claridad del día.
Verdad
Todo hallazgo anida en su posibilidad pretérita.
Los espías y los curiosos tiemblan de futuro.
Deliran con cruzar.
Mueren por la bruta flor.

Ceci Pozzo.
(Enero del 97)

INDICE

<i>Resumen</i>	1
<i>Introducción general</i>	
El Ca²⁺ en los procesos celulares	4
El Ca²⁺ en la transmisión sináptica	7
Diversidad de los canales de Ca²⁺ (CCVD)	10
<i>CCVD activados por pequeñas despolarizaciones (LVA)</i>	12
<i>CCVD activados por grandes despolarizaciones (HVA)</i>	12
Aspectos moleculares de los CCVD	16
Regulación de los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes	22
Propiedades de los terminales nerviosos aislados	26

Capítulo 1

Caracterización farmacológica de los canales de calcio voltaje-dependientes de los terminales sinápticos de la corteza cerebral frontal de rata y el cerebro de pollo.

Introducción

<i>Aspectos generales</i>	30
<i>Empleo de toxinas y otros bloqueantes para la discriminación farmacológica de los CCVD</i>	31
a) w-Conotoxinas	32
b) w-Agatoxinas	35
c) Otros bloqueantes	36

Objetivo	38
Materiales y Métodos	
<i>Preparación de la fracción cruda de sinaptosomas</i>	39
<i>Obtención de la fracción pura de sinaptosomas</i>	
Algunos aspectos importantes de los procedimientos de purificación	41
Técnica de purificación de sinaptosomas con gradientes de Percoll	42
<i>Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en sinaptosomas</i>	44
<i>Curva de calibración</i>	47
<i>Soluciones</i>	48
<i>Cálculos y estadística</i>	48
<i>Materiales</i>	49
Resultados	
<i>Condiciones para la estimulación del influjo de Ca^{2+} a los terminales sinápticos</i>	51
<i>Efecto de ω-CgTx GVIA sobre la captación de Ca^{2+} inducida por despolarización en los terminales sinápticos de corteza frontal de rata y cerebro de pollo</i>	53
<i>La FTX inhibe la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de ambas especies</i>	54
<i>Efecto de w-Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+}</i>	55
<i>Acción conjunta de w-CgTx GVIA y FTX sobre la captación de Ca^{2+} en sinaptosomas de cerebro de pollo</i>	56
<i>Efecto de la w-CgTx MVIID, nitrendipina y cadmio sobre la captación de Ca^{2+} estimulada</i>	58
Discusión	60

Capítulo 2

Efecto del tratamiento con una droga convulsivante sobre las propiedades farmacológicas de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de los terminales sinápticos de cerebro de rata.

Introducción

<i>Aspectos generales de la regulación de los CCVD</i>	67
<i>Actividad convulsiva y drogas convulsivantes</i>	69
<i>El ácido 3-mercaptopropiónico, su empleo como droga convulsivante</i>	71

Objetivo	73
-----------------	----

Materiales y métodos

<i>Tratamiento de los animales con el ácido 3-mercaptopropiónico</i>	74
<i>Preparación de la fracción cruda de sinaptosomas</i>	76
<i>Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en sinaptosomas</i>	76
<i>Soluciones</i>	76
<i>Cálculos y estadística</i>	76
<i>Materiales</i>	77

Resultados

<i>Influjo de Ca^{2+} basal y estimulado con K^+ en los terminales sinápticos</i>	78
<i>Sensibilidad farmacología de la captación de Ca^{2+} en terminales nervioso aislados de cerebro de ratas sometidas a tratamiento agudo con MP</i>	79
<i>Dependencia de la captación de Ca^{2+} con la concentración de KCl</i>	82
<i>Tratamiento crónico con MP: propiedades farmacológicas y</i>	

<i>dependencia con la concentración de KCl de la captación de Ca²⁺</i>	83
<i>Discusión</i>	86

Capítulo 3

Acción del Péptido Atrial Natriurético sobre el influjo de Ca²⁺ a través de los canales voltaje-dependientes de los terminales sinápticos de hipotálamo.

Introducción

<i>El péptido atrial natriurético</i>	90
<i>Receptores para ANP</i>	92
<i>Efectos fisiológicos del péptido atrial natriurético</i>	
Acción de ANP sobre los órganos periféricos	95
ANP en el sistema nervioso central	97
<i>El papel del hipotálamo en el control de la volemia</i>	98

<i>Objetivo</i>	101
------------------------	-----

<i>Materiales y Métodos</i>	102
------------------------------------	-----

Resultados

<i>Estimulación de la captación de Ca²⁺ en sinaptosomas de hipotálamo</i>	103
<i>Caracterización farmacológica de los CCVD presentes en los terminales hipotalámicos</i>	105

<i>Efecto de péptidos natriuréticos sobre la captación de Ca²⁺</i>	
Captación basal de Ca ²⁺	106
Acción de ANP sobre la captación de Ca ²⁺ estimulada	107
Péptido atrial natriurético de tipo C (CNP)	108
<i>Estudio de la acción inhibitoria de ANP sobre la captación de Ca²⁺ estimulada</i>	109
<i>Discusión</i>	111
<i>Discusión General</i>	117
<i>Bibliografía</i>	120
<i>Abreviaturas</i>	143

RESUMEN

El Ca^{2+} juega un papel preponderante en la regulación de numerosos procesos celulares tales como el acoplamiento excitatorio-contráctil, la secreción hormonal, la expresión de genes y la proliferación celular.

Además, en la neuronas, el Ca^{2+} que entra a través de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD) participa en la transmisión sináptica como una señal intracelular que dispara el proceso de liberación de neurotransmisor en respuesta a la despolarización de la membrana. Así, entre todos los procesos celulares en los que participa el Ca^{2+} en el sistema nervioso, el papel que cumple en la excitación es, sin lugar a dudas, uno de los más prominentes.

Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD) conforman una de las familias de canales iónicos más heterogéneas. Muy probablemente, esta característica refleja la gran diversidad de procesos celulares en los que participan.

De acuerdo a sus propiedades de activación, los CCVD han sido divididos en dos clases: los canales que se activan por pequeñas despolarizaciones (low voltage activated, LVA) y los canales que requieren grandes despolarizaciones para su activación (high voltage activated, HVA).

Entre los HVA, han sido descritos al menos tres tipos de canales de Ca^{2+} : los CCVD de tipo *L*, los de tipo *N* y los canales de tipo *P/Q*, distinguidos por su sensibilidad a bloqueantes. Los CCVD de tipo *L* son sensibles a las dihidropiridinas, compuestos que pueden actuar como antagonistas o agonistas; los de tipo *N* son canales bloqueados por la toxina ω -CgTx GVIA, y los de tipo *P/Q* son inhibidos por las toxinas ω -Aga IVA y FTX.

Uno de los objetivos de este trabajo es la caracterización farmacológica de los CCVD en los terminales sinápticos del cerebro de dos especies de vertebrados, el pollo y la rata. En el primer capítulo se determina la sensibilidad a los distintos bloqueantes que presenta el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente en sinaptosomas de cerebro anterior de pollo y corteza frontal de rata.

En los terminales sinápticos de corteza frontal de rata, los CCVD que median la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización ($[\text{K}]_e = 40 \text{ mM}$) son de alto umbral de activación y sensibles a ω -Aga IVA, FTX y altas concentraciones de ω -CgTx MVIID, características de los CCVD de tipo *P/Q*.

Contrariamente, el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente en los terminales nerviosos del cerebro anterior del pollo es mediado por CCVD de alto umbral de activación sensibles a ω -CgTx GVIA. Sin embargo, este proceso también es bloqueado, aunque parcialmente, por FTX, ω -Aga IVA y ω -CgTx MVIID. Estos resultados presentan evidencias de la existencia, en los terminales sinápticos del cerebro anterior del pollo, de un canal de Ca^{2+} con características farmacológicas no descritas anteriormente.

Por otro lado, los CCVD son componentes de membrana altamente regulados y, como consecuencia de la modulación de su actividad, los procesos que dependen de la entrada de Ca^{2+} a través de los mismos puede ser ajustados de manera muy precisa. Otro objetivo de este trabajo es el estudio de la modulación de la actividad de los CCVD de los terminales sinápticos.

En el capítulo 2 se determinan los posibles cambios en las propiedades del influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD en los terminales nerviosos aislados a partir de corteza frontal de rata, producidos como consecuencia del tratamiento de los animales con el ácido 3-mercaptopropiónico (MP), una droga convulsivante que provoca una generalizada hiperactividad neuronal.

Los animales fueron sometidos a dos tratamientos distintos con MP: tratamiento agudo (1 dosis MP 150 mg/kg) y tratamiento crónico (1 dosis MP 35 mg/kg cada 24 horas, durante 3 días) y estudiados en los periodos de convulsión o postconvulsión.

Las propiedades farmacológicas de los CCVD que participan del influjo de Ca^{2+} a los terminales sinápticos no son modificadas como consecuencia del tratamiento agudo ni del tratamiento crónico con MP. Más aún, tampoco es afectada significativamente la dependencia de la captación de Ca^{2+} con la concentración extracelular de KCl en los

animales tratados con MP, lo que podría sugerir que las características de activación de los CCVD tampoco son alteradas por el tratamiento.

En el estudio desarrollado en el capítulo 3, se determina el efecto modulador del péptido atrial natriurético (ANP) sobre la actividad de los CCVD de los terminales sinápticos de hipotálamo de rata. ANP, además ser liberado por los miocitos atriales en respuesta al estiramiento de la pared del atrio, es sintetizado y liberado en el sistema nervioso central, en particular, en el hipotálamo.

En este trabajo se analiza el efecto del ANP sobre la entrada de Ca^{2+} a los terminales nerviosos aislados de hipotálamo de rata. ANP inhibe potentemente y de manera dependiente de la concentración la entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente ($\text{IC}_{50} = 2 \text{ nM}$). Este proceso es también bloqueado por la toxina ω -Aga IVA, indicando que los CCVD involucrados en el influjo de Ca^{2+} a los terminales de hipotálamo podrían pertenecer a los tipo *P/Q*.

Por otro lado, otro péptido de la familia de los factores natriuréticos, el péptido natriurético tipo C, no afecta el influjo de Ca^{2+} en esta preparación, lo que sugiere la especificidad de la acción de ANP.

En este trabajo tesis se identifican las propiedades farmacológicas de los CCVD de terminales sinápticos del SNC del pollo y la rata, y de esta manera, los resultados aportan a la comprensión de los componentes involucrados en la transmisión sináptica en el SNC de vertebrados.

Por otro lado, este estudio proveen evidencias del papel modulador del péptido atrial natriurético sobre la actividad de los CCVD de los terminales sinápticos de hipotálamo de rata. Estos resultados podrían facilitar la comprensión de los efectos fisiológicos de ANP sobre el sistema nerviosos central y de los mecanismos involucrados en el control de la volemia y la presión arterial.

Introducción General

El Ca^{2+} en los procesos celulares

El Ca^{2+} juega un papel preponderante en la regulación de numerosos procesos celulares tales como el acoplamiento excitatorio-contráctil, la secreción hormonal, la expresión de genes y la proliferación celular (Augustine y Neher, 1992; Sheng y Greenberg, 1990; Zafra et al., 1990). En particular en las neuronas, el Ca^{2+} participa de los procesos de comunicación e integración de la información a través de la modulación de la excitabilidad neuronal, por su acción sobre otros canales iónicos, y en forma directa mediante la generación de potenciales eléctricos dendríticos y somáticos (Tsien et al., 1988; Smith y Augustine, 1988).

Además, el Ca^{2+} regula la incorporación de material en el proceso de transporte axoplásmico, es esencial en el acoplamiento entre la excitación y la liberación de neurotransmisores, y participa en fenómenos modulatorios de la transmisión sináptica tales como la potenciación o la depresión a largo plazo (Lynch y Baudry, 1984). En estas funciones celulares, el Ca^{2+} actúa como segundo mensajero, e interviene en la regulación de la actividad de enzimas y canales iónicos, y probablemente formando parte de programas genéticos responsables de respuestas celulares a largo plazo (Sheng y Greenberg, 1990).

En el interior de las células existen abundantes cantidades de Ca^{2+} , pero gran parte de este se encuentra secuestrado en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico, y parte unido a proteínas. Es por ello que la concentración como catión libre en el citoplasma de las células es menor a $0,1 \mu\text{M}$. Contrastando, en el medio extracelular la concentración de Ca^{2+} es del orden milimolar, existiendo por lo tanto un gradiente de concentración entre el medio extracelular y el intracelular de unas 10000 veces.

Diversos mecanismos mantienen la concentración de Ca^{2+} intracelular en niveles estables por debajo de $0,1 \mu\text{M}$. En condiciones de reposo la permeabilidad de la membrana plasmática para el Ca^{2+} es muy baja impidiendo el ingreso masivo del catión. Por otro lado, la presencia en el citoplasma de gran cantidad de proteínas que unen Ca^{2+} con alta afinidad (calmodulina, parvalbúmina, etc.) y la existencia de proteínas que funcionan como transportadores e intercambiadores de iones en la membrana plasmática y en las de

organelas, permiten el mantenimiento de la homeostasis en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Los componentes y estructuras que participan en el balance o “*buffering*” del Ca^{2+} se resumen en la Figura 0.1. en el contexto de un terminal presináptico. Sin embargo, idénticos mecanismos de *buffering* de Ca^{2+} han sido descritos en otras regiones de las neuronas.

En respuesta a estímulos de naturaleza variada (cambios en el potencial, mensajeros químicos), la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta a valores cercanos a los 400 μM . Estos cambios rápidos y transitorios en la concentración de Ca^{2+} intracelular son, principalmente, consecuencia dos procesos:

a) Aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} . Esto se produce por la apertura de canales por los cuales el Ca^{2+} pasa desde el exterior al interior celular arrastrado por su gradiente electroquímico. Dos grupos de canales permeables a Ca^{2+} han sido descritos en la membrana plasmática de las neuronas y serán tratados mas adelante.

b) Liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares. Esto se produce como consecuencia de la activación de canales e intercambiadores presentes en la membrana de las mitocondrias y del retículo endoplásmico liso, dos organelas que funcionan como los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Un ejemplo es el caso de hormonas que, actuando sobre receptores en la superficie celular, estimulan la formación de inositol trifosfato (IP_3), que activa canales permeables a Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplásmico, con la consiguiente liberación del ion al citoplasma.

En las células excitables estos fenómenos se combinan tal que el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular promueve la liberación de más Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. El rápido aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , como consecuencia de la apertura de canales en la membrana plasmática, activa canales intracelulares que liberan Ca^{2+} produciendo el fenómeno conocido como “liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} ”. Este proceso que genera una onda masiva de liberación de Ca^{2+} desde las organelas al citoplasma es considerado de gran importancia en la producción de aumentos locales en la concentración de Ca^{2+} , es decir, que se generan principalmente en estructuras

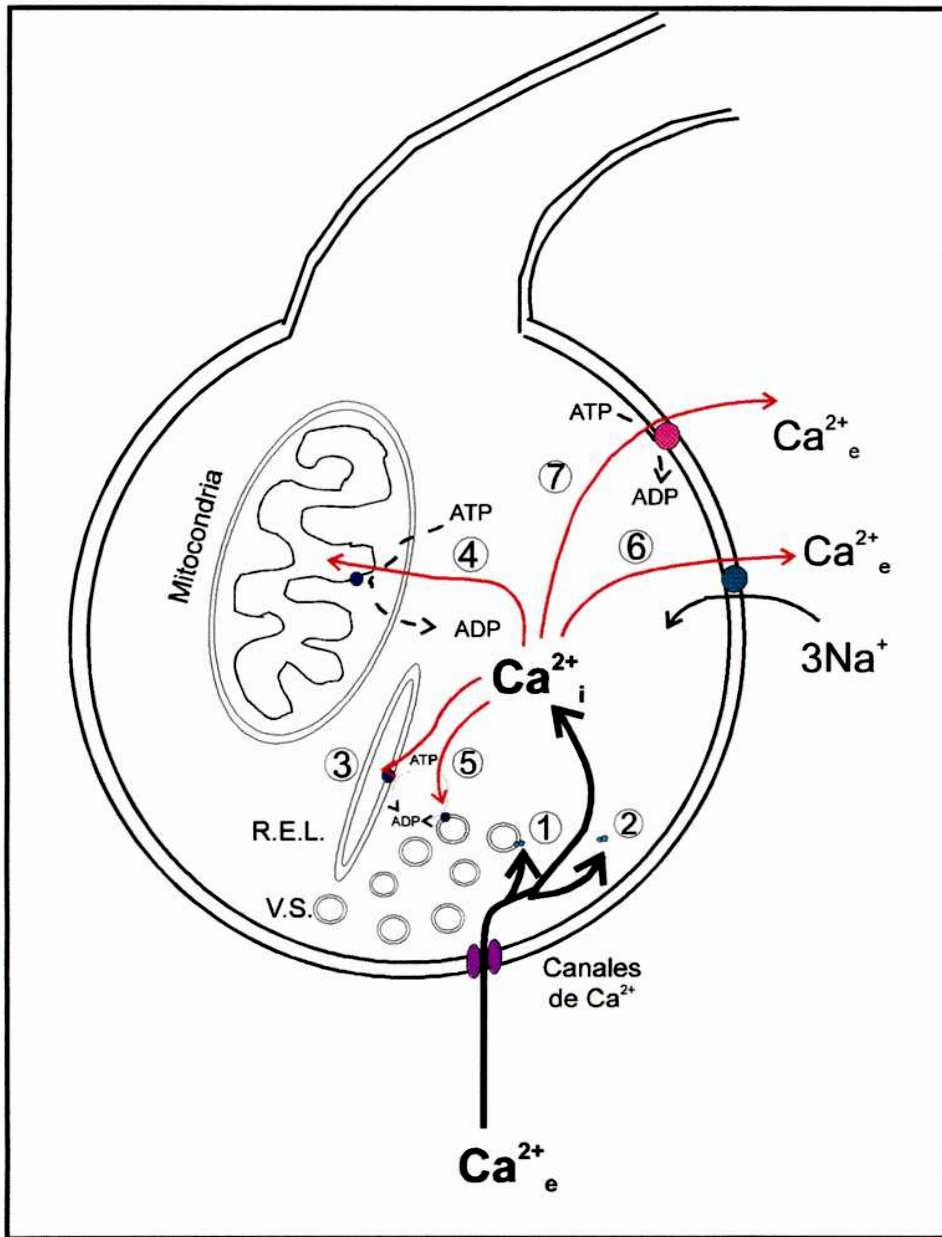


Figura 0.1. Vías de transporte y organelas involucradas en la regulación del balance o *buffering* de Ca^{2+} en el terminal presináptico. Principales vías de entrada de Ca^{2+} : los canales permeables a Ca^{2+} . (1) Proteínas que unen Ca^{2+} involucradas en procesos celulares, por ejemplo, liberación de neurotransmisor; (2) Proteínas que unen Ca^{2+} involucradas en el *buffering*, por ejemplo, parvalbúmina; (3) REL, Retículo Endoplásmico Liso, almacenamiento de Ca^{2+} ; (4) Mitocondrias, almacenamiento de Ca^{2+} ; (5) V.S., vesículas sinápticas que captan Ca^{2+} . Principales vías de salida del Ca^{2+} : (6) intercambiador Na^+/Ca^{2+} ; (7) bomba de Ca^{2+} . Esquema extraído de Blaustein, M.P. (1988).

fisiológicamente compartimentalizadas como, por ejemplo, las espinas dendríticas (Miller R.J., 1992).

En las neuronas y otras células excitables, los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} están asociados a la apertura de dos tipos de canales: los canales activados por sustancias químicas, y los canales iónicos activados por cambios en el potencial de membrana.

Dentro del primer grupo se encuentran los receptores ionotrópicos, receptores para neurotransmisores cuya activación provoca el flujo de iones; y los canales iónicos activados por segundos mensajeros.

Por otro lado, los canales de Ca^{2+} activados por cambios en el voltaje o canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD) reciben esta denominación porque la probabilidad de apertura del canal aumenta enormemente cuando la membrana plasmática se despolariza. Los CCVD forman una extensa familia que se describe, en detalle, más adelante.

El Ca^{2+} en la transmisión sináptica

Las sinápsis químicas representan la principal forma en que las células del sistema nervioso de los vertebrados se comunican entre sí y con sus células efectoras. El Ca^{2+} participa en la transmisión sináptica como una señal intracelular que dispara el proceso de liberación de neurotransmisor en respuesta a la despolarización de la membrana. Así, entre todos los procesos celulares en los que participa el Ca^{2+} en el sistema nervioso, el papel que cumple en la excitación es, sin lugar a dudas, uno de los más prominentes.

La base de la teoría que propone el importante papel del Ca^{2+} en la transmisión sináptica es el resultado de un conjunto de descubrimientos que tuvieron lugar en la década de los 60 y los 70. Los estudios fisiológicos sobre la transmisión sináptica fueron preferentemente desarrollados en la sinápsis gigante del calamar, ya que las dimensiones del terminal presináptico, mucho mayores que la de los terminales sinápticos de vertebrados, facilita los registros electrofisiológicos y permite insertar microelectrodos para inyectar iones o

corriente dentro del terminal presináptico. Más importante aún, esta preparación permite la inserción simultánea de dos microelectrodos en el terminal presináptico, condición que era requerida en ese momento para realizar experimentos de fijación del voltaje “*voltage-clamp*”.

En 1967, Katz y Miledi demostraron que la transmisión sináptica en el sinápsis gigante de calamar no necesariamente requería la llegada del potencial de acción al terminal presináptico, sino que despolarizaciones del terminal, causadas por la inyección de corriente, inducían la liberación de neurotransmisor. Este descubrimiento tiene una gran importancia dado que permitió separar la excitabilidad eléctrica generada por el potencial de acción del mecanismo responsable de la liberación de neurotransmisor.

Katz y Miledi (1967b), además, demostraron que eliminando el Ca^{2+} de la solución extracelular se bloquea la transmisión sináptica y que, contrariamente, un aumento en la transmisión sináptica se observa cuando se aumenta la concentración extracelular de este ion. Estos dos hallazgos sentaron las bases para la idea de que la entrada de Ca^{2+} era imprescindible para la liberación de neurotransmisor y que el influjo podía ser inducido por despolarización del terminal sin necesidad de que el potencial de acción invadiera la presinápsis.

Unos años más tarde, Llinás y colaboradores (1980) realizaron experimentos de *voltage-clamp* en el terminal presináptico del axón gigante de calamar en los que, gracias al bloqueo de los canales de Na^+ y K^+ , pudieron registrar las corrientes de Ca^{2+} presinápticas. Mostraron que despolarizaciones graduadas del terminal generaban corrientes de Ca^{2+} graduadas en el terminal presináptico y una respuesta postsináptica modulada por la amplitud de esta corriente. En primer lugar, esto demostró la existencia de canales de Ca^{2+} en el terminal sináptico y, confirmó que estos podían ser activados por despolarizaciones del terminal y eran responsables de la entrada de Ca^{2+} que inducían la liberación de neurotransmisor.

Como consecuencia de la corta latencia observada entre los registros de la corriente de Ca^{2+} presináptica y la respuesta postsináptica, solo 0,2 milisegundos, estos investigadores propusieron que los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes debían estar localizados próximos

al sitio de liberación de neurotransmisor. Y más aún, las vesículas sinápticas debían también estar colocalizadas en esta región (Llinás et al., 1981).

Los estudios estructurales del terminal sináptico aportaron el otro conjunto de evidencias que, sumadas a los descubrimientos fisiológicos, nos permiten alcanzar la comprensión que hoy tenemos de los mecanismos que participan de la transmisión sináptica. En 1954, De Robertis y Bennett mostraron por primera vez la presencia de grandes cantidades de pequeñas organelas, las vesículas sinápticas, en los terminales sinápticos. Cada una de estas organelas mide aproximadamente 40-50 nM de diámetro y almacena miles de moléculas de neurotransmisor.

Las vesículas sinápticas son estructuras subcelulares que no están distribuidas uniformemente en el terminal sináptico, sino que se encuentran agrupadas y próximas a zonas de mayor densidad membrana plasmática denominadas *zonas activas*. Interesantes detalles de la estructura de la membrana del terminal fueron revelados por la técnica de criofractura en la placa neuromuscular de la rana. Grupos ordenados de grandes proteínas transmembrana son el principal constituyente de las *zonas activas* (De Robertis E., 1967).

Estos mismos estudios realizados en la sinápsis gigante del calamar, confirmaron esta observación y sugirieron que las proteínas que forman las *zonas activas* son sitios por donde entra el Ca^{2+} (Pumplin y Reese, 1978; Pumplin et al., 1981).

Pero más interesante aún resultó la comparación de las micrografías de las réplicas de criofractura del terminal antes y algunos milisegundos después de ser estimulado. Así pudo verse que, luego de la estimulación, en las zonas próximas a las *zonas activas* aparecían huecos en la membrana que serían el resultado de la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana (Heuser y Reese, 1981; Miller y Heuser, 1984)

Estudios posteriores en los que se introdujo un indicador fluorescente para Ca^{2+} , Fura-2, y quelantes de Ca^{2+} con distintas cinéticas para la unión al Ca^{2+} en el terminal presináptico del axón del calamar revelaron que sólo el quelante de Ca^{2+} BAPTA, que une el ion muy rápidamente, es capaz de bloquear la liberación (Augustine et al., 1992). Por otro lado, EGTA, un quelante más lento, reduce la señal del indicador Fura-2 sin afectar la liberación. Estos resultados demuestran que la liberación de neurotransmisor ocurre dentro de los

primeros 10 μ segundos después entrada de Ca^{2+} al terminal y sugieren que las vesículas sinápticas están muy próximas a los sitios por donde entra el Ca^{2+} .

Otro hecho muy interesante es que estudios de este tipo permitieron tener una idea aproximada del rango de variación de la concentración de Ca^{2+} en el terminal y, mucho más importante aún, mostraron que el aumento en la concentración de Ca^{2+} en las *zonas activas* es, por lo menos, diez veces mayor que en el resto del terminal presináptico (Smith y Augustine, 1988).

Esta evidencia fue la semilla de la actual teoría acerca de la existencia de *microdominios*, es decir, regiones acotadas del terminal donde, como consecuencia de la apertura de los CCVD, el aumento en la concentración de Ca^{2+} es muy grande. Esta teoría además propone que el aumento de Ca^{2+} en la vecindad de los canales de Ca^{2+} , o sea en los *microdominios* y no el aumento en todo el terminal, es la señal que desencadena la liberación de neurotransmisor (Simon y Llinás, 1985; Zucker y Fogelson, 1986; Augustine y Neher, 1992).

Si bien hoy en día nadie discute el importante papel que juega el Ca^{2+} en la transmisión sináptica, la gran heterogeneidad de la familia de los CCVD genera el interrogante de cuáles y cuántos son los tipos de CCVD involucrados en este proceso. Sin embargo, la extensa cantidad de información sobre las propiedades de las distintas clases de canales resumida a continuación provee de las herramientas necesarias para analizar esta pregunta.

Diversidad de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD)

Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes conforman una de las familias de canales iónicos más heterogéneas. Muy probablemente, esta característica refleja la gran diversidad de procesos celulares en los que participan los CCVD.

Cada neurona contiene múltiples tipos de canales de Ca^{2+} y todos ellos son fundamentales para la integración y la expresión de la actividad neuronal. Los distintos tipos de CCVD difieren en su localización celular, sus propiedades biofísicas y farmacológicas, y también, están sujetos a distintos mecanismos de modulación.

Los CCVD han sido clasificados según diferentes criterios pero está ampliamente aceptado que hay dos clases de CCVD definibles por su perfil de activación: los que tienen un bajo umbral de voltaje para su activación (low voltage-activated, LVA) y los que requieren grandes despolarizaciones para su activación (high voltage-activated, HVA) (Tabla 0.1)

	Tipos de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes				
	LVA	HVA	HVA	HVA	HVA
	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>P</i>	<i>Q</i> ⁶
Activación a ¹ (mV)	-70	-20	0	-15	-15
Rango de inactivación (mV)	-110 a -60	-120 a -30	-60 a -10	no posee	?
Inactivación ² (ms)	$\tau \gg 20-50$	$\tau \gg 50-80$	$\tau \gg 500$	no posee	$\tau \gg 100$
Conductancia del canal ³ (pS)	8	12-18	25	9-19	?
Bloqueo por Cd^{2+}	resistente	sensible	sensible	sensible	sensible
Bloqueo por	Amiloride	ω -CgTx GVIA ⁴ ω -CgTx MVIIC	dihidropiridinas	ω -Aga IVA ⁵ ω -CTxMVIIC FTX	ω -Aga IVA ω -CTxMVIIC FTX

Tabla 0.1. Características biofísicas y farmacológicas de los distintos tipos de CCVD

(1) En 110 mM Ba^{2+} ; (2) 0 mV, 10 mM extracelular Ca^{2+} o Ba^{2+} (21°C); (3) Conductancia máxima en 110 mM Ba^{2+} (21°C); (4) ω -CgTx GVIA extraída de *Conus geographus*; (5) ω -Aga IVA extraída de *Agelenopsis aperta*; (6) Las características de canal único no se conocen, se consideran semejantes a las obtenidas por expresión de la subunidad α_1 A en oocitos de *Xenopus sp.* Extraído de Randall y Tsien (1995).

Los CCVD activados por pequeñas despolarizaciones (Low Voltage Activated, LVA)

Muchas células, en respuesta a una despolarización suave, generan una corriente de Ca^{2+} que se activa a potenciales muy cercanos al potencial de reposo. Estas corrientes se desvanecen muy rápidamente, a pesar de mantenerse la despolarización, fenómeno conocido como inactivación de la corriente. Debido a la corta duración de estas corrientes de Ca^{2+} , ellas son llamadas **corrientes de tipo T** (transientes).

Los CCVD de tipo T, responsables de las corrientes de Ca^{2+} con las características recién descritas, están presentes en las neuronas del sistema nervioso central y periférico, así como también, en las células del músculo liso, cardíaco y estriado; en fibroblastos, osteoblastos, oocitos y células secretoras (Carbone y Swandulla, 1989).

Como consecuencia de que la activación de los CCVD de tipo T ocurre a potenciales cercanos al potencial de reposo, estos canales son los responsables de la actividad neuronal oscilatoria, es decir, de las fluctuaciones en el potencial de membrana independientes de la actividad sináptica, y por lo tanto, son importantes para la regulación de la excitabilidad neuronal (Llinás y Yarom, 1981; Bean, 1985).

CCVD activados por grandes depolarizaciones (High voltage activated, HVA)

Los CCVD correspondientes a la clase HVA se encuentran ampliamente distribuidos en las neuronas, las células musculares y las células secretoras (Carbone y Swandulla, 1989). Además del alto umbral de activación, las corrientes de Ca^{2+} generadas por estos canales pueden ser rápida identificadas por dos características:

- la cinética de inactivación de las corrientes varía con el voltaje y con la concentración de Ca^{2+}
- la conductancia de los canal HVA es mayor (2 o 3 veces) que la conductancia de los canales de tipo T

Dentro de los HVA, al menos tres tipos de CCVD han sido identificados, los CCVD de tipo L, los de tipo N, y los CCVD de tipo P.

La corriente de tipo L ("long lasting") se mantienen activas mientras subsista la despolarización, mostrando muy poca inactivación. Se caracterizan por su sensibilidad a las dihidropiridinas (DHP), siendo bloqueadas por la nitrendipina, nifedipina y nimodipina, y activadas por la DHP agonista Bay K 8644 (ver Introducción, Capítulo 1).

Las corrientes de tipo *L* han sido identificadas en todos los tipos de células musculares y en las células secretoras (Hoffman et al., 1994). En el sistema nervioso central, las áreas de mayor concentración de canales de tipo *L* investigadas mediante la fijación de DHP radioactiva, son la corteza y el hipocampo; pero también se los encuentra en el bulbo olfatorio, el núcleo caudado y el cerebelo (Gould et al., 1985). Los canales de tipo *L* se ubican fundamentalmente en los cuerpos neuronales y dendritas proximales, más que en los terminales sinápticos (Westenbroek et al., 1990).

Los CCVD de tipo *L* son esenciales para el acoplamiento de la excitación-contracción en el músculo esquelético, cardíaco y liso. En consecuencia, el empleo de antagonistas de los canales *L* para el tratamiento de la hipertensión es consecuencia de sus efectos fisiológicos sobre estos mecanismos.

Por otro lado, la participación de las corrientes de tipo *L* en el influjo de Ca^{2+} a las neuronas varía en los distintos tipos celulares. Mintz y colaboradores (1992b) mostraron que, en las neuronas CA3 del hipocampo, un 40 % de la corrientes de Ca^{2+} es transportada por canales tipo *L*; mientras que, en las células de Purkinje del cerebelo, los canales *L* solo participan con un 5% de la corriente de Ca^{2+} total (Mintz et al., 1992b).

La corriente tipo N se inactiva con una constante de tiempo (τ) de cientos de milisegundos, esto es más rápidamente que la *L*, pero mucho más lentamente que la *T*; por lo que su nombre deriva de su inicial descripción como corrientes *ni L ni T*.

Farmacológicamente se las reconoce por ser resistente a la acción de las DHP y por ser bloqueada por concentraciones nanomolares de ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA), una toxina peptídica del caracol marino *Comus geographus* (Olivera et al., 1985) (ver Introducción, Capítulo 1).

Estudios radioautográficos utilizando [125 I]- ω -CgTx GVIA sugieren la presencia de este tipo de canales en la sustancia gris del cerebro en concentración mayor que los de tipo *L*, incluyendo la corteza cerebral, hipocampo y bulbo olfatorio (Kerr et al., 1988; Takemura et al., 1988). También están presentes en algunas células secretorias y en la hipófisis (Sher y Clementi, 1991). Sin embargo, contrastando con la distribución celular observada para los canales de tipo *L*, los canales sensibles a ω -CgTx GVIA se encuentran localizados en los terminales sinápticos, además de en dendritas y cuerpos neuronales (Westenbroek et al., 1992).

Las corrientes de tipo *N* son predominante en los cuerpos neuronales de las neuronas simpáticas y conduce entre el 20 y el 40 % de las corrientes de Ca^{2+} en las células del hipocampo, corteza, médula y ganglios de la raíz dorsal, pero solo un 5 % de la corriente de Ca^{2+} en las neuronas de Purkinje (Mintz et al., 1992a).

Mediante el empleo del antagonista específico para los CCVD de tipo *N*, ω -CgTx GVIA, ha sido posible determinar el importante papel de las corrientes de Ca^{2+} de tipo *N* en la transmisión sináptica en la placa neuromuscular y sistema nervioso central de vertebrados inferiores (Olivera et al., 1994); y en el sistema nervioso simpático y en neuronas del sistema nervioso central de mamíferos, como por ejemplo, en hipocampo, estriado y corteza cerebral (Dunlap et al., 1995).

Otro tipo de corriente de Ca^{2+} activada por fuertes despolarizaciones (HVA) fue descrita en las células de Purkinje del cerebelo y denominada **corriente de tipo *P*** ("Purkinje") (Llinás et al., 1989). Estas corrientes se no se inactivan o lo hacen muy lentamente. Se diferencian farmacológicamente de las corrientes *N* porque no son sensibles a la ω -CgTx GVIA, y se distinguen de las corrientes *L* porque son resistentes a las DHP (Llinás et al., 1989).

Las corrientes de tipo *P* se caracterizan por ser sensible a dos componentes del veneno de la araña *Agenelopsis aperta* (funnel web spider), una poliamina de bajo peso molecular, funnel web toxin (FTX) (Llinás et al., 1989) y un péptido de 48 aminoácido (aa)

denominado ω -Agatoxina IVA (ω -Aga IVA) (Mintz et al., 1992a) (ver Introducción, Capítulo 1).

Estas toxinas permitieron la purificación del canal y la consiguiente preparación de anticuerpos policlonales que fueron empleados para estudiar la distribución de los CCVD de tipo *P* en el sistema nervioso central. Llinás y colaboradores (1992) observaron fuerte inmunorreactividad en la capa molecular del cerebelo, en particular en las dendritas de las células de Purkinje, en las células periglomerulares del bulbo olfatorio y corteza entorrinal, en neuronas del tallo cerebral, habenula, oliva inferior y piso del cuarto ventrículo; mientras que estos canales parecen escasamente localizados en las células del hipocampo, sustancia nigra y neocortex.

Los CCVD sensibles a ω -Aga IVA parecen ser los canales más fuertemente asociados a la liberación de neurotransmisor en el sistema nervioso central de mamíferos (Dunlap et al., 1995). Además, en mamíferos, estos canales regulan neurotransmisión a nivel de la placa neuromuscular (Protti y Uchitel, 1993).

Por otro lado, a partir de estudios en los que se emplearon técnicas de biología molecular, se describió una corriente de Ca^{2+} denominada **corriente de tipo Q**. Esta corriente, producto de la expresión en oocitos de una clase de subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} (α_1 clase A), es menos sensible a ω -Aga IVA que las corrientes *P* y posee una cinética de inactivación lenta, pero no nula como en el caso de las corrientes *P* (Randall y Tsien, 1995). Como ya se analizará mas adelante, aún está en discusión si las diferencias entre las corrientes *P* y *Q* se deben a las propiedades estructurales de las proteínas que conforman el canal y si son realmente dos clases distintas de corrientes de Ca^{2+} HVA.

Existen evidencias de la existencia de un nuevo tipo de corriente de Ca^{2+} voltaje-dependiente, la **corriente de tipo R** (resistente), denominada de esta manera, por la resistencia que tiene al bloqueo por ω -Aga IVA, ω -CgTx GVIA y las DHP (Zhang et al., 1993).

La falta de un antagonista específico para la corriente de tipo *R* dificulta su identificación y la determinación del papel fisiológico que cumple esta corriente en las células. Si bien algo similar ocurre con las corrientes de tipo *T*, para las que tampoco se ha encontrado un antagonista específico, las claras características biofísicas de las corrientes *T* permiten su rápida discriminación. Las propiedades biofísicas de las corrientes *R* y de los clones expresados en sistemas heterólogos, son intermedias y no permiten su clasificación dentro del grupo de los LVA ni de los HVA (Zhang et al., 1993; Tottene et al., 1996).

Aspectos moleculares de los CCVD

Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes son expresados en tan baja densidad en la membrana de las células excitables que los esfuerzos para su purificación empleando técnicas bioquímicas se han restringido a aquellos tejidos donde, inusualmente, hay una alta o localizada expresión de los CCVD. Este es el caso de las células del músculo esquelético, en las cuales, los CCVD son particularmente abundantes en el sistema de túbulos T. Así, la disección molecular de los canales de calcio ha sido posible en base a los estudios bioquímicos y moleculares realizados inicialmente en los canales de tipo *L* del músculo esquelético (Caterall et al., 1988).

Los CCVD son un complejo hetero-oligomérico conformado por 4 subunidades: α_1 , α_2/δ , β , γ (Figura 0.2.). La subunidad α_1 (175-270 kDa) forma el poro por el cual pasan los iones y es la principal responsable de dependencia con el voltaje de la activación y de las propiedades de permeabilidad del canal (Tsien et al., 1991; Campbell et al., 1988). Esta proteína posee cuatro regiones (I, II, III y IV); cada una de las cuales está formada por 6 regiones transmembranales (S1-S6) (Figura 0.2). Los segmentos S4 están cargados positivamente y se piensa que forma el sensor de voltaje, es decir la región en la molécula que desencadena los cambios conformacionales en respuesta a las variaciones del voltaje a través de la membrana. Por otro lado, tanto la subunidades α_1 como la β contiene sitios de fosforilación dependientes del AMP cíclico (cAMP), que deben estar fosforilados para la activación del canal (Mundiña-Weilenmann et al., 1991; Nunoki et al., 1989).

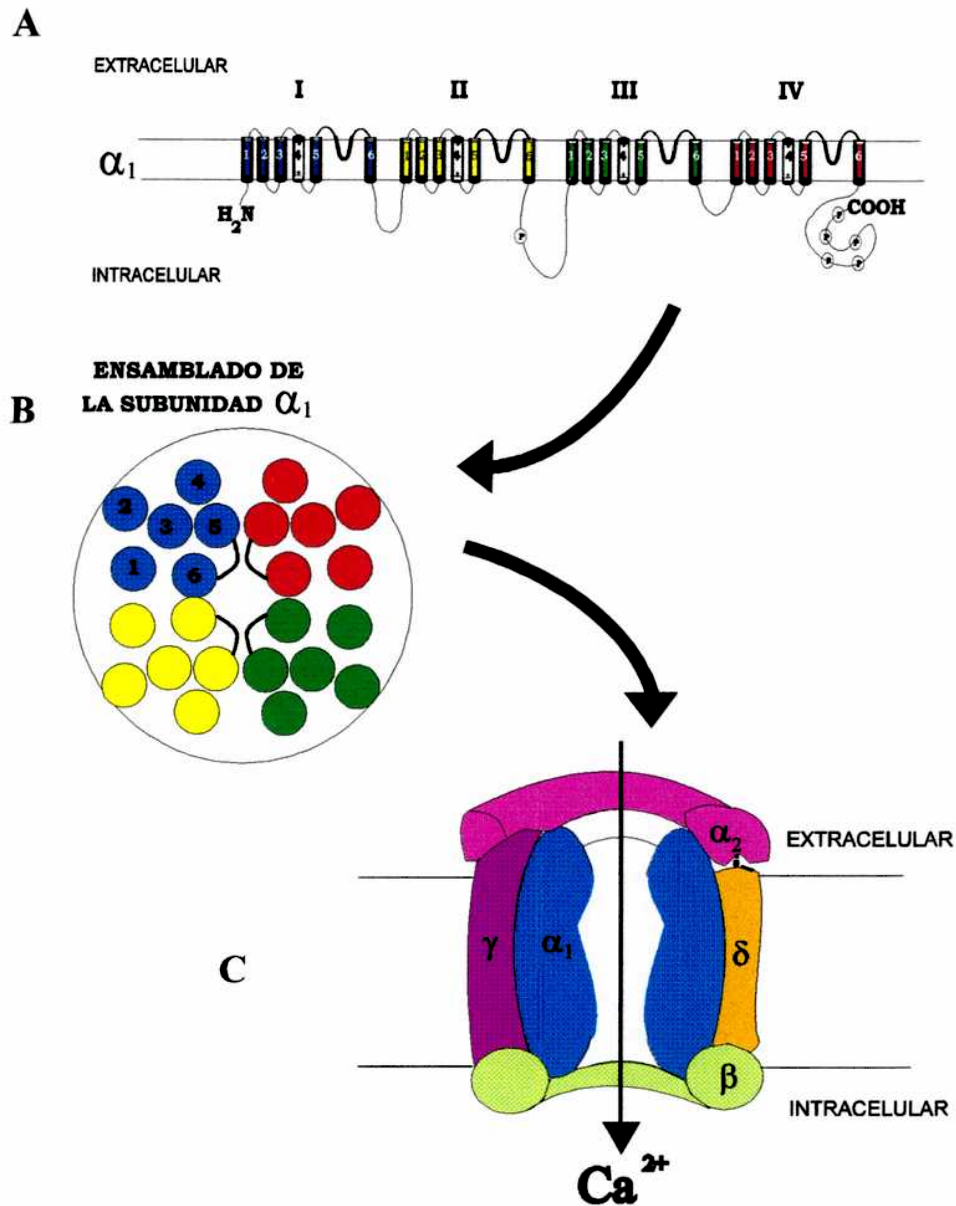


Figura 0.2. Estructura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

A) Subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes donde se distinguen las cuatro regiones (I, II, III, IV) con sus correspondientes dominios transmembrana (S1, S2, S3, S4, S5, S6) y las regiones intracelulares y extracelulares. B) Esquema de la que representa la aparente disposición de los dominios transmembrana de la subunidad α_1 en la membrana plasmática, nótese la posición del segmento S4, dominio que se supone responde a cambios en el voltaje. C) Esquema de la aparente disposición en la membrana plasmática de las cuatro subunidades que conforman los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente.

Las otras subunidades, si bien no son esenciales para el flujo voltaje-dependiente de iones, contribuyen significativamente al fenotipo funcional del canal nativo (Singer et al., 1991; Stea et al., 1994). La subunidad δ es una proteína transmembranal de 25-32 kDa; y la subunidad α_2/γ es un dímero de 125-160 kDa, producto de modificaciones postraduccionales de un único precursor (De Jongh et al., 1990). La subunidad β , cuyo peso molecular varía entre 50 y 80 kDa, es una proteína intracelular que aparece asociada al complejo desde la cara interna.

La subunidad β afecta la velocidad y la dependencia con el voltaje de la inactivación del canal. La coexpresión con la subunidad α_1 de distintas variantes de la subunidad β pueden producir cambios, de hasta 10 veces, en la constante de tiempo de la inactivación del canal conformado por la subunidad α_1 solamente. Además, diferentes subunidades β actúan modulando la dependencia con el voltaje de la activación y el estado estacionario de la inactivación (Stea et al., 1994).

En un principio, mediante técnicas bioquímicas, y más tarde, gracias al empleo de las herramientas de la biología molecular, fue posible la identificación de los componentes estructurales de los CCVD del cerebro de mamíferos.

La mayor heterogeneidad ha sido encontrada en la familia de subunidad α_1 y en la familia de la subunidad β . Un mínimo de seis genes distintos codifican para las subunidades α_1 denominadas de clase A, B, C, D, E y S (Birbaumer et al., 1994; Snutch y Peiner, 1992) (Figura 0.3.). Todas, exceptuando una clase (la clase S), son expresadas en el sistema nervioso y cada una de ellas pueda ser procesada por *splicing* alternativo. En consecuencia, en la actualidad se conocen, como mínimo, 19 subunidades α_1 estructuralmente distintas; 16 de las cuales son expresadas en el cerebro (Figura 0.3).

De forma similar, existe un mínimo de 4 genes para la familia de la subunidad β que codifican para, al menos, 9 proteínas distintas; la mayoría de ellas también expresadas en las neuronas. Así, la potencial heterogeneidad estructural por la combinación de los distintos integrantes de las familias de las subunidades es muy grande. Nuevamente, esta complejidad sugiere las diversas posibilidades de especialización funcional.

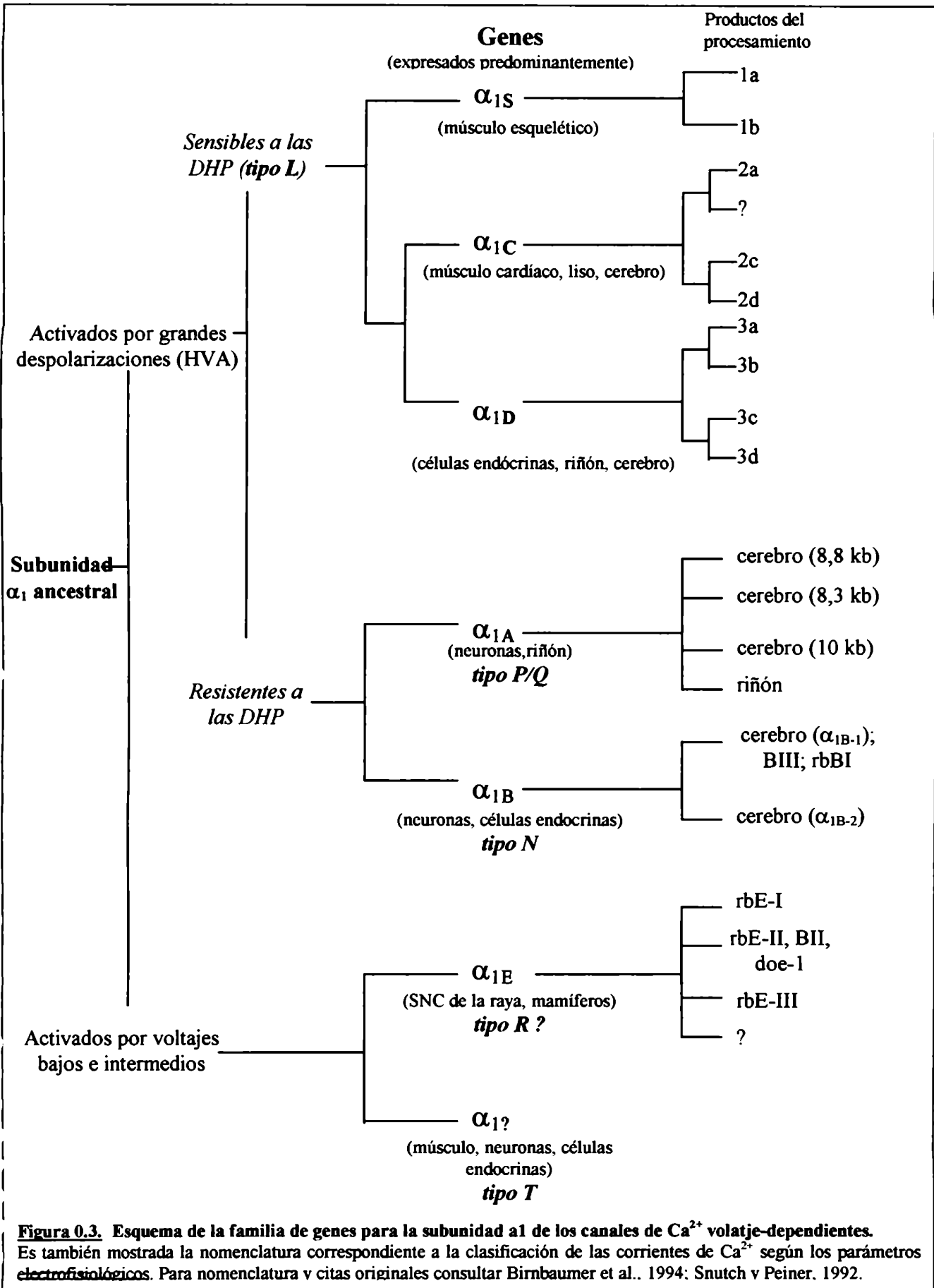


Figura 0.3. Esquema de la familia de genes para la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} volatje-dependientes. Es también mostrada la nomenclatura correspondiente a la clasificación de las corrientes de Ca^{2+} según los parámetros electrofisiológicos. Para nomenclatura y citas originales consultar Birnbaumer et al., 1994; Snutch y Peiner, 1992.

Con el objeto de determinar el significado funcional de esta heterogeneidad, se han expresado muchos de estos genes, solos y en combinación con las otras subunidades, en sistemas heterólogos, especialmente en oocitos de *Xenopus*. Más aún, estos estudios fueron promovidos por el interés por reconciliar la clásica división de los CCVD según criterios farmacológicos y biofísicos (Tabla 0.1), con la clasificación proveniente de los estudios de biología molecular (Figura 0.3.).

Sin embargo, hasta el momento la precisa determinación del fenotipo farmacológico es conocida sólo para los canales sensibles a las DHP. Los antagonistas del canal *L* se unen a la subunidad α_1 , en la putativa región extracelular entre los dominios SS1 y SS2 (Hofmann et al., 1994). Las subunidades α_1 de la clase S, C y D producen corrientes sensibles a las DHP, pero interesantemente, estas subunidades presentan cierta variabilidad en la región extracelular que podría explicar las diferentes sensibilidades a las DHP observadas, por ejemplo, en las corrientes de tipo *L* en músculo cardíaco y liso (Welling et al., 1993).

Los canales de Ca^{2+} de la clase B también han sido clasificados farmacológicamente. La expresión de la subunidad α_{1B} , en presencia de α_2 - δ y la subunidad β , en oocitos de *Xenopus* y en células embrionarias de riñón humano produce la unión de [^{125}I]- ω -CgTx GVIA a estas células (Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992); y la aparición de corrientes de Ca^{2+} sensibles a ω -CgTx GVIA en la células embrionarias de riñón humano y en miocitos de ratones disgénicos (Williams et al., 1992; Fujita et al., 1993). La toxina se une con una afinidad muy alta ($K_d \approx 50$ pM) y su lenta disociación (entre 10^{-4} - 10^{-5} /s) produce la inhibición casi irreversible de estas corrientes de Ca^{2+} .

Es considerado que la ω -CgTx GVIA produce una inhibición irreversible sólo sobre α_{1B} , sin embargo, aún no se sabe con certeza si la subunidad α_{1B} es la subunidad que enteramente determina el pegado de la toxina, ni si los diversos integrantes de la clase B de canales de Ca^{2+} expresan diferentes sensibilidades al antagonista. Esta última idea ha sido sugerida por el hecho de que las corrientes de Ca^{2+} de las neuronas simpáticas de rata son más sensibles a ω -CgTx GVIA ($\text{IC}_{50} = 0,7$ nM) que aquellas de las neuronas simpáticas de la rana ($\text{IC}_{50} = 33$ nM) (Hess P., 1990).

Los bloqueantes purificados del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* han sido especialmente útiles para definir las corrientes de Ca^{2+} de tipo *P*. Como ya fue mencionada anteriormente, ω -Aga IVA, uno de estos antagonistas, inhibe las corrientes *P* con una alta afinidad ($\text{IC}_{50}=1\text{-}50\text{ nM}$), y concentraciones en el rango de 100 y 200 nM son utilizadas para determinar la presencia de canales de tipo *P* en las neuronas (Mintz et al., 1992b; Mintz y Bean, 1993).

La observación de que la subunidad α_{1A} es expresada en grandes cantidades en las neuronas de Purkinje del cerebelo llevo a la especulación de que ω -Aga IVA sería el antagonista específico de los canales de Ca^{2+} que contienen la subunidad α_{1A} . Sin embargo, la expresión de la subunidad α_{1A} en oocitos de *Xenopus* resultó en una corriente de Ca^{2+} que es menos sensible a ω -Aga IVA comparada con las corrientes *P* de las neuronas de Purkinje (Sather et al., 1993; Stea et al., 1994). Esta corriente de Ca^{2+} mediada por la subunidad α_{1A} en los oocitos ha sido denominada de tipo *Q*.

En la actualidad, sin embargo, no está aún claro qué diferencias estructurales subyacen, si las hay, a las distintas sensibilidades al bloqueo por ω -Aga IVA de las corrientes *P* y *Q*. Sin bien, en las células grano de cerebelo ha sido descrita una corriente de Ca^{2+} con características similares a las corrientes *Q* (Randall y Tsien, 1995), no se descarta la posibilidad de las diferencias aparentes en la sensibilidad sean el resultado de distintos isotipos de la subunidad α_{1A} . Por otro lado, la combinación de subunidades que componen el canal o diferentes procesamientos postraduccionales, o ambos, podrían ser la causa de las diferencias observadas.

En el estudio realizado en las neuronas grano del cerebelo, Randall y Tsien (1995) proponen que las dos corrientes sensibles a ω -Aga IVA, las corrientes *P* ($K_d \approx 1\text{ nM}$) y *Q* ($K_d \approx 90\text{ nM}$), se distinguen por la cinética de inactivación, que es lenta para la corriente *Q*, e inexistente para la corriente *P* (corriente no-inactivada). Sin embargo, esta observación no fue reproducida en los experimentos realizados, en las células grano, por Tottene y

colaboradores (1996); donde se pone en tela de juicio la afirmación de que todas las corrientes con características del tipo *P* son bloqueadas con alta afinidad por ω -Aga IVA.

Dado que esta discusión aún esta abierta, y con el objeto de no restringir la discusión de los resultados planteados en este trabajo de tesis, en adelante nos referiremos a la toxina ω -Aga IVA como un antagonista de los CCVD de tipo *P/Q*.

La caracterización farmacológica de los canales de Ca^{2+} de la clase E ha estado restringida a estudios de la expresión de las subunidades en sistemas heterólogos; dado que existen pocos evidencias de corrientes de Ca^{2+} nativas con propiedades similares a las de la clase E. La expresión de la subunidad α_{1E-II} (o su homólogo *doe-1*) en oocitos de *Xenopus* da como resultado una corriente con características intermedias entre las corrientes HVA y LVA (Soong et al., 1993). Excepto por su alta sensibilidad al Ni^{2+} , ningún antagonista específico ha sido descrito para estas corrientes, razón por la cual quedan aún por ser determinadas las características farmacológicas de los canales clase E (Dunlap et al., 1995).

Regulación de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes

Como consecuencia de que los CCVD median la entrada de Ca^{2+} que desencadena la liberación de neurotransmisor, no resulta sorprendente que los CCVD sean el blanco de muchos eventos modulatorios que tienden a aumentar o disminuir su actividad y, de esta manera, modificar la eficacia sináptica.

Los mecanismos modulatorios de los CCVD mejor comprendidos son los ejercidos por neurotransmisores y en los que participa la proteína G. La mayoría de estos estudios han sido realizados en las neuronas de los ganglios simpáticos de rata, dado que estas neuronas pueden ser fácilmente aisladas y mantenidas en cultivo por varios días. Las corrientes de Ca^{2+} en estas neuronas son predominantemente corrientes de tipo *N* y, hasta el momento, se conocen mas de 20 neurotransmisores y neuromoduladores distintos que modulan la actividad del CCVD sensible a la ω -CgTx GVIA (Hille B., 1994). La mayoría de estos

neurotransmisores reducen entre un 20% y 90% las corrientes de Ca^{2+} de tipo *N* a través de una vía en la que participa la proteína G.

Existen múltiples evidencias, entre las que se encuentra la sensibilidad a la toxina de pertusis, que sugieren que, en la modulación por la acetilcolina, la somatostatina y la adenosina de los CCVD de tipo *N*, participa la proteína G_o , la proteína G más abundante en las neuronas (Hille B., 1994). Sin embargo, han sido descritas al menos cinco vías distintas que convergen en la modulación de los CCVD de tipo *N* (Figura 0.4.).

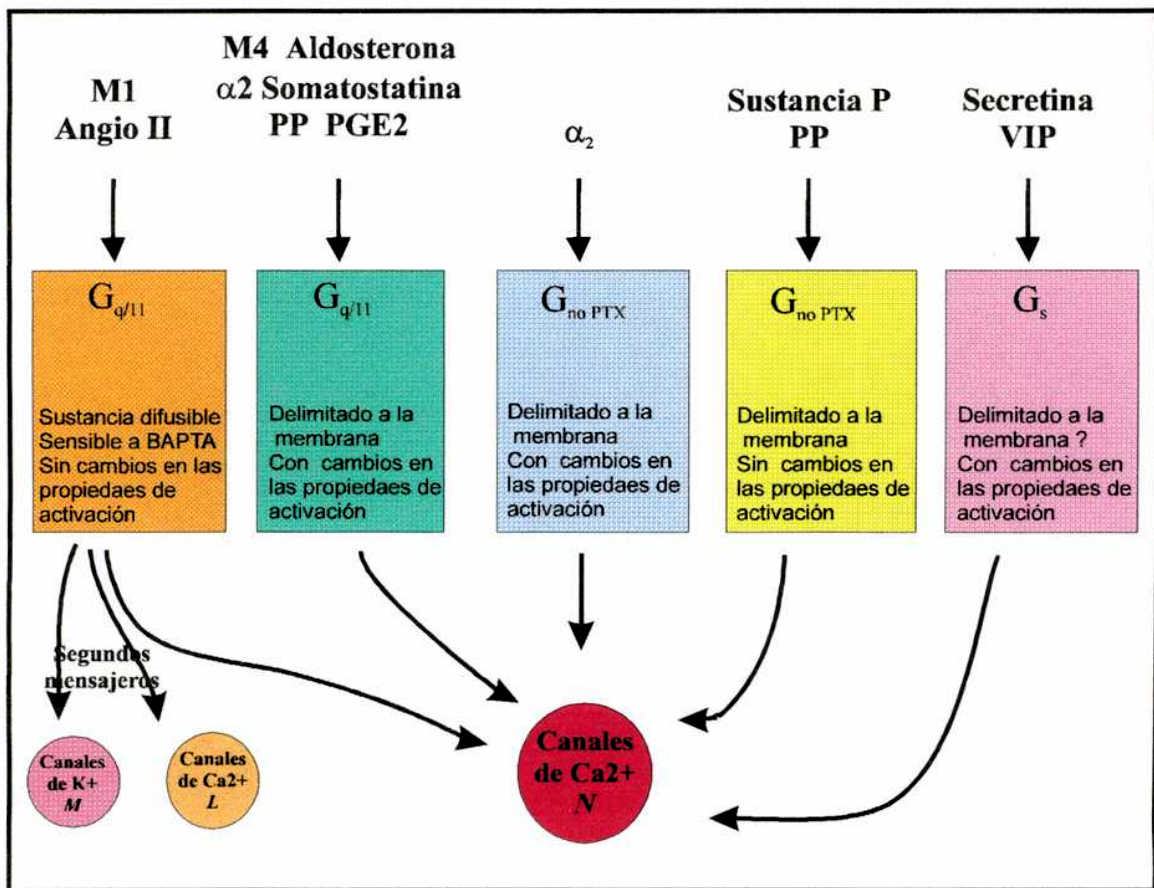


Figura 0.4. Cinco vías modulatorias que convergen en tres canales iónicos.

El esquema representa las vías modulatorias descritas en las neuronas simpáticas. Abreviaturas: Angio II, angiotensina II; SP, sustancia P; PP, polipéptido pancreático; G, proteína G; $G_{no\text{-}ptx}$, proteína G insensible a la toxina de pertusis; M_1 y M_4 , receptores muscarínicos; α_2 , receptores adrenérgicos α_2 ; PGE2, prostaglandinas E_2 ; y VIP, péptido vasoactivo intestinal.

Como puede observarse en la Figura 0.4, la regulación de los canales de Ca^{2+} puede involucrar la modulación de distintas propiedades biofísicas. Si bien es sabido que la proteína G afecta la actividad de la adenilato ciclasa y, en consecuencia regula los niveles de cAMP en el citoplasma, se ha demostrado que cuatro de las cinco vías descritas en las neuronas simpáticas, no están mediadas por cambios en el metabolismo del nucleótido cíclico.

Además, ninguno de los segundos mensajeros descritos han sido involucrados en el mecanismo de modulación, lo que sugiere que está delimitado a la membrana plasmática (Brown y Birnbaumer, 1990). Se presume que un componente de la proteína G en estado activo interactúa directamente con el canal, disminuyendo su probabilidad de apertura (Hill B., 1994).

Si bien, conclusiones rápidas proponían a la subunidad α de la proteína G (G_α) como el componente esencial para la ejecución de la modulación, la clarísima demostración de que las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G ($G_{\beta\gamma}$) son las que modulan, por ejemplo, los canales de $\text{K}^+_{(IR)}$ (canales de K^+ que rectifican hacia adentro, inward rectifier) (Logothetis et al., 1987; Reuveny et al., 1994), generó otra hipótesis que debió ser testada.

En un excelente trabajo, Stephen R. Ikeda (1996) demostró que las subunidades $G_{\beta\gamma}$, y no la subunidad G_α , participan en la modulación que ejerce la noradrenalina sobre los CCVD de tipo *N* en las neuronas simpáticas. La sobre-expresión transitoria de las subunidades $G_{\beta\gamma}$ en estas neuronas reproduce y ocluye el efecto de la noradrenalina sobre las corrientes de Ca^{2+} de tipo *N*. Contrariamente, la sobre-expresión de la subunidad G_α tiene efectos mínimos sobre los niveles basales de corriente *N* pero atenúa la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} que ejerce la noradrenalina. Esta última observación es consistente con el hecho de la subunidad G_α secuestra las subunidades $G_{\beta\gamma}$, impidiéndoles ejercer su acción moduladora.

Otro importante mecanismo descrito para modulación de los corrientes de Ca^{2+} es la fosforilación/defosforilación de los canales mediada por segundos mensajeros. Las primeras evidencias de la existencia de estos mecanismos surge de estudios de regulación de los canales de tipo *L* presentes en células cardíacas. La noradrenalina, actuando a través de los receptores β -adrenérgicos, aumenta la corriente de Ca^{2+} lenta; mientras que la acetilcolina

(ACh), por medio de los receptores colinérgicos muscarínicos, revierte el efecto de la noradrenalina disminuyendo dicha corriente (Reuter, 1983; Tsien et al., 1986).

Diversas evidencias sugieren que el efecto de la noradrenalina y la acetilcolina involucra la regulación de los CCVD de tipo *L* por una vía dependiente de cAMP. Cualquier agente que produzca un aumento en los niveles citoplasmáticos de cAMP en células cardíacas, por ejemplo los agonistas β -adrenérgicos, aumentan la probabilidad de apertura de los canales *L* (Reuter, 1983; Tsien et al., 1986). Además, la microinyección de la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de cAMP (PKA) en miocitos reproduce los efectos de la noradrenalina (Osterrieder et al., 1982; Brum et al., 1983), y la inyección de un inhibidor específico de la PKA, bloquea el efecto de los agonistas β -adrenérgicos (Bkaily y Sperelakis, 1984).

Por otro lado, se ha demostrado que otras proteínas quinasas también participan en la regulación de los CCVD. En neuronas embrionarias de pollo, activadores de la proteína quinasa dependiente de diacilglicerol (PKC), como los ésteres de forbol, inhiben las corrientes de Ca^{2+} (Rane y Dunlap, 1986; Marchetti y Brown, 1988).

En las neuronas del caracol marino *Helix aspera*, cGMP activa una corriente de Ca^{2+} y este efecto es reproducido por la inhibición de la fosfodiesterasa dependiente de cGMP (Paupardin-Tritsch et al., 1986). Además, fue demostrado que los CCVD sensibles a las DHP de las células musculares puede ser fosforilado por la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (Hosey et al., 1986).

Un mecanismo poco conocido pero muy interesante ha sido descrito por Passafaro y colaboradores (1994). En células de neuroblastoma humano en cultivo, la incubación con ω -CgTx GVIA o con Cd^{2+} provoca la incorporación en la membrana plasmática de nuevos canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes. Experimentos de permeabilización de la membrana revelaron la existencia de un depósito “*pool*” intracelular de sitios de unión para la ω -CgTx GVIA que eran incorporados a la membrana en respuesta a este tratamiento. Este fenómeno es prevenido por bajas temperaturas y por nocodazol. Estos resultados sugieren que estímulos específicos, como en este caso el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} , podrían inducir la translocación de CCVD a la membrana plasmática.

Recientemente, otro mecanismo de translocación de los CCVD a la membrana plasmática ha sido descrito por los mismos autores en las células de neuroblastoma humano. El *pool* intracelular de los sitios de unión a ω -CgTx GVIA aparece en una fracción subcelular enriquecida en gránulos de secreción de cromogramina-B. Estímulos que promueven la secreción, como ser el KCl, la ionomicina y los ésteres de forbol, provocan la translocación a la membrana de los CCVD. Esta observación fue acompañada con un aumento en la señal del indicador de Ca^{2+} fluorescente Fura-2 en respuesta a estímulos despolarizantes. Tanto la cinética como la dependencia con el Ca^{2+} y la proteína quinasa C del mecanismo de translocación de los CCVD de tipo N a la membrana es similar a la del mecanismo de secreción regulada de cromogramina-B, sugiriendo que los CCVD podrían ser incorporados a la membrana plasmática como consecuencia de la secreción regulada de péptidos (Passafaro et al., 1996).

Si bien todos estos estudios demuestran la modulación de la corriente de Ca^{2+} registradas en el soma neuronal, todos los autores de estos trabajos proponen que similares mecanismos podrían afectar la entrada de Ca^{2+} al terminal y de esta manera regular la transmisión sináptica.

Propiedades de los terminales nerviosos aislados

En las células en general, pero en mucho mayor grado en las neuronas, los procesos celulares están compartimentalizados, es decir, ocurren en regiones acotadas de la célula, donde los cambios que se generan en la concentración de iones y de segundos mensajeros no necesariamente se extienden a la totalidad de la célula. Este hecho es consecuencia de que muchos de los componentes celulares, tanto citoplasmáticos como de membrana, no se encuentran distribuidos uniformemente en las células.

Un claro ejemplo de esto lo constituyen los terminales sinápticos, compartimentos celulares especializados en la transmisión sináptica. Los terminales presinápticos del sistema nervioso central son, en general, engrosamientos de una fina ramificación axonal que entran

en contacto con una dendrita, un soma, o inclusive un axón de otra neurona. La región de la célula postsináptica que contacta con el terminal presináptico también sufre modificaciones durante la sinaptogénesis que dan como resultado estructuras postsinápticas muy especializadas.

Mediante estudios de microscopía electrónica y métodos de fraccionamiento subcelular, se estimó que las regiones sinápticas representan la mayor parte del volumen de la sustancia gris del cerebro (Rodríguez de Lores-Arnaiz y De Robertis, 1972).

Salvo escasas excepciones, como la sinápsis gigante del calamar, los terminales sinápticos de las neuronas del sistema nervioso central resultan inaccesibles para el registro de las corrientes de Ca^{2+} presinápticas. Las técnicas para el registro electrofisiológico de corrientes en las neuronas han avanzado enormemente y hoy en día es posible obtener muy buenos registros de corrientes en somas de neuronas pequeñas en rodajas “*slices*” de cerebro, experimentos que además requieren de la utilización de cámaras de video con infrarrojo para una buena visualización de la zona de registro. Sin embargo, las corrientes que se generan en el terminal nervioso sigue siendo inaccesible y, como consecuencia de la diferencial distribución de los CCVD y otros canales, no es posible extrapolar lo que ocurre en el soma a los terminales sinápticos.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para la visualización de cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} , *imaging* de Ca^{2+} . Estas técnicas se valen de compuestos químicos fluorescentes que tienen afinidad por el Ca^{2+} y que modifican su espectro de emisión o de absorción, dependiendo del indicador, como consecuencia de la unión del ion. Los más usados son Fura-2, Fluo-3 y, recientemente, Oregon-green; todos, en general, compuestos derivados de los quelantes de Ca^{2+} EGTA y BAPTA. El desarrollo de esta técnica viene acompañado de un tremendo mejoramiento de las técnicas de microscopía que permiten la iluminación de la preparación con la longitudes de onda requeridas y la detección de la luz emitida. Sin embargo, sumado a la baja resolución temporal que tienen estas mediciones, la resolución espacial sigue siendo pobre para determinar los cambios de la fluorescencia en regiones tan pequeñas que, por otro lado, resultan enmascarados por los enormes cambios producidos en otras regiones próximas de las neuronas circundantes.

Mediante procedimientos de homogeneización y centrifugación diferencial del tejido nervioso es posible aislar terminales nerviosos intactos, estructura subcelular que recibe el nombre de sinaptosoma. Las técnicas para aislamiento de sinaptosomas permiten el estudio de la morfología y de los procesos fisiológicos que tienen lugar en el terminal sináptico.

Los sinaptosomas tiene un diámetro de aproximadamente 500 μm y contienen gran parte de la membrana presináptica, donde puede distinguirse la presencia de *los zonas activos* y otras especializaciones de la membrana presináptica, que ha sido rota y resellada durante el proceso de homogeneización. En su interior se distinguen mitocondrias, sistemas de cisternas involucradas en el reciclado de la membrana como consecuencia del proceso de exocitosis y gran cantidad de vesículas sinápticas (Rodríguez de Lores-Arnaiz y De Robertis, 1972).

Las especializaciones de la matriz extracelular en la zona del contacto sinápticos mantienen fuertemente unida la membrana presináptica de la postsináptica, razón por la cuál, la fracción de terminales aislados además contiene parte de la membrana postsináptica que incluye las especializaciones postsinápticas, sitio donde están los receptores postsinápticos.

Los sinaptosomas son capaces de ejecutar muchas de las funciones fisiológicas de los terminales sinápticos observadas en *slices* de cerebro. Los terminales nerviosos aislados y mantenidos en medios adecuados producen compuestos de alta energía por medio de la glicólisis y la fosforilación oxidativa; y sintetizan moléculas como lípidos, proteínas y polisacáridos (Rodríguez de Lores-Arnaiz y De Robertis, 1972). Tienen la habilidad de acumular iones y de transportar distintos neurotransmisores y otro tipos de moléculas por mecanismos pasivos, activos o facilitados. Además, ha demostrado ser una preparación apropiada para el estudio directo de las reacciones bioquímicas involucradas en la síntesis y degradación de neurotransmisores (Rodríguez de Lores-Arnaiz y De Robertis, 1972).

Por otro lado, como consecuencia de que las propiedades de permeabilidad selectiva de la membrana se mantienen intactas por bastante tiempo luego de su purificación, los sinaptosomas mantienen un potencial de reposos negativo y es posible mediante estímulos adecuados despolarizar la membrana y desencadenar la liberación de neurotransmisor. Los

sinaptosomas han sido y son empleados para estudiar los mecanismos involucrados en la liberación de neurotransmisor (Dunlap et al., 1995).

Muy relevante es el hecho de que los sinaptosomas constituyen una muy buena preparación para el estudio de los CCVD involucrados en la neurotransmisión. Es posible medir el flujo de Ca^{2+} mediante la determinación de la incorporación del isótopo radioactivo. Uno de los primeros informes de la utilización de la técnica de captación de Ca^{2+} en sinaptosomas fueron Drachman y Fanburg en 1969, donde determinaron el efecto de la toxina botulínica sobre el influjo de Ca^{2+} a los sinaptosomas.

Posteriormente, Blaustein (1975) caracterizó la captación de Ca^{2+} en respuesta a diferentes estímulos despolarizantes y la liberación de neurotransmisor asociada. Mostró que la velocidad de la captación de Ca^{2+} aumenta cuando se incrementa la concentración de KCl por arriba de 15-20 mM y que este efecto es reversible. El Rb^+ reemplaza al K^+ en la estimulación de la captación de Ca^{2+} pero el Cs^+ es cinco veces menos efectivo y el Li^+ no tiene efecto. Otros dos agentes despolarizantes, la veratridina y el veneno del escorpión *Leirus quinquestriatus*, también estimulan la captación de Ca^{2+} pero la acción de estas sustancias es bloqueada por la tetrodotoxina, bloqueante de los canales de Na^+ .

Además, demostró que la captación de Ca^{2+} estimulada por K^+ es bloqueada por Mg^{2+} , Mn^{2+} y La^{2+} , todos bloqueantes de los corrientes de voltaje-dependientes. También midió la liberación de noradrenalina y acetilcolina por los sinaptosomas y determinó que la dependencia de este proceso con el Ca^{2+} extracelular.

En resumen, estos experimentos demuestran que los sinaptosomas estimulados por agentes despolarizantes bajo condiciones fisiológicas, aumentan su permeabilidad al Ca^{2+} , acumulan el ion y liberar neurotransmisor en respuesta a la influjo estimulado de Ca^{2+} .

En este trabajo de tesis se utilizaron terminales nerviosos aislados del SNC de vertebrados para estudiar las propiedades farmacológicas y la modulación de los CCVD de los terminales sinápticos.

Capítulo 1

Caracterización farmacológica de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de los terminales sinápticos de la corteza cerebral frontal de rata y el cerebro de pollo.

INTRODUCCION

Aspectos generales

Desde el descubrimiento en 1953 de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Fatt y Katz, 1953), éstos se han identificado como componentes ubicuos de las células excitables de animales de todos los fila. El primer informe sobre la existencia de múltiples tipos de canales de Ca^{2+} apareció unos 20 años después; Hagiwara y colaboradores (1975) demostraron la presencia de dos corrientes de Ca^{2+} biofísicamente distintas en los oocitos de la estrella de mar *Mediaster aequalis*. Los autores hipotizaron que estas corrientes resultaban de la entrada de Ca^{2+} a través de proteínas estructuralmente diferentes. Los estudios realizados durante la década pasada confirmaron esta hipótesis, y más aún han revelado la complejidad estructural de la familia de los canales de Ca^{2+} . Este hallazgo sugiere la heterogénea especialización funcional de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD).

Podría especularse que la evolución de los múltiples tipos de canales de Ca^{2+} emergió en paralelo con la de diversas funciones celulares que dependen del Ca^{2+} . Así las propiedades de los distintos CCVD está optimizada para el control de una función particular. A un nivel rudimentario, esta idea ha sido apoyada por el hecho de que, por ejemplo, los canales de Ca^{2+} responsables del acoplamiento de la contracción-excitación en el músculo son distintos a los involucrados en el acoplamiento excitación-secreción en los terminales nerviosos.

Por otro lado, distintos tipos de canales de Ca^{2+} participan en la liberación de neurotransmisor. Si bien los canales de Ca^{2+} de los terminales presinápticos comparten algunas características como, por ejemplo, ser activados por grandes despolarizaciones; la diversidad estructural da como resultado canales con propiedades biofísica y farmacológicas distintivas.

En los últimos años, los científicos interesados en el funcionamiento del sistema nervioso han invertido grandes esfuerzos para intentar responder algunas preguntas al respecto. Son los mismos tipos de CCVD los que participan en la transmisión sináptica en las distintas especies de animales? Cuáles y cuántos son los tipos de CCVD que controlan la neurotransmisión en el SNC de una especie? Diferentes tipos de CCVD cooperan en el

control de la liberación de neurotransmisor en un mismo terminal sináptico? Las respuestas a estas preguntas requieren de información precisa acerca de los fenotipos farmacológicos y biofísicos de los distintos integrantes de la extensa familia de CCVD.

Empleo de toxinas y otros boqueantes para la discriminación farmacológica de los CCVD.

El uso de sustancias con efectos bloqueantes de la actividad de los CCVD ha sido de gran utilidad para la discriminación de los distintos tipos de canales involucrados en flujo de Ca^{2+} a las células. Estas valiosas herramientas no solo nos permiten conocer las propiedades de los canales que participan en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} , sino además la distribución celular de los CCVD y los procesos celulares en los que éstos están involucrados.

Dos clases de ligandos peptídicos, colectivamente referidos como las ω -toxinas, han sido utilizados para definir varias clases de CCVD (Olivera et al., 1991; Sher y Clementi, 1991). Dentro del grupo de ω -toxinas se encuentra: a) la familia de ω -Conotoxinas (ω -CgTx), conformada por péptidos de entre 24 a 29 aminoácidos aislados de los caracoles *Comus sp.* y, b) la familia de ω -Agatoxinas (ω -Aga), aisladas a partir de la araña americana “funnel-web spider” *Agelenopsis aperta*. En ambas familias, los ligandos de los CCVD son toxinas que se encuentran en el veneno de estos animales y que presumiblemente son utilizados para capturar a sus presas inmovilizándolas.

Por otro lado, también serán descritas otras sustancias, de naturaleza no peptídica, que ejercen acciones modulatorias sobre la actividad de los CCVD.

a) Las ω -Conotoxinas

En el veneno de cada especie de *Comus sp.* existen múltiples ω -CgTx, múltiples péptidos que, con distinto grado de selectividad, bloquean algunos tipos de CCVD. Todas las ω -CgTx comparten una característica estructural, poseen 4 puentes disulfuros que forman pequeños rulos, “*loops*”, de 1 a 6 aminoácidos entre las cisteínas que forman estas uniones. La hipervariabilidad de los residuos aminoacídicos esta restringida a los *loops* y se presume que resulta importante para la actividad biológica (Olivera et al., 1994).

La primer ω -CgTx aislada fue la ω -CgTx GVIA, obtenida a partir del veneno del *Comus geografus* (Olivera et al., 1984). Este péptido es un potente e irreversible bloqueante de los CCVD resistentes a las dihidropiridinas, los CCVD de tipo *N* (Nowycky et al., 1985; Carbone et al., 1990; McCleskey et al., 1987; Plummer et al., 1989).

ω -CgTx GVIA bloquea la liberación de neurotransmisor (Kerr y Yoshikami, 1984) y la corriente presináptica de Ca^{2+} en la placa neuromuscular de la rana toro (Katz et al., 1995); y la neurotransmisión en el órgano eléctrico del *Torpedo* (Koyano et al., 1987). En sinaptosomas de cerebro de pollo, se demostró la existencia de sitios de unión de alta afinidad para la [^{125}I] ω -CgTx GVIA (Cruz y Olivera, 1986) y, en concordancia, se reportó que esta toxina inhibe el influjo de Ca^{2+} y un 70% de la liberación de neurotransmisor (Rivier et al., 1987; Lundy et al., 1989).

Si bien se ha reportado que ω -CgTx GVIA reduce la frecuencia de los potenciales miniaturas de la placa neuromuscular del ratón (Protti et al., 1991), este bloqueante de los CCVD de tipo *N* no afecta la liberación de neurotransmisor evocada en esta preparación ni en la placa neuromuscular de la rata ni del humano (Sano et al., 1987; Protti et al., 1996; Wessler et al., 1990a).

Contrariamente a lo observado en vertebrados no mamíferos, esta toxina no produce parálisis cuando es administrada intraperitonealmente en el ratón. (Olivera et al., 1985). Sin embargo, la inyección intracerebral de ω -CgTx GVIA causa temblores en el ratón, sugiriendo entonces que esta toxina tiene efectos sobre el sistema nervioso central de mamíferos (Olivera et al., 1985). En rebanadas de cerebro y en sinaptosomas de distintas

regiones del cerebro de rata, se ha demostrado que la ω -CgTx GVIA inhibe parcialmente, pero de manera muy potente, la liberación de glutamato (Suszkiw et al., 1987; Luebke et al., 1993), acetilcolina (Wessler et al., 1990b), dopamina (Turner et al., 1993) y noradrenalina (Dooley et al., 1988); estimuladas eléctricamente o mediante el aumento de la concentración extracelular de KCl.

Si bien los CCVD de tipo *N* participan en la neurotransmisión en el SNC de mamíferos, no son los únicos responsables de este proceso. En hipocampo, por ejemplo, la liberación de glutamato y GABA es mediada por entrada de Ca^{2+} a través de CCVD sensibles a ω -CgTx GVIA y ω -Aga IVA que actúan de manera sinérgica (Mintz et al., 1995).

También ha sido reportado que ω -CgTx GVIA inhibe la neurotransmisión autonómica en diversas preparaciones de mamíferos (Allescher et al., 1989; Surprenant et al., 1990; DeLuca et al., 1990; Pruneau y Angus, 1990).

Witcher y colaboradores (1993) mostraron que los canales de tipo *N* incorporados en bicapas lipídicas tienen una alta probabilidad de apertura que se ve reducida en presencia de ω -CgTx GVIA. Si bien la probabilidad de apertura es más baja, los estados abiertos del canal persisten, hecho que sugiere que el sitio de unión de la toxina no es el poro del canal.

Es sabido que los cationes inhiben potentemente el pegado de [^{125}I] ω -CgTx GVIA al canal de tipo *N* en el siguiente orden $Na^+ < Ba^{2+} < Ca^{2+} < Cd^{2+}$ (Abe et al., 1986??). Existen evidencias de que el sitio de unión del ion Ca^{2+} está en el poro del canal y que regula alostéricamente el pegado de ω -CgTx GVIA (Witcher et al., 1993).

Una estrategia que utiliza técnicas de la biología molecular ha permitido purificar un gran número de ω -conotoxinas del veneno del *Comus magus*. A partir de una biblioteca de cDNA de las células del conducto que secreta el veneno de este caracol marino, se han podido sintetizar un conjunto de péptidos que tienen actividad de bloqueantes de los CCVD (Tabla 1.1).

ω -CgTx MVIID, uno de los péptidos identificados con esta novedosa estrategia, causa parálisis y muerte cuando es inyectada en el pez (Hillyard et al., 1992). En experimentos de competición de la unión de [^{125}I] ω -CgTx GVIA a membranas de cerebro de rata, se mostró

Tabla 1.1 Bloqueantes de Canales de Ca²⁺ Voltaje-Dependientes.

Familia	Toxina	Origen	Estructura química	Principales Efectos
ω -CgTx	ω -CgTx GVIA	<i>Conus Geografus</i>	péptido (27aa)	bloqueo irreversible de CCVD de tipo N
	ω -CgTx MVIIA	<i>Conus Magus</i>	péptido (25aa)	bloqueo reversible de CCVD de tipo N
	ω -CgTx MVIIC	<i>Conus Magus</i>	péptido (26aa)	amplia especificidad por CCVD de tipo no-L
	ω -CgTx MVIID	<i>Conus Magus</i>	péptido (25 aa)	marcada preferencia por CCVD de tipo no-N.
ω -Aga toxinas	ω -Aga IA	<i>Agelenopsis aperta</i>	péptido (69aa)	bloqueo irreversible de CCVD de vertebrados e invertebrados
	ω -Aga IB	<i>A. aperta</i>	péptido (69aa)	amplia especificidad
	ω -Aga IIA	<i>A. aperta</i>	péptido (9,5 kDa)	bloquea neurotransmion en insectos y la union de ω -CgTx GVIA
	ω -Aga IIIA	<i>A. aperta</i>	péptido (76aa)	amplia especificidad por HVA
	ω -Aga IVA	<i>A. aperta</i>	péptido (48aa)	bloquea CCVD de tipo P/Q
	ω -Aga IVB	<i>A. aperta</i>	péptido (48aa)	bloquea canales P/Q, 8 veces mas lenta que ω -Aga IVA
	ω -Aga IVC	<i>A. aperta</i>	enanteómero de ω -Aga IVB en serina 46	similar a ω -Aga IVB, pero menos potente y menos estable.
DHP	FTX	<i>A. aperta</i>	desconocida	bloquea CCVD de tipo P
	nitrendipina	síntesis orgánica	1,4-dihidropiridina	bloquea los CCVD de tipo L
	nifedipina	síntesis orgánica	1,4-dihidropiridina	bloquea los CCVD de tipo L
	nimodipina	síntesis orgánica	1,4-dihidropiridina	bloquea los CCVD de tipo L
	BayK 8644	síntesis orgánica	1,4-dihidropiridina	agonista de los CCVD de tipo L
SZ(+)-(s)-202-791	síntesis orgánica	1,4-dihidropiridina	agonista de los CCVD de tipo L	

que ω -CgTx MVIID tiene muy baja afinidad por el sitio de alta afinidad para ω -CgTx GVIA (canales de tipo *N*, en mamífero) (Monje et al., 1993). Sin embargo, cuando se determinó la afinidad por el sitio de unión de ω -CgTx MVIIC, se vio que ω -CgTx MVIID tiene una similar afinidad, en el rango nanomolar, por el sitio de unión de ω -CgTx MVIIC, mientras que la afinidad de ω -CgTx GVIA es 100 veces menor.

En resumen, ω -CgTx MVIID muestra una marcada preferencia por los canales de tipo no-*N* respecto de los canales de Ca^{2+} de mamífero de tipo *N* (Monje et al., 1993).

b) Las ω -Agatoxinas

Otra familia de las ω -toxinas es la que constituyen las ω -Aga, un heterogéneo grupo de polipéptidos con un peso molecular que varía entre 5 y 10 kDa que bloquean la actividad de los CCVD (Tabla 1.1) (Adams et al., 1989;1990). Estas toxinas son purificadas del veneno de arañas y clasificadas en cuatro grupos de acuerdo a (Adams et al., 1989; Pocock et al., 1992):

- la actividad como bloqueantes de la neurotransmisión en invertebrados
- la unión a los canales de Ca^{2+} de tipo *N* de vertebrados
- determinado por el desplazamiento de la unión de [^{125}I] ω -CgTx GVIA a membranas de terminales sinápticos
- la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} de tipo *P* en neuronas del SNC de vertebrados

Esta toxina de 48 aminoácidos contiene 8 residuos cisteína y la configuración de los *loops* en la estructura de esta toxina es similar a la configuración de los 4-*loops* descritas en las ω -conotoxinas. La estructura tridimensional de ω -Aga IVA consiste en un rígido grupo central de aminoácidos, las cuatro regiones *loop* flexibles, y una cola en el extremo carboxiterminal extremadamente flexible. A pesar del bajo porcentaje de homología en la secuencia de aminoácidos de ω -Aga IVA y ω -CgTx GVIA, ambas comparten la orientación y localización de los puentes disulfuro en sus estructuras secundarias (Olivera et al., 1994).

En mamíferos, ω -Aga IVA actúa como un potente bloqueante de los canales de tipo P/Q y no afecta la actividad de los canales de tipo T , L ni N . El valor de IC_{50} para el canal de tipo P de las neuronas de Purkinje es 2-3 nM y la disociación de la unión de ω -Aga IVA al canal es muy sensible al voltaje (Mintz et al., 1992b; 1993). El bloqueo de los CCVD de tipo P puede ser revertido en segundos luego de despolarizar la membrana a altos voltaje. Mayores concentraciones de ω -Aga IVA son requeridas para la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} de tipo Q en las células granulares del cerebelo ($IC_{50}= 50, 30$ y $300nM$) (Zhang et al., 1993).

ω -Aga IVA bloquea casi completamente la corriente de Ca^{2+} resistente a las dihidropiridinas y a ω -CgTx GVIA en las neuronas de la región CA1 del hipocampo (80-90%) (Luebke et al., 1993; Castillo et al., 1994; Takahashi y Momiyama, 1993) y las corrientes de Ca^{2+} en rebanadas de cerebelo y médula espinal (95%) (Takahashi y Momiyama, 1993). Este conjunto de evidencias sugiere que los CCVD de tipo P/Q son importantes mediadores de la entrada de Ca^{2+} a las neuronas en el SNC de mamíferos.

Sin embargo, en la rata, ω -Aga IVA inhibe parcialmente (50-70%) la liberación de glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral (Turner et al., 1992) y la liberación de dopamina en sinaptosomas de estriado (Turner et al., 1993). Estos últimos trabajos apoyan la hipótesis de que más de un único tipo de CCVD controla la neurotransmisión en SNC de mamíferos (Dunlap et al., 1995).

En el sistema nervioso periférico de mamíferos, ω -Aga IVA ejerce potentes efectos inhibitorios sobre la neurotransmisión. En la placa neuromuscular del ratón, esta toxina bloquea la transmisión sináptica ($IC_{50} = 10nM$) y la corriente de Ca^{2+} presináptica registrada con electrodos extracelulares ubicados en el perineuro (Protti y Uchitel, 1993). Contrariamente, ω -Aga IVA no es efectiva en el bloqueo de la transmisión sináptica en la placa neuromuscular de la rana, donde los canales de Ca^{2+} son sensibles a ω -CgTx GVIA (Katz et al., 1995).

c) Otros bloqueantes

Como se ilustra en la Tabla 1.1, las ω -CgTx y las ω -Aga no son los únicos bloqueantes conocidos de los CCVD. La FTX, otra toxina aislada a partir del veneno de la araña

Agelenopsis aperta, ha sido descrita como un bloqueante de las corrientes de Ca^{2+} de las neuronas de Purkinje de mamífero (Cherksey et al., 1991). Si bien el detalle de la estructura química de esta toxina aun no es conocido, la presencia de numerosos grupos aminos en la estructura propuesta y el bajo peso molecular de esta molécula permiten clasificarla dentro del grupo de las poliaminas. Como consecuencia del desconocimiento de su exacto peso molecular, en éste y todos los trabajos que emplean esta toxina, no es posible expresar la concentración y debemos referirnos a diluciones del extracto purificado ($\mu\text{l/ml}$).

FTX bloquea la corriente de Ca^{2+} asociada con la liberación de neurotransmisor en la sinápsis gigante del calamar (Llinás et al., 1989), la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular del ratón (Uchitel et al., 1992) y del humano (Protti et al., 1996) y la entrada de Ca^{2+} a sinaptosomas del Torpedo (Moulian y Gaudry-Talarmain, 1993). Esta toxina también bloquea la liberación de catecolaminas de la células cromafines de la médula adrenal (Duarte et al., 1993) y los canales de Ca^{2+} de la neurohipófisis de rata (Wang y Lemos, 1994). Si bien en un principio FTX fue considerado un bloqueante específico de los canales de tipo *P*, en los últimos años numerosos trabajos, incluyendo el presentado en este capítulo, han mostrado que esta toxina tiene efecto sobre otros canales de Ca^{2+} además de los de tipo *P*.

Las dihidropiridinas (DHP) representan otra gran familia de bloqueantes de canales. Algunos de los integrantes de esta familia son bloqueantes de los CCVD de tipo *L*, mientras que otros poseen reconocidos efectos agonistas sobre los CCVD (Tabla 1.1). La nitrendipina es una 1,4-dihidropiridina producida por síntesis orgánica que bloquea la corriente de Ca^{2+} en todos los tipos de células musculares de vertebrados, así como en algunas neuronas y células neuroendócrinas (Hofmann et al., 1994).

Mediante registros de canal único se sabe que, en presencia de estas drogas antagonistas, los CCVD de tipo *L* entran en un estado quiescente permaneciendo menor tiempo en los estado abierto. Contrariamente, las dihidropiridinas agonistas, como BayK 8644 y SZ(+)-(s)-202-791, promueven un estado abierto más activo caracterizado por largos tiempos de apertura del canal (Hess, 1990).

OBJETIVO

El objeto de este estudio es la caracterización de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de los terminales sinápticos del sistema nervioso de mamíferos y de aves. Con este fin, se determinará la sensibilidad a bloqueantes de los distintos tipos de CCVD, del influjo de Ca^{2+} a sinaptosomas de cerebro de rata y de pollo.

MATERIALES Y METODOS

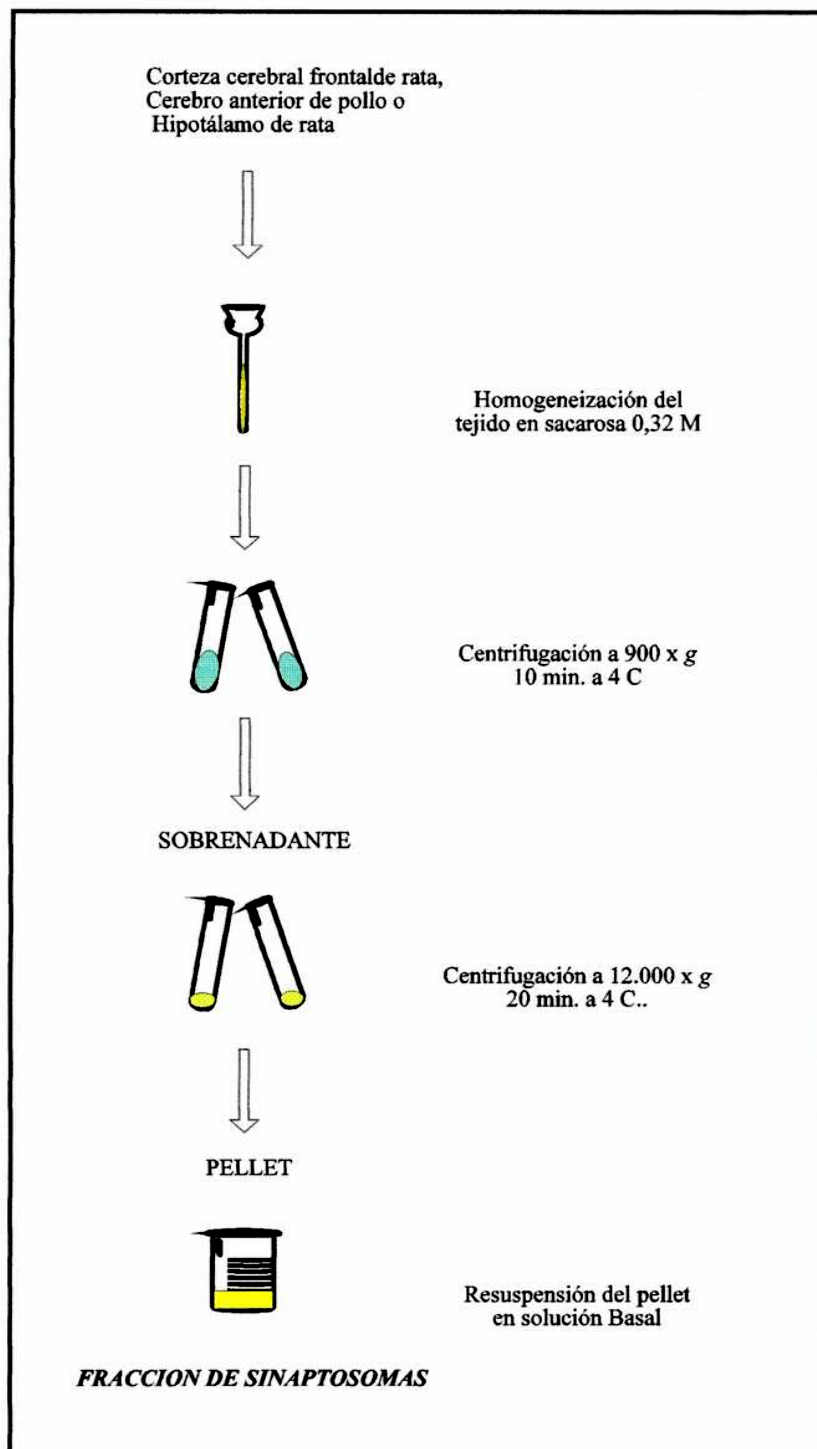
Preparación de la fracción cruda de sinaptosomas

Se utilizaron ratas machos de cepa endocriadas Wistar de 200 a 300 g de peso (aprox. 2 meses de edad) y pollos machos de la cepa White Leghorn de 13 a 30 días de edad. Luego de la decapitación, se extrajo rápidamente el encéfalo. Se procedió a la disección de la corteza cerebral frontal de la rata o del cerebro anterior (se eliminó el cerebelo y el tallo cerebral) de pollo sobre un papel de filtro bañado en solución homogenizadora y mantenido a 4 °C. Se tuvo especial cuidado en la eliminación de la sustancia blanca que se encuentra por debajo de la corteza cerebral, lo que permite reducir la contaminación con mielina de la fracción sinaptosomal cruda (ver mas abajo).

El tejido disecado se homogenizó manualmente en solución de homogeneización al 8% (P/V) con 8 pasadas utilizando un homogeneizador de vidrio y teflón. El homogenato se centrifugó a 900 x g (3000 rpm en rotor SS34 y centrifuga RC5C de Sorvall Instrument) por 10 min. a 4°C, con el objeto de separar los núcleos y restos celulares no disgregados durante la homogeneización que quedarán en el pellet (P₁). El sobrenadante (S₁) fue centrifugado a 12.000 x g (10.000 rpm en rotor SS34 y centrifuga RC5C de Sorvall Instrument) por 20 min. a 4°C para obtener el pellet mitocondrial (P₂) que contiene los sinaptosomas. Durante todo el procedimiento la muestra fue mantenida a 4°C (Esquema 1.1.).

El pellet puede ser resuspendido en solución isotónica que contenga glucosa como la solución Basal y ser utilizada para estudiar aspectos fisiológicos y farmacológicos de la función sináptica.

Sin embargo, la fracción sinaptosomal cruda, como llamaremos a esta preparación, contiene además de sinaptosomas, fragmentos de axones mielínicos y amielínicos y mitocondrias (Rodríguez de Lores-Arnaiz y De Robertis, 1972). Por esta razón, resulta conveniente purificar los sinaptosomas mediante centrifugaciones sucesivas empleando gradientes discontinuos.



Esquema 1.1. Protocolo para la preparación de la fracción cruda de sinaptosomas.

Obtención de la fracción pura de sinaptosomas

Algunos aspectos importantes de los procedimientos de purificación

Las condiciones utilizadas para la obtención de la fracción pura de sinaptosomas al igual que la duración del procedimiento, son factores críticos que afectan la actividad metabólica de esta fracción subcelular. La técnica clásica para la obtención de sinaptosomas es la utilizada primeramente por De Robertis y colaboradores en 1961 y consiste en el empleo de gradiente de densidad de sacarosa (luego Gray y Whittaker, 1962; Dodd et al., 1981).

Para esta técnica se emplean largas centrifugaciones de altas velocidades (3 a 4 horas para gradientes discontinuos y 1,5 horas para continuos) y soluciones de sacarosa hiperosmóticas para la formación del gradiente de densidad. Este procedimiento presenta dos principales desventajas: la fracción de sinaptosomas mantiene un significativo grado de contaminación y su actividad metabólica es dañada por los largos tiempos de requeridos y por la hiperosmolaridad de la soluciones de sacarosa (Whittaker, 1968; 1969; Day et al., 1971).

La solución al problema de la hiperosmolaridad de las soluciones de gradiente llegó con el desarrollo de gradientes de Ficoll/sacarosa, que permitió mejorar la actividad metabólica de los sinaptosomas (Kurokawa et al., 1965; Autilio et al., 1968; Cotman y Matthews, 1971). El uso de esta técnica redujo notablemente la duración del procedimiento de purificación (Booth y Clark, 1978). Sin embargo, el hecho de que el Ficoll se adhiere a las membranas biológicas puede interferir con los estudios bioquímicos que se realizan con la preparación de sinaptosomas.

El desarrollo de una técnica de purificación que utiliza Percoll para la formación de los gradientes de densidad solucionó todos estos problemas. Los coloides de sílica cubiertos con PVP (polivinilpirrolidona), Percoll, es un material que ha sido utilizado para la separación de distintos tipos celulares y de partículas subcelulares con gran éxito (Wolff, 1975; Cooper y Perry, 1980; Pertoft y Laurent, 1982). Nagy y Delgado-Escueta (1984), describieron un método para el aislamiento de terminales nerviosos de cerebro que utiliza gradientes discontinuos de Percoll.

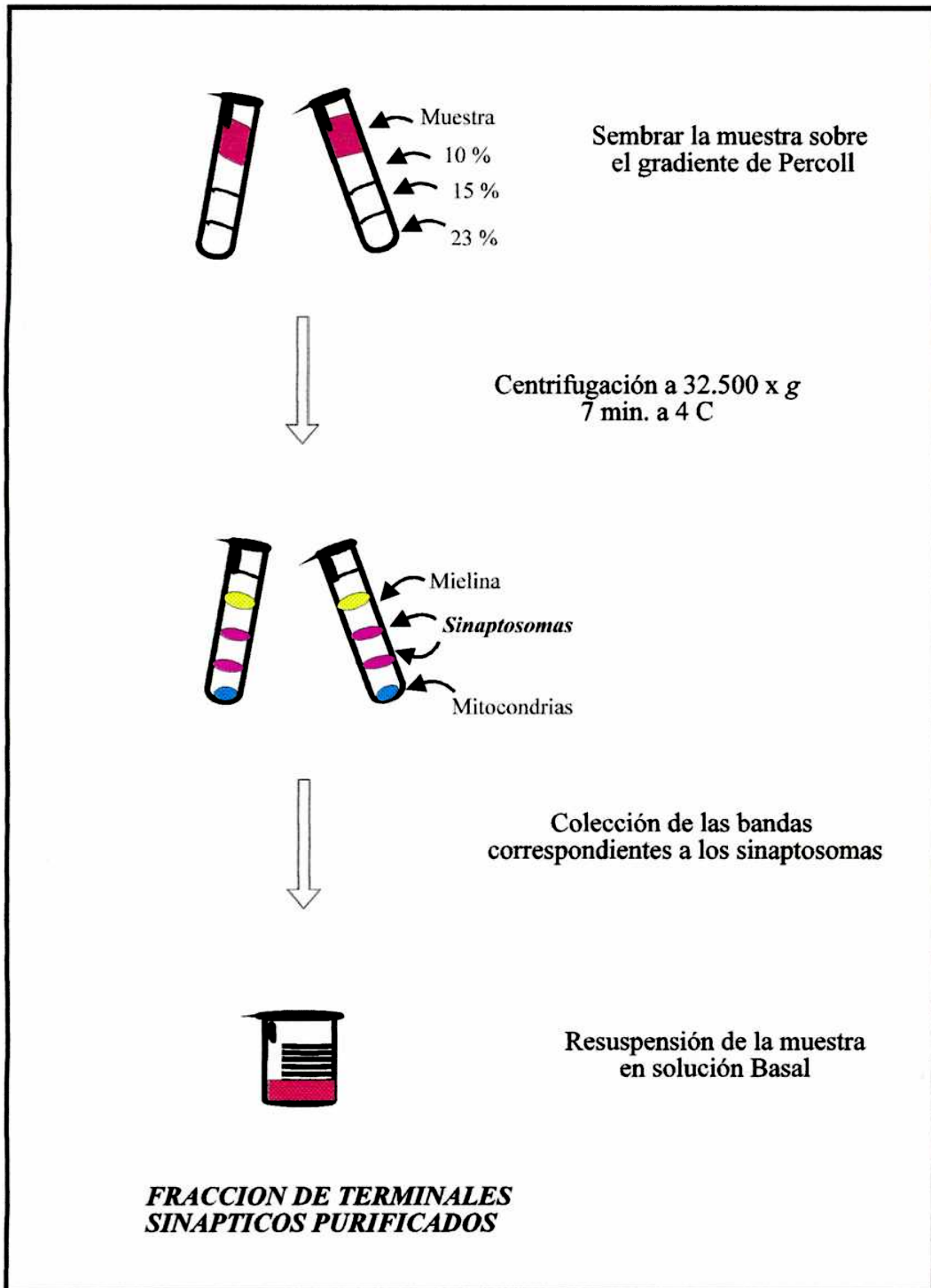
Las ventajas de este método son: la corta duración del procedimiento, el empleo de materiales inocuos que permiten un alto rendimiento metabólico de la actividad de los sinaptosomas y la pureza de los mismos.

Un método alternativo para la preparación de fracciones puras de sinaptosomas se basa en la partición en dos fases creadas por dextrano-polietilenglicol. Este procedimiento ha sido empleado para la preparación de partículas celulares (Walter et al., 1985) y resulta muy exitoso para la obtención de mitocondrias de cerebro con gran pureza (Lopez-Perez et al., 1981). Terminales nerviosos con mínima contaminación y muy buena actividad metabólica han sido preparados con este rápido método (menos de una hora) y que no requiere la utilización de ultracentrífuga (Enriquez et al., 1990). Resulta especialmente útil para preparación a gran escala como la requerida para la purificación de proteínas y ácidos nucleicos.

Técnica de purificación de sinaptosomas con gradientes de Percoll

A continuación se describe el método empleado para este trabajo que es una modificación del inicialmente descrito por Nagy y Delgado-Escueto y que fue desarrollado por Taupin y colaboradores (1994).

Los gradientes fueron preparados en tubos de policarbonato de 9 ml de capacidad, utilizando una bomba de perfusión que permitió un lento y constante flujo de las distintas soluciones, todo mantenido a 4 °C. Un volumen de 2,3 ml de la solución de Percoll 23%, 15% y 10% (V/V) (en un buffer de sacarosa 0,32M; MgCl 1mM, previamente filtradas a través de filtros Millipore AP15 y llevadas a pH 7,4 con HCl antes de ser usadas), fueron colocadas consecutivamente en los tubos para la formación de los gradientes. Nótese que si el gradiente está bien formado pueden visualizarse las interfases al colocar los tubos a contraluz. Es importante que los tubos en los que se utilizan en este paso sean transparentes de manera de poder verificar la correcta formación del gradiente y visualizar las bandas que deben ser colectadas luego de la centrifugación (ver Esquema 1.2).



Esquema 1.2. Protocolo para la preparación de sinaptosomal purificados

El pellet mitocondrial (P₂) obtenido en el procedimiento descrito anteriormente, fue resuspendido en la solución homogeneizadora 3,5-4% (P/V considerando el peso inicial del tejido) y 2 ml fueron sembrados sobre la solución de Percoll al 10% en cada uno de los tubos del gradiente. Los gradientes fueron centrifugados a 32.500 x g por 7 min ($\omega^2 t$ 2,13 x 10⁹ rad²/s; 21.500 rpm en un rotor 70.1 Ti y ultracentrífuga Beckan L8-70M) a 4°C. El freno fue utilizado en la desaceleración. En cada gradiente, la muestra se ha separado en cinco fracciones (ver Esquema 1.2.). Las bandas en la interfase 10%-15% y 15%-23% corresponden a los sinaptosomas. Con la precaución de no perturbar el gradiente y siempre a 4 °C, se descartan las fracciones de 0% Percoll y la mielina. Se colectan las fracciones correspondientes a los sinaptosomas de todos los gradientes y procede al lavado* del Percoll mediante el lento agregado de 3 volúmenes de solución Basal. Se centrifuga a 22.000 x g (15.000 rpm en rotor SS34 y centrífuga RC5C de Sorvall Instrument) por 15 min a 4 °C. El pellet (P₃) se resuspende en solución Basal hasta concentración final de proteínas de 3-5 mg/ml.

Una alícuota de la muestra fue reservada para la determinación de la concentración de proteínas que se realizó por un método que emplea ácido bicinchonínico y es una modificación del método de Lowry (Smith et al., 1985).

* El lavado puede ser obviado en algunos casos dado que el Percoll es una sustancia inerte y, en consecuencia, la duración del proceso de purificación se reduce mejorando la actividad metabólica de la muestra de sinaptosomas.

Captación de ⁴⁵Ca²⁺ en sinaptosomas

Alícuotas de 100 µl de la fracción pura de sinaptosomas fueron incubadas en un baño a 30 °C por 15 min en ausencia o presencia de los bloqueantes de los CCVD. En todos los casos, el volumen de las drogas agregado no supero el 10% del volumen de incubación.

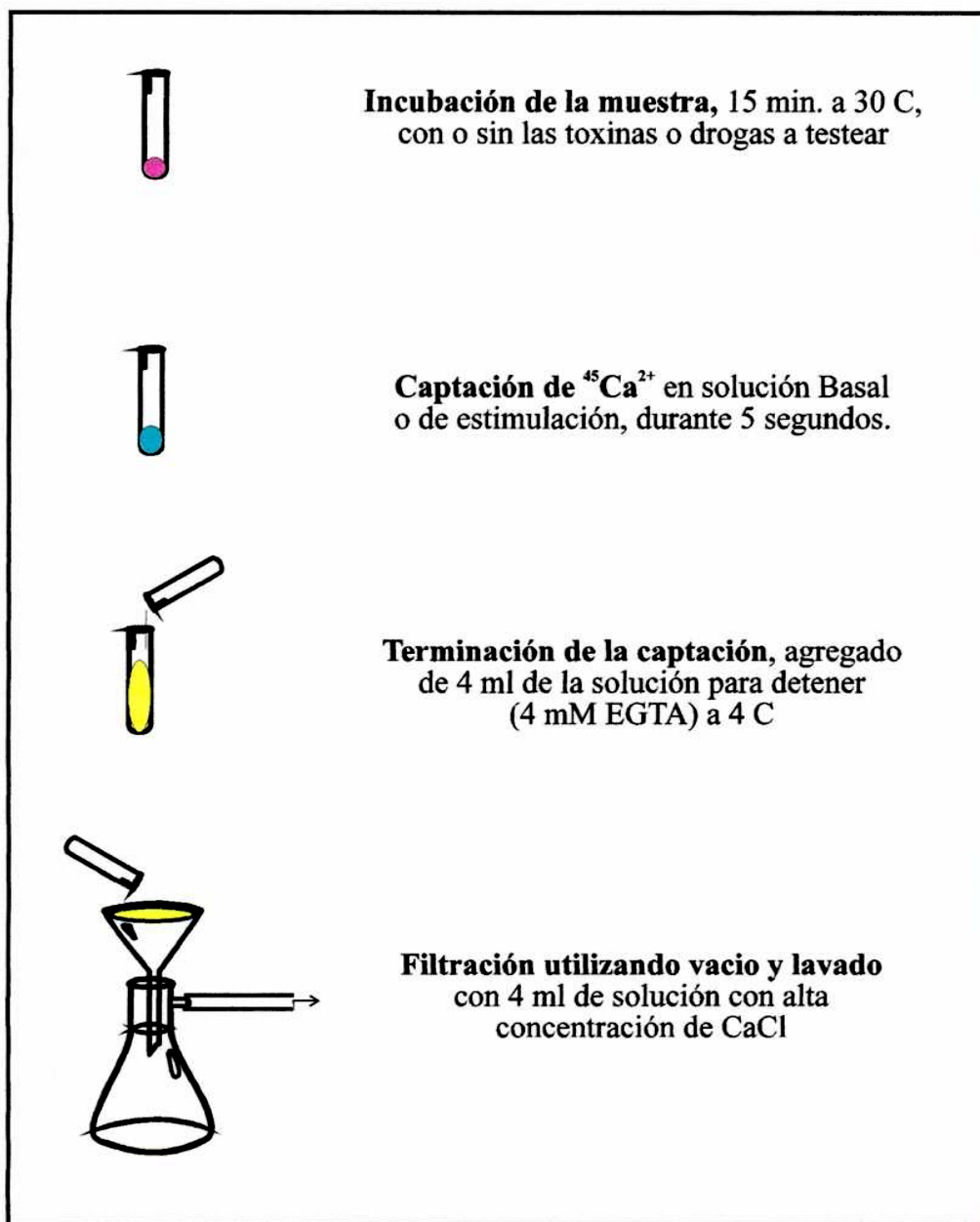
Se procedió a la medición de la captación basal y de la captación estimulada mediante el agregado de 100 µl de solución basal (5 mM KCl) o solución despolarizante (40 mM KCl)

respectivamente, que contenían ambas 1 μCi (37 KBq) de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Para la preparación de estas soluciones se procede a separar solución basal, el total de volumen a ser utilizado en el experimento, y se le agrega el volumen correspondiente del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para alcanzar una concentración de 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Luego de mezclar la solución, se separa el volumen que será requerido de solución despolarizante y se le agrega un volumen pequeño de KCl de manera de alcanzar una concentración final de 40 mM (recuérdese que la solución basal es 5 mM KCl). De esta forma, ambas soluciones, basal y despolarizante, tiene la misma concentración de actividad en cada experimento.

La captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en ambas condiciones se realizó durante 5 segundos y se detiene mediante el agregado de 4 ml de solución para detener la captación, a 4 °C. Inmediatamente se filtró a través de filtros Whatmann GF/B empleando vacío y se lavaron los filtros con 4 ml de solución de lavado a 4 °C, dos veces (Esquema 1.3.).

Antes de cada experimento, los filtros fueron sumergidos por 15-20 min en solución basal con PEI (polietilénimina). Este pretratamiento reduce el pegado inespecífico del Ca^{2+} radioactivo, dado que la PEI bloquea las cargas negativas que los papeles de filtro contienen. Los filtros fueron colectados en microvialas y secados en una estufa a 35 °C. La radiactividad retenida en los filtros fue determinada por centelleo líquido en un equipo Tracor Analytic, modelo 6892 y utilizando xileno-PPO como solución centelladora. Se utilizó una curva de calibración para $^{45}\text{Ca}^{2+}$ construida a partir de standards para transformar las cpm medidas a dpm.

En todos los casos, la medición de la captación de Ca^{2+} fue realizada durante los 45 min posteriores a la purificación para minimizar la pérdida de actividad (Rivier et al., 1987). Cada uno de las determinaciones se realizó por triplicado. La captación inespecífica fue determinada también por triplicado mediante el agregado de la solución detenedora en primer lugar, seguida del agregado de la solución basal conteniendo $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Todos los experimentos fueron realizados con soluciones en las que el ion Na^+ fue reemplazado por Colina para minimizar la entrada de Ca^{2+} por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ funcionando en forma reversa (Blaustein M.P., 1988 y Lentzner et al., 1992).



Esquema 1.3. Protocolo de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en sinaptosomas de SNC.

Curva de calibración para $^{45}\text{Ca}^{2+}$

En determinaciones de actividad por centelleo líquido, la eficiencia de medición de cada una de las muestras es distinta. Los equipos más modernos están dotados con una tecnología que les permite calcular la eficiencia y la actividad absoluta (dpm) de cada una de las muestras, pero no siempre se cuenta con uno de estos equipos. Por esta razón, es necesario construir curvas de calibración que nos permitan, a partir de otros parámetros, determinar la eficiencia de medición de cada una de las muestras. La curva de calibración debe ser hecha en condiciones similares a las que se realizan los experimentos.

Preparación de los standards: se preparó una dilución del radioisótopo en agua destilada o solución basal y se colocaron alícuotas de 100 μl sobre 12 papeles de filtros. Se colocaron los filtros en microviales y se los secó en estufa a 35 $^{\circ}\text{C}$. Una vez secos, se permitió que los tubos alcancen la temperatura ambiente y se agregó 3 ml de solución centelladora (el mismo volumen que para la medición de las muestras en los experimentos).

Si bien a partir de cálculos teóricos se puede estimar la actividad de cada tubo, debido a errores de pipeteo al realizar la dilución y durante el fraccionamiento de las alícuotas fue necesario realizar una determinación de la actividad con un contador de centelleo que calcula la eficiencia y la actividad de las muestras en dpm.

Determinación de la eficiencia de medición: una vez conocida la actividad exacta contenida en cada vial, se agregaron distintos volúmenes de una sustancia *quencheante* (en nuestro caso, ácido acético) a la solución centelladora. Cada determinación se realizó por duplicado y se dejó un duplicado control (sin agregado de *quencheante*). Se contó la radioactividad en el mismo contador de centelleo líquido que se empleó para los experimentos. A continuación, se calculó la eficiencia de medición como la relación:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Actividad absoluta (dpm)}}{\text{Actividad medida (cpm)}}$$

donde la Actividad absoluta es la calculada para cada vial y la Actividad medida es la determinada en el contador de centelleo líquido que se empleará en los experimentos.

Determinación de los parámetros de la curva y cálculo de la eficiencia de medición de las muestras: se graficaron los datos de eficiencia en función de los parámetros de eficiencia que determina el contador, que pueden ser la relación de estándar externo (ESR) o la relación de canales A y B (A/B). Por regresión lineal se determinaron los valores de los parámetros de la recta, que serán luego empleados para estimar la eficiencia de cada vial a partir de los valores de ESR o A/B de cada determinación experimental. Finalmente, conociendo la eficiencia de conteo de cada uno de los viales se calculó las dpm de las determinaciones experimentales.

La curva de calibración fue realizada como mínimo una vez por año y cada vez que fue modificado algún parámetro del aparato contador de centelleo líquido.

Soluciones

Solución de homogeneización: 320 mM sacarosa; 1,3 mM MgCl; 10 mM HEPES; pH 7,4 ajustado con Trizma base.

Solución basal: 132 mM ColinaCl; 5 mM KCl; 1,3 mM MgCl; 1,2 mM CaCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 10 mM HEPES y 10 mM glucosa; pH 7,4 ajustado con Trizma base.

Solución de lavado: 132 mM ColinaCl; 5 mM KCl; 1,3 mM MgCl; 4 mM CaCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 10 mM HEPES y 10 mM glucosa; pH 7,4 ajustado con Trizma base.

Solución para detener la captación: 132 mM ColinaCl; 5 mM KCl; 1,3 mM MgCl; 1,2 mM CaCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 4 mM EGTA; 10 mM HEPES y 10 mM glucosa; pH 7,4 ajustado con Trizma base.

Cálculos y estadística

Los datos en cpm fueron ingresados a una planilla de cálculo (Microsoft Excel) donde fueron convertidos a dpm. Se restó el promedio de la captación inespecífica a todos los

datos. Luego, se calculó el promedio de las dpm captadas en condiciones basales y estimuladas. Los experimentos donde la relación: captación basal/captación estimulada para el control (sin droga), resultó menor a 1.5 fueron descartados. Los triplicados que mostraron error standard mayores que el 10% del promedio también fueron descartados.

Se define la captación de Ca^{2+} estimulada como el influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ neto inducido por la despolarización que genera la alta concentración de KCl extracelular. Se calcula mediante la resta de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en condiciones estimuladas y la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en condiciones basales.

Las diferencias significativas entre los controles y las incubaciones con los bloqueantes fueron analizadas con el programa InStat2, con el test *t*-Student de dos colas o un test de múltiples comparaciones luego de ANOVA en los casos necesarios, donde los valores de *P* figuran en los respectivos pies de figura.

En los gráficos concentración vs respuesta los datos fueron ajustados a una curva sigmoidea de la siguiente ecuación: $y = (max - min) / (1 + (x/IC_{50})^{n_H}) + min$, donde *x* es el logaritmo de la concentración de bloqueante; *max*, el máximo estimado de la captación estimulada; *min*, el mínimo estimado de la captación estimulada; IC_{50} es la concentración estimada de la toxina a la cual inhibe el 50% de la captación estimulada; y n_H , el número de Hill. Se utilizó el programa SigmaPlot o el Prism y el valor de los parámetros ajustados en cada caso figura en el pie de figura correspondiente. En los casos en que no aparece el valor de n_H es porque el ajuste mas adecuado corresponde a una sigmoidea de pendiente igual a 1, y en los que no aparece el valor máximo estimado es porque el ajuste mas adecuado los fijó como constante igual al 100%.

Materiales

HEPES, Trizma base, Percoll, EGTA, PPO, sacarosa y ColinaCl fueron obtenidos de la empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Las sales, xileno y la glucosa de Mallinckrodt. El calcio radioactivo de los distribuidores NEN-Du Pont. Las toxinas ω -CgTx

GVIA y ω -Aga IVA fueron compradas a Peptide International Co. FTX fue purificada por B. Cherksey. La nitrendipina fue obtenida de Research Biochemicals International. La toxina ω -CgTx MVIIC fue gentilmente obsequiada por el Dr. B. Olivera.

RESULTADOS

Condiciones para la estimulación del influjo de Ca^{2+} a los terminales sinápticos

Con el objeto de determinar las condiciones óptimas para la activación de los CCVD en los terminales sinápticos de cerebro anterior del pollo y de corteza frontal de rata, se realizaron los siguientes experimentos. Se midió el influjo Ca^{2+} estimulado por distintas concentraciones de KCl en fracciones crudas de sinaptosomas de ambas preparaciones. En sinaptosomas de cerebro anterior de pollo, la despolarización de los sinaptosomas inducida por 40, 50 y 60 mM KCl produjeron una similar captación de Ca^{2+} (Figura 1.1).

Mas aún, la inhibición que ejerce de 1 μM ω -CgTx GVIA sobre la captación de Ca^{2+} estimulada por las distintas concentraciones de KCl resultó estadísticamente similar (ANOVA y test Tukey de múltiples comparaciones, $P > 0,05$). Por otro lado, la captación basal de Ca^{2+} no es afectada por la misma concentración del bloqueante de los CCVD de tipo N.

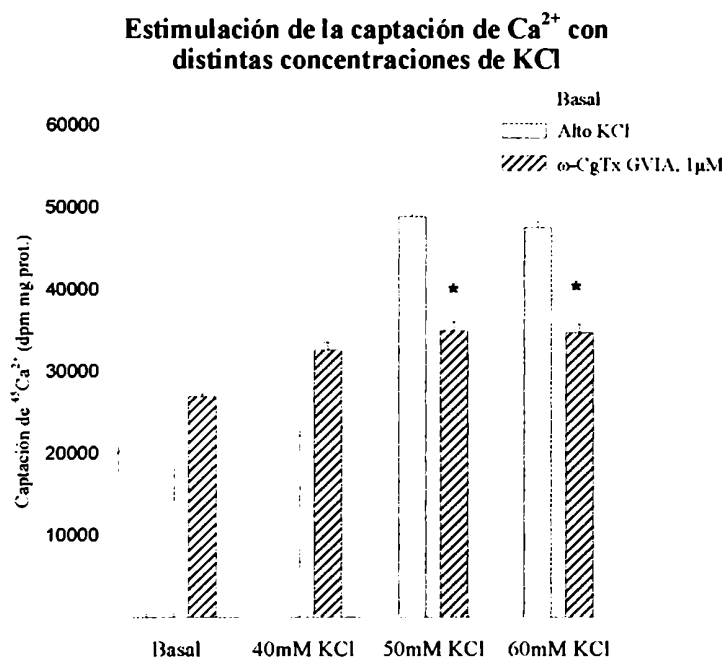
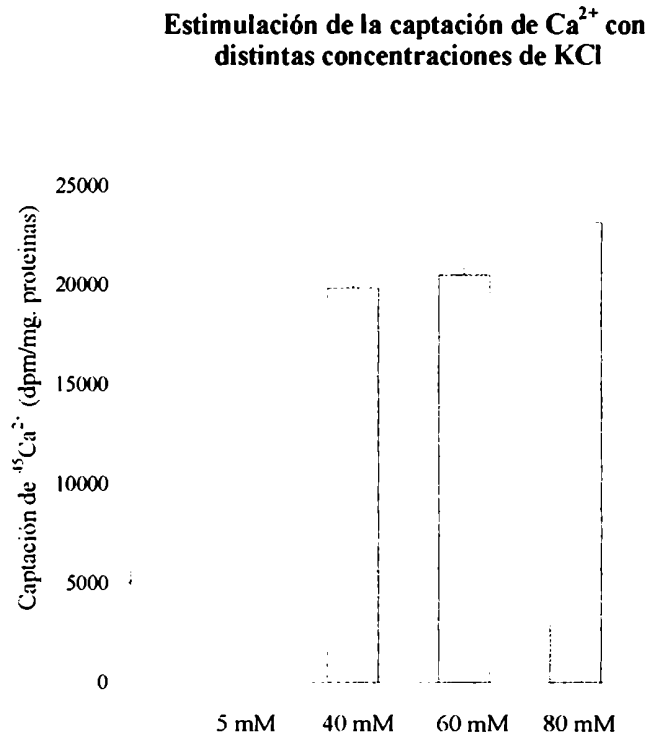


Figura 1.1 Captación de Ca^{2+} en fracción cruda de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo. Las barras son la media \pm ES de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ expresada en dpm/mg de proteínas en condiciones basales (5 mM KCl, barras blancas) y estimuladas con distintas concentraciones de KCl (barras grises), en ausencia (barras lisas) o presencia de 1 μM ω -CgTx GVIA (barras rayadas). Las diferencias significativas respecto de la captación sin droga fueron determinadas con el test de Tukey, (*) $P < 0,01$.

En sinaptosomas de corteza de rata, se realizaron experimentos similares en los que se midió la captación de Ca^{2+} en condición basal (5 mM KCl) y estimulada por distintas concentraciones de KCl (Figura 1.2.).

Figura 2.1 Captación de Ca^{2+} en fracción cruda de sinaptosomas de corteza frontal de rata. Las barras son la media \pm ES de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ expresada en dpm/mg de proteínas, en condiciones basales (5 mM KCl, barras blancas) y estimuladas con distintas concentraciones de KCl (barras grises). Las diferencias significativas respecto de la captación de Ca^{2+} basal fueron determinadas con el test de Tukey. (*) $P < 0.01$.



Finalmente, se eligió la concentración de 40 mM KCl para inducir el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD por ser la mínima concentración con la que se alcanza el máximo de incorporación en las preparaciones de sinaptosomas de ambas especies. Además, en experimento de espectrofluorometría con indicadores de Ca^{2+} , Tareilus y colaboradores (1993) mostraron que, en sinaptosomas de corteza frontal, el aumento máximo de la concentración intracelular de Ca^{2+} (400 nM aprox.) se alcanza con 35-45 mM KCl.

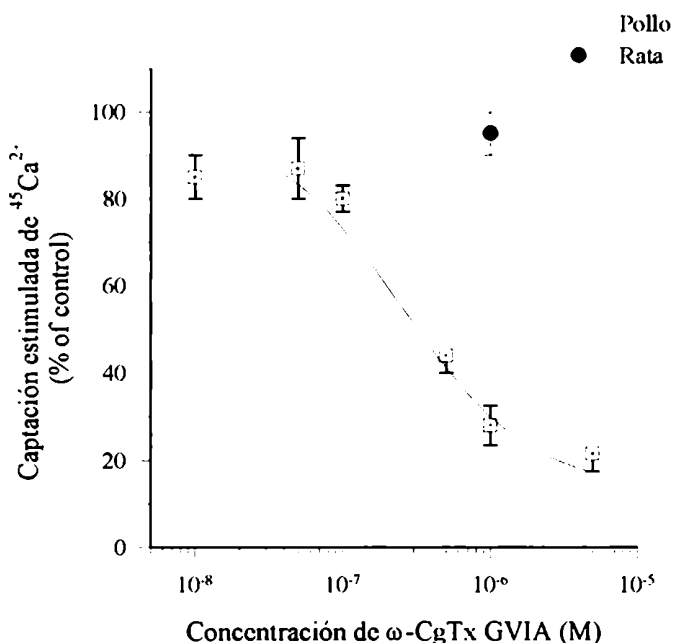
Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre el influjo de Ca^{2+} inducido por despolarización en los terminales sinápticos de corteza frontal de rata y cerebro de pollo.

En preparaciones de sinaptosomas purificados, se determinó el efecto de la toxina ω -CgTx GVIA, bloqueante de los CCVD de tipo *N*, sobre la captación de Ca^{2+} basal y estimulada por 40 mM KCl. Debido a que definimos la captación estimulada como la captación total de Ca^{2+} obtenida en condiciones despolarizantes menos la captación de Ca^{2+} basal (ver materiales y métodos), un efecto de las toxinas o bloqueantes sobre los mecanismos de captación basal de Ca^{2+} afectaría nuestra determinación del efecto de los bloqueantes sobre la captación de Ca^{2+} estimulada.

La captación de Ca^{2+} basal de los sinaptosomas de corteza frontal de rata y cerebro de pollo no es afectada por altas concentraciones de ω -CgTx GVIA (1 μM inhibe $6,8 \pm 1,4 \%$ y $-7,3 \pm 2,2 \%$ de la captación control; en pollo y rata, respectivamente). Sin embargo, la captación de Ca^{2+} estimulada por despolarización en sinaptosomas de cerebro anterior de pollo es fuertemente inhibido por ω -CgTx GVIA (Figura 1.3).

Efecto de ω -CgTx GVIA sobre la captación de Ca^{2+} estimulada

Figura 1.3. Captación estimulada de Ca^{2+} en función de la concentración de ω -CgTx GVIA. Los símbolos y representan la media \pm ES (barras) de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl en presencia de la toxina expresada como porcentaje de la captación estimulada control, $n = 5-11$. Los datos fueron ajustados a la ecuación sigmoidea que se indica en materiales y métodos, donde los valores de los parámetros estimados son: $\text{IC}_{50} = 247 \mu\text{M}$; máximo = $97,5 \pm 5,4\%$; mínimo = $13,4 \pm 8 \%$; $R^2 = 0,96$.



La inhibición que la ω -CgTx GVIA ejerce es dependiente de la concentración con un valor de IC_{50} estimado de 250 nM y alcanza la saturación con 1 μ M de la toxina. La inhibición máxima (valor estimado, $86,6 \pm 8 \%$) no se modificó al prolongar el tiempo de incubación con la toxina con los sinaptosomas de cerebro de pollo (15 min a 4 °C seguidos de 15 min a 30 °C).

Contrariamente, 1 μ M ω -CgTx GVIA no tiene efecto sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de corteza frontal de rata (Figura 1.3).

La FTX inhibe la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de ambas especies

Se estudio el efecto de la toxina purificada de la araña americana *Agelenopsis aperta* sp., FTX, sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en ambas preparaciones. En sinaptosomas purificados de cerebro de rata, FTX inhibe la captación estimulada de Ca^{2+} de manera dependiente de la concentración (Figura 1.4).

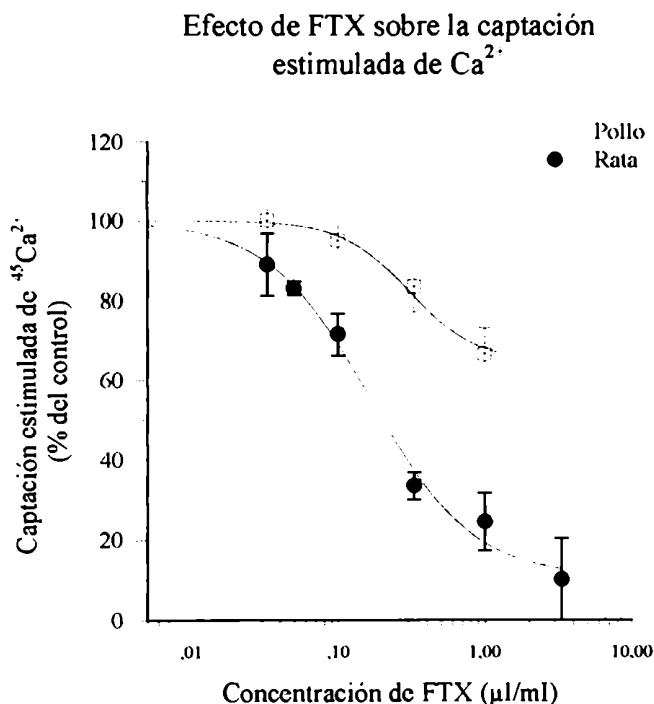


Figura 1.4. Captación estimulada de Ca^{2+} en función de la concentración de FTX. Los símbolos y representan la media \pm ES (barras) de la captación de $^{45}Ca^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl expresada como porcentaje de captación estimulada control (sin toxina), $n = 6-14$. Los datos fueron ajustados a la ecuación sigmoidea que se indica en materiales y métodos, donde los valores de los parámetros estimados son: $IC_{50} = 0.166 \pm 0.002 \mu$ l/ml; $n_H = 1.24 \pm 0.18$; mínimo = $10.7 \pm 4.26 \%$; $R^2 = 0.998$ para la rata y $IC_{50} = 0.306 \pm 0.002 \mu$ l/ml; $n_H = 1.89 \pm 0.28$; mínimo = $64.5 \pm 1.26 \%$; $R^2 = 0.998$ para el pollo.

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados en el laboratorio donde se mostró que FTX inhibe este proceso en preparaciones crudas de sinaptosomas (Uchitel et al., 1992).

Por otro lado, en sinaptosomas de cerebro de pollo, el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD mostró ser sensible a bloqueantes de los canales de tipo *N*. Sin embargo, los resultados de nuestros experimentos muestran que FTX inhibe en forma dependiente de la concentración la captación de Ca^{2+} estimulada en los sinaptosomas de cerebro de pollo (Figura 1.4).

Si bien los valores de IC_{50} estimados para la inhibición de FTX son similar en ambas preparaciones, $0,166 \pm 0,002 \mu\text{l/ml}$ en la rata y $0,306 \pm 0,002 \mu\text{l/ml}$ en el pollo; la inhibición máxima estimada fue del $89,3 \pm 4,26 \%$ en la rata y $35,5 \pm 1,26 \%$ en el pollo.

Por otro lado, FTX no afecta la captación de Ca^{2+} basal en sinaptosomas de rata, ni en sinaptosomas de cerebro de pollo.

Efecto de ω -Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+}

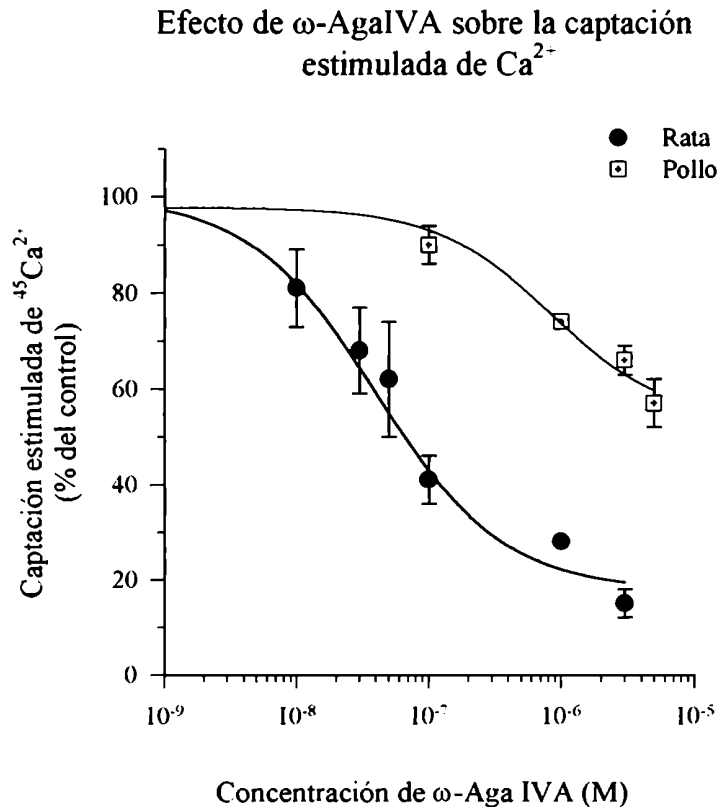
En vista del efecto inhibitorio que FTX, un bloqueantes de los CCVD de tipo *P*, ejerce sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de cerebro de pollo, una preparación con CCVD sensibles a ω -CgTx GVIA, resultó interesante analizar el efecto de ω -Aga IVA en esta preparación.

ω -Aga IVA inhibe la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de corteza frontal de rata de manera dependiente de la concentración como previamente fue demostrado (Mintz et al., 1992b) (Figura 1.5.). Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de la curva sigmoidea donde el 50% de inhibición se alcanza con una concentración estimada de 48 nM y, una inhibición máxima del $85 \pm 3\%$ es ejercida por 3 μM ω -Aga IVA.

Los resultados presentados en la Figura 1.5 muestran que ω -Aga IVA, en una concentraciones de 100 nM, inhibe el $10 \pm 4\%$ de la captación de Ca^{2+} estimulada. Si bien

mayor concentraciones de esta toxina producen una mayor inhibición de la captación, con 5 μM $\omega\text{-Aga IVA}$ no se alcanza la saturación del efecto.

Figura 1.5. Captación estimulada de Ca^{2+} en función de la concentración de $\omega\text{-Aga IVA}$. Los símbolos y representan la media \pm ES (barras) de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl expresada como porcentaje de la captación estimulada control. $n= 6-10$. Los datos fueron ajustados a la ecuación sigmoidea que se indica en materiales y métodos, donde los valores de los parámetros estimados son: $\text{IC}_{50}= 48,2$ nM; máximo= $98,4 \pm 4,5$ %; mínimo= $19,6 \pm 3,9$ %; $R^2 = 0,98$ para la rata y $\text{IC}_{50}= 851$ nM; máximo= $97,8 \pm 3,3$ %; mínimo= $53,2 \pm 6,7$ %; $R^2 = 0,975$ para el pollo.



Es importante mencionar que altas concentraciones de $\omega\text{-Aga IVA}$ ($1 \mu\text{M}$) no modifican la captación de Ca^{2+} basal en los sinaptosomas de corteza frontal de rata ni en los terminales de cerebro anterior de pollo.

Acción conjunta de $\omega\text{-CgTx GVIA}$ y FTX sobre la captación de Ca^{2+} en sinaptosomas de cerebro de pollo

En sinaptosomas de cerebro de pollo la inhibición que ejerce $\omega\text{-CgTx GVIA}$ se superpone con el efecto del bloqueante de los CCVD de tipo P , FTX. Con el objeto de determinar si

los bloqueantes de los canales de tipo *P* y *N* comparten un sitio de acción en esta preparación, se analizó la acción combinada de ω -CgTx GVIA y FTX.

La tabla 1.2 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ω -CgTx GVIA, en ausencia y presencia de una concentración saturante de FTX (1 μ l/ml).

La incubación de sinaptosomas de cerebro de pollo con 100 nM y 500 nM de ω -CgTx GVIA junto con 1 μ l/ml FTX resultó en una inhibición significativamente mayor que la ejercida por la misma concentración de ω -CgTx GVIA aplicada sola. Sin embargo, en ambos casos, el efecto combinado fue menor que la suma de los efectos inhibitorios individuales.

Si el efecto inhibitorio ejercido por las toxinas fuera aditivo, se esperaría una inhibición del 54% con 100 nM de ω -CgTx GVIA mas 1 μ l/ml FTX (valor experimental, 39 ± 3 %) y una inhibición del 89% en el caso de 500 nM ω -CgTx GVIA mas 1 μ l/ml FTX (valor experimental, 77 ± 6 %).

FTX \ ω-CgTx GVIA	0	100 nM	500 nM	1 μM
0	0 \pm 7	21 \pm 3	56 \pm 4	78 \pm 5
1 μl/ml	33 \pm 10	39 \pm 3 *	77 \pm 6 *	66 \pm 3

Tabla 1.2. Porcentaje de inhibición de la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de cerebro de pollo. Cada valor es la media \pm ES del porcentaje de inhibición de la captación de $^{45}Ca^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl. respecto de la captación control (sin droga). n = 3-7. Se empleo el test t-Student para evaluar diferencias entre las inhibiciones ejercidas por ω -CgTx GVIA en ausencia y presencia de FTX. donde (*) denota diferencias significativas con $P < 0.015$.

Contrariamente, cuando se analizó el efecto conjunto de concentraciones saturantes de ω -CgTx GVIA y FTX (1 μ M y 1 μ l/ml, respectivamente), la inhibición combinada nunca fue

mayor que la observada con 1 μM de $\omega\text{-CgTx}$ GVIA aplicada sola. Estos últimos resultados fueron consistentemente observados en tres experimentos independientes.

Todos los resultados aquí presentados sugieren que FTX y $\omega\text{-CgTx}$ GVIA podrían compartir el mismo sitio de acción sobre los terminales sinápticos del cerebro anterior del pollo.

Efecto de $\omega\text{-CgTx}$ MVIID, nitrendipina y cadmio sobre la captación de Ca^{2+} estimulada

Para completar la caracterización farmacológica de los CCVD de los sinaptosomas de ambas especies, se estudio la sensibilidad a $\omega\text{-CgTx}$ MVIID de la captación de Ca^{2+} . $\omega\text{-CgTx}$ MVIID es un péptido preparado a partir del veneno del *Conus magus*. Estudios previos realizados por Monje y colaboradores (1993) postularon que esta toxina presenta una marcada preferencia por los CCVD de tipo *no-N* frente a CCVD de mamíferos de tipo *N*.

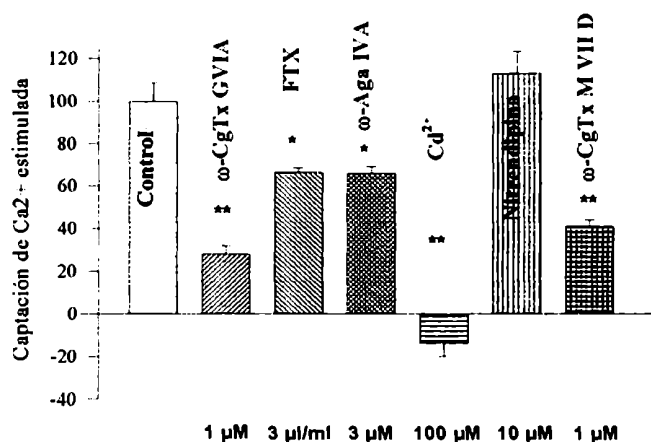
En sinaptosomas de corteza frontal de rata, donde la captación de Ca^{2+} mostró ser muy sensible a bloqueantes de canales de tipo *P/Q*, 1 μM de $\omega\text{-CgTx}$ MVIID inhibe el $58 \pm 1\%$ de la captación de Ca^{2+} estimulada (Figura 1.6A). Contrariamente a lo esperado, en los sinaptosomas de pollo 1 μM de esta toxina bloquea el $59 \pm 3\%$ del influjo de Ca^{2+} estimulado (Figura 1.6B).

La nitrendipina, un antagonista de los CCVD de tipo *L*, en concentraciones de 10 μM no tiene efecto significativo sobre la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ en ninguna de las dos preparaciones ($88 \pm 6\%$ y $113 \pm 10\%$ es la captación de Ca^{2+} expresada como porcentaje del control en sinaptosomas de rata y de pollo, respectivamente).

Por otro lado, el ion Cd^{2+} (100 μM), bloqueante inorgánico de todos los tipos de CCVD de alto umbral de activación, inhibió completamente el influjo de Ca^{2+} inducido por despolarización en ambas especies. Este último resultado permite afirmar que, en ambas preparaciones de sinaptosomas, la captación de Ca^{2+} estimulada por 40 mM KCl se produce a través de canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación.

Bloqueantes de los CCVD sobre la captación de Ca^{2+} estimulada

A) Sinaptosomas de cerebro anterior de pollo



B) Sinaptosomas de corteza frontal de rata

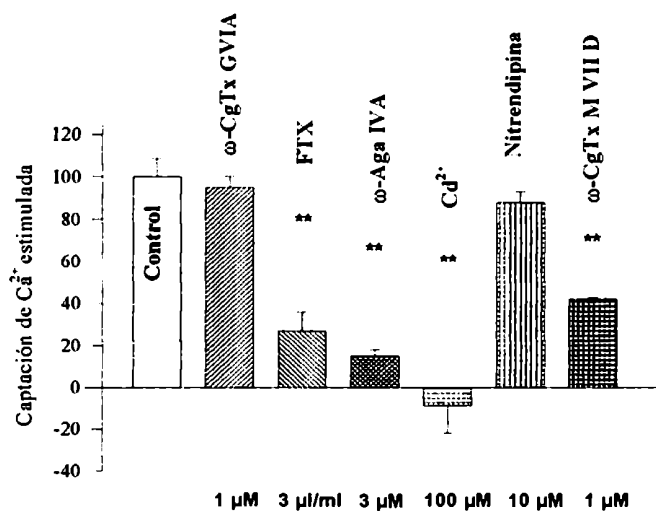


Figura 1.6. Perfil farmacológico de los CCVD de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo (A) y de corteza frontal de rata (B). La barra representa el promedio \pm ES de la captación de $^{45}Ca^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl expresada como porcentaje de la captación estimulada control, n=3-7. Se empleó el test *t*-Student para evaluar diferencias respecto al control, donde (*) denota diferencias significativas con $P < 0,02$ y (**) con $P < 0,02$.

DISCUSION

En el estudio farmacológico desarrollado en este capítulo, encontramos que la toxina ω -CgTx GVIA, bloqueante de los canales de tipo *N*, inhibe selectivamente los CCVD de los terminales nerviosos del cerebro anterior del pollo adulto. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito anteriormente por otros autores (Rivier et al., 1987; Venema et al., 1992; Lundy et al., 1989). Existe, sin embargo, una discrepancia en cuanto al rango de concentración de ω -CgTx GVIA a la cual se observa el efecto inhibitorio. Estos autores reportan valores de IC_{50} para la inhibición del flujo de Ca^{2+} en esta preparación de un orden de magnitud menor que el encontrado en este estudio (10 nM; 38 nM y 14 nM, respectivamente).

Diferencias en la edad de los animales utilizados para el estudio y/o en la pureza de la preparación de los sinaptosomas podrían explicar este hecho. Por ejemplo, en los trabajos de Rivier y en los de Venema se utilizaron pollos de 2 días de edad, mientras que este trabajo fue realizado en animales en los que el desarrollo del SNC está completo. Han sido descritos cambios en las propiedades farmacológicas de los CCVD en distintos estadios del desarrollo del SNC que coinciden con los períodos de proliferación dendrítica y sinaptogénesis, tanto en el cerebro de pollo (Gray et al., 1992) como en mamíferos (Litzinger et al., 1993). Si bien en las aves, este período crítico ocurre justo antes del nacimiento (Azimi-Zonooz y Litzinger, 1992), el desarrollo del SNC continúa en estadios postnatales y múltiples diferencias existen entre una sinápsis recién formada y una sinápsis madura.

Por otro lado, el tiempo de incubación de los sinaptosomas con la toxina, la temperatura de incubación y la concentración de Ca^{2+} de las soluciones son factores que determinan la unión irreversible de la toxina al canal y no son los mismos en los distintos estudios mencionados. En este estudio reportamos que altas concentraciones de ω -CgTx GVIA alcanzan el equilibrio luego de 15 min de incubación a 30 °C, ya que aumentar el tiempo de incubación no modifica la inhibición observada. Sin embargo, no podemos afirmar que esto sea válido también para bajas concentraciones de la toxina. En los trabajos de Rivier y

Venema, las incubaciones son de 15 min a 4 °C y 15 min a 30 °C en el primero y de 20 min a 4 °C y 10 min a 30 °C en el segundo. Sería importante considerar que, si bien tiempos de incubación prolongados permiten asegurar el estado de equilibrio para la unión de la toxina al canal, también disminuyen la actividad metabólica de la preparación de sinaptosomas y, en consecuencia, la capacidad de captar calcio inducida por despolarización. Este hecho observado experimentalmente por nosotros, es también discutido en el trabajo de Rivier y colaboradores.

Finalmente, ha sido descrito que el Ca^{2+} disminuye la afinidad de ω -CgTx GVIA por el sitio de unión de baja afinidad (Witcher et al., 1993; Feigenbaum et al., 1988; Wagner et al., 1988). En los trabajos arriba mencionados se utilizaron distintas concentraciones de $CaCl_2$ en la soluciones de incubación y ésta podría ser una de las razones de la discrepancia observada en la sensibilidad a ω -CgTx GVIA.

Por otro lado, en los terminales sinápticos de cerebro anterior de pollo, la nitrendipina, un bloqueante de los canales de tipo *L*, no tiene efecto sobre la captación de Ca^{2+} voltaje-dependiente. Sin embargo, cuando se estudió el efecto de FTX y ω -Aga IVA, dos bloqueantes de los canales de tipo *P/Q*, sobre el influjo de Ca^{2+} en esta preparación se observó que estas toxinas inhiben de manera dosis dependiente la captación voltaje-dependiente. Mientras los valores de IC_{50} para el efecto de FTX en la rata y en pollo están dentro del mismo rango de concentración, la sensibilidad del influjo de Ca^{2+} para la ω -Aga IVA es 10 veces menor en los terminales nerviosos del pollo que en los de la rata.

Se evaluó el efecto inhibitorio combinado de FTX y ω -CgTx GVIA sobre la captación de Ca^{2+} en terminales de pollo y se encontró que la inhibición no presenta características aditivas a ninguna de las concentraciones estudiadas. Mas aún, la inhibición que ejercen concentraciones saturantes de ambas toxinas aplicadas juntas nunca resultó mayor a la inhibición máxima observada con ω -CgTx GVIA sola, a pesar de que ésta es significativamente menor al 100%. Estos resultados sugieren que FTX y ω -CgTx GVIA actúan sobre los mismos canales en los terminales nerviosos del pollo y, dado que 1 μ l/ml de

FTX producen una inhibición máxima del 33%, es posible que esta toxina actúe como un bloqueante parcial de estos canales.

Ha sido demostrado que FTX no afecta los CCVD de tipo *N* de mamíferos (Manfridi et al., 1993). En consecuencia, los resultados de este trabajo sugieren que un canal con características farmacológicas no descritas anteriormente participa en la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización en el SNC del pollo.

Además, estos resultados aportan nuevas evidencias que apoyan la teoría propuesta por Olivera y colaboradores (1994) de que ω -CgTx GVIA podría tener una especificidad más amplia en vertebrados inferiores (aves y anfibios) que en vertebrados superiores (mamíferos).

Casi simultáneamente a la publicación de los resultados de este trabajo, Lundy y colaboradores (1994) reportaron resultados que, si bien presentan algunas diferencias cuantitativas con respecto a nuestros datos, sugieren la misma conclusión. Mas aún, ellos muestran que la toxina ω -CgTx MVIIC, bloqueante de los CCVD de tipo *N* y *P*, inhibe con una sensibilidad mayor que la presentada por ω -CgTx GVIA el influjo de Ca^{2+} a los terminales del pollo.

El valor de IC_{50} de ω -CgTx MVIIC (2,2 nM) reportado para la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a los terminales sinápticos de pollo es menor que el valor de IC_{50} descrito para la acción de ω -CgTx MVIIC sobre los canales *P* (1-10 μ M), *Q* (~150 nM) y *N* (~65 nM). El hecho de que esta toxina ha sido identificada a partir de una biblioteca de ADNc del veneno del *Comus magus* sugiere que esta toxina evolucionó para actuar específicamente sobre los canales de Ca^{2+} de sus presas, vertebrados no mamíferos. Estos canales podrían ser similares o idénticos a los descritos en los terminales nerviosos del cerebro de las aves en este trabajo y en el de Lundy y colaboradores (1994).

La toxina ω -CgTx MVIID, obtenida de la misma manera que la MVIIC y también presente en el veneno del *Comus magus*, fue descrita como un bloqueante con una selectividad preferencial por canales de tipo no-*N* (Monje et al., 1993; Hillyard et al., 1992).

El sitio de alta afinidad para esta toxina aún no está bien caracterizado pero puede incluir una región de la subunidad α_1 de clase A (Haack et al., 1993). En la placa neuromuscular de mamífero, donde los CCVD de tipo *P* median la liberación de neurotransmisor (Uchitel et al., 1992; Protti y Uchitel, 1993), ω -CgTx MVIID (1 μ M) reduce en 63% el contenido cuántico (Katz et al., 1997).

En este trabajo analizamos el efecto de esta toxina sobre el influjo de Ca^{2+} a través de canales sensibles a ω -CgTx GVIA (sinaptosomas de SNC de pollo) y en una preparación con CCVD sensibles a ω -Aga IVA (sinaptosomas de SNC de rata). Sugestivamente, 1 μ M de esta toxina produjo un similar porcentaje de inhibición sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en la rata y en el pollo. Estos últimos resultados refuerzan la conclusión anteriormente discutida de que en el cerebro del ave, ω -CgTx GVIA actúa sobre CCVD con características distintas a las clásicamente descritas para los canales de tipo *N*.

En los terminales sinápticos de corteza frontal de rata, la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización no es afectada por ω -CgTx GVIA. Estos resultados podrían sugerir que los canales de Ca^{2+} de tipo *N* no participan en el influjo de Ca^{2+} en esta preparación. Otro estudio en los que se midieron variaciones en la concentración de Ca^{2+} durante el primer segundo luego de la despolarización, sugieren conclusiones similares dado que muestran que la ω -CgTx GVIA no afecta el aumento de la concentración de Ca^{2+} inducida por despolarizaciones de los sinaptosomas de corteza frontal de rata (Thomas et al., 1994).

Sin embargo, se ha reportado el pegado de [125 I] ω -CgTx GVIA a membranas de sinaptosomas de mamífero (Feigenbaum et al., 1988 y Wagner et al., 1988). En base a la demostrada similitud entre los distintos tipos de CCVD (Snutch et al., 1990), resulta plausible que la ω -CgTx GVIA se una a los CCVD presentes en los terminales sinápticos de corteza frontal de mamífero pero no tenga un efecto inhibitorio sobre la actividad de los mismos.

Por otro lado, Turner y colaboradores (1993) han descripto que, si bien la liberación de glutamato de sinaptosomas de corteza frontal es muy sensible a la ω -Aga IVA, la ω -CgTx

GVIA inhibe una fracción de este proceso. El hecho de que la ω -CgTx GVIA bloquee parcialmente la liberación sin un significativo efecto sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización ni sobre la concentración del ion en los terminales, puede dar cuenta de la dependencia exponencial del Ca^{2+} en la liberación de neurotransmisor. De acuerdo a lo mostrado por Augustine y colaboradores (1985), la dependencia de la liberación de neurotransmisor con la concentración de Ca^{2+} extracelular tiene una relación exponencial con un factor de tres-cuatro, aproximadamente, lo que indica que pequeñas variaciones en el flujo de Ca^{2+} al terminal afectan fuertemente la liberación de neurotransmisor.

La localización de los CCVD dentro del terminal sináptico es también otro factor crítico que regula la participación de distintos CCVD en la neurotransmisión. Existen muchas evidencias de que los CCVD involucrados en el proceso de liberación de neurotransmisor están agrupados formando las *zonas activas*, donde una asociación espacial existiría entre los CCVD allí localizados y las vesículas sinápticas que están por ser liberadas (ver *Introducción General*, El Ca^{2+} y la transmisión sináptica). Bajo la luz de esta teoría, por ejemplo, CCVD localizados en los terminales sinápticos pero fuera de las *zonas activas*, tendrían una importante participación en la regulación de la concentración de Ca^{2+} en el terminal, pero no serían factores determinantes en el proceso de neurotransmisión fásica. Si bien, el ejemplo presentado no es, evidentemente, lo que ocurre con los CCVD sensibles a ω -Aga IVA dado que esta toxina bloquea gran parte de la liberación de glutamato en la corteza frontal de la rata, es posible que una distribución espacial diferencial sea la razón de la diferencia observada en el efecto de ω -CgTx GVIA sobre la liberación de neurotransmisor y el influjo de Ca^{2+} al terminal.

Los bloqueantes de los CCVD de tipo *P/Q*, FTX y ω -Aga IVA, inhiben fuertemente el influjo de Ca^{2+} a los terminales sinápticos de corteza frontal de rata. Ambos antagonistas ejercen su acción de manera dependiente de la concentración, hecho que está de acuerdo con otros trabajos publicados anteriormente (Mintz et al., 1992b; Uchitel et al., 1992). La casi completa inhibición de la captación de Ca^{2+} que ejercen estos bloqueantes sugiere que

los CCVD de tipo *P/Q* son la principal vía de entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente de los terminales sinápticos de la corteza frontal de rata.

Las mediciones de los cambios de concentración de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de los terminales sinápticos permite la distinción de dos fases: una rápida, que ocurre en los primeros segundos después de la despolarización, y una lenta, que se prolonga por minutos (Blaustein M.P., 1988 y Lentzner et al., 1992). En este trabajo, las mediciones de la captación de Ca^{2+} han sido realizadas durante los 5 segundos que siguen a la despolarización, hecho que implica que son determinaciones de la fase rápida del influjo de Ca^{2+} . Bowman y colaboradores (1993) mostraron que, en la fase lenta de la entrada de Ca^{2+} a los terminales, también participan los canales de Ca^{2+} de alto voltaje de activación de tipo *P/Q*, hecho que concuerda con la lenta inactivación que caracteriza a este tipo de canales (Usowicz et al., 1992).

El valor de IC_{50} (48 nM) obtenido en este estudio para el efecto de ω -Aga IVA sobre el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente en los terminales de corteza frontal de rata es mayor que los reportados para los canales de tipo *P* descritos primeramente en las células de Purkinje (2 nM) (Mintz et al., 1992b). Este hecho podría sugerir que, en los terminales de corteza, la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización está principalmente mediada por CCVD con características más similares a los CCVD de tipo *Q* (Zhang et al., 1993). Sin embargo, es necesario considerar que la división de los canales sensibles a ω -Aga IVA en dos clase: *P* y *Q*, es aún muy controvertida. Las diferencias en la sensibilidad a la toxina podría ser el resultado de distintas variantes de *splicing* alternativo de la subunidad α_1 clase A o de una diferente combinación de las otras subunidades que conforman el canal.

El bloqueante de los CCVD de tipo *L*, nitrendipina, no tiene efecto sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en los terminales nerviosos de corteza frontal de rata. Contrariamente a lo observado en los mecanismos de acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético, cardíaco y liso donde los CCVD de tipo *L* cumplen un papel esencial, esto resultado, sumado a la falta de efecto en la preparación de terminales de cerebro anterior de

pollo, sugiere que los canales de tipo *L* podrían tener poca participación en la transmisión sináptica del SNC de vertebrados.

Este trabajo revela las propiedades farmacológicas de los canales de Ca^{2+} que median la entrada del ion a los terminales sinápticos de la corteza frontal de la rata y del cerebro anterior del pollo. En ambas preparaciones, los CCVD mostraron ser sensibles a más de un bloqueante, hecho que resalta la importancia de una caracterización farmacológica completa.

En base a estos resultados es posible concluir los CCVD de tipo *P/Q* son los principales mediadores del influjo de Ca^{2+} a los terminales de corteza frontal de rata y que, en los terminales sinápticos del cerebro anterior del pollo, existiría un canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente con características farmacológicas no descriptas anteriormente.

Capítulo 2

Efecto del tratamiento con una droga convulsivante sobre las propiedades farmacológicas de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de los terminales sinápticos de cerebro de rata.

INTRODUCCION

Aspectos generales de la regulación de los CCVD

Como ya se ha discutido, la regulación de los canales de Ca^{2+} es de vital importancia porque la entrada de Ca^{2+} a través de los CCVD constituye la principal vía por la cual los cambios en el potencial de membrana pueden influenciar otros procesos celulares. El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ha sido aceptado como un hecho crítico en la inducción de cambios de larga duración, “*long-term*”, en las neuronas (Lynch y Baudry, 1984). Además, agentes que producen un aumento en la concentración de Ca^{2+} , inducen diferenciación y crecimiento, y desencadenan la expresión de genes (Sheng y Greenberg, 1990; Zafra et al., 1990). La entrada de Ca^{2+} a través de CCVD en los terminales sinápticos es, por otro lado, el acontecimiento que desencadena la liberación de neurotransmisor y de esta forma la regulación de los CCVD implica la modulación de la transmisión sináptica.

En los últimos años, se han descrito la existencia de diversos factores que regulan la actividad de los CCVD y han sido discutido también en la *Introducción General*. En particular en este capítulo, resulta interesante resaltar otros aspectos de la modulación de los canales de Ca^{2+} presinápticos. Garcia y colaboradores (1994) han mostrado que la estimulación repetitiva con el neurotransmisor glutamato induce un aumento de las corrientes de Ca^{2+} de alto umbral de activación en neuronas de hipocampo. La aplicación diaria (1 hora) de 10 μM de glutamato al medio de cultivo de neuronas diferenciadas de hipocampo provoca un aumento de la corrientes de Ca^{2+} que es prevenido por la presencia de bloqueantes de la síntesis proteica en el medio de incubación, lo que indica que es necesaria la síntesis de proteínas para la manifestación del aumento en la corriente. Durante la estimulación con glutamato, se observa un aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} que decae luego lentamente por 2 a 3 minutos, y retorna a los valores normales en 10 minutos. De manera similar, despolarizaciones periódicas de la membrana, con altas concentraciones de KCl, inducen un aumento del Ca^{2+} intracelular y repiten el efecto a largo plazo sobre las corrientes que induce el glutamato.

Además de los neurotransmisores, otros factores co-liberados por los terminales sinápticos han mostrado tener potentes efectos reguladores de la actividad de los CCVD. El ATP co-liberado junto con la noradrenalina por los terminales sinápticos excitatorios del sistema nervioso sináptico es rápidamente hidrolizado y convertido en adenosina por la ectonucleótidasa. En neuronas en cultivo del ganglio cervical superior, estudios electrofisiológicos mostraron que la adenosina produce una inhibición de las corrientes de Ca^{2+} que es dosis-, tiempo- y voltaje-dependiente (Zhu y Ikeda, 1993). Este efecto está mediado por receptores A1 para adenosina acoplados a la proteína G sensible a la PTX (toxina de pertusis), y provoca la inhibición de CCVD de tipo *N* y de un componente no identificado de la corriente de Ca^{2+} (ver Figura 0.4., *Introducción General*)

Por otro lado, la activación de receptores α_2 adrenérgicos en los sinaptosomas de corteza cerebral de rata provoca el cierre de los CCVD de tipo *N* y una inhibición del influjo de Ca^{2+} a los terminales (Xiang et al., 1990).

Un interesante trabajo realizado por Tsakiridou y colaboradores (1995) muestra que en animales que padecen una epilepsia de ausencia, un aumento de las corrientes de Ca^{2+} de tipo *T*, de bajo umbral de activación, es observado en neuronas talámicas disociadas. Esta alteración es específica para las corrientes de bajo umbral de activación ya que no se observaron modificaciones en las corrientes de tipo *L* en estas neuronas.

Los autores proponen que el incremento en la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} podría aumentar la probabilidad de activación recurrente intratalámica, fortaleciendo los mecanismos de sincronización de los sistemas tálamo-corticales. De esta manera, esta observación podría representar una alteración primaria de las neuronas que posiblemente explique la sintomatología observada en las epilepsias generalizadas.

En resumen, sumada a la importancia fisiológica de la regulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} ejercida por ejemplo por los neurotransmisores, surgen evidencias de que alteraciones en la actividad de los canales podrían estar asociadas con algunos tipo de patologías.

Recientemente, Ophoff y colaboradores (1996) reportaron alteraciones en el gen que codifica para la subunidad α_1 de los CCVD cerebrales de tipo *P/Q* en pacientes con

migrania familiar hemipléjica y personas que padecen de ataxia episódica tipo-2. La descripción de esta canalopatía es la primera evidencia de alteraciones genéticas en los CCVD y de su asociación con una patología en humanos. Por último, los autores sugieren que los CCVD podrían estar implicados también en las formas más comunes de migrañas.

Actividad convulsiva y drogas convulsivantes

La actividad convulsiva no es solamente una manifestación patológica sino también una propiedad inherente a las neuronas, ya que cuando a un cerebro normal, se le suministra un estímulo apropiado (drogas convulsivantes, electrochoque o lesiones), puede presentar convulsiones. Esta propiedad nos permite estudiar los cambios neuroquímicos provocados por la hiperactividad en el cerebro normal.

Es importante comprender las variadas causas, tipos y grados de intensidad de la actividad epiléptica. Una clasificación moderna de las mismas hace especial distinción entre las convulsiones que son generalizadas desde su aparición, de aquellas que son parciales o focales en su comienzo y luego secundariamente generalizadas.

En las convulsiones parciales, los registros electroencefalográficos indican la activación inicial de un conjunto limitado de neuronas o un hemisferio cerebral. A su vez, las convulsiones parciales se dividen, de acuerdo al grado de preservación de las alteraciones de la conciencia, en simples cuando está preservada, y complejas en los casos que ocurren con alteración de la conciencia. Las convulsiones generalizadas son producto de la activación, desde su inicio, de sistemas neuronales en ambos hemisferios. La manifestación inicial puede ser la alteración de la conciencia; y las manifestaciones motoras cuando están presentes son siempre bilaterales.

Las convulsiones pueden ser inducidas en animales mediante la administración de drogas o por estimulación eléctrica. En este último caso, la aplicación de choques eléctricos de alta intensidad provoca crisis generalizadas tónico-clónicas. Sin embargo, la aplicación repetida de estímulos eléctricos de alta frecuencia pero baja intensidad sobre estructuras límbicas u otras regiones cerebrales aumenta la duración, la amplitud y la propagación sináptica. Esto

conduce a la aparición de signos conductuales patológicos y al desarrollo progresivo de actividad epileptiforme con convulsiones generalizadas. Este fenómeno ha sido denominado encendido o “*kindling*” (Goddard et al., 1969) y provoca un estado de susceptibilidad convulsiva que es permanente, indicando que el *kindling* implica una alteración persistente en la organización sináptica. (Kirkby et al., 1993). En algunos aspectos el *kindling* se asemeja al fenómeno de potenciación sináptica, donde se observa un aumento en la eficacia sináptica (Lynch y Baudry, 1984).

Durante el transcurso de los últimos 25 años, se han utilizado numerosas drogas que producen convulsiones luego de su administración endovenosa, intraventricular o intraperitoneal. Los mecanismos de acción más comunes de las drogas convulsivantes son:

a) por interferencia con los mecanismos de suministro o degradación de sustratos para el metabolismo energético cerebral, como es el caso de drogas que provocan severos cuadros de hipoxia, hipoglucemia o en los envenenamiento con fluoroacetato.

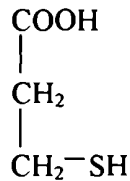
b) por estimulación directa del sistema nervioso, como por ejemplo, el pentametilentetrazol, el fluorotilo o las sales de amonio (Folbergrova et al., 1985; Kreisman et al., 1981).

c) por inhibición de la captación de ciertos aminoácidos, como es el caso de la metionina sulfoximina (Stone W.A., 1969; Sabado et al., 1979).

d) por acciones antagonistas de la inhibición fisiológica de neurotransmisores, como las drogas que interfieren con el metabolismo de GABA. El efecto puede estar mediado por acciones a nivel postsináptico: bloqueo de la función de los receptores GABA_A, picrotoxina, bicuculina y algunas β -carbolinas; o por acciones a nivel presináptico de la droga: inhibición de la síntesis de GABA por interferencia con el fosfato de piridoxal (cofactor) y/o por interferencias con el glutamato (sustrato) y/o sobre la enzima de síntesis glutámico decarboxilasa. Este último es el caso del ácido aminooxiacético y el ácido 3-mercaptopropiónico.

El ácido 3-mercaptopropiónico, su empleo como droga convulsivante

El ácido 3-mercaptopropiónico (MP), cuya fórmula se muestra a continuación, es uno de los compuestos más activos de una serie de mercaptoácidos que fueron analizadas por Sprince y colaboradores en 1969.



Esta droga inyectada en ratas y ratones produce convulsiones y ataques de corrida a los pocos minutos de su administración. Sprince y colaboradores la señalaron como una droga excelente para el uso en modelos experimentales de epilepsia por varias razones: es efectiva a bajas dosis, lo que produce un alto porcentaje de convulsiones sin muerte; tiene extrema rapidez de acción y su efecto se protege con fenobarbital.

Lamar C. demostró en 1970 que MP inhibe a las enzimas glutamato decarboxilasa y GABA aminotransferasa *in vitro*. Ambas enzimas se hallan relacionadas en forma directa con la síntesis y degradación de GABA (Curtis et al., 1971), enzimas que se encuentran alteradas en varios tipos de epilepsias (Delgado-Escueta A.V., 1984). Estudios *in vivo* mostraron que la administración de MP produce una disminución de la actividad de la enzima GABAaminotransferasa y de los niveles de GABA en corteza cerebral y cerebelo (Rodríguez de Lores Arnaiz et al., 1972; 1973). En cerebelo, estudios *in vitro* mostraron que MP no afecta la unión de [¹⁴C]GABA a su receptor (Sabato et al., 1979), pero inhibe la liberación de GABA sin afectar la liberación de noradrenalina y serotonina en la misma preparación (Fan et al., 1981).

Los estudios morfológicos mostraron que, en corteza cerebral, MP no produce alteraciones en las neuronas, pero sí en las células gliales (Rodríguez de Lores Arnaiz et al., 1973). Más aún, en la corteza del cerebelo de ratas tratadas con una dosis de 150 mg/kg de MP fueron observadas alteraciones morfológicas en especial en las neuronas de Purkinje (Rodríguez de Lores Arnaiz et al., 1972).

Las convulsiones inducidas por MP están asociadas con grandes cambios en las reservas de energía del cerebro. Se observó una disminución en los niveles de ATP, fosfocreatina, glucógeno y glucosa; así como un aumento de la concentración de lactato respecto de los valores normales. El consumo de glucosa durante las convulsiones inducidas con MP aumentan entre 6 y 7 veces (Folbergrova J., 1977).

OBJETIVO

En este trabajo se estudiarán los posibles cambios en las propiedades farmacológicas de la captación de Ca^{2+} voltaje-dependiente en los terminales nerviosos aislados del cerebro de ratas sometidas al tratamiento con la droga convulsivante MP. Además con el objeto de determinar cambios en sensibilidad a los estímulos despolarizantes se estudiará la dependencia con la concentración de KCl, de la captación de Ca^{2+} en sinaptosomas del SNC de animales controles y de animales sometidos al tratamiento con MP. Estos estudios serán realizados en animales sometidos a dos tratamientos distintos con la droga convulsivante: tratamiento agudo (1 dosis MP 150 mg/kg) y tratamiento crónico (1 dosis MP 35 mg/kg cada 24 horas, durante 3 días).

Durante la convulsión, una masiva liberación de neurotransmisores se produce como consecuencia de la intensa actividad neuronal, por lo cual este estudio permitirá determinar el posible efecto regulador de los neurotransmisores sobre los CCVD, de una manera que no implique la administración exógena de los neurotransmisores y donde pueda estudiarse el efecto a largo plazo de la hiperactividad neuronal.

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento de los animales con el ácido 3-mercaptopropiónico (MP)

Se utilizaron ratas macho Wistar de 120 a 200 g de peso que fueron mantenidas bajo un régimen de 12 horas de luz-oscuridad, con libre acceso a alimento balanceado y agua. Las ratas se inyectaron intraperitonealmente (ip.) con una solución de MP (en NaCl 0,15 M, neutralizada con Tris base, que fue preparada minutos antes de comenzar el experimento) en distintas dosis de acuerdo al tratamiento empleado. Como controles se utilizaron ratas inyectadas ip. con solución fisiológica (0,15 M NaCl) (tratamiento control).

- Tratamiento agudo: 1 dosis de MP 150 mg/kg (ip.). Los animales fueron decapitados en el período de *convulsión* (3 a 5 minutos luego de la inyección) o de *postconvulsión* (18 a 20 minutos luego de la inyección).

Los animales sometidos a este tratamiento muestran, en general, un comportamiento uniforme. La primera modificación conductual de los animales se observa a los pocos minutos (2-3) y consiste en un aumento del estado de alerta, inmovilidad, rápidos movimientos de las vibrizas y cierre ocasional de los ojos. La convulsión comienza a los 3-5 minutos, con característicos movimientos tónico-clónicos, corridas, movimientos de rotación de los animales sobre si mismos y, breves y repentinos retornos a la postura normal, acompañados de intensos temblores principalmente de las patas traseras.

Ente los 15 y 18 minutos después de la inyección, los animales se encuentran en un profundo estado depresivo marcado por una intensa flaccidez corporal (estado postconvulsivo) del cual no se recuperan y mueren luego de 20 minutos de la inyección aproximadamente.

- Tratamiento crónico: 1 dosis de MP 35 mg/kg aplicada (ip.) diariamente durante 3 días. Los animales son decapitados 24 hs después de la última inyección. El comportamiento de los animales sometidos a este tratamiento se resume en el Tabla 2.1.

Las características conductuales de los estados convulsivo y postconvulsivos de los animales inyectados con esta dosis de MP son básicamente similares a lo observado con la dosis de 150 mg/kg, pero la duración e intensidad de las conductas es marcadamente menor que en el caso del tratamiento agudo.

Día de tratamiento	# de animales	Peso (media \pm ES)	# de animales que convulsionan	convulsión (tiempo desde inyección)	% de supervivencia
1°	17	156 \pm 5.13 (gr)	11 (64.7%)	5.95 \pm 0.52 (min)	82.35
2°	14	154.7 \pm 5.9 (gr)	10 (71.43%)	6.74 \pm 0.72 (min)	100
3°	14	151.7 \pm 6 (gr)	5 (35.7%)	9.8 \pm 0.66 (min)	100

Tabla 2.1. Tratamiento crónico de animales con MP (35mg/kg). La tabla resume las características y la respuesta de los animales que fueron tratados durante 3 días consecutivos con MP.

Los animales se reponen de la depresión postconvulsiva (excepto algunos que no superan la primera inyección) y 24 horas luego de la inyección se encuentran totalmente recuperados.

- Tratamiento control: se inyectó solución fisiológica (ip.) en la misma relación de volumen/peso del animal que las ratas inyectadas con MP. Los animales fueron decapitados a los mismo tiempos postinyección que los animales tratados con MP (convulsión, 4 min.; postconvulsión, 20 min. o tratamiento crónico, 24 hs luego de la última inyección).

Debe aclararse que estos controles no fueron hecho en todos los casos por dos razones: 1) en todos casos en que se realizó la inyección de SF en paralelo, el resultado de los experimentos de captación resultó igual al de ratas sin tratamiento, lo cual demostró que la inyección *per se* no tiene efecto sobre los parámetros medidos y 2) el manipuleo de grandes cantidades de tejido aumenta los tiempo requeridos para la purificación de los sinaptosomas, disminuyendo considerablemente la actividad biológica de la preparación.

Preparación de la fracción cruda de sinaptosomas, Obtención de la fracción pura de sinaptosomas y Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en sinaptosomas

La preparación de los sinaptosomas, su purificación y la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fueron realizadas de la manera descrita en el Capítulo 1.

Soluciones

Se emplearon las mismas soluciones que las descritas en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1

Cálculos y estadística

El tratamiento de los datos, los cálculos estadísticos y el ajuste de los datos a la ecuación sigmoidea fue realizo de forma similar a lo descrito en el Capítulo 1.

Para las curvas de estimulación, los datos fueron ajustados a una ecuación hiperbólica ($y = B_{max} \cdot x / (K_d + x)$), donde x es la concentración de KCl. Para el ajuste de ecuaciones se utilizó el programa SigmaPlot o el Prism, y el valor de los parámetros estimados aparece en el pie de figura correspondiente.

Materiales

HEPES, Trizma base, Percoll, EGTA, PPO, sacarosa, ColinaCl y el ácido 3-mercaptopropiónico fueron obtenidos de la empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Las sales, xileno y la glucosa de Mallinckrodt. El calcio radioactivo de los distribuidores NEN-Du Pont. Las toxinas ω -CgTx GVIA y ω -Aga IVA fueron compradas a Peptide International Co. La nitrendipina fue obtenida de Research Biochemicals International.

RESULTADOS

Influjo de Ca^{2+} basal y estimulado con K^+ en los terminales sinápticos

Se determinó la captación de Ca^{2+} basal y estimulada por 40 mM de KCl en fracción cruda de sinaptosomas de corteza frontal de animales tratados con la droga convulsivante ácido 3-mercaptopropiónico (MP) (150mg/kg) y de animales inyectados con solución fisiológica (SF) empleados como controles. Los animales sometidos al tratamiento agudo fueron sacrificados durante el período de convulsión y de postconvulsión, y la incorporación de Ca^{2+} fue comparada con la de los animales tratados con SF (Figura 2.1).

No se observan diferencias en la captación de Ca^{2+} basal de los animales tratados con MP y con SF. Más aún, la captación de Ca^{2+} estimulada por K^+ es similar en los animales controles y las ratas tratadas con MP y sacrificados en convulsión y postconvulsión.

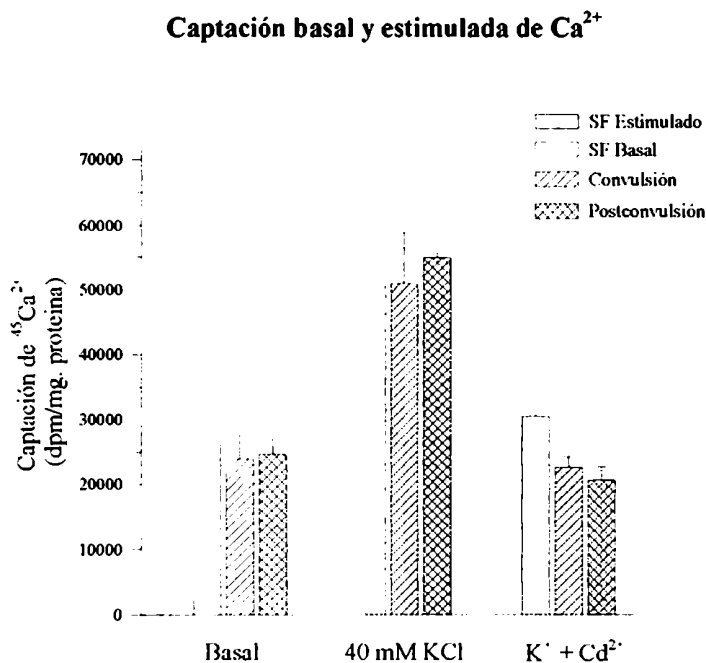


Figura 2.1 Captación de Ca^{2+} en fracción cruda de sinaptosomas de animales sometidos al tratamiento agudo. Las barras representan la media \pm ES (n=4-7) de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ basal (barras blancas) y estimulada con 40 mM KCl (barras grises) expresadas en dpm/mg proteínas, en cada una de las condiciones: tratamiento agudo con MP (150 mg/kg), sacrificados en convulsión (rayas oblicuas) y postconvulsión (cuadriculado), y animales inyectados con SF (lisas).

Los tratamientos no resultaron significativamente diferentes al control, en ninguna de las condiciones analizadas (test de Newman-Keuls, $P > 0,05$)

El ion Cd^{2+} (100 μM) bloquea completamente la captación de Ca^{2+} estimulada en las tres casos, bajando la radioactividad incorporada por los sinaptosomas a los niveles basales.

La observación de que en los terminales nerviosos aislados a partir del cerebro de los animales sometidos al tratamiento agudo la captación de Ca^{2+} basal, estimulada con K^+ y estimulada con K^+ en presencia de Cd^{2+} no difieren de la captación control asegura la integridad de la preparación de sinaptosomas, así como la de los mecanismos celulares involucrados en la captación de Ca^{2+} .

Sensibilidad farmacología de la captación de Ca^{2+} en terminales nervioso aislados de cerebro de ratas sometidas a tratamiento agudo con MP

Se prepararon fracciones puras de sinaptosomas de corteza frontal de ratas sometidas al tratamiento agudo con MP y sacrificadas en el periodo de postconvulsión y se determinó la sensibilidad de la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ , a los distintos bloqueantes de los CCVD (Tabla 2.2).

	<i>Control</i>	<i>Nitrendipina</i> (10 μM)	<i>Control</i>	<i>w-CgTx GVIA</i> (1 μM)
Promedio de la captación estimulada (% del control)	100	102,3 (n.s.)	100	89,5 (n.s.)
Error Standard	2,1	4,6	6,8	9,3
# determinaciones	5	6	5	6

Tabla 2.2 Efecto de nitrendipina y ω -CgTx GVIA sobre la captación estimulada en ratas sometidas al tratamiento agudo con MP y sacrificadas en postconvulsión. La captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl es expresada como porcentaje de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada control (sin droga) (n=3-6). El test *t*-Student fue utilizado para determinar la significancia de las diferencias entre los valores promedio de la captación con los bloqueantes y sus respectivos controles. (n.s.) diferencias no significativas.

Nitrendipina (10 μM), la dihidropiridina bloqueante de los CCVD de tipo *L*, no afecta la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ (Tabla 2.2), al igual que ocurre en los animales control. Similarmente, el bloqueante de los canales de tipo *N*, $\omega\text{-CgTx}$ GVIA, a una concentración de 1 μM no produce un efecto significativo sobre la captación de Ca^{2+} estimulada por K^+ . Por otro lado, ninguna de estos bloqueantes tiene efecto sobre la captación de Ca^{2+} basal (Figura 1.6).

En estos animales sometidos al tratamiento agudo con MP, se determinó la sensibilidad de la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ a la $\omega\text{-Aga IVA}$, toxina bloqueante de los CCVD de tipo *P*. La figura 2.2 muestra el gráfico concentración-respuesta para esta toxina en los animales tratados con MP junto con el efecto de la toxina en sinaptosomas de animales controles (extraídos de la figura 1.5. del capítulo 1).

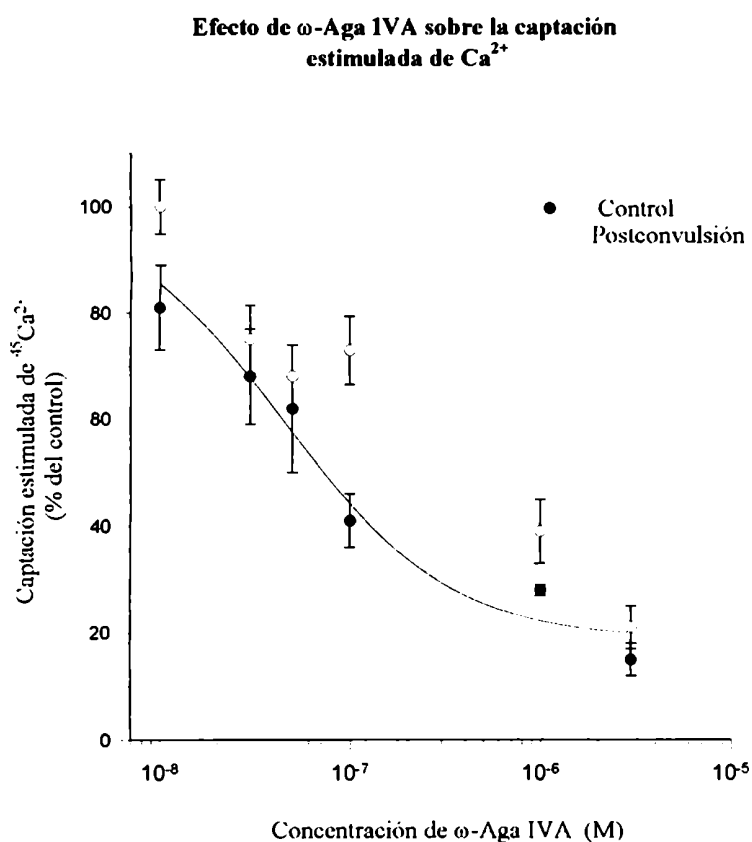


Figura 2.2 Curva concentración vs respuesta de $\omega\text{-Aga IVA}$ sobre la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl en sinaptosomas purificados de corteza frontal de animales sometidos al tratamiento agudo con MP (150 mg/kg). Los símbolos representan la media \pm ES de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada con 40 mM KCl expresada como porcentaje de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ control (sin toxina). La curva que ajusta a los datos corresponde a una ecuación sigmoidea con los parámetros estimados: IC_{50} = 105 nM; min = 25.3 ± 8 %; max = constante (100%); R^2 = 0.91 para el tratamiento agudo (línea quebrada) y IC_{50} = 45.6 nM; min = 18.7 ± 3.9 %; R^2 = 0.97 para el control (línea entera). Los datos y la curva control fueron extraídos de la Figura 1.5.

Al igual que en los sinaptosomas de corteza frontal de animales controles, ω -Aga IVA ejerce un potente efecto inhibitorio sobre la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ , sin afectar la captación de Ca^{2+} basal. El valor estimado de IC_{50} para ω -Aga IVA en las ratas sometidas al tratamiento con MP es 105,2 nM y la inhibición máxima estimada del $74,3 \pm 8,0$ %. Si bien el valor de IC_{50} es el doble del estimado en el control (48,2 nM), el valor de inhibición máxima no difiere significativamente del valor estimado control ($77,3 \pm 3,9$) (Figura 2.2).

Más aún, analizando por separado el efecto inhibitorio de cada una de las concentraciones de ω -Aga IVA testada en ambas condiciones (control y tratamiento con MP), solo 100 nM de la toxina producen un bloqueo estadísticamente distinto en los animales sometidos al tratamiento con MP (test *t*-Student, $P= 0,0018$). Por esta razón, se realizó además un experimento en el que los sinaptosomas de corteza frontal de animales inyectados con MP y con SF fueron preparados simultáneamente y se determinó el efecto de ω -Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+} estimulado por K^+ .

En este experimento, 100 nM ω -Aga IVA inhibió un 25 % la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ en ratas inyectadas con SF y un 54% ratas tratadas con MP. Así, la tendencia antes observada de que la inhibición de ω -Aga IVA resultaba menor en los animales sometidos al tratamiento con la droga convulsivante fue revertida en el experimento realizado en paralelo.

Por otro lado, con este experimento se descartan las posibles diferencias creadas por variaciones en la actividad de la toxina con el tiempo, diferencias en la preparación de la fracción de sinaptosomas purificados y otras variables experimentales. Los resultados nos permiten concluir que la sensibilidad a ω -Aga IVA de la captación de Ca^{2+} estimulada no es afectada por el tratamiento agudo con MP.

En el tratamiento agudo con MP de animales sacrificados en convulsión, se determinó el efecto de distintas concentraciones de ω -Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ . Similarmente a lo observado en los animales controles, en sinaptosomas preparados a partir de la corteza frontal de animales sacrificados en convulsión 10 nM de la toxina inhibe

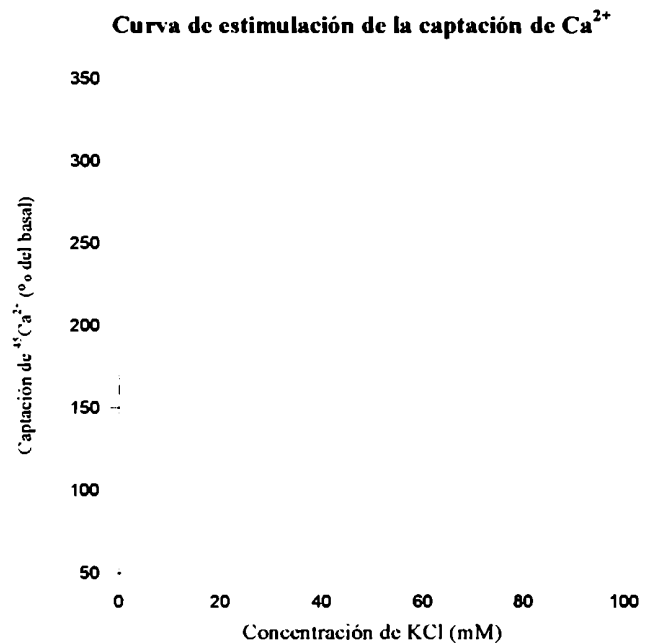
un $27 \pm 6 \%$, 100 nM un $56 \pm 5 \%$ y, 1 μM produce un bloqueo del $72,6 \pm 2 \%$ de la captación de Ca^{2+} estimulada.

Dependencia de la captación de Ca^{2+} con la concentración de KCl

Resultó interesante analizar si el tratamiento de animales con MP produce cambios en la activación de las canales en respuesta al estímulo despolarizantes. Si bien el tratamiento con MP no produce diferencias en la sensibilidad a los bloqueantes de la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ , otras características de los CCVD, como por ejemplo, la dependencia con el voltaje de la activación del canal y/o la inactivación del mismo podrían verse afectadas por el tratamiento con la droga convulsivante.

Se realizaron experimentos en los que se determinó la captación de Ca^{2+} en condiciones basal y estimulada con distintas concentraciones de KCl en terminales nerviosos aislados de la corteza frontal de animales sometidos a tratamiento agudo, estudiadas en postconvulsión, y de animales controles (Figura 2.3).

Figura 2.3 Dependencia con la concentración de KCl de la captación de Ca^{2+} en animales sometidos al tratamiento agudo con MP. Los símbolos representan la media \pm ES de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ expresada como porcentaje de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ basal (5 mM KCl), en sinaptosomas de corteza frontal de animales inyectados con MP (150 mg/kg), estudiados en postconvulsión, y de animales controles (inyectados con SF) (n=5-6). Las líneas representan la curva de la ecuación hiperbólica que ajusta a los datos en el tratamiento agudo (quebrada) y en el control (entera). Los parámetros estimados son: $B_{\text{max}} = 332,5 \pm 21,3 \%$, $K = 7,5 \pm 2$ mM, $R^2 = 0,93$ para el primero y $B_{\text{max}} = 279,2 \pm 13,9 \%$, $K = 5,4 \pm 1,3$ mM, $R^2 = 0,93$ para el control.



En estos experimentos se observa que, en ambas preparaciones, existe una fuerte dependencia de la captación de Ca^{2+} con la concentración extracelular de KCl. Los datos, expresados como porcentajes de la captación basal de Ca^{2+} (7583 ± 380 dpm/mg prot. en el tratamiento con MP y 7910 ± 843 dpm/mg prot. en el control), fueron ajustados a la ecuación de una hipérbola rectangular a partir de la cual se estimaron los parámetros B_{\max} (captación máxima) y K (punto de inflexión de la curva que corresponde a la concentración de K^+ que logra el 50% de la captación máxima). Los parámetros que aparecen en el pie de la figura 2.3 corresponden a los de las curvas allí graficadas.

Sin embargo, para una mejor estimación de la dependencia del influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD con la concentración de KCl es necesario hacer el ajuste considerando solamente la captación de Ca^{2+} inducida por despolarización. En otras palabras, fue necesario determinar el ajuste a la ecuación hiperbólica tomando sólo los valores de la captación de Ca^{2+} estimulada neta: la captación de Ca^{2+} estimulada por K^+ menos la captación de Ca^{2+} basal. En este caso, para el tratamiento agudo postconvulsivo los valores estimados para el B_{\max} y el K son de $261,7 \pm 46,4$ % y de $19,5 \pm 9,8$ mM, respectivamente; y de $196,6 \pm 32,7$ % y de $16 \pm 8,1$ mM para los controles.

Tratamiento crónico con MP: propiedades farmacológicas y dependencia con la concentración de KCl de la captación de Ca^{2+}

En animales inyectadas con 35 mg/kg de MP durante tres días consecutivos y sacrificados 24 hs después de la última inyección se efectuaron estudios similares a los descriptos anteriormente en los animales sometidos al tratamiento agudo. Se determinó la sensibilidad a la toxina ω -Aga IVA de la captación de Ca^{2+} en sinaptosomas de corteza frontal estimulados con K^+ (Figura 2.4).

Efecto de ω -Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en el tratamiento crónico

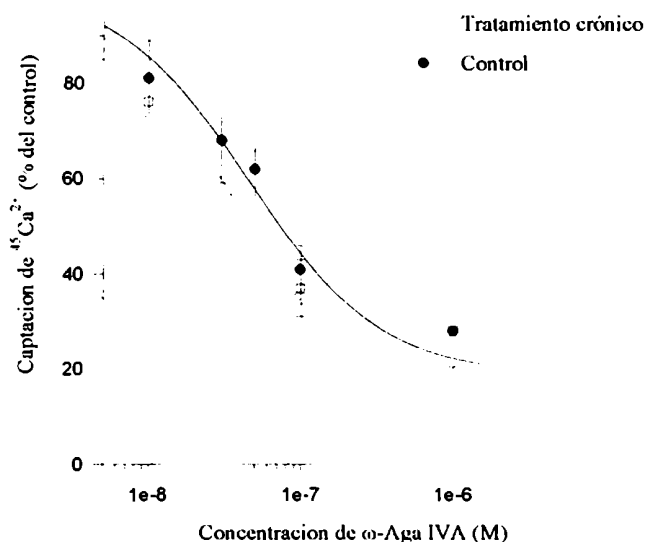


Figura 2.4 Curva concentración vs repuesta de ω -Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas purificados de corteza frontal de animales sometidos al tratamiento crónico con MP (tres dosis, 35 mg/kg.). Los símbolos representan la media \pm ES de la captación de Ca^{2+} estimulada expresada como porcentajes del control (sin toxina) (n=4-9). Las curvas que ajustan a los datos corresponden a la ecuación sigmoidea y los parámetros estimados son IC_{50} = 37.9 nM; min= 8.9 ± 9.9 %; max= constante (100%); R^2 = 0,97 para el tratamiento crónico (línea quebrada) y IC_{50} = 45.6 nM; min= 18.7 ± 3.6 %; max= constante (100%) R^2 = 0,98 para el control (línea entera). Los datos y la curva control fueron extraídos de la Figura 1.5.

La toxina ω -Aga IVA inhibe fuertemente la captación de Ca^{2+} estimulada con un valor estimado de IC_{50} de 37,9 nM y ejerce una inhibición máxima en esta preparación del $91,1 \pm 9,9$ %. Ni los efectos inhibitorios de las distintas concentraciones de la toxina ni los parámetros de la ecuación que ajusta a los datos son significativamente distinto de lo observado en los animales controles.

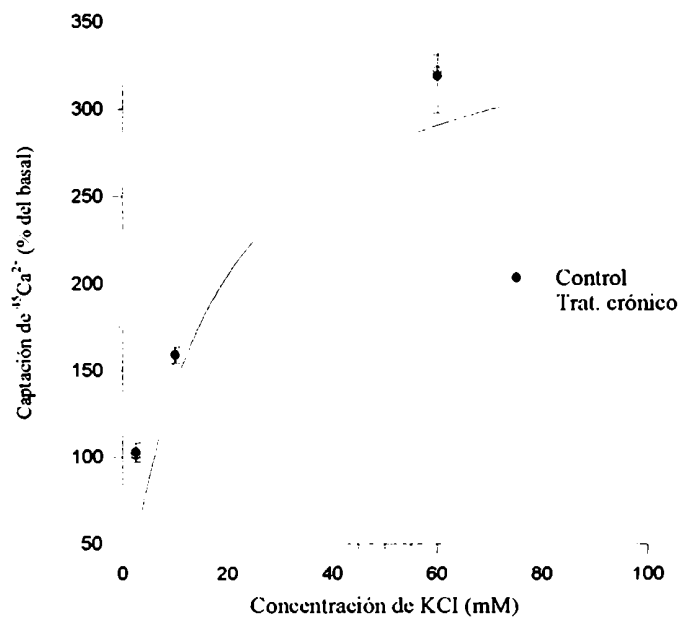
Por otro lado, ambos bloqueantes, ω -CgTx GVIA (1 μM) y nitrendipina (10 μM) carecen de efecto inhibitorios sobre la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ en estos animales (% de inhibición, $12 \pm 2\%$ y 9 ± 1 %, respectivamente), al igual que lo observado en los animales sometidos al tratamiento agudo con MP (Tabla 2.2) y en los controles (Figura 1.6).

La figura 2.5 muestra la dependencia de la captación de Ca^{2+} con la concentración de KCl en animales tratados crónicamente con MP y en animales inyectados con SF según el mismo protocolo. La captación basal de Ca^{2+} en ambas condiciones es similar (12780 ± 509

dpm/mg prot. en el tratamiento crónico y 12336 ± 1331 dpm/mg prot. en el control) por lo que los datos se expresaron como porcentajes de la captación basal de Ca^{2+} en cada uno de las condiciones.

Figura 2.5 Dependencia con la concentración de KCl de la captación de Ca^{2+} en animales tratados crónicamente con MP y en animales controles. Los símbolos representan la media \pm ES de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ expresada como porcentaje de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ basal en sinaptosomas de animales sometidos al tratamiento crónico con MP (35 mg/kg) y animales controles (inyectados con SF) (n=4-6). La línea quebrada es la curva de la ecuación hiperbólica que ajusta a los datos en el tratamiento crónico y la línea entera, en el control. Los parámetros estimados son: $B_{\text{max}} = 373 \pm 69,9 \%$; $K = 13,7 \pm 8,6 \text{ mM}$; $R^2 = 0,78$ para el primero y $B_{\text{max}} = 367,6 \pm 63 \%$; $K = 15,9 \pm 8,7 \text{ mM}$; $R^2 = 0,83$ para el control.

Curva de estimulación de la captación de Ca^{2+} en el tratamiento crónico con MP



Así podemos afirmar que la sensibilidad farmacológica y la dependencia con el voltaje de la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de corteza frontal no se modifica con el tratamiento crónico con MP de los animales.

DISCUSION

Numerosos trabajos muestran los efectos moduladores de los neurotransmisores y neuromoduladores sobre la transmisión sináptica y, por otro lado, varios otros demuestran efectos moduladores sobre la actividad de los CCVD. Sin embargo, pocos trabajos describen modulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} en los terminales sinápticos. Además, existen pocas evidencias de que estos efectos moduladores puede ser producido por neurotransmisores liberados endógenamente. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar la posible acción moduladora de estos agentes liberados endógenamente durante la convulsión sobre la actividad de los CCVD de los terminales nerviosos.

La actividad convulsiva inducida por drogas resulta una interesante manera de lograr una masiva actividad neuronal que, como ya se discutió en la Introducción de este capítulo, es una propiedad inherente a las neuronas. Los animales sometidos al tratamiento agudo con una alta dosis de la droga convulsivante MP experimentan una convulsión con característicos movimientos tónico-clónicos que dura entre cinco y siete minutos. Como consecuencia del efecto de esta droga sobre el sistema nervioso central, se produce una hiperactividad neuronal acompañada de una masiva liberación de neurotransmisores y neuromoduladores. Dada las características motoras de las convulsiones podemos suponer que la corteza frontal de las ratas, región que cumple principalmente funciones motoras, está involucrada.

Los experimentos preliminares realizados en fracciones crudas de sinaptosomas de corteza frontal de los animales sometidos al tratamiento agudo mostraron que el influjo de Ca^{2+} basal y estimulado por K^+ , en animales sacrificados durante la convulsión y en el período depresivo de la postconvulsión, es similar al influjo de Ca^{2+} determinado en las preparaciones de animales controles (inyectados con SF). Así, podemos asegurar la integridad morfológica de los terminales sinápticos, indispensable para una buena determinación de la captación, y el buen estado de los mecanismo fisiológicos que participan en el influjo de Ca^{2+} y la despolarización del terminal inducida por alto K^+ .

La sensibilidad de los mecanismos voltaje-dependiente del influjo de Ca^{2+} al terminal por los distintos bloqueantes de los CCVD no es modificada por el tratamiento agudo con MP. Altas concentraciones del bloqueante de los CCVD de tipo *L*, nitrendipina, y de la toxina ω -CgTx GVIA, antagonista irreversible de los CCVD de tipo *N*, son inefectivos inhibidores del influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente a los terminales de corteza frontal de los animales sacrificados durante la convulsión y en postconvulsión, al igual que en los animales controles.

La toxina ω -Aga IVA, bloqueante de los CCVD de tipo *P/Q*, inhibe fuertemente y de manera dependiente de la concentración la entrada de Ca^{2+} a los terminales de sinápticos. Si bien en las preparaciones de los animales sacrificados en postconvulsión, el valor de IC_{50} estimado a partir de la ecuación sigmoidea (105,2 nM) es el doble del observado en las preparaciones controles (48,2 nM), esta diferencia no resulta claramente significativa.

En los terminales nerviosos aislados de los animales en postconvulsión, solo la inhibición que ejerce 100 nM ω -Aga IVA sobre la captación de Ca^{2+} es significativamente menor a la observada en los animales controles. Un experimento pareado en el cual ambas condiciones (control y postconvulsión) fueron analizadas conjuntamente, descarta esta tendencia observada inicialmente.

Cuando se determinó la sensibilidad al voltaje del mecanismo de entrada de Ca^{2+} a los terminales nerviosos aislados no se observaron diferencias significativas entre la preparación control y la de los animales sometidos al tratamiento agudo con MP y estudiados en postconvulsión. La captación voltaje-dependiente de Ca^{2+} alcanza un máximo estimado de un $261,7 \pm 46,4$ % de la captación basal en postconvulsión y un $196,6 \pm 32,7$ % de la captación basal en los controles; mientras que la concentración de KCl estimada que induce el 50% de la captación máxima es $19,5 \pm 9,8$ mM para el tratamiento agudo postconvulsivo y $16 \pm 8,1$ mM para el tratamiento control.

Estos estudios muestran que, en el tratamiento agudo con MP, no se observa ningún cambio significativo en las propiedades farmacológicas ni en sensibilidad al voltaje del mecanismo de entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente a los terminales nerviosos.

Con el objeto de determinar si la modulación de la actividad de los CCVD ejercida por la hiperactividad neuronal es quizás una consecuencia evidenciada a largo plazo, se llevaron a cabo los experimentos en los que los animales fueron sometidos durante tres días a una baja dosis de la droga convulsivante. En el tratamiento crónico, los animales tuvieron un comportamiento que se resumen en la sección Materiales y Métodos de este capítulo. Las convulsiones con expresiones motoras tónico-clónicas fueron comunes, aunque de menor duración y con tendencia a desaparecer a medida que progresaban los días del tratamiento.

Las características farmacológicas de los CCVD involucrados en el influjo de Ca^{2+} a los terminales sinápticos en los animales sometidos al tratamiento crónico es similar a las observadas en los animales controles. Nuevamente, la nitrendipina y la ω -CgTx GVIA no tienen efecto sobre la entrada de Ca^{2+} basal ni voltaje-dependiente.

Al igual que en sinaptosomas de corteza frontal de los animales controles, el péptido bloqueante de los CCVD de tipo P/Q , ω -Aga IVA, inhibe potentemente la entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente ($\text{IC}_{50} = 37,9 \text{ nM}$), sin afectar los mecanismos basales en las preparaciones del tratamiento crónico. Este resultado sugiere que el tratamiento crónico con MP no afecta la sensibilidad a los bloqueantes de la captación de Ca^{2+} voltaje-dependiente de los terminales nerviosos de la corteza cerebral.

La dependencia con el voltaje de la entrada de Ca^{2+} a los terminales sináptico en los animales tratados crónicamente con MP fue comparada con la de preparaciones de animales inyectados con SF según el mismo protocolo. No se observaron diferencias significativas en la captación de Ca^{2+} de los terminales nerviosos aislados a partir del SNC de los animales en tratamiento control respecto de los animales en tratamiento crónico con MP.

Por otro lado, si bien los valores estimado para la captación máxima (B_{max}) y el punto de inflexión de la curva (K) fueron levemente mayores en el tratamiento crónicos y su control que los valores estimados para el tratamiento agudos con MP y su respectivo control, estas diferencias no fueron significativas y probablemente son consecuencia del no tan buen ajuste de los datos, en el primer caso, a la ecuación hiperbólica.

La ausencia de cambios en las propiedades de los CCVD que ha sido demostrada en este trabajo, ya sea minutos después de una fuerte convulsión o luego de varios días de

convulsiones inducidas por MP, pueden reflejar la ausencia de acciones moduladoras sobre la actividad de los CCVD involucrados en el influjo de Ca^{2+} a los terminales. Sin embargo, estos resultados no descartan posibles alteraciones o cambios en las características de los CCVD que no sean puestas en evidencia por esta técnica.

Ha sido demostrado que la actividad de los CCVD es modulada por diversos factores a través de la acción de las proteínas G, fosforilaciones y defosforilaciones, y cambios en la tasa de incorporación y degradación de los canales en la membrana plasmática (ver *Introducción General*). Debe ser considerada la posibilidad de que una modulación en la actividad de los CCVD ejercida rápidamente, es decir en 5-15 minutos, como la esperada en los animales sometidos al tratamiento agudo con MP disminuya o desaparezca durante el tiempo que lleva la preparación de la fracción pura de los terminales sinápticos. Esta posibilidad no puede ser considerada en el caso del estudio del efecto del tratamiento crónico, pero sí tenida en cuenta en el tratamiento agudo.

Por otro lado, este trabajo ha sido desarrollado en terminales sinápticos de corteza frontal y no descarta posibles cambios en la actividad de los CCVD en terminales de otras áreas del SNC. Girardi y colaboradores (1994) y otros trabajos ya mencionados en la Introducción de este capítulo han mostrado que las alteraciones inducidas por las convulsiones con MP son específicas para las distintas áreas del SNC.

En resumen, en el tratamiento agudo con altas dosis de MP y en tratamiento repetido con bajas dosis de la droga convulsivante, se mantienen inalteradas las propiedades farmacológicas y la dependencia con el voltaje del influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD a los terminales sinápticos.

Capítulo 3

Acción del Péptido Atrial Natriurético sobre el influjo de Ca^{2+} a través de canales voltaje-dependientes en terminales sinápticos de hipotálamo.

INTRODUCCION

El Péptido Atrial Natriurético (ANP)

El descubrimiento del péptido atrial natriurético (ANP) fue la culminación de muchos años de estudios morfológicos y bioquímicos. Hace menos de dos décadas, DeBold y colaboradores demostraron que el extracto enriquecido en gránulos de los miocitos de atrio cardíaco de la rata tiene potentes propiedades natriuréticas (DeBold, 1979; DeBold et al., 1981). Este descubrimiento llevó a postular la existencia de un factor natriurético dentro de los gránulos del atrio que fue aislado por diversos grupos a partir de distintas especies (Oikawa et al., 1984; Oikawa et al., 1985; Seidman et al., 1984).

En todas las especies de mamíferos examinadas, se ha encontrado un único gen para ANP con significativa homología en la organización y secuencia de nucleótidos. El gen, que contiene tres exones y dos intrones, codifica para un preproANP de 152 aminoácidos. Rápidamente, el preproANP es convertido en un péptido de 126 aminoácidos, proANP, que es la forma predominante que se encuentra almacenada en los gránulos atriales. En respuesta a señales apropiadas, proANP (aa 1-126) es liberado y convertido en ANP (aa 99-126), la forma biológicamente activa de esta hormona.

Tanto la secuencia de aminoácidos como la estructura terciaria del ANP encontrado en todas las especies de mamíferos conservan una altísima homología. El anillo intracatenario de 17 miembros formado por un puente disulfuro entre dos residuos cisteína (Cys 105 y Cys 121) es imprescindible para la actividad biológica de la hormona (Figura 3.1).

Por otro lado, esta estructura es mantenida en todos miembros de la familia de péptidos natriuréticos. Existe un significativo nivel de homología en la estructura y secuencia entre los péptidos de tipo A, de tipo B (por ejemplo, brain natriuretic peptide, BNP) y de tipo C (CNP) de la familia de péptidos natriuréticos (Figura 3.1). Las semejanzas se extienden a la secuencia de nucleótidos en el gen, hecho que permitió la rápida identificación de los péptidos emparentados utilizando como sonda ANPcDNA. En general, todos estos péptidos producen similares efectos fisiológicos: natriuresis y relajación muscular. En particular, BNP, al igual que ANP, tiene aparentes acciones como antagonista fisiológico de la

vasopresina, las endotelinas y el sistema renina/angiotensina/aldosterona (Brenner et al., 1990; Ruskoaho H., 1992). El papel del CNP *in vivo* esta aún menos definido; si bien este péptido podría no ser un importante modulador de la natriuresis y la diuresis (Stingo et al., 1992; Clavell et al., 1993), es expresado por las células endoteliales y tiene efectos vasodilatadores (Sudoh et al., 1990; Suga et al., 1992).

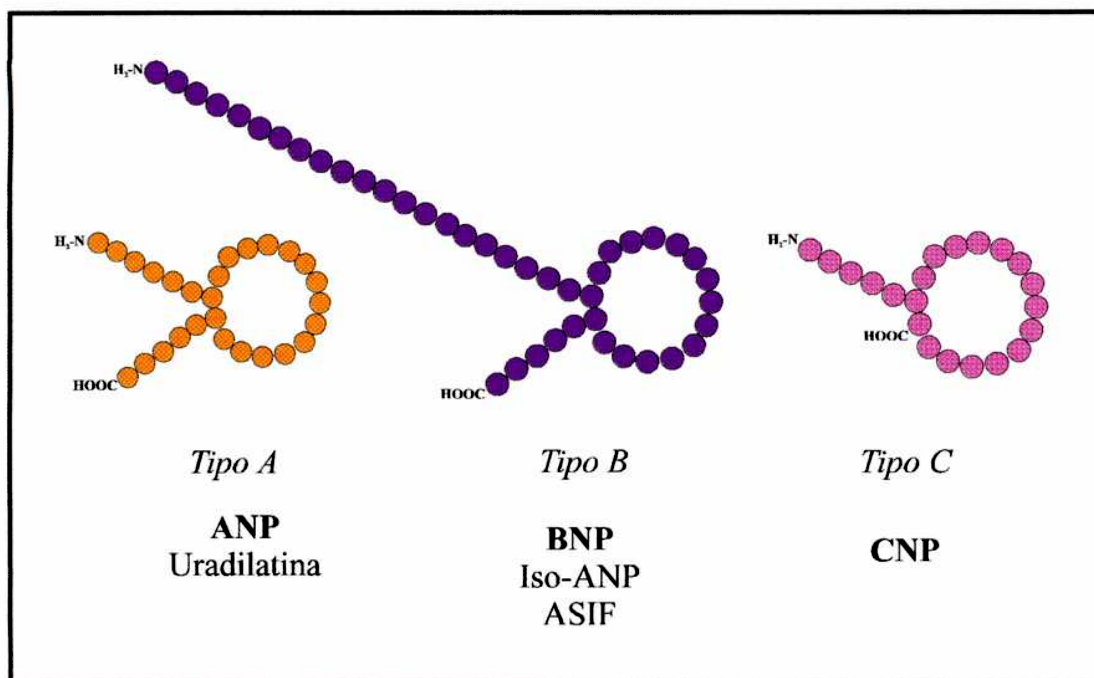


Figura 3.1. Miembros de la familia de péptidos natriuréticos. La homología estructural de los péptidos es mostrada esquemáticamente. ANP, péptido atrial natriurético tipo A. BNP, péptido atrial natriurético tipo B. CNP, péptido atrial natriurético tipo C. Esquema extraído de Rosenzweig y Seidman, 1991.

Una variedad de estímulos modulan los niveles de ANP. A nivel postraduccional, el procesamiento del preproANP podría ser un punto crítico en la regulación de los niveles generales ANP. La regulación directa a nivel transcripcional ha sido demostrada *in vivo*. Los glucocorticoides y la hormona tiroideas aumentan los niveles del mRNA para ANP

(Gardner et al., 1986a; Day et al., 1987; Ladenson et al., 1988), mientras que la privación de agua o de sodio provoca una disminución reversible en los niveles del RNA mensajero (Mukoyama et al., 1990; Takayanagi et al., 1985).

Aunque la expresión de ANP se produce principalmente en los miocitos atriales, también fue observada en pulmón (Gardner *et al.* 1986b), adenohipófisis (Gardner 1986b), hipotálamo (Gardner 1986b), cerebro anterior (Saper *et al.* 1985), glándulas suprarrenales (Ong *et al.* 1987) y riñón (Sakamoto *et al.* 1985).

En particular, en el hipotálamo, se detectó inmunorreactividad al ANP en los núcleos paraventriculares y la región anteroventral del tercer ventrículo (AV3V), zonas relacionadas con la regulación de la volemia y la presión arterial (Gundlach y Knobe, 1992). Las fibras de estas neuronas proyectan caudoventralmente hacia la eminencia media y la neurohipófisis. Shibasaki y colaboradores (1986) demostraron la presencia de ANP en neuronas hipotalámicas y en fibras de la zona externa de la eminencia media. Este grupo, utilizando la técnica de radioinmunoensayo, reportó la liberación de ANP de fragmentos de hipotálamo por mecanismos dependientes de Ca^{2+} .

Receptores para ANP

Experimentos recientes, demostraron la existencia de varios tipos de sitios receptores para la familia de péptidos natriuréticos en la mayoría de los tejidos (Kosecki et al., 1986; Leitman et al., 1986; Meloche *et al.*, 1986). Se han descrito, al menos, tres tipos de receptores: de tipo A, tipo B y tipo C (NPR-A, NPR-B y NPR-C, respectivamente). Todos ellos se encuentran distribuidos en diversos tejidos como glándulas suprarrenales, riñón, la vasculatura, el sistema nervioso central, hígado y músculo liso del colon (Bianchi et al., 1985; Quirion et al., 1986).

El NPR-A y NPR-B poseen una alta homología en la secuencia de aminoácidos y en la estructura. Pertenecen al grupo de receptores de membrana con actividad de guanilato-ciclasa junto con otros dos tipos receptores para enterotoxina-estables-a-temperaturas (Sta-R y RetGC) (Garbers y Lowe, 1994). Aparentemente, NPR-A y NPR-B contienen un único

dominio transmembrana que separa el extremo aminoterminal, dominio extracelular que representa el sitio de unión de los péptidos natriuréticos, de la región intracelular que contiene un dominio con actividad de guanilato-ciclasa y un dominio homólogo a las proteínas quinasas (Garbers, D.L. 1992) (Figura 3.2). Aunque el número de monómeros que conforman los receptores nativos es un punto aún en discusión, se reconoce que NPR-A y NPR-B aparecen agregados como homodímeros unidos por puentes disulfuro (Garbers y Lowe, 1994).

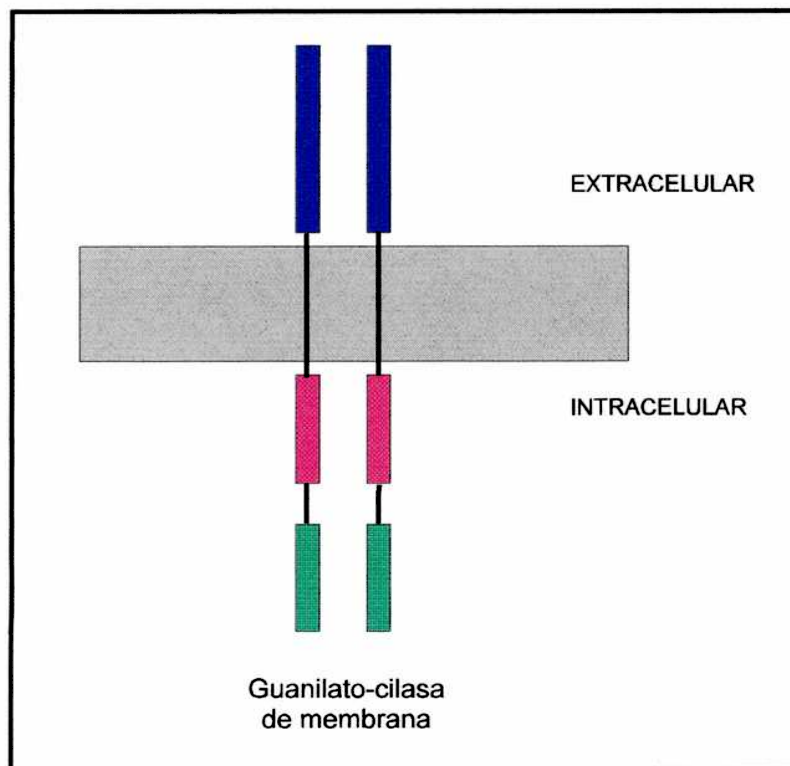


Figura 3.2. Receptores de membrana con actividad guanilato-ciclasa.

Estructura general de los receptores guanilato-ciclasas de membrana de vertebrados . Los dominios putativos con actividad guanilato-ciclasa están coloreados en verde y en rosa, los dominios con homología a las proteínas quinasas. Extraído de Garbers y Lowe, 1994.

La función del dominio homólogo a las proteínas quinasas no es aún bien comprendida, pero se sabe que ATP es requerido para la activación del dominio con actividad guanilato-

ciclase en respuesta a la unión de los péptidos natriuréticos (Kurose et al., 1987; Koller et al., 1992) y ha sido sugerido que el nucleótido de adenosina se une a este dominio (Chinkers y Garbers, 1989). La conversión de ATP a ADP parece nos ser necesaria, dado que análogos no hidrolizables del nucleótido sustituyen al ATP (Chang et al., 1990; Chinkers et al., 1991).

El NPR-A ha sido purificado a aparente homogeneidad por Wong y colaboradores (1995). En este trabajo se demostró que NPR-A es capaz de transducir la unión de ANP en la síntesis de cGMP (4,3 μ mol formados de cGMP /min/mg proteína; 5,8 nmol sitios de unión a 125 I-ANP/mg proteína) en ausencia de otras proteínas. NPR-A contiene un único sitio de unión de alta afinidad para ANP (K_d = 60 pM) y un EC_{50} para ATP de 0,3 mM.

En base a la afinidad relativa de los péptidos natriuréticos por los dos tipos de receptores, NPR-A ha sido propuesto como el receptor para ANP y BNP; mientras que NPR-B es considerado el receptor específico para el péptido natriurético tipo C, CNP (Koller et al., 1991; Bennett et al., 1991).

El descubrimiento de la existencia de guanilato-ciclasas actuando como receptores produciendo cGMP en respuesta a la interacción con sus ligandos, constituyó un novedoso mecanismo para la transducción de señales a través de segundos mensajeros. Cabe mencionar que los receptores con actividad guanilato-ciclase actualmente han sido divididos en dos grupos: los receptores de membrana que reconocen diferentes péptidos, NPR-A, NPR-B, Sta-R y RetGC; y los receptores citoplasmáticos que reconocen al óxido nítrico (NO) y otras drogas, como ser los nitrovasodilatadores (Garbers D.L., 1992).

Muchos de los efectos fisiológicos de ANP conocidos hoy en día, como ser la vasodilatación (Waldman y Murad, 1987; Lincoln y Cornwell, 1993), el aumento de la filtración glomerular y la inhibición de la reabsorción de Na^+ por el túbulo renal (Huang et al., 1986), parecen estar mediados por NPR-A y un aumento en la concentración intracelular de cGMP. En experimentos en los que se eliminó el gen para NPR-A utilizando la técnica de *knock-out* se demostró que, independientemente de la dieta salina, los ratones presentaban una presión sanguínea elevada de forma crónica (Lopez et al., 1995).

El tercer tipo de receptor para la familia de péptidos natriuréticos, NPR-C, también llamado de *clearance* o ANP-R₂, no posee actividad guanilato-ciclasa (Fuller et al., 1988). NPR-C es una proteína asociada a la membrana plasmática que existe como un homodímero, con un dominio extracelular homólogo a NPR-A y NPR-B, y un dominio citoplasmático de 37 aminoácidos (Itakura et al., 1994; Stults et al., 1994). Este receptor posee una especificidad para sus ligando más amplia ya que une los tres tipos de péptidos natriuréticos. Además, NPR-C une análogos peptídicos de ANP, más pequeños, que no activan la guanilato-ciclasa y, por esta razón, son empleados como agonistas específicos de NPR-C (Maack et al., 1987).

El papel del NPR-C ha sido originalmente considerado el de eliminación de la circulación del péptido, “*clearance*”, a través de su internalización y posterior degradación (Maack et al., 1987; Nussenzveig et al., 1990). La falta de evidencias concretas de respuestas celulares desencadenadas por la unión de los péptidos natriuréticos a NPR-C, sumado a la gran abundancia relativa de este tipo de receptor, sugirieron estas primeras conclusiones. Recientemente, Anand-Srivastava y colaboradores (1996) han demostrado que el dominio citoplasmático de NPR-C inhibe la enzima adenilato-ciclasa presente en membranas de corazón. Tanto ANP como los análogos más pequeños de ANP, no efectivos para la unión y activación de los receptores con actividad guanilato-ciclasa, resultaron igualmente potentes en la inhibición de la actividad adenilato-ciclasa ($K_i \approx 1\text{nM}$). Este mecanismo es dependiente de GTP y bloqueado por la toxinas de pertusis, sugiriendo la participación de una proteína G como mediadora de los efectos de NPR-C sobre la adenilato-ciclasa.

Efectos fisiológicos del Péptido Atrial Natriurético

Acción de ANP sobre los órganos periféricos

ANP es una hormona peptídica (28 aa) secretada principalmente por los miocitos auriculares en respuesta al estiramiento de la pared atrial, como ocurre por ejemplo durante un aumento del volumen intravascular (DeBold, 1979; DeBold et al., 1981).

Las acciones combinadas del ANP sobre la vasculatura, riñones y las glándulas suprarrenales, tienen como objetivo disminuir la presión sanguínea y el volumen intravascular (Ballermann y Brenner, 1985; 1986). La reducción de la presión sanguínea es lograda como consecuencia de una disminución de la resistencia vascular periférica (mediada por la relajación directa del músculo liso vascular), y la reducción de la descarga sistólica y el volumen intravascular.

En el riñón, el ANP actúa sobre receptores específicos en la microvasculatura renal y en el epitelio tubular, induciendo hiperfiltración por el glomérulo, inhibiendo la reabsorción de Na^+ y suprimiendo de la liberación de renina. Estos efectos producen como resultado un aumento de la natriuresis y la diuresis y, consecuentemente, una disminución de la presión arterial.

Mediante la inhibición de la síntesis de aldosterona, ANP impide el aumento de la reabsorción de Na^+ que ejerce la hormona liberada por la corteza suprarrenal. Así la reducción de la presión arterial y del volumen intravascular es ejercida directamente a través de receptores para ANP presentes en las células glomerulosas de la corteza suprarrenal e indirectamente a través de la inhibición de la liberación de renina por el aparato yuxtglomerular (Maack et al., 1984).

Los efectos de ANP sobre el músculo liso también han sido ampliamente estudiados. ANP impide la contracción del músculo liso inducida por numerosos agonistas y, como el mecanismo de contracción de las células musculares lisas involucra un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , ha sido propuesto que ANP interfiere con este proceso (Brenner et al., 1990). El incremento de Ca^{2+} inducido por agonistas también es inhibido por ANP en células de músculo liso vascular (Hassid A., 1986; Meyer-Lehnert et al., 1988), células mesangiales (Appel et al., 1987; Hassid A., 1987) y células de la glomerulosa suprarrenal (Chartier y Schiffrin, 1987).

El mecanismo por el cual ANP impide el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} podría implicar la regulación de la liberación o la recaptación del Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, o la modulación de la entrada o salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática.

Como se mencionó anteriormente, muchos de los efectos fisiológicos de esta hormona endócrina están mediados por un aumento de la concentración del segundo mensajero cGMP que es independiente de la actividad de las enzimas guanilato-ciclasas solubles (Hamet et al. 1984, Murad 1986, Murad et al. 1987). El cGMP, a su vez, activa proteínas quinasas dependientes de cGMP (PKG), produciéndose así, la fosforilación de una gran cantidad de proteínas intracelulares.

Numerosos trabajos analizaron la acción del cGMP sobre los mecanismos de movilización de Ca^{2+} en las células musculares lisas con resultados contradictorios (Capponi et al., 1986; Garcia et al., 1984; Meisheri et al., 1986; Takai et al., 1982).

Recientemente, dos trabajos muestran que la activación de la PKG produce un incremento de la corrientes de K^+ sensibles a caribdotoxina en músculo liso de traquea y en una línea celular de ovario de hamster (Zhou et al., 1996) y en neuronas de hipocampo (Furukawa et al., 1996). Ambos trabajos señalan a una fosfatasa como sustrato de la PKG, la cual a su vez produce la desfosforilación de los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} que dejan a esta proteína en un estado más activo. Ha sido propuesto que, como consecuencia de la activación de los canales de K^+ , se reduce la despolarización y la consiguiente activación de los CCVD y la entrada de Ca^{2+} .

Por otro lado, debe mencionarse que ANP también inhibe la actividad de la adenilato-ciclasa en varios sistemas, generando la posibilidad de que algunos efectos fisiológicos de ANP sean provocados por un bloqueo de producción de cAMP (Brenner, et al., 1990).

ANP en el sistema nervioso central

Además de los conocidos efectos de ANP sobre los órganos periféricos, diversos estudios sugieren que la liberación hipotalámica de ANP cumple un importante papel en la regulación de la natruiresis por parte del SNC. Las neuronas de los núcleos paraventriculares y de la región anteroventral del tercer ventrículo (AV3V) del hipotálamo sintetizan y liberan ANP. Bealer y colaboradores, en 1983, mostraron que la destrucción de la región AV3V inhibe la excreción de Na^+ , mientras que su estimulación la aumenta. Por otro lado, se observó que

ANP inhibe la secreción de vasopresina, ante dos estímulos fuertes para su liberación, como son la hemorragia y la privación prolongada de agua (Samson, K. 1985).

Por último, ha sido reportado que, en hipotálamo y médula suprarrenal de rata, ANP modula la transmisión noradrenérgica en forma antagónica a la acción que ejerce la angiotensina sobre este sistema (Vatta et al., 1993, 1993b). Esta hormona afecta los mecanismos de recaptación de noradrenalina (NA) (Vatta et al., 1994; 1995) y la liberación de NA dependiente de Ca^{2+} (Vatta et al., 1992, 1994b).

El papel del hipotálamo en el control de la volemia

El hipotálamo, junto con otras estructuras del sistema límbico, recibe información directa del medio interno y actúa directamente sobre éste. En esta región del sistema nervioso central se encuentra un gran número de circuitos neuronales que regulan funciones vitales, como ser: la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, la osmolaridad de la sangre y la ingesta de agua y comida.

Anatómicamente, el hipotálamo está delimitado en su extremo posterior por los cuerpos mamilares y por el quiasma óptico en el extremo anterior. Puede dividirse en una región periventricular que está inmediatamente alrededor del tercer ventrículo, una región lateral y una región media. Estas últimas se encuentran separadas por los haces descendientes del fornix provenientes del hipocampo.

Una de las funciones principales del hipotálamo es controlar la secreción de la glándula hipófisis, a la cual está unida por medio del *infundibulum*. El hipotálamo controla el sistema endócrino directamente mediante la secreción de productos neuroendócrinos a la circulación general en la hipófisis posterior (neurohipófisis). Indirectamente, el hipotálamo regula el sistema neuroendócrino mediante la secreción de hormonas reguladoras a un sistema porta local (en la eminencia media), que lleva la sangre a los capilares de la hipófisis anterior (adenohipófisis). Estas hormonas reguladoras hipotalámicas, que pueden ser excitatorias o inhibitorias, controlan la síntesis y la liberación de las hormonas de la adenohipófisis a la circulación general, razón por la cual, se las conoce también como factores liberadores.

Las neuronas *magnocelulares* hipotalámicas están ubicadas en los núcleos paraventricular y supraóptico, y proyectan sus axones a través del tracto hipotálamohipofiseal hacia la eminencia media y la neurohipófisis (Palkovits et al., 1981). Algunas de estas células sintetizan las hormonas *oxitocina* y *vasopresina* (hormona antidiurética, ADH) que son liberadas, desde los terminales nerviosos neurohipofisarios, directamente a la circulación general. Las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular, que regulan la hipófisis anterior y la actividad del sistema autónomo, expresan también ANP y ha sido sugerido que ANP funciona como un neuromodulador pudiendo suprimir la liberación de vasopresina (Samson, 1985; Standaert et al., 1987).

Por otro lado, otros factores humorales también pueden afectar la liberación de vasopresina, como por ejemplo, la angiotensina II, hormona secretada en situación de stress hídrico, que aumenta la concentración de vasopresina en sangre (Silverman y Zimmeman, 1983).

Las células involucradas en la liberación de vasopresina, así como también otras células hipotalámicas ubicadas en estructuras en las que la barrera hematoencefálica es débil, responden directamente a estímulos osmóticos o a cambios en la concentración sanguínea del ion Na^+ .

Por otro lado, ha sido demostrado que estas células pueden también ser influenciadas por aferencias neuronales, como ocurre ante un decremento del volumen sanguíneo que provoca un aumento de la liberación de vasopresina (Sundsten y Sawyer, 1961). En el lado de baja presión de la circulación (aurícula derecha y paredes de grandes venas) se encuentran los sensores de volumen vascular que, ante una disminución de la volemia, envían la información a la región del hipotálamo donde se encuentran las neuronas que producen vasopresina.

Además de los mecanismos recién mencionados, otros mecanismos hipotalámicos participan en la regulación de la volemia. ANP es un potente regulador del balance electrolítico corporal y ha sido bien demostrada la síntesis y liberación de este péptido en el hipotálamo (Saper et al., 1985; Gardner, 1986b; Shibasaki et al., 1986). Si bien en un principio gran cantidad de estudios mostraban la importante función que cumple el SNC en

la regulación de la volemia y la excreción de sales, con el descubrimiento de la liberación cardiaca de ANP, los mecanismos centrales fueron tenidos menos en cuenta. Recientemente, numerosos grupos de investigación han vuelto a poner su interés en el rol del SNC en este proceso.

Ha sido demostrado que la destrucción de las neuronas que contienen ANP, ubicadas en la región AV3V del hipotálamo u otras lesiones en la eminencia media y neurohipófisis, sitios hacia donde proyectan estas neuronas, provocan una disminución inicial en los niveles plasmáticos de ANP (Antunes-Rodrigues, 1991). Más aún, cada una de estas lesiones suprime significativamente el aumento de ANP que es inducido por expansión del volumen sanguíneo.

Dado que el común denominador en estas lesiones es la eliminación del sistema de ANP neuronal, este estudio sugiere que el ANP cerebral juega un papel importante en los mecanismos que median la liberación de ANP a la circulación general. Resulta posible que una expansión del volumen sanguíneo, detectada por los barorreceptores de la aurícula derecha y los arcos aórticos, cause aferencias al sistema de ANP hipotalámico e induzca la liberación del péptido desde la eminencia media y la neurohipófisis.

OBJETIVO

El objeto de este trabajo es determinar los efectos moduladores del ANP sobre la el flujo de Ca^{2+} a través de los CCVD en los terminales sinápticos de hipotálamo de rata. Estos estudios permitirán conocer posibles efectos fisiológicos del ANP, a través de los cuales, el péptido liberado por las neuronas hipotalámicas podría participar en la regulación de la neurotransmisión y en el control del balance hídrico corporal.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la fracción cruda de sinaptosomas y Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en sinaptosomas

Para este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar cuyo peso se encontraba entre 250-300g. Todos los animales fueron mantenidos a temperatura y humedad constantes, bajo un régimen de 12 horas de luz-oscuridad, con libre acceso a alimento balanceado y agua. Las ratas fueron decapitadas entre las 12 AM y las 2 PM y los cerebros fueron removidos rápidamente. Los hipotálamos fueron disecados como fue descrito por Iversen, L.L. (1971).

La preparación de la fracción cruda de sinaptosomas de hipotálamo y la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fueron realizadas de la manera descrita en el Capítulo 1. Las soluciones empleadas son las mismas descritas en el capítulo 1.

Cálculos y estadística

Han sido realizados de manera similar a lo descrito en el capítulo 1 y 2.

Materiales

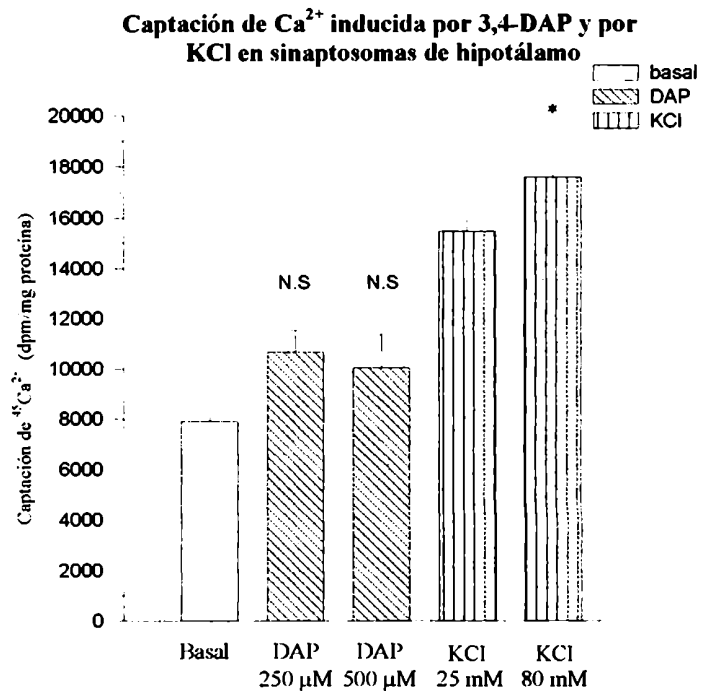
HEPES, Trizma base, Percoll, EGTA, PPO, sacarosa, ColinaCl, 3,4-diaminopiridina y Azul de Metileno fueron obtenidos de la empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Las sales, xileno y la glucosa de Mallinckrodt. El calcio radioactivo, de los distribuidores NEN-Du Pont. Las toxinas ω -CgTx GVIA y ω -Aga IVA, rat ANP(1-28) y CNP fueron adquiridas de Peptide International Co. La nitrendipina fue obtenida de Research Biochemicals International.

RESULTADOS

Estimulación de la captación de Ca^{2+} en sinaptosomas de hipotálamo

La capacidad de captar calcio en forma voltaje-dependiente es una evidencia de la integridad funcional y morfológica de los sinaptosomas. Con el objetivo de corroborar dicha integridad y de caracterizar la sensibilidad de los sinaptosomas a distintas formas de despolarización se realizaron, en primer lugar, experimentos en los que se indujo la captación estimulada de Ca^{2+} de dos maneras distintas. Por un lado, se utilizó 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), bloqueante los canales de K^+ , que produce una despolarización de la membrana de los sinaptosomas; y por el otro lado, se indujo la despolarización de los terminales mediante el aumento de la concentración de iones K^+ en la solución extracelular. La figura 3.1 resume los datos de la captación de Ca^{2+} basal y estimulada de estas dos maneras en los sinaptosomas de hipotálamo de rata.

Figura 3.1 Captación de Ca^{2+} basal e inducida por 3,4-DAP y por KCl en fracción cruda de sinaptosomas de hipotálamo. Las barras representan las medias \pm ES de la captación de Ca^{2+} expresada en dpm/mg de proteínas ($n=5-6$), en condiciones basales, estimulada con 250 μM y 500 μM DAP y estimulada con 25 mM y 80 mM KCl. Se determinaron las diferencias respecto al control (basal) con el test de Dunnett. N.S., no significativas; * diferencias significativas, $P < 0,01$.



La despolarización causada por el agregado de 3,4-DAP produce un aumento de la captación de Ca^{2+} , respecto de la captación en condiciones basales, de un $35 \pm 8.2\%$ y un $27 \pm 13.3\%$ a las concentraciones de $250 \mu\text{M}$ y $500 \mu\text{M}$, respectivamente. La despolarización por K^+ estimula la captación de Ca^{2+} en un $96 \pm 7.1\%$ y en un $120 \pm 5.1\%$ a las concentraciones de 25 mM y 80 mM , respectivamente. Como consecuencia de la gran diferencia observada en la capacidad del bloqueante de los canales de K^+ y el aumento de la concentración de este ion para estimular la captación de Ca^{2+} en esta preparación, se optó por la estimulación con K^+ para los experimentos siguientes.

En segundo lugar, se estudió con mayor detalle la dependencia del influjo de Ca^{2+} con la concentraciones de KCl para determinar la concentración óptima del ion (Figura 3.2).

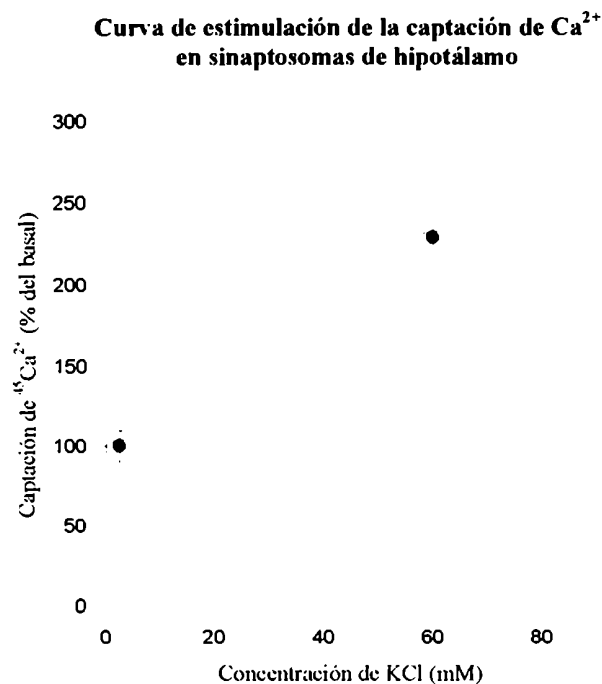


Figura 3.2 Dependencia con la concentración de KCl de la captación de Ca^{2+} . Los símbolos representan la media \pm ES de la captación de Ca^{2+} expresada como porcentaje de la captación basal (5 mM de KCl) ($n=3-6$). Los datos fueron ajustados a una ecuación hiperbólica y los parámetros estimados son: $B_{\text{max}} = 266.9 \pm 13.5\%$, $K = 8.89 \pm 2.1 \text{ mM}$, $R^2 = 0.97$.

Como era de esperar para una preparación con canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente, la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aumenta como consecuencia del incremento de la concentración extracelular de KCl por encima de 5 mM . Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la captación de Ca^{2+} cuando es estimulada con $25, 40, 60$ u 80 mM de KCl.

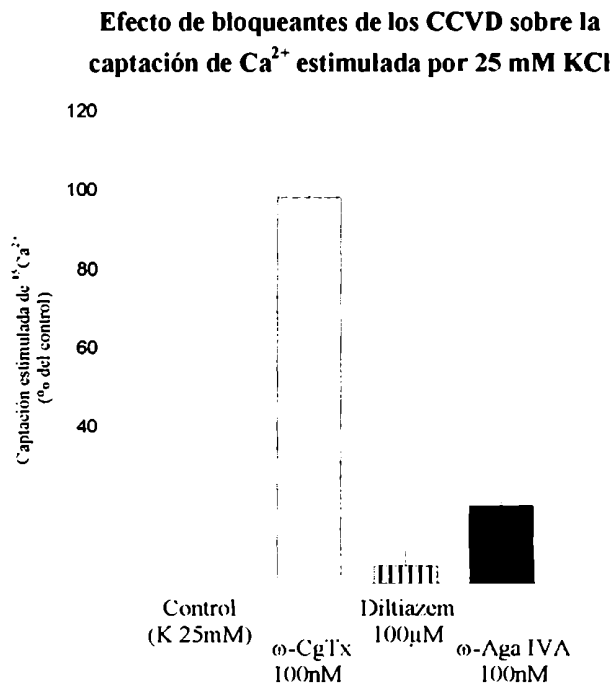
Por esta razón, y debido a que en los estudios en los que se analizó el efecto del ANP sobre la liberación estimulada de ^3H -noradrenalina de terminales hipotalámicos se utilizó una concentración de KCl de 25 mM, se decidió estimular la captación de Ca^{2+} en los sinaptosomas de hipotálamo con 25 mM de KCl.

Caracterización farmacológica de los CCVD presentes en los terminales hipotalámicos

Se realizaron experimentos para determinar los tipos de canales de calcio voltaje-dependientes presentes en los terminales sinápticos de hipotálamo de rata. Como se puede observar en el gráfico de la Figura 3.3, ω -CgTx GVIA, en una concentración de 100 nM, no tiene efecto alguno sobre la captación de Ca^{2+} estimulada. Sin embargo, ω -Aga IVA, el bloqueante de los CCVD de tipo P/Q , en una concentración de 100 nM, produce una inhibición del influjo de Ca^{2+} estimulado del $80 \pm 13 \%$.

Figura 3.3 Efecto de los bloqueantes de los CCVD sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de hipotálamo de rata. La barras representan la media \pm ES de la captación de Ca^{2+} estimulada por 25 mM KCl, expresada como porcentaje de la captación control (sin bloqueante). $n=3-6$.

(*) denota diferencias significativas respecto al control sin bloqueantes determinadas con el test Tukey de múltiples comparaciones. $P < 0.02$.



Los bloqueantes específicos de los canales de tipo L son las dihidropiridinas, drogas que por su naturaleza química deben ser disueltas en etanol o dimetil-sulfóxido (DMSO). Sin embargo, estos solventes resultaron ser muy nocivos para la preparación sinaptosomal de

hipotálamo. Si bien la captación de Ca^{2+} basal no se vio afectada por bajas concentraciones de estos solventes (0,05-0,01%), la captación estimulada de Ca^{2+} se vio reducida fuertemente, mostrando una marcada sensibilidad a la presencia de los mismos en el medio de incubación.

El diltiazem es un bloqueante inespecífico de los CCVD, que tiene efectos sobre los CCVD de tipo L y no necesita ser disuelto en solventes orgánicos. Por esta última razón, se determinó el efecto del diltiazem en esta preparación. A una concentración de 100 μM , diltiazem produce un bloqueo del $96 \pm 12\%$, siendo esta diferencia estadísticamente no significativa comparada con el efecto del ω -Aga IVA (Figura 3.3).

Por otro lado, ninguno de los bloqueantes de los CCVD afecta la captación de Ca^{2+} en condiciones basales.

Efecto de péptidos natriuréticos sobre la captación de Ca^{2+}

Captación basal de Ca^{2+}

Los terminales sinápticos poseen, además de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje, otros mecanismos a través de los cuales el Ca^{2+} entra a los mismos y que son los responsables de la captación basal de Ca^{2+} que ocurre en condiciones no despolarizantes.

Debido a que definimos la captación estimulada como la captación total de Ca^{2+} obtenida en condiciones despolarizantes menos la captación basal de Ca^{2+} (ver materiales y métodos), un efecto del ANP sobre alguno de estos mecanismos basales afectaría nuestra determinación de la acción de los péptidos natriuréticos sobre la captación de Ca^{2+} estimulada.

Se realizaron experimentos de medición de la captación de Ca^{2+} en condiciones basales (5 mM de KCl) en presencia de altas concentraciones de estos péptidos (Figura 3.4). Como se puede observar en el gráfico de la Figura 3.4, ninguno de los péptidos tiene efectos significativos sobre la captación basal de Ca^{2+}

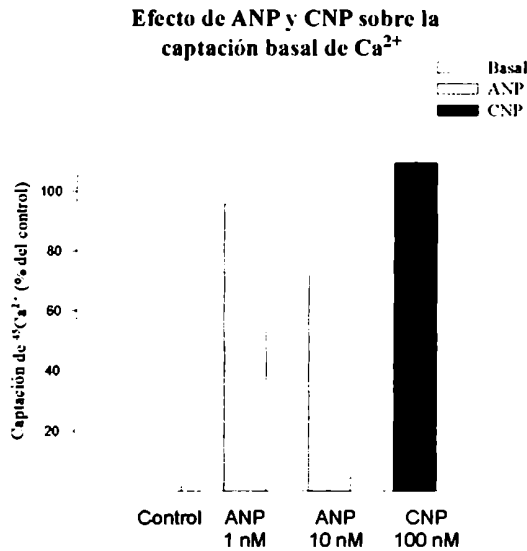
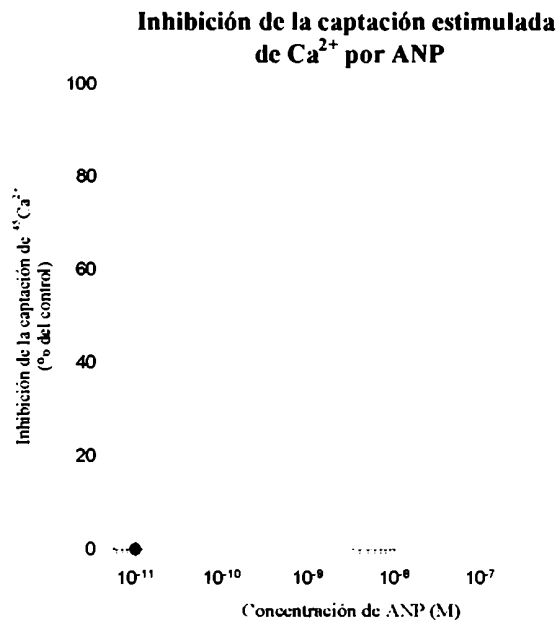


Figura 3.4 Efecto de ANP y CNP sobre la captación basal de Ca^{2+} en sinaptosomas de hipotálamo. Las barras representan la media \pm ES de la captación basal de Ca^{2+} expresada como porcentaje de la captación control (en ausencia de péptido), n= 4-8. Ninguno de los tratamientos produce diferencias significativas con respecto al control analizadas con el test Dunnett. P > 0.05.

Acción del Péptido Natriurético de tipo A, ANP, sobre la captación de Ca^{2+} estimulada

En sinaptosomas de hipotálamo de rata, ANP inhibe potentemente la captación de Ca^{2+} estimulada con 25 mM KCl (Figura 3.5).

Figura 3.5 Curva concentración vs res-puesta para ANP sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en sinaptosomas de hipotálamo. Los símbolos representan la media \pm ES del porcentaje de inhibición de la captación de Ca^{2+} estimulada por 25 mM KCl, n= 5-9. Se consideró como 0% de inhibición a la captación en ausencia de ANP. Los datos fueron ajustados a una ecuación sigmoidea (línea negra) y los parámetros estimados son IC_{50} = 1.9 nM; max= 74.57 ± 4.4 %; min= 5.93 ± 5.38 %; $R^2 = 0.97$.



Este efecto es dependiente de la concentración y el valor de IC_{50} estimado a partir del ajuste de los datos a una ecuación sigmoidea es 1,9 nM. La inhibición máxima se alcanza con 10 nM de ANP y es de un $74.6 \pm 4.4\%$ de la captación de Ca^{2+} estimulada control.

Péptido atrial natriurético de tipo C (CNP)

CNP, el péptido natriurético tipo C, al igual que ANP tiene efectos inhibitorio sobre la liberación estimulada de 3H -NA en hipotálamo de rata (Vatta y colaboradores, comunicación verbal). Si bien, este efecto inhibitorio es menor que el observado con ANP, es alcanzado con muy bajas concentraciones del péptido (1 pM) sugiriendo su especificidad.

Se realizaron experimentos para determinar si CNP produce también algún efecto sobre el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD en los terminales nerviosos hipotalámicos (Figura 3.6.).

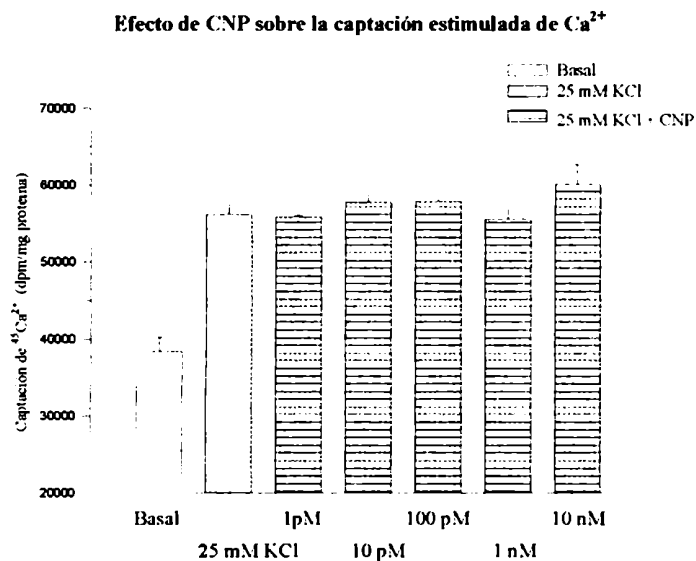


Figura 3.6 Efecto de CNP sobre la captación estimulada de Ca^{2+} en sinaptosomas de hipotálamo. Las barras representan la media \pm ES de la captación de Ca^{2+} expresada en dpm/mg de proteínas. $n = 4-10$. No se observaron diferencias significativas en la captación de Ca^{2+} estimulada en presencia de las distintas concentraciones de CNP respecto a la captación estimulada control (en ausencia del péptido). test de Dunnett. $P > 0,05$.

Como se puede observar en el gráfico de la Figura 3.6, CNP no tiene efecto alguno sobre la captación de Ca^{2+} voltaje-dependiente a ninguna de las concentraciones probadas.

De la misma manera que cuando se determinó el efecto de ANP sobre la captación de Ca^{2+} , las concentraciones de CNP probadas se encuentran dentro del orden de concentración en que los péptidos tienen efectos sobre la liberación de $^3\text{H-NA}$ en hipotálamo.

La falta de efecto de CNP sobre la captación de Ca^{2+} voltaje-dependiente hace suponer que el mecanismo por el cual el CNP inhibe la liberación de NA es distinto al de ANP y no involucra la modulación de los CCVD.

Estudio de la acción inhibitoria de ANP sobre la captación de Ca^{2+} estimulada

Como se mencionó en la introducción, muchas de las acciones biológicas de ANP están asociadas con un aumento de la concentración intracelular de cGMP y dos de los receptores conocidos de los péptidos natriuréticos, NPR-A y el NPR-B, poseen un dominio intracelular con actividad de guanilato-ciclasa.

Con el objeto de desentrañar el mecanismo por el cual ANP produce su acción inhibitoria sobre el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente, se determinó la acción de un inhibidor de la actividad guanilato-ciclasa sobre la inhibición de ANP.

En experimentos preliminares, se analizó el efecto de azul de metileno, un inhibidor poco específico de la guanilato-ciclasa, sobre la captación de Ca^{2+} basal, estimulada control y estimulada en presencia de 10 nM de ANP.

Como se observa en la Figura 3.7, AM (100 μM) no afecta *per se* la captación de Ca^{2+} basal ni la estimulada de manera estadísticamente significativa (test de múltiples comparaciones Tukey, $P > 0,05$). En estos experimentos, ANP (10 nM) produjo una inhibición del 72 ± 26 % de la captación de Ca^{2+} estimulada, hecho que está de acuerdo con los datos de la curva concentración-respuesta para el péptido.

En cambio, la incubación del ANP (10 nM) junto con el AM (100 μM) inhibe un 5 ± 11 % la captación de Ca^{2+} estimulada, efecto que no es estadísticamente significativo. Así, podemos concluir que AM revierte el potente efecto inhibitorio que el péptido natriurético tipo-A ejerce sobre el influjo de Ca^{2+} estimulado en sinaptosomas de hipotálamo.

Efecto de ANP y Azul de Metileno sobre la captación de Ca^{2+} basal y estimulada

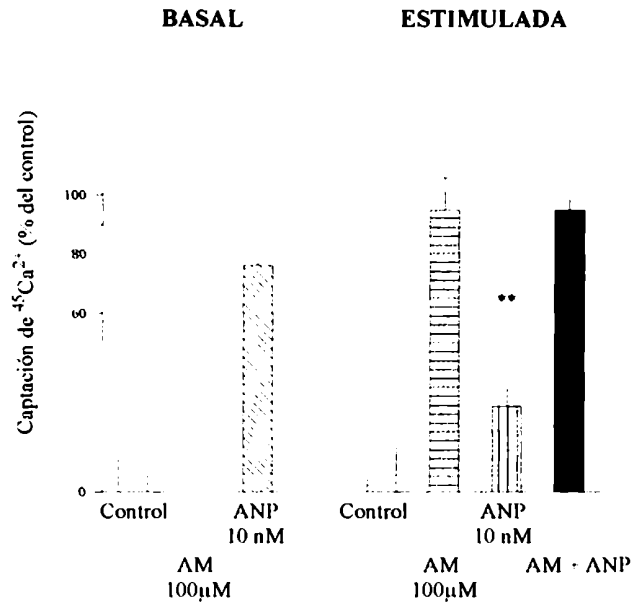


Figura 3.7 Efecto de ANP y Azul de Metileno sobre la captación de Ca^{2+} basal y estimulada en sinaptosomas de hipotálamo. Las barras representan la media \pm ES de la captación de Ca^{2+} basal (barras blancas) y estimulada (barras grises) expresadas como porcentaje de la captación control (sin drogas) correspondiente en cada caso ($n=3-11$). (**) denota diferencias muy significativas con respecto al control determinadas con el test de múltiples comparaciones Tukey, $P < 0.001$.

DISCUSION

La captación de Ca^{2+} en los terminales sinápticos de hipotálamo puede ser estimulada con 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), un bloqueante de los canales de K^+ , y mediante un aumento en la concentración externa de KCl. Los canales de K^+ sensibles a 3,4-DAP son los principales responsables del potencial de membrana, en consecuencia, una reducción en la permeabilidad del ion K^+ a través de estos canales produce la despolarización de la membrana.

Si bien el tratamiento con 3,4-DAP resultó un estímulo eficaz para la liberación de neurotransmisor en otras preparaciones (Pocock & Nicholls, 1992), la captación de Ca^{2+} en los terminales sinápticos de hipotálamo no resulta suficientemente estimulada. Una posible explicación para este hecho es que, en los terminales sinápticos de hipotálamo, la población de canales de K^+ sensibles a 3,4-DAP sea pequeña o no participe activamente en el mantenimiento del potencial de membrana en este comportamiento celular. Otra posibilidad que debe ser mencionada es que las concentraciones de 3,4-DAP utilizadas no sean suficientes para alcanzar la despolarizaciones de los terminales con la consiguiente apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

Por otra parte, un aumento en la concentración extracelular de KCl resultó un estímulo apropiado para inducir el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD. Las concentraciones de KCl probadas (25; 40; 60 y 80 mM), produjeron un aumento de aproximadamente el 100% en la captación de Ca^{2+} , respecto de la captación basal en 5 mM de KCl.

Si bien el valor estimado para la captación máxima (obtenido del B_{max} de la ecuación hiperbólica) fue del 170%, experimentalmente la estimulación con 25 mM de KCl no es significativamente distinta de la obtenida con 80 mM. Es importante considerar, sin embargo, que tanto la variación en la osmolaridad introducida por el cambio de concentración de KCl, como la despolarización inducida, deben ser mantenidos dentro de rangos fisiológicos. Por esta razón, en este estudio, se utilizó 25 mM de KCl para despolarizar los terminales.

En los terminales sinápticos de hipotálamo de rata, el influjo de Ca^{2+} inducido por despolarización es sensible a la toxina ω -Aga IVA, bloqueante de los CCVD de tipo P/Q . Estos canales de Ca^{2+} se encuentran ampliamente distribuidos en las neuronas del sistema nervioso central y algunas neuronas del sistema nervioso periférico de mamíferos (Mintz et al., 1992b). En el capítulo 1 se mostró que ω -Aga IVA, una toxina extraída del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, inhibe potentemente el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD en los terminales sinápticos de corteza frontal de rata. Otros estudios han reportado la participación de los CCVD sensibles a ω -Aga IVA en la liberación de diversos neurotransmisores en el sistema nervioso central (Mintz et al., 1995).

Por otro lado, el efecto inhibitorio de ω -Aga IVA sobre el influjo de Ca^{2+} inducido por despolarización es mayor en los terminales sinápticos de hipotálamo que lo observado en la preparación de corteza frontal. Una concentración de 100 nM de esta toxina, bloquea un $80 \pm 13 \%$ de la captación de Ca^{2+} en hipotálamo mientras que, en sinaptosomas purificados de corteza frontal de rata, ω -Aga IVA inhibe un $59 \pm 5 \%$ (ver Resultados, *Capítulo 1*). La alta sensibilidad a ω -Aga IVA de los mecanismos que median el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependientes sugiere que los CCVD de tipo P/Q juegan un importante papel en los terminales sinápticos de hipotálamo.

El bloqueante específico de los canales de tipo N , ω -CgTx GVIA, no afecta el influjo de Ca^{2+} estimulado por K^+ en los terminales sinápticos de hipotálamo. Sin embargo, esta observación no es evidencia suficiente para negar la presencia de CCVD de tipo N en los terminales hipotalámicos, ni su participación en la neurotransmisión en esta preparación.

Muchos autores coinciden en la existencia conjunta de canales sensibles a ω -Aga IVA y a ω -CgTx GVIA en los terminales sinápticos de algunas preparaciones y en su acción sinérgica como mediadores de la neurotransmisión (Luebke et al., 1993; Castillo et al., 1994; Turner et al., 1993), sin embargo esto no siempre se correlaciona con un efecto de estas toxinas sobre la captación de Ca^{2+} a los terminales.

Por ejemplo, en sinaptosomas de corteza frontal de rata, Turner y colaboradores (1993) mostraron que la liberación de neurotransmisor, además de ser fuertemente bloqueada por ω -Aga IVA, es inhibida por ω -CgTx GVIA. Este efecto, si bien es parcial, es potente

(IC_{50} =1-10 nM); pero no se correlaciona con la falta de efecto observada con 1 μ M de ω -CgTx GVIA sobre la captación estimulada de Ca^{2+} en esta misma preparación (ver capítulo 1).

Las posibles explicaciones para estas discrepancias ha sido discutida el capítulo 1 y están relacionadas con la especial localización de los CCVD que participan en la liberación de neurotransmisor (*zonas activas*) y las evidencias de que la exocitosis es inducida por cambios locales (*microdominios*) de la concentración de Ca^{2+} en el terminal nerviosos.

Por otro lado, el influjo estimulado de Ca^{2+} también es sensible al diltiazem, un bloqueante poco específico de los CCVD de tipo *L*. La ventaja de utilizar esta benzodiazepina, en lugar de los clásicos antagonistas de los CCVD de tipo *L* pertenecientes a la familia de las dihidropiridinas (nitrendipina, isradipina, etc.), es que no es necesaria la disolución en solventes orgánicos. La preparación de sinaptosomas resulta muy sensible, aún en bajas concentraciones, al etanol, metanol y DMSO. Más específicamente, estos solventes afectan la captación estimulada de Ca^{2+} , sin alterar sensiblemente a la captación basal. Esta observación experimental creemos que es debida al efecto de estos solventes sobre la permeabilidad de la membrana plasmática que impiden la despolarización del terminal.

En los últimos años, han surgido nuevos bloqueantes de naturaleza peptídica que han sido reportados como bloqueantes de los CCVD de tipo *L* (DeWeille et al., 1991; Schweitz et al., 1994). Si bien la especificidad de los mismos esta aún bajo estudio, realizamos experimentos preliminares para determinar el efecto de uno de ellos, la calcicludina, sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en los terminales sinápticos de hipotálamo. En estos estudios, que no figuran en la tesis, una alta concentración de calcicludina (100 nM) no pudo repetir el potente efecto inhibitorio del diltiazem sobre el influjo de Ca^{2+} estimulado.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que ANP produce una fuerte inhibición del influjo de Ca^{2+} estimulado en los terminales sinápticos de hipotálamo. Este efecto es dependiente de la concentración (IC_{50} = 2 nM) y alcanza una inhibición máxima del 75% con 10 nM de ANP. La unión de ANP a los receptor de los péptidos natriuréticos (NPR) tiene una constante de disociación (K_d) que varía entre 50 y 500 pM (Martin y

Ballermann, 1989). De esta manera, el valor del IC_{50} estimado en este trabajo para el efecto de ANP sobre el influjo voltaje-dependiente de Ca^{2+} es, en promedio, 50 veces mayor que el calculado para la unión del péptido a sus receptores. Este hecho no sorprende ya que se está analizando un efecto muy probablemente mediado por señales intracelulares y segundos mensajeros. Más aún, otros efectos reportados de ANP en hipotálamo se observan dentro del rango de concentración que tiene efecto sobre la entrada de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Vatta et al., 1993b).

Como se mencionó más arriba ANP ejerce un bloqueo máximo del 75 % sobre el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente en los terminales hipotalámicos. Esto podría significar que, si ANP tiene efecto sobre todos los terminales sinápticos de esta preparación, el péptido no produce un bloqueo total de la entrada de Ca^{2+} estimulada por despolarización. Otra posibilidad que resulta más factible es que, como consecuencia de la heterogeneidad de terminales en la preparación, sólo una porción de los mismos posea receptores para ANP y represente la población de terminales capaces de ser modulados por este péptido natriurético.

Considerando los resultados aquí presentados en conjunto con los efectos inhibitorios del ANP sobre la liberación de NA inducida por K^+ , acetilcolina y angiotensina II (Vatta et al., 1992), podemos considerar la posibilidad de que el ANP inhibe la liberación de NA mediante una disminución del influjo estimulado de Ca^{2+} a los terminales sinápticos.

En células musculares cardíacas de rana, ANP inhibe el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD de tipo *I* inducido por isoproterenol, interfiriendo con la vía dependiente de cAMP por la cual isoproterenol activa los CCVD de tipo *I*. (Gisbert y Fischmeister, 1988; Hassid A., 1986)

Sin embargo, como fue aclarado anteriormente, no es tan simple la correlación entre lo observado a nivel de las mediciones del influjo de Ca^{2+} a los terminales y las determinaciones de la liberación de neurotransmisor. En estudios realizados por Vatta y colaboradores (comunicación verbal), en los que se midió el efecto de distintos bloqueantes de los CCVD sobre la liberación de [3H]-NA en hipotálamo, se obtuvieron resultados distintos que los observados con los bloqueantes sobre la captación de Ca^{2+} . Por ejemplo, ω -CgTx GVIA

(1 μ M) no tiene efecto sobre la captación de Ca^{2+} estimulada con K^+ mientras que 100 nM de la toxina produce una inhibición del 40% sobre la liberación de NA inducida por K^+ (en la misma concentración, 25 mM). En cambio, 100 nM de ω -Aga IVA produce un bloqueo del 80% del influjo estimulado de Ca^{2+} , mientras que inhibe sólo un 40% de la liberación de NA.

Una posible explicación para estas discrepancias se surge de considerar las diferencias que presentan las preparaciones de hipotálamo empleadas. Existen diferencias al analizar los efectos de los bloqueantes sobre un comportamiento celular, como en este caso los terminales sináptico, que al realizar las determinaciones en pedazos de tejido donde la integridad celular es mantenida y las mediciones representan lo ocurrido en toda la célula.

Por otro lado, estas observaciones también podrían estar relacionadas con la hipótesis que propone la existencia de los *microdominios* en la concentración de Ca^{2+} intracelular y por las evidencias de una asociados espacial y funcionalmente entre los CCVD y las vesículas sinápticas (ver *Introducción General*).

El péptido atrial natriurético tipo C, CNP, a ninguna de las concentraciones probadas ejerce algún efecto sobre la captación de Ca^{2+} estimulada en esta preparación sinaptosomal. Este resultado sugiere que la acción inhibitoria sobre el influjo de Ca^{2+} es ejercida selectivamente por el péptido natriurético de tipo A. Ya ha sido mencionado en la introducción de este capítulo que, según la afinidad relativa de los péptidos natriuréticos por los distintos tipos de NPR, ANP es postulado como el ligando específico para el NPR-A mientras que CNP se une con alta afinidad al NPR-B.

En trabajos aún no publicados, Vatta y colaboradores observaron que CNP inhibe la liberación de NA en hipotálamo (comunicación verbal). De acuerdo a lo observado en este estudio, podríamos sugerir que los mecanismos por los cuales CNP afecta la neurotransmisión serían distintos a los ejercidos por ANP y no involucrarían alteraciones en el influjo de Ca^{2+} a través de los CCVD.

Los mecanismos de entrada de Ca^{2+} que no dependen de cambios en el voltaje para su activación son los responsables de la captación basal de Ca^{2+} por el terminal nervioso y no son afectados por ninguno de los péptidos natriuréticos. Esto indica que la modulación que

ejerce el ANP sobre la entrada de Ca^{2+} al terminal es específicamente sobre un mecanismo dependiente del voltaje.

Por otro lado, el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente a los terminales nerviosos de hipotálamo es potentemente inhibido por ω -Aga IVA, sugiriendo que los CCVD de tipo *P/Q* están involucrados en este proceso.

El inhibidor poco específico de la enzima guanilato-ciclasa, azul de metileno (AM), no produce *per se* efectos significativos sobre la captación de Ca^{2+} basal ni sobre la estimulada en los terminales hipotalámicos. Esto sugiere que, al menos de una manera no detectable por este método, la entrada de Ca^{2+} basal y la voltaje-dependiente, no están siendo moduladas tónicamente por algún proceso dependiente de cGMP.

Por otro lado, cuando se determinó el efecto conjunto de ANP y AM, se observó una reversión en la inhibición producida por el péptido natriurético sobre el influjo de Ca^{2+} estimulado por despolarización. Estos experimentos preliminares podrían señalar la participación de una vía dependiente de cGMP en la modulación del influjo de Ca^{2+} que ejerce ANP. Sin embargo, se requiere el empleo de inhibidores más específicos de la guanilato ciclasa y de análogos de cGMP para la certera identificación de las vías y segundos mensajeros involucrados en este proceso.

Finalmente, podemos concluir que este estudio revela la acción moduladora de ANP sobre la entrada de Ca^{2+} a través de CCVD a los terminales nerviosos hipotalámicos. Así, podríamos sugerir que este péptido involucrado en la regulación del balance hídrico y de electrolitos que es sintetizado y liberado en el hipotálamo, podría llegar también a modular la transmisión sináptica.

Discusión General

Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente que están localizados en los terminales sinápticos cumplen una importante función en la transmisión sináptica. Estas proteínas de membrana permeables al Ca^{2+} son el nexo entre dos eventos, el potencial de acción y la liberación de neurotransmisor, que deben ser asociados para que la comunicación entre las neuronas tenga lugar.

El Ca^{2+} que entra a las neuronas a través de estos canales cumple el papel de segundo mensajero desencadenando, de una manera aún no bien comprendida, la fusión de la membrana de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la consiguiente liberación de su contenido.

La identificación de las propiedades, tanto farmacológicas como biofísicas, de los distintos tipos de CCVD y el estudio de los procesos que modulan su actividad son de crucial importancia para comprender los mecanismos que participan en la transmisión sináptica.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis es la identificación los tipos de CCVD involucrados en la entrada de Ca^{2+} a los terminales nerviosos del SNC de la rata y el pollo. En segundo término, resultó de interés determinar el posible efecto modulador del tratamiento con una droga convulsivante, que genera una activación neuronal generalizada, sobre las propiedades de los CCVD de los terminales nervioso. Por último, en el tercer capítulo, se analizó el efecto regulador del péptido atrial natriurético sobre la actividad de los CCVD de los terminales nerviosos de hipotálamo.

Con estos objetivos, se realizaron mediciones de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por agentes despolarizantes (K^+ y 3,4-DAP) en terminales nerviosos aislados a partir del SNC de las distintas especies de vertebrados.

Como fue ya discutido en la Introducción General, los terminales sinápticos son compartimentos celulares poco accesibles para el estudio de las corrientes iónicas. Sin embargo, esta técnica resultó muy útil para estudiar las características de los CCVD presentes en los terminales sinápticos.

Este trabajo revela que en el SNC de una especie de vertebrados mamíferos y en una especie de vertebrados no mamíferos, los distintos tipos de CCVD que median el flujo de

Ca^{2+} a los terminales pueden ser discriminados por la sensibilidad a bloqueantes. Muchos de estos bloqueantes son toxinas presentes en el veneno de invertebrados, la araña *Agelenopsis aperta* y los caracoles marinos de las especies de *Conus*, que tienen por presas a especies superiores.

En los terminales sinápticos de corteza frontal de rata, el flujo de Ca^{2+} voltaje-dependiente ocurre principalmente a través de CCVD de tipo *P/Q*, bloqueados por ω -Aga IVA y FTX. Contrariamente, en los terminales nerviosos del cerebro anterior del pollo, este proceso es mediado por CCVD de alto umbral de activación sensibles a ω -CgTx GVIA.

Sin embargo, el flujo de Ca^{2+} a los terminales nerviosos de SNC del pollo también es bloqueado, aunque parcialmente, por FTX, ω -Aga IVA y ω -CgTx MVIID; sugiriendo la existencia de CCVD con características farmacológicas no descritas anteriormente.

Estos resultados podrían evidenciar el rumbo de la evolución de los integrantes de la familia de los CCVD que acompaña el surgimiento de nuevas o más específicas funciones en el SNC de las distintas especies de vertebrados.

La evolución de las propiedades de los CCVD involucra también la evolución de los mecanismos de modulación que actúan sobre los mismos. Como es ampliamente admitido, la gran ventaja que presentan las sinápsis químicas, tan abundantes en el SNC de vertebrados, respecto de las sinápsis eléctricas, predominantes en el sistema nervioso de invertebrados, es la mayor capacidad de modulación de las sinápsis que se valen de sustancias químicas.

La gran mayoría de los mecanismos descritos de modulación de la transmisión sináptica que podrían involucrar regulación de la actividad de los CCVD, son ejercidos por los mismos neurotransmisores. Por otro lado, en los casos en los que se demostró la regulación de la actividad de los CCVD por acción de los neurotransmisores, estos mecanismos han sido descritos para las corrientes de Ca^{2+} presentes en el soma neuronal y mediante el agregado exógenos de estas sustancias.

En el capítulo 2, describimos el estudio de los cambios en las propiedades de los CCVD que podrían ser inducidos por una liberación endógena de neurotransmisor provocada por durante la convulsión. Para este estudio se trataron ratas con el ácido 3-mercaptopropiónico, un droga convulsivante, en forma aguda y crónica.

Observamos que las propiedades farmacológicas de los CCVD que participan del influjo de Ca^{2+} a los terminales sinápticos no es modificada como consecuencia del tratamiento agudo ni del tratamiento crónico con MP. Más aún, tampoco fue afectada significativamente la dependencia de la captación de Ca^{2+} con la concentración extracelular de KCl en los animales tratados con MP, lo que podría sugerir que las características de activación de los CCVD no son alteradas por el tratamiento.

Múltiples hipótesis podrían explicar la falta de acción moduladora de los tratamientos con MP sobre la actividad de los CCVD, y ya han sido discutidas en el capítulo correspondiente. Sin embargo, resta resaltar la importancia de este estudio que analiza posible efectos moduladores sobre los CCVD de los terminales sinápticas que ocurren en un contexto fisiológico.

Los estudios descritos en el capítulo 3, muestran que el péptido atrial natriurético inhibe potentemente y de manera dependiente de la concentración la entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente ($\text{IC}_{50} = 2 \text{ nM}$) en los terminales nerviosos de hipotálamo. Los CCVD que median el influjo de Ca^{2+} a estos terminales son sensibles a ω -Aga IVA, característica de los CCVD de tipo P/Q.

Por otro lado, el efecto inhibitorio de ANP sobre el influjo de Ca^{2+} voltaje-dependiente no es reproducido por el péptido natriurético tipo C, y es revertido por la incubación con azul de metileno. Estas observaciones sugieren que el mecanismo por el cual ANP modula la actividad de los CCVD es específico para el péptido de tipo A y podría involucrar una vía dependiente del cGMP.

Además, estos resultados confirman que la preparación de terminales nerviosos aislados y la técnica de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ son herramientas muy útiles para el estudio de los mecanismos que modulan la actividad de los CCVD.

Así, este trabajo de tesis identifica los tipos CCVD a través de los cuales se genera la entrada de Ca^{2+} voltaje-dependiente involucrada en la liberación de neurotransmisor en el SNC de vertebrados; y describe un mecanismo de modulación de los CCVD en hipotálamo de rata, que podrían aportar a la comprensión de los efectos fisiológicos de ANP sobre el SNC y de los mecanismos involucrados en el control de la volemia y la presión arterial.

Bibliografía

- Abe, T.; Koyano, K.; Saisu, H. Nishiuchi, Y.; Sakakibara, S. (1986) Binding of ω -conotoxin to receptor sites associated with the voltage-sensitive calcium channel. *Neurosci. Lett.* **71**: 203-208.
- Adams, M.E.; Bindokas, V.P.; Hasegawa, L. y Venema, V.J. (1990) ω -Agatoxins: novel calcium channel antagonist of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *J. Biol. Chem.* **265**: 861-867.
- Adams, M.E.; Herold, E.E. y Venema, V.J. (1989) Two classes of channel specific toxins from funnel web spider venom. *J. Comp. Physiol. A* **164**: 333-342.
- Allescher, H.D.; Willis, S.; Schusdziarra, V. y Classen, M. (1989) Omega-conotoxin GVIA specifically blocks neuronal mechanisms in rat ileum. *Neuropeptides* **13**: 253-258.
- Anand-Srivastava, M.B.; Sehl, P.D. y Lowe, D.G. (1996) Cytoplasmic Domain of natriuretic peptide-C receptor inhibits adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **271**: 19324-19329.
- Antunes-Rodrigues, J.; Ramalho, M.J.; Reis, L.C.; Menani, J.V.; Turrin, M.Q.A.; Gutkowska, J. y McCann, S.M. (1991) Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibits volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc.Natl. Acad. Sci.* **88**: 2956-2960.
- Appel, R.G.; Dubyak, G.R. y Dunn, M.J. (1987) Effect of atrial natriuretic factor on cytosolic free calcium in rat glomerular mesangial cells. *FEBS Lett.* **224**: 396-400.
- Ascher, P. y Novak, L.(1987) Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends in Neurosc* **10**: 284-288.
- Augustine, G.J. y Neher, E. (1992) Neuronal Ca^{2+} signalling takes the local route. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**: 302-307.
- Augustine, G.J.; Adler, E.M.; Charlton, M.P.; Hans, M.; Swandulla, D. y Zipser, K. (1992) Presynaptic calcium signals during neurotransmitter release: detection with fluorescent indicators and other calcium chelators. *J Physiol (Paris)* **86**: 129-134.
- Augustine, G.J.; Charlton, M.P. y Smith, S.J. (1985) Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J Physiol* **367**: 163-181.
- Augustine, G.J.; Charlton, M.P. y Smith, S.J. (1987) Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.* **10**: 633-693.
- Autilio, L.A.; Appel, S.H.; Pettis, P. y Gambetti, P.L. (1968) Biochemical studies of synaptosomes in vitro. I. Protein synthesis. *Biochemistry* **7**: 2615-2622.

- Azimi-Zonooz, A. y Litzinger, M.J. (1992) The developing chick brain shows a dramatic increase in the ω -Conotoxin binding sites around the hatching period. *Int. J. Devl. Neurosci.* **10**: 447-451.
- Ballermann, B.J. y Brenner, B.M. (1985) Biologically active atrial peptides. *J. Clin. Invest.* **76**: 2041-2048.
- Ballermann, B.J. y Brenner, B.M. (1986) Role of atrial natriuretic peptides in fluid homeostasis. *Circ. Res.* **58**: 619-630.
- Bealer, S.L.; Haywood, J.R.; Gruber, K.H.; Buckalew, V.M.; Fink, G.D.; Brody, M.J. y Johnson, A.K. (1983) *Am. J. Physiol.* **244**: R51-R57.
- Bean, B.P. (1985) Two kinds of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 367-384.
- Bean, B.P.; Sturek, M.; Puga, A. y Hermsmeyer, K. (1986) Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Circ Res* **59**: 229-235.
- Bennett, B.D.; Bennett, G.L.; Vitangcol, R.V.; Jewerr, J.R.S.; Burnier, J.; Henzel, W. y Lowe, D.G. (1991) Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J. Biol. Chem.* **266**: 23060-23067.
- Bianchi, C.; Gutkowska, J.; Thibault, G.; Garcia, R.; Genest, J. y Cantin, M. (1985) Radioautographic localization of atrial natriuretic factor in rat tissues. *Histochemistry* **82**: 441-450.
- Birnbaumer, L.; Campbell, K.P.; Catterall, W.A.; Harpold, M.M.; Hofmann, F.; Horne, W.A.; Mori, Y.; Schwartz, A.; Snutch, T.P.; Tanabe, T. y Tsien, R.W. (1994) The naming of voltage-dependent calcium channels. *Neuron* **13**: 505-506.
- Bkaily, G. y Sperelakis, N. (1984) Injection of protein kinase inhibitor into cultured heart cells blocks calcium slow channels. *Am J Physiol* **246**: H630-H634.
- Blaustein, M.P. (1975) Effects of potassium, veratridine, and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. *J Physiol* **247**: 617-655
- Blaustein, M.P. (1988) Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci.* **10**: 438-443.

Bolger, G.T.; Weissman, B.A. y Skolnick, P. (1985) The behavioural effects of the calcium antagonist to BAY K 8644 in the mouse: antagonism by the calcium antagonist nifedipine. *Nauny-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **328**: 373-377.

Booth, R.F.G. y Clark, J.B.(1978) A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically component synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.* **176**: 365-370.

Bourson, A.; Moser, P. C., Gower, A. J. y Mir, A.K. (1989) Central and behavioral effects of the dihydropyridine calcium channel activator BAY K 8644 in the rat. *Eur. J. Pharmacol* **160**: 339-347.

Bowman, D.; Alexander, S. y Lodge, D. (1993) Pharmacological characterization of the calcium channels coupled to the plateau phase in KCl-induced intracellular free Ca^{++} elevation in chicken and rat synaptosomes. *Neuropharmacology* **32**: 1195-1202.

Brenner, BM.; Ballermann, BJ.; Gunning, ME. y Zeidel, ML. (1990) Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol. Rev.* **70**: 665-669.

Brown, A.M. y Birnbaumer, L. (1990) Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu. Rev. Physiol.* **52**: 197-213.

Brum, G.; Flockerzi, V.; Hofmann, F.; Osterrieder, W. y Trautwein, W. (1983) Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes. *Pflugers Arch* **398**: 147-154

Campbell, K.P.; Leung, A.T. y Sharp, A.H. (1988) The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* **11**: 425-430.

Capponi, A.M.; Lew, P.D.; Wuthrich, R. y Vallotton, M.B. (1986) Effects of atrial natriuretic peptide on the stimulation by angiotensin II of various target cells. *Hypertension* **4** Suppl. II: S61-S65.

Carbone, E. y Swandulla, D. (1989) Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **54**: 31-58.

Carbone, E.; Sher, E. y Clementi, F. (1990) Ca^{2+} currents in human neuroblastoma IMR 32 cells: kinetics, permeability and pharmacology. *Pflugers Arch.* **416**: 170-179.

Carvalho, C.M.; Duarte, C.V.; Ferreira, I.L. y Carvalho, A.P. (1993) Effect of Ca^{2+} channels blockers on the K^{+} or 4-aminopyridine evoked $[Ca^{2+}]_i$ increase and dopamine release in rat striatum synaptosomes. *Soc Neurosc abst* 720.20.

- Castillo, P.E.; Weisskopf, M.G. y Nicoll, R.A. (1994) The role of Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* **12**: 261-269.
- Caterall, W.A.; Seagar, M.J. y Takahashi, M. (1988) Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J. Biol Chem* **263**: 3533-3538.
- Cazalis, M.; Dayanithi, G. y Normdmann, J.J. (1987) Hormone release from isolated nerve endings of the rat neurohypophysis. *J. Physiol* **390**: 55-70.
- Clavell, A.L.; Stingo, A.J.; Wei, C.M.; Heublein, D.M. y Burnett, J.C. (1993) C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide. *Am. J. Physiol.* **264**: R290-R295.
- Cooper, A.J. y Perry, S. (1980) The application of freeze-thaw percoll gradients to whole-cell isopycnic fractionations: preliminary results. *J. Immunol. Methods* **37**: 353-362.
- Cotman, C.W. y Matthews, D.A. (1971) Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochem. Biophys. Acta* **249**: 380-394.
- Cruz, L.J. y Olivera, B.M. (1986) Calcium channel antagonist. ω -conotoxin defines a new high affinity site. *J. Biol. Chem.* **261**: 6230-6333.
- Curtis, D.R.; Duggan, A.W.; Felix, D.; Johnston, G.A.R. y McLennan, H. (1971) Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain Res.* **33**: 57-73.
- Chang, C.H.; Kohse, K.P.; Chang, B.; Hirata, M.; Douglas, E. y Murad, F. (1990) Characterization of ATP-stimulated guanylate cyclase activation in rat lung membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1052**: 159-165.
- Chartier, L. y Schiffrin, E.L. (1987) Role of calcium in effects of atrial natriuretic peptide on aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol.* **252**: E485-E491.
- Cherksey, B.D.; Sugimori, M. y Llinás, R.R. (1991) Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **635**: 80-89.
- Chinkers, M. y Garbers, D.L. (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* **245**: 1392-1394.
- Chinkers, M.; Singh, S. y Garbers, D.L. (1991) Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *J. Biol. Chem.* **266**: 4088-4093.

Day, E.D.; McMillen, P.N.; Mickey, D.D. y Appel, S.H. (1971) Zonal centrifuge profiles of rat brain homogenates: instability in sucrose, stability in iso-osmotic Ficoll-sucrose. *Anal. Biochem.* **39**: 29-45.

Day, M.L.; Schwartz, D.; Weigand, R.C.; Stockman, S.R.; Brunnert, H.E.; Currie, M.G.; Standaert, D.G. y Needleman, P. (1987) Ventricular atriopeptine: unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy and dexamethasone. *Hypertension* **9**: 485-491.

De Jongh, K.S.; Warner, C. y Catterall, W.A. (1990) Subunits of purified calcium channels. α_2 and δ are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* **265**: 14738-14741.

De Robertis, E. (1967) Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. The macromolecular components involved in nerve transmission are being studied. *Science* **156**: 907-914

De Robertis, E. y Bennett H.S. (1954) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* **13**: 35.

De Robertis, E.; Pellegrino de Iraldi, A.; Rodriguez de Lorez Arnaiz, G. y Gomez, C.J. (1961) Cholinergic and noncholinergic nerve endings in rat brain. Isolation and subcellular distribution. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 229-235.

DeBold, A.J. (1979) Heart atrial granularity: effects of changes in water-electrolyte balance. *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* **161**: 508-511.

DeBold, A.J.; Borenstein, HB.; Veress, AT. y Sonnenberg, A. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intra-venous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* **28**: 89-94.

Delgado-Escueta, A.V. (1984) Summation of the workshops and discussion: The new wave of research in the epilepsies. *Ann. Neurol.* **16** (suplemento): 145-158.

DeLuca, A.; Li, C.G.; Rand, M.J.; Reid, J.J.; Thaina, P. y Wong-Dusting, H.K. (1990) Effects of omega-conotoxin GVIA on autonomic neuroeffector transmission in various tissues. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 437-447.

DeWeille, J.R.; Schweitz, H.; Maes, P. et al. (1991) Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1437-1440.

Dodd, P.R.; Barry, J.A.; Oakley, A.E.; Perry, E.K. y Delaunoy, J.P. (1981) A rapid method for preparing synaptosomes: comparison with alternative procedures. *Brain Res.* **226**: 107-118.

- Dooley, D.J.; Lupp, A.; Hertting, G. y Ossvald, H. (1988) ω -Conotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release. *Eur. J. Pharmacol.* **148**: 261-267.
- Drachman, D.B. y Fanburg, B.L. (1969) The effect of botulinum toxin on uptake of calcium by synaptosomes. *J Neurochem* **16**: 1633-1635.
- Duarte, C.B.; Rosario, L.M. y Sena, C.M. (1993) A toxin fraction FTX from the funnel web spider poison inhibits dihydropyridine insensitive Ca^{2+} channel coupled to catecholamines release in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem* **60**: 908-913.
- Dubel, S.J.; Starr, T.V.; Hell, J.; Ahlijanian, M.K.; Enyeart, J.J.; Catterall, W.A. y Snutch, T.P. (1992) Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 5058-5062
- Dunlap, K.; Luebke, J.I. y Turner, T.J. (1995) Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* **18**: 89-98.
- Enriquez, J.A.; Sánchez-Prieto, J.; Muiño Blanco, M.T.; Hernandez-Yago, J. y López-Perez, M.J. (1990) Rat brain synaptosomes prepared by phase partition. *J. Neurochem.* **55**: 1841-1849.
- Fan, S.G.; Wusteman, M. y Iversen, I.L. (1981) 3-mercaptopropionic acid inhibit GABA release from rat brain slices in vitro. *Brain Res.* **229**: 379-387.
- Fatt, P. y Katz, B. (1953) *J. Physiol.* **120**: 171-204.
- Feigenbaum, P.; Garcia, M. y Kaczorowski, G.J. (1988) Evidence for distinct sites coupled to high affinity ω -conotoxin receptors in rat brain synaptic plasma membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 298-305.
- Folbergrova, J. (1977) Cerebral energy reserves of mice during seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. *Neurosci.* **2**: 315-319.
- Folbergrova, J.; Ingavar, M.; Nevander, G. y Siesjo, B.K. (1985) Cerebral metabolic changes during and following fluorothyl-induced seizures in ventilated rats. *J. Neurochem.* **44**: 1419-1426.
- Fujita, Y.; Mynlieff, M.; Dirksen, R.T.; Kim, M.S.; Niidome, T.; Nakai, J.; Friedrich, T.; Iwabe, N.; Miyata, T.; Furuichi, T. et al. (1993) Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain *Neuron* **10**: 585-598.

Fuller, F.; Porter, J.G.; Arfsten, A.E.; Miller, J.; Schilling, J.W.; Scarborough, R.M.; Schenk, D.B. y Lewicki, J.A. (1988) Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J. Biol. Chem.* **263**: 9395-9401.

Furukawa, K.; Barger, S.W.; Blalock, E.M. y Mattson, M.P. (1996) Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. *Nature* **379**: 74-78.

Garbers, D.L. (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* **71**: 1-4.

Garbers, D.L. y Lowe, D.G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J. Biol. Chem.* **269**: 30741-30744.

Garcia, D.E.; Cavalié, A. y Lux, H.D. (1994) Enhancement of voltage-gated Ca²⁺ currents induced by daily stimulation of hippocampal neurons with glutamate. *J. Neurosci.* **14**: 545-553.

Garcia, R.; Thinbault, G.; Cantin, M. y Genest, J. (1984) Effect of purified atrial natriuretic factor on rat and rabbit vascular strips and vascular beds. *Am. J. Physiol.* **247**: R34-R39.

Gardner, D.C.; Deschepper, C.F.; Ganong, W.F.; Hane, S.; Fiddes, J.; Baxter, J.D. y Lewicki, J. (1986b) Extra atrial expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 6697-6701.

Gardner, D.C.; Hane, S.; Trachewsky, D.; Shenk, D. y Baxter, J.D. (1986a) Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoids in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**: 1047-1054.

Gisbert, M.-P. y Fschmeister, R. (1988) Atrial natriuretic factor regulates the calcium current in frog isolated cardiac cells. *Circ. Res.* **62**: 660-667.

Goddard, G.V.; Mc Intyre, D.C. y Leech, C.K. (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurol.* **25**: 295-330.

Gould, R.J.; Myurphy, K.M.M. y Snyder, S.H. (1985) Autoradiographic localisation of calcium channel antagonist receptors in rat brain with [³H]-nitrendipine. *Brain Res.* **330**: 217-223.

Gray, D.B.; Brusès, J.L. y Pilar, G.R. (1992) Developmental switch in the pharmacology of Ca²⁺ channels couple to acetylcholine release. *Neuron* **8**: 1-10.

Gray, E.G. y Whittaker, V.P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragment derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* **96**: 79-88.

Gundlanch, A.L. y Knobe, K.E. (1992) Distribution of preproatrial natriuretic peptide in rat brain detected by in situ hybridization of DNA oligonucleotides: enrichment in hypothalamic and limbic regions. *J. Neurochem.* **59**: 758-761.

Haack, J.; Kinser, P.; Yoshikami, D. y Olivera, M. (1993) Biotinylated derivatives of ω -conotoxins G IVA and M VIID: probes for neuronal calcium channels. *Neuropharmacology* **32**: 1151-1159.

Hagiwara, S.; Ozawa, S. y Sand, O. (1975) Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* **65**: 617-644.

Hamet, P.; Tremblay, J.; Pang, S.C.; Garcia, R.; Thinbault, G.; Gutkowska, J.; Cantin, M. y Genest, J. (1984) Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 515-527.

Hassad, A. (1986) Atriopeptin II decrease cytosolic free Ca in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **251**: C681-C686.

Hassad, A. (1987) Atriopeptin II decrease resting and hormone-elevated cytosolic Ca in cultured mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **253**: F1077-F1082.

Hess, P. (1990) Calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **13**: 337-356.

Heuser, J.E. y Reese, T.S. (1981) Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **88**: 564-580

Hille, B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* **17**: 531-536.

Hillyard, D.R.; Monje, V.D.; Mintz, I.M.; Bean, B.P.; Nadasdi, L.; Ramachandran, J.; Miljanich, G.; Azimi-Zonooz, A.; McIntosh, J.M.; Cruz, L.J.; Imperial, J.S. y Olivera, B.M. (1992) A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic calcium channels. *Neuron* **9**: 69-77.

Hofmann, F.; Biel, M.; Flockerzi, V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 399-418.

Hosey, M.M.; Borsotto, M. y Lazdunski, M. (1986) Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridine-sensitive voltage-dependent Ca^{2+} channel in skeletal muscle membranes by cAMP- and Ca^{2+} -dependent processes. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 3733-3737.

Huang, C-L.; Ives, H.E. y Cogan, M.G. (1986) In vivo evidence that cGMP is the second messenger for atrial natriuretic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 8015-8018.

Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* **380**: 255-258.

Itakura, M.; Iwashina, M.; Mizuno, T.; Ito, T.; Hagiwara, H. y Hirose, S. (1994) Mutational analysis of disulfide bridges in the type C atrial natriuretic peptide receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 8314-8318.

Iversen, L.L. (1971) Role of transmitter uptake mechanism in synaptic neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* **41**: 571-591.

Katz B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses *J Physiol* **192**: 407-436.

Katz, B. y Miledi, R. (1967b) Ionic requirements of synaptic transmitter release. *Nature* **215**: 651.

Katz, E.; Ferro, P.A.; Cherksey, B.D.; Sugimory, M.; Llinás, R. y Uchitel, O.D. (1995) Effects of Ca^{2+} channel blockers on transmitter release and presynaptic currents at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* **486**: 695-706.

Katz, E.; Protti, D.A.; Ferro, P.; Rosato Siri, M. y Uchitel, O.D. Effects of calcium channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* (en prensa).

Kerr, L M; Filloux, F.; Olivera, B.M. (1988) Autoradiographic localization of calcium channels with ^{125}I -W-conotoxin in rat brain *Eur J. Pharmacol* **146**: 181-186.

Kerr, L.M. y Yoshikami, D. (1984) A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* **308**: 282-284.

Kirkby, R.D.; Gilbert, T.H. y Corcoran, M.E. (1993) Kindling antagonism: mapping of susceptible sites. *Brain Res.* **616**:17-24.

Koller, K.J.; de Sauvage, F.J.; Lowe, D.L. y Goeddel, D.V. (1992) Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2581-2590.

- Koller, K.J.; Lowe, D.G.; Bennett, G.L.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H. y Goeddel, D.V. (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* **252**: 120-123.
- Kosecki, C.; Hayashi, Y.; Ohnuma, N. y Imai, M. (1986) Difference in molecular size of receptors for alpha-rat atrial natriuretic polypeptide among the kidney, aorta and adrenal gland as detected by direct UV-photoaffinity labeling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**: 200-207.
- Koyano, K.; Abe, T.; Nishiuchi, Y. y Sakakibara, S. (1987) Effects of synthetic ω -conotoxin on synaptic transmission. *Eur. J. Pharmacol.* **135**: 337-343.
- Kreisman, N.R.; Sick, T.J.; Lamanna, J. y Rosenthal, M. (1981) Local tissue oxygen tension-cytochrome a_3 redox relationship in rat cerebral cortex in vivo. *Brain Res.* **218**: 161-174.
- Kurokawa, M.Y.; Sakamoto, M.T. y Kato, M. (1965) Distribution of sodium-plus-potassium-stimulated adenosine-triphosphatase activity in isolated nerve-ending particules. *Biochem. J.* **97**: 833-844.
- Kurose, H.; Inagami, T.; Ui, M. (1987) Participation of adenosine 5'-triphosphate in the activation of membrane-bound guanylate cyclase by the atrial natriuretic factor. *FEBS Lett.* **219**: 375-379.
- Ladenson, P.W.; Bloch, K.D. y Seidman, J.G. (1988) Modulation of atrial natriuretic factor by thyroid hormone: messenger ribonucleic acid and peptide levels in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid rat atria and ventricles. *Endocrinology* **123**: 652-657.
- Lamar, C. (1970) Mercaptopropionic acid: a convulsant that inhibits glutamate decarboxylase. *J. Neurochem.* **17**: 165-170.
- Leitman, D.C.; Andresen, J.W.; Kuno, T.; Kamisaki, Y.; Chang, J.K. y Murad, F. (1986) Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 11650-11655.
- Lincoln, T.M. y Cornwell, T.L. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* **7**: 328-338.
- Litzinger, M.J.; Grover, B.B.; Saderup, S. y Abbott, J.R. (1993) Voltage sensitive calcium channels mark a critical period in mouse neurodevelopment. *Int. J. Devl. Neurosci.* **11**: 17-24.

Logothetis, D.E.; Kurachi, Y.; Galper, J.; Neer, E.J. y Clapham, D.E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**: 321-326.

Lopez, M.J.; Wong, S.K-F.; Kishimoto, I.; Dubois, S.; Mach, V.; Friesen, J.; Garbers, D.L. y Beuve, A. (1995) Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* **378**: 65-68.

López-Perez, M.J.; Paris, G. y Larsson, C. (1981) Highly purified rat brain mitochondria prepared by phase partition. *Biochem. Biophys. Acta* **635**: 359-368.

Luebke, J.L.; Dunlap, K. y Turner, T.J. (1993) Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* **11**: 1-20.

Lundy M.P.; Hamilton, M.G. y Frew, R. (1994) Pharmacological identification of a novel Ca²⁺ channel in chicken brain synaptosomes. *Brain. Res.* **643**: 204-210.

Lundy, P.M.; Stauderman, K.; Goulet, J.C. y Frew, R. (1989) Effect of ω -conotoxin GVIA on Ca²⁺ influx and endogenous acetylcholine release from chicken brain preparations. *Neurochem. Int.* **14**, 49-54.

Lynch, G. y Baudry, M. (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* **224**: 1057-1063.

Llinás, R. y Yarom, Y. (1981) Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian olivary neurons *in vitro*. *J. Physiol.* **315**: 569-584.

Llinás, R.; Steinberg, I.Z. y Walton, K. (1980) Transmission in the squid giant synapse: a model based on voltage clamp studies. *J Physiol (Paris)* **76**: 413-418

Llinás, R.; Steinberg, I.Z. y Walton, K. (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* **33**: 323-351

Llinás, R.; Sugimori, M.; Hillman, D.E. y Cherksey, B. (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ in the mammalian central nervous system. *Trends in Neuroscience* **15**:351-355.

Llinás, R.R.; Sugimori, M.; Lin, J.W. y Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1689-1693.

Maack, T.; Marion, D.N.; Camargo, M.J.; Kleinert, H.D.; Laragh, J.H.; Vaughan, E.D. y Atlas, S.A. (1984) Effects of auriculin on blood pressure, renal function and renin-aldosterone system in dog. *Am. J. Med.* **77**: 1069-1075.

Maack, T.; Suzuki, M.; Almeida, F.A.; Nussenzveig, D.; Scarborough, R.M.; McEnroe, G.A. y Lewicki, J.A. (1987) Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* **238**: 675-678.

Madison, D.V.; Malenka, R.C. y Nicoll, E.A. (1991). Mechanisms Underlying Long-Term Potentiation of Transmission. *Annu Rev Neurosci* **14**: 379-397.

Manfridi A., Charpak S., Chersksey B., Sugimori M. and Llinás R. (1993) FTX selectively blocks P-type calcium currents in hippocampal and olivary neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 721.6.

Marchetti, C. y Brown, A.M. (1988) Protein kinase activator 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol inhibits two types of calcium currents in GH3 cells. *Am J Physiol* **254**: C206-C210.

Martin, E.R. y Ballermann, B.J. (1989) Atrial natriuretic peptide receptors. En: *Contemporary Issues in Neurology. Atrial Natriuretic Peptide*, editado por B.M. Brenner y J.H. Stein. New York: Churchill-Livingstone **21**: 105-136.

McCleskey, E.W.; Fox, A.P.; Feldman, D.H.; Cruz, L. J. y Olivera, B.M. (1987) ω -Conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4327-4331.

Meisner, K.D.; Taylor, C.J. y Saney, H. (1986) Synthetic atrial peptide inhibits intracellular calcium release in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **250**: C171-C174.

Meloche, S.; Ong, H.; Cantin, M. y Delean, A. (1986) Affinity crosslinking of atrial natriuretic peptide to its receptor in bovine adrenal zona glomerulosa. *J. Biol. Chem.* **261**: 1525-1531.

Meyer-Lehnert, H.; Caramelo, C.; Tsai, P. y Schrier, R.W. (1988) Interaction of atriopeptin II and vasopressin on calcium kinetics and contraction of aortic smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **82**: 1407-1414.

Miller, R.J. (1992) Neuronal Ca^{2+} : getting it up and keeping it up. *Trends in Neurosci.* **15**: 317-319.

Miller, R.J. (1992) Neuronal Ca^{2+} : getting it up and keeping it up. *Trends Neurosci.* **15**: 317-319.

- Miller, T.M. y Heuser, J.E. (1984) Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **98**: 685-698.
- Mintz I.M. y Bean, B.P. (1993) Block of calcium channels in rat neurons by synthetic omega-Aga-IVA. *Neuropharmacology* **32**: 1161-1169.
- Mintz, I.M.; Adams, M.E. y Bean, B.P. (1992b) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*, **9** : 85-95.
- Mintz, I.M.; Sabatini, B.L. y Regehr, W.G. (1995) Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* **15**: 675-688.
- Mintz, I.M.; Venema, V.J. y Swiderek, K. (1992a) P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega -Aga IVA. *Nature* **355**: 827-829.
- Monje, V.; Haack, J.; Naisbitt, S.; Miljanich, G.; Ramachandran, J.; Nasdasdi, L.; Olivera, B.M.; Hillyard, D. y Gray, W. (1993) A new *Comus* peptide ligand for calcium channel subtypes. *Neuropharmacology* **32**, 1141-1149.
- Moulian, N. y Gaudry-Talarmain, Y.M. (1993) *Agelenopsis aperta* venom and FTX, a purified toxin, inhibit acetylcholine release in Torpedo synaptosomes. *Neuroscience* **54**: 1035-1041.
- Mukoyama, M.; Nakao, K.; Saito, Y.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Suga, S.; Shirakami, G.; Jougasaki, M.; Imura, H. (1990) Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* **323**: 757-758.
- Mundiña-Weilenmann, C.; Chang, C.H.F.; Gutierrez, L.M. y Hosey, M.M. (1991). Demonstration of the phosphorylation of dihydropyridine sensitive calcium channels in chick skeletal muscle and the resultant activation of the channels after reconstitution. *J. Biol. Chem* **266**: 4067-4073.
- Murad, F. (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. *J. Clin. Invest.* **78**: 1-5.
- Murad, F.; Leitman, D.C.; Bennett, B.M.; Molina, C. y Waldman, S.A. (1987) Regulation of guanylate cyclase by atrial natriuretic factor and the role of cGMP in vasodilatation. *Am. J. Med. Sci.* **294**: 139-143.
- Nagy, A. y Delgado-Escueta, A.V. (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* **43**: 1114-1123.

- Nowycky, M.C.; Fox, A.P. y Tsien, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**: 440-443.
- Nunoki, K.; Florio, V. y Caterall, W.A. (1989) Activation of purified calcium channels by stoichiometric protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6816-6820.
- Nussenzveig, D.R.; Lewicki, J.A. y Maack, T. (1990) Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J. Biol. Chem.* **265**: 20952-20958.
- Oikawa, S.; Imai, M.; Inuzuka, C.; Tawaragi, Y.; Nakazato, H. y Matsuo, H. (1985) Structure of dog and rabbit precursor of atrial natriuretic polypeptide deduced from nucleotide sequence of cloned cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 892-899.
- Oikawa, S.; Imai, M.; Ueno, A.; Tanaka, S.; Noguchi, T.; Nakazato, H.; Kangawa, A.; Fukuda, A. y Matsuo, H. (1984) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor of human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* **309**: 724-726.
- Olivera, B. M.; Gray, W.R. y Zeikus, R. (1985) Peptide neurotoxins from fish hunting cone snails. *Science* **230**: 1338-1343.
- Olivera, B. M.; Rivier, J.; Scott, J.K.; Hillyard, D.R. y Cruz, L.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 22067-22070.
- Olivera, B.M.; Imperial, J.S.; Cruz, L.J.; Bindokas, V.P.; Venema, V.J. y Adams, M.E. (1991) *Ann. NY Acad. Sci.* **635**: 114-122.
- Olivera, B.M.; McIntosh, J.M. y Cruz, L.J. (1984) Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *conus geographus* venom. *Biochemistry* **23**: 5087-5090.
- Olivera, B.M.; Miljanich, G.P.; Ramachandran, J. y Adams, M.E. (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu-Rev-Biochem.* **63**: 823-867.
- Ong, H.; Lazure, C.; Nguyen, T.T.; McNicoll, N.; Seidah, N.; Chretien, M. y Delean, A. (1987) Bovine adrenal chromaffin granules are a site of synthesis of atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 957-963.
- Ophoff, R.A.; Terwindt, G.M.; Vergouwe, M.N.; van Eijk, R.; Oefner, P.J.; Hoffman, S.M.G.; Lamerdin, J.E.; Mohrenweiser, H.W.; Bulman, D.E.; Ferrari, M.I. Haan, J.; Lindhout, D.; van Ommen, G.; Hofker, M.H.; Ferrari, M.D. y Frants, R.R. (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* **87**: 543-552.

Osterrieder, W.; Brum, G.; Hescheler, J.; Trautwein, W.; Flockerzi, V. y Hofmann, F. (1982) Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca^{2+} current. *Nature* **298**: 576-578

Passafaro, M.; Clementi, F.; Pollo, A.; Carbone, E. y Sher, E. (1994) omega-Conotoxin and Cd^{2+} stimulate the recruitment to the plasmamembrane of an intracellular pool of voltage-operated Ca^{2+} channels. *Neuron* **12**: 317-326.

Passafaro, M.; Rosa, P.; Sala, C.; Clementi, F. y Sher, E. (1996) N-type Ca^{2+} channels are present in secretory granules and are transiently translocated to the plasma membrane during regulated exocytosis. *J Biol Chem* **271**: 30096-30104.

Paupardin-Tritsch, D.; Hammond, C.; Gerschenfeld, H.M.; Nairn, A.C. y Greengard, P. (1986) cGMP-dependent protein kinase enhances Ca^{2+} current and potentiates the serotonin-induced Ca^{2+} current increase in snail neurones. *Nature* **323**: 812-814.

Perney, T.M.; Hirning, L.D.; Leeman, S.E. y Miller, R. (1986) Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc Natl Acad. Sci* **83**: 6656-6659.

Pertoft, H. y Laurent, T.C. (1982) Sedimentation of cells in colloidal silica (Percoll), in *Cell separation: Methods and Selected Applications*, Vol. 1 (Pretlow T.G. and Pretlow T.P., ed.) Academic Press, New York.

Plummer, M.R.; Logothetis, D.E. y Hess, P. (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**: 1453-1463.

Pocock, J.M.; Venema, V.J. y Adams, M.E. (1992) Omega-agatoxins differentially block calcium channels in locust, chick and rat synaptosomes. *Neurochem. Int.* **20**: 263-270.

Protti, D.A. y Uchitel, O.D. (1993) Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *NeuroReport* **5**: 333-336.

Protti, D.A.; Reisin, R.; Mackinley, A.T. y Uchitel, O.D. (1996) Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology* **46**, 1391-1396.

Protti, D.A.; Szczupak, L.; Scornik, F.S. y Uchitel, O.D. (1991) Effect of ω -Conotoxina GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Research* **557**: 336-339.

- Pruneau, D. y Angus, J.A. (1990) Apparent vascular to cardiac sympatholytic selectivity of ω -conotoxin GVIA in the pithed rat. *Eur. J. Pharmacol.* **184**: 127-133.
- Pumplin, D.W. y Reese, T.S. (1978) Membrane ultrastructure of the giant synapse of the squid *Loligo pealei*. *Neuroscience* **3**: 685-696.
- Pumplin, D.W.; Reese, T.S. y Llinás, R. (1981) Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? *Proc Natl Acad Sci* **78**: 7210-7213.
- Quirion, R.; Dalpe, M. y Dam, T.V. (1986) Characterization and distribution of receptor for the atrial natriuretic peptide in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 174-180.
- Randall, A. y Tsien, R.W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **15**: 2995-3012.
- Rane, S.G. y Dunlap, K. (1986) Kinase C activator 1,2-oleoylacetyl glycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 184-188.
- Regan, L. J.; Sah, D.W.Y. y Bean, B.P. (1991) Calcium channel in rat central and peripheral neurons: high threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron* **6**: 269-280, 1991.
- Reuter, H. (1983) Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* **301**: 569-574.
- Reuveny, E.; Slesinger, P.A.; Inglese, J.; Morales, J.M.; Iniguez-Lluhi, J.A.; Lefkowitz, R.J.; Bourne, H.R.; Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1994) Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* **370**: 143-146.
- Rivier, J.; Galyean, R.; Gray, W.R.; Azimi-Zonooz, A.; McIntosh, J.M.; Cruz, L.J. y Olivera, B.M. (1987) Neuronal calcium channel inhibitors. Synthesis of ω -conotoxin GVIA and effects on ^{45}Ca uptake by synaptosomes. *J.biol.Chem.* **262**: 1194-1198.
- Rodriguez de Lores Arnaiz, G., Alberici de Canal, M. y De Robertis, E. (1972) Alteration of GABA system and Purkinje cells in rat cerebellum by the convulsant 3-mercaptopropionic acid. *J. Neurochem.* **19**: 1379-1385.
- Rodriguez de Lores Arnaiz, G.; Cardoni, R. y Peregrino de Iraldi, A. (1973) Levels of norepinephrine in rat cerebellum after administration of the convulsant 3-mercaptopropionic acid. *Intern. J. Neuroscience* **6**: 269-271.
- Rodriguez de Lores-Arnaiz, G. y De Robertis, E. (1972) Properties of the isolated nerve endings. *Current Topics in Membranes and Transport* **3**: 237-272.

- Ruskoaho, H. (1992) Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol. Rev.* **44**: 479-602.
- Sabato, U.C., Fiszer de Plazas, S. y De Robertis, E. (1979) The convulsant drugs 3-mercaptopropionate and methionine sulfoximine inhibit L-glutamate and L-aspartate binding to a hydrophobic protein fraction from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* **4**: 713-722.
- Sakamoto, M.; Nakao, K.; Kihara, M.; Morii, N.; Sugawara, A.; Suda, M.; Shimukura, M.; Kiso, Y.; Yamori, Y. y Imura, H. (1985) Existence of atrial natriuretic polypeptide in kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**: 1281-1287.
- Samson, W.K. (1985) Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. *Neuroendocrinology* **40**: 277-279.
- Sano, K.; Enomoto, K. y Maeno, T. (1987) Effects of synthetic ω -conotoxin, a new type Ca^{2+} antagonist, on frog and mouse neuromuscular transmission. *Eur. J. Pharmacol.* **141**, 235-241.
- Saper, C.B.; Standsert, D.G.; Currie, M.G.; Schwartz, D.; Geller, D.M. y Needleman, P. (1985) Atriopeptide-immunoreactivity neurons in the brain: presence in cardiovascular regulatory areas. *Science* **227**: 1047-1050.
- Sather, W.A.; Tanabe, T.; Zhang, J.F.; Mori, Y.; Adams, M.E. y Tsien, R.W. (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel α_1 subunit. *Neuron* **11**: 291-303.
- Schroeder, J.E.; Fischbach, P.S. y McCleskey, E.W. (1990) T-type calcium channels: heterogeneous expression in rat sensory neurons and selective modulation by phorbol esters. *J. Neurosci* **10**: 947-951.
- Schweitz, H.; Heurteaux, C.; Bois, P.; Moinier, D.; Romey, G. y Lazdunski, M. (1994) Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca^{2+} channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 877.
- Seidman, C.E.; Duby, A.D.; Choi, E.; Graham, R.M.; Haver, E.; Homcy, E.C.; Smith, J.A. y Seidman, J.G. (1984) The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by a complementary DNA clone. *Science* **255**: 324-326.
- Sheng, M. y Greenberg, M.E. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**: 477-485.

Sher, E. y Clementi, F. (1991) ω -conotoxin binding and effects on calcium in vertebrate cells. *Neuroscience* **42**: 301-307.

Shibasaki, T.; Naruse, M.; Naruse, K.; Masuda, A.; Kim, Y.S.; Imaki, T.; Yamauchi, N.; Demura, H.; Inagami, T. y Shizume, K. (1986) Atrial natriuretic factor is released from rat hypothalamus in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**: 590-595.

Silverman, A.J. y Zimmanman, E.A. (1983) Magnocellular secretory system. *Annu. Rev. Neurosci.* **6**: 357-380.

Simon S.M. y Llinás, R. (1985) Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. *Biophys. J.* **48**: 485-498.

Singer, D.; Biel, M.; Lotan, I.; Flockerzi, V.; Hofmann, F. y Dascal, N. (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**: 1553-1557.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85.

Smith, S.J. y Augustine, G.J. (1988) Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release *Trends Neurosci.* **11**: 458-464

Snutch, T.; Leonard, P.; Gilbert, M.; Lester, H. y Davidson, N. (1990) Rat brain express a heterogeneous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 3391-3395.

Snutch, T.P. y Reiner, P.B. (1992) Ca^{2+} channels diversity of form and function. *Cur Opin. Neurobiol.* **2**: 247-253.

Soong, T.W.; Stea, A.; Hodson, C.D.; Dubel, S.F.; Vincnet, S.R. y Snutch, T.P. (1993) Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* **260**: 1133-1136.

Sprince, H.; Parker, C.M.; Josephs, J. y Magazino, J. (1969) Convulsant activity of homocysteine and other short-chain mercaptoacids: protection therefrom. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **166**: 323-325.

Standaert, D.G.; cechetto, D.F.; Needleman, P. y Bader, C.B. (1987) Inhibition of the firing of vasopressin neurons by atropetin. *Nature* **329**: 151-153.

Stea, A.; Tomlinson, W.J.; Wah Soong, T.; Bourinet, E.; Dubel, S.J.; Vincent, S.R. y Snutch, T.P. (1994) Localization and fuctional properties of a rat brain α_{1A} calcium channel reflect similarities to neuronal *Q*- and *P*-type channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 10576-10580.

- Stingo, A.J.; Clavell, A.L.; Aarhus, L.L. y Burnett, J.C. (1992) Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. *Am. J. Physiol.* **262**: H308-H312.
- Stone, W.E. (1969) Action of convulsivants: neurochemical aspects. "Basic Mechanisms of the Epilepsies" Ed. Little Brown & Co, Boston. pp 184-193.
- Stults, J.T.; O'Connell, K.L.; Garcia, C.; Wong, S.; Engel, A.M.; Garbers, D.L. y Lowe, D.G. (1994) The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer. *Biochemistry* **33**: 11372-11381.
- Sudoh, T.; Minamino, N.; Kangawa, K. y Matsuo, H. (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 863-870.
- Suga, S.; Nakao, K.; Itoh, H.; Komatsu, Y.; Ogawa, Y.; Hama, N. y Imura, H. (1992) Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J. Clin. Invest.* **90**: 1145-1190.
- Sugimori, M. ; Cherksey, B. and Llinas, R. (1993) P-type calcium channels are responsive for transmission at the parallel and climbing fibers synapses in Purkinje cells *Soc Neurosci abst.* 627.16 .
- Sundsten, J.W. y Sawyer, C.H. (1961) Osmotic activation of neurohypophysial hormone release in rabbits with hypothalamic islands. *Exp. Neurol.* **4**: 548-561.
- Surprenant, A.; Shen, K.Z.; North, R.A. y Tatsumi, H. (1990) Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J. Physiol. Lond.* **431**, 585-608.
- Suszkiw, J.B.; Murawsky, M.M. y Fortner, R.C. (1987) Heterogeneity of presynaptic calcium channels revealed by species differences in the sensitivity of synaptosomal Ca entry to ω -conotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 1283-1286.
- Takahashi, T. y Momiyama, A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* **366**: 156-158.
- Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K. y Nishizuka, Y. (1982) Counteraction of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase activation by adenosine 3'5'-monophosphate in platelets. *J. Biochem.* **91**: 403-406.

Takayanagi, K.; Tanaka, A.W.; Maki, M. y Inagami, T. (1985) Effects of changes in water-sodium balance on levels of atrial natriuretic factor messenger RNA and peptide in rats. *Life Sci.* **36**: 1843-1848.

Takemura, M.; Kiyama, H.; Fukui et al. (1988) Autoradiographic visualization in rat brain of receptors for W-conotoxin-GVIA, a newly discovered calcium antagonist. *Brain Res.* **451**:386-389.

Taupin, P.; Zini, S.; Cesselin, F.; Ben-Ari, Y. y Soisin, M.P. (1994) Subcellular Fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: morphological and biochemical characterization in control and degranulated rat hippocampus. *J. Neurochem.* **62**: 1586-1594.

Thomas, M.; Puligandla, P. y Dunn, S. (1994) Effects of calcium channel blockers on the kinetics of voltage-dependent changes in synaptosomal calcium concentrations. *Brain Res.* **635**: 9-17.

Tottene, A.; Moretti, A. y Pietrobon, D. (1996) Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J. Neurosci.* **16**: 6353-6363.

Tsakiridou, E.; Bertollini, L.; de Curtis, M.; Avanzini, G. y Pape, H.C. (1995) Selective increase in T-type conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J. of Neurosci.* **15**: 3110-3117.

Tsien, R.W., Lipscombe, D.; Madison, D.V; Bley, K.R. y Fox, A.P. (1988) Multiple types of neuronal calcium and their selective modulation. *Trends in Neurosci.* **11**, 431- 438 .

Tsien, R.W.; Bean, B.P.; Hess, P.; Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC (1986) Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **18**: 691-710.

Tsien, R.W.; Ellinor, P.T. y Horne, W.A. (1991) Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 349-354.

Turner, T.J.; Adams, M.E. y Dunlap, K. (1993) Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9518-9522.

Turner, T.T.; Adams, E.A. y Dunlap, K. (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by ω -AGA-IVA. *Science* **258**: 310-313.

Uchitel, O.D.; Protti, D.A.; Sanchez, V.; Cherksey, B.D, Sugimori, M. y Llinás, R.R. (1992) P-type voltage dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3330-3333.

Usovicz, M.; Sugimori, M.; Cherksey, B. y Llinás, R. (1992) P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **9**: 1185-1199.

Vatta, M.S.; Bianciotti, L.G. y Fernandez, B.E. (1993a) Influence of atrial natriuretic factor on uptake, intracellular distribution, and release of norepinephrine in rat adrenal medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**: 195-200.

Vatta, M.S.; Papouchado, M.L.; Bianciotti, L.G. y Fernandez, B.E. (1993b) Atrial natriuretic factor inhibits norepinephrine release in the presence of angiotensin II and III in the rat hypothalamus. *Comp. Biochem. Physiol.* **106**: 545-548.

Vatta, M.S.; Papouchado, M.L.; Bianciotti, L.G.; Locatelli, A. y Fernandez, B.E. (1994b) Atrial natriuretic factor modifies norepinephrine release in a sodium-free medium. *J. Auton. Pharmacol.* **14**: 267-273.

Vatta, M.S.; Papouchado, M.L.; Locatelli, A.S.; Bianciotti, L.G. y Fernandez, B.E. (1992) Effects of atrial natriuretic factor on norepinephrine release in the rat hypothalamus. *Regulatory Peptide* **41**: 171-181.

Vatta, M.S.; Rodriguez-Fermepín, M.; Bianciotti, L.G.; Perazzo, J.; Monserrat, A. y Fernandez, B.E. (1995) Atrial natriuretic factor enhances norepinephrine uptake in circuloventricular organs, locus coeruleus and nucleus tractus solitarii of the rat. *Neurosci. Lett.* **197**: 29-32.

Vatta, M.S.; Travaglianti, M.; Bianciotti, L.G.; Coll, C.; Perazzp, J. y Fernandez, B.E. (1994) Atrial natriuretic factor effects on norepinephrine uptake in discrete telencephalic and diencephalic nuclei of the rat. *Brain Res.* **646**: 324-326.

Venema, V.J.; Swiderek, K.M.; Lee, T.D.; Hathaway, G.M. y Adams, M.E. (1992) Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of ω -agatoxins. *J.Biol.Chem.* **267**: 2610-2615.

Wagner, J.A.; Snowman, A.M.; Biswas, A.; Olivera, B.M. y Snyder, S.H. (1988) ω -Conotoxin GVIA binding to a high-affinity receptor in brain: characterization, calcium sensitivity, and solubilization. *J. Neurosci.* **8**: 3354-3359.

Waldman, S.A. y Murad, F. (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* **39**: 163-196.

Walter, H.; Brooks, D.E. y Fisher, D. (1985) in *Partitioning in Aqueous Two-Phase System: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*. Academic Press, Orlando, Florida.

- Wang, G. y Lemos, J.R. (1994) Effects of funnel web spider toxin on Ca^{2+} currents in neurohypophysial terminals. *Brain Res.* **663**: 215-222
- Welling, A.; Kwan, Y.W.; Bosse, E.; Flockerzi, V.; Hofmann, F. y Kass, R.S. (1993) Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels. Molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ. Res.* **73**: 974-980.
- Wessler I Hellwig D, Racke K et al. (1990) Epithelium-derived inhibition of [3H]acetylcholine release from the isolated guinea-pig trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **342**: 387-393.
- Wessler I.; Dooley D.J.; Osswald, H. y Schlemmer, F. (1990a) Differential blockade by nifedipine and ω -conotoxin GVIA of α -1 and β -1 adrenoceptor-controlled calcium channels on motor nerve terminals in the rat. *Neurosci. Lett.* **108**: 173-178
- Westenbroek, R.E.; Ahljianian, M.K. y Catterall, W.A. (1990) Clustering of L-type Ca^{2+} channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* **347**: 281-284.
- Westenbroek, R.E.; Hell, J.N.; Warner, C.; Dubel, S.J.; Snutch, T.P. y Catterall, W.A. (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel α 1 subunit. *Neuron* **9** 1099-115.
- Westenbroek, R.E.; Sakurai, T.; Elliott, E.M.; Hell, J.W.; Starr, T.V.; Snutch, T.P. y Catterall, W.A. (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the α 1A subunits of brain calcium channels. *J. Neurosci.* **15**: 6403-6418
- White, G.; Lovinger, D.M. y Weight, F.F. (1989) Transient low threshold calcium current triggers burst firing through and afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc. Natl Acad. Sci USA* **86**: 6802-6806.
- Whittaker, V.P. (1968) The morphology of fraction of rat forebrain synaptosomes separated on continuous sucrose. *Biochem. J.* **106**: 412-417.
- Whittaker, V.P. (1969) The synaptosome, in *Handbook of Neurochemistry* Vol 2 (Lajtha A., ed.), pp. 327-364. Plenum. Press, New York.
- Williams, M.E.; Brust, P.F.; Feldman, D.H. Patthi, S.; Simerson, S.; Maroufi, A.; McCue, A.F.; Velicelebi, G.; Ellis, S.B. y Harpold, M.M. (1992) Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* **257**: 389-395.
- Witcher DR, De Waard M, Campbell KP Characterization of the purified N-type Ca^{2+} channel and the cation sensitivity of omega-conotoxin GVIA binding. *Neuropharmacology* **32**: 1127-1139.

- Wolff, D.A. (1975) The separation of cells and subcellular particles by colloidal-a silica density centrifugation, in *Methods in Cell Biology*, Vol. 10 (prescott DM., ed.) Academic Press, New York.
- Wong, S.K.; Ma, C.; Foster, D.C.; Chen, A. y Garbers, D.L. (1995) The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in absence of other protein. *J. Biol. Chem.* **270**: 30818-30822.
- Xiang, J.Z.; Morton, J.; Brammer, M.J. y Campbell, I.C. (1990) Regulation of calcium concentration in synaptosomes: α_2 -adrenoceptors reduce free Ca^{2+} by closure of N-type Ca^{2+} channels. *J. of Neurochem.* **55**: 303-310.
- Young, A.B. y Fagg, G.E. (1990) Excitatory amino acid receptors in the brain : membrane binding and receptor autoradiographic approaches . *Trend Pharmacol Sci* **11**: 126-133.
- Zafra, F.; Hengerer, B.; Leibrock, J.; Thoenen, H. y Lindholm, D. (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* **9**: 3545-3550
- Zhang, J.; Randall, D.; Ellinor, P.; Horne, W.A.; Sathwer, W.A.; Tanabe, T.; Shwarz, T.L. y Tsein, R.W. (1993) Distintive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**, 1075-1088.
- Zhou, X-B.; Ruth, P.; Schlossmann, J.; Hofmann, F. y Korth, M. (1996) Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca^{2+} -activated K^+ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **33**: 19760-19767.
- Zhu, Y. y Ikeda, S.R. (1993) Adenosine modulates voltage-gated Ca^{2+} channels in adult rat sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* **70**: 610-620.
- Zucker, R.S. y Fogelson, A.L. (1986) Relationship between transmitter release and presynaptic calcium influx when calcium enters through discrete channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 3032-3036.

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AM	azul de metileno
ANP	péptido atrial natriurético
ATP	adenosina trifosfato
AV3V	región anteroventral del tercer ventrículo
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CCVD	canales de Ca ²⁺ voltaje-dependientes
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
CNP	péptido natriurético tipo C
DHP	dihidropiridinas
GTP	guanosina trifosfato
NA	noradrenalina
NPR	receptores para los péptidos natriuréticos
NPR-A	receptores tipo A para los péptidos natriuréticos
NPR-B	receptores tipo B para los péptidos natriuréticos
NPR-C	receptores tipo C para los péptidos natriuréticos
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PKG	proteína quinasa dependiente de cGMP
SNC	sistema nervioso central
ω -Aga IVA	ω -Agatoxina IVA
ω -CgTx GVIA	ω -Conotoxina GVIA
ω -CgTx MVIIC	ω -Conotoxina MVIIC
ω -CgTx MVIID	ω -Conotoxina MVIID