

Tesis Doctoral

# Alteraciones en la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L) y su modulación por drogas antiepilépticas

Di Guilmi, Mariano Nicolás

2012-03-02

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

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

Cita tipo APA:

Di Guilmi, Mariano Nicolás. (2012-03-02). Alteraciones en la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L) y su modulación por drogas antiepilépticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Di Guilmi, Mariano Nicolás. "Alteraciones en la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L) y su modulación por drogas antiepilépticas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-03-02.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Alteraciones en la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L) y su modulación por drogas antiepilépticas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Lic. Mariano Nicolás Di Guilmi**

Director de tesis: Prof. Dr. Osvaldo Daniel Uchitel

Consejero de Estudios: Prof. Dr. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: IFIBYNE, UBA-CONICET

Buenos Aires, 2012

## **Alteraciones en la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L) y su modulación por drogas antiepilépticas**

### **Resumen**

Ratones transgénicos (*knock-in*, KI) con mutaciones del canal de calcio P/Q fueron utilizados como modelos murinos de Migraña Hemipléjica Familiar tipo I. Se estudiaron mediante técnicas de *patch-clamp* (*whole cell*) las corrientes de calcio presinápticas (IpCa) en los terminales nerviosos gigantes del caliz de Held y las corrientes postsinápticas en las neuronas que este inerva. En los KI S218L se observó la activación de las IpCa hacia potenciales más hiperpolarizados y una reducción de la amplitud de la corriente de calcio siendo esto último dependiente de la duración de la repolarización del potencial de acción. A pesar de la reducción de las IpCa las corrientes postsinápticas evocadas están incrementadas así como la frecuencia pero no la amplitud de las espontáneas indicando la existencia de un ingreso continuo de calcio al terminal presináptico, posible generador de cambios en la maquinaria de liberación responsable de la ganancia de función observada.

La droga antiepiléptica pregabalina estudiada sobre ratones normales mostró ser efectiva en disminuir la liberación evocada a través de la reducción de la amplitud de las IpCa y de la remoción de su inactivación. La mayor tasa de inactivación observada en el KI R192Q fue absolutamente removida por la pregabalina.

**Palabras claves:** cáliz de Held; migraña; S218L; pregabalina; corriente de calcio P/Q; *patch-clamp*; transmisión sináptica excitatoria.

## **Synaptic transmission alterations on transgenic mice model of migraine (S218L) and its modulation by antiepileptic drugs**

### **Abstract**

Transgenic mice models (knock-in, KI), with the human mutation on the P/Q calcium channels were used as model of Familial Hemiplegic Migraine type-1. Using patch-clamp (whole-cell) recordings, it was studied presynaptic calcium currents (IpCa) at the calyx of Held and postsynaptic currents onto principal cells of the MNTB. It was observed a shift of the I-V curve to more negative potentials on KI mice and a reduction of calcium currents (IpCa) depending on the shape of action potentials. Despite the reduction of IpCa, both amplitude of excitatory postsynaptic currents and frequency of miniature events were enhanced (without changes on its amplitude). These data suggest a continuous calcium influx at resting membrane potential which might be responsible to enhance transmitter release and its possible gain of function.

The anticonvulsant medication pregabalin was tested on WT mice showing a reduction of postsynaptic currents by reduction of IpCa and removing its inactivation. It was observed that inactivation rate of IpCa in KI R192Q was larger in KI than WT and it was completely recovered after PGB application.

**Keywords:** calyx of Held; migraine; S218L; pregabalin; P/Q calcium currents; patch-clamp; excitatory synaptic transmission

## **Agradecimientos**

Al *Dr. Osvaldo Uchitel*, a quien le agradezco profundamente el haberme abierto las puertas de su laboratorio y un gran camino para mi futuro académico. Quien me ayudo a crecer y quien me supo guiar en mi “juventud” científica.

A *Carlota*, quien me acompañó desde mis inicios en el laboratorio. A quien le debo mis conocimientos de patch e incansables ayudas, desde los experimentos hasta sus preocupaciones por mi descanso.

A *Francisco Urbano*, con quien pude madurar y discutir muchos aspectos científicos. Quien ha colaborado en mi formación y guiado intelectualmente.

A *María Eugenia*, quien supo acompañarme con mis locuras, corridas y pequeñas obsesiones y con quien compartimos más que una línea de trabajo, una amistad.

A la *Dr. Lidia Szczupak*, quien ha sido mi consejera de estudios y mentora de que yo eligiera neurociencias como área científica muchos años atrás.

A los *miembros del LFBM*, directores, becarios y técnicos, quienes a diario hacen del laboratorio un lugar de alto nivel para poder desarrollar trabajos de gran nivel científico.

A mis *compañeros del labo* (pasados y presentes): Paula P, Paula F, Barby, Elisa, Itatí, Laura, Joaquin, Yani, Vero, Belén, Carina, Noelia, Lucas, Roberto, Natalia, Hernan y Ramona; con quienes compartimos seminarios, discusiones, muchos mates y buenos momentos. En especial a Andres, por las charlas nocturnas y discusiones científicas.

Al *Prof. Ian Forsythe*, quienes ha posibilitado mi estancia corta en el exterior y con quien hemos compartido discusiones científicas relacionadas a el proyecto desarrollado en esta tesis.

Al *Prof. Gerard Borst*, quien gentilmente ofreció su laboratorio para desarrollar parte de esta tesis y quien colaboró con sus comentarios en este proyecto.

A los *amigos de la facu*: Isa, Vani, Silvina y muy especialmente a Sabo, Dami, Ari, Andy con quienes compartimos muchísimas cosas durante la carrera y que desde allá al inicio veíamos este momento muy lejano.

A *Inés y Mateo*, mis dos amores y las dos sonrisas que me reciben a diario en casa. Quienes me brindan cotidianamente su amor y apoyo incondicional. Amor, simplemente gracias...

A mi *familia*: mamá, papá, Agustín, suegra y cuñada. Quienes han estado muy cerca colaborando y brindándome a diario su apoyo. En especial quería agradecer a mi mamá quien ha sido, desde mi niñez, el motor en la investigación.

*A mis dos amores,  
Inés y Mateo*

## Abreviaturas

**aCSF:** cerebrospinal fluid (fluido cerebroespinal artificial)

**aVCN:** anterior cochlear ventral nucleus (núcleo coclear ventral)

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico

**CCDV:** canales de calcio voltaje-dependiente

**CSD:** cortical spreading depression (propagación de la depresión cortical)

**EPSC:** Excitatory post-synaptic current (corriente post-sináptica excitatoria)

**FHM:** familial hemiplegic migraine (migraña hemipléjica familiar)

**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutirico

**HVA:** high voltage activated (canales de calcio de alto umbral de activación)

**IpCa:** corriente de calcio presinaptica

**IP:** inter-pulso

**Isol:** Isoleucina

**I-V:** relacion corriente voltaje

**KI:** knock-in

**KO:** knock-out

**LSO:** lateral superior olive (oliva superior lateral)

**LVA:** low voltage activated (canales de calcio de bajo umbral de activación)

**mEPSC:** miniature EPSC (corriente post-sináptica excitatoria miniaturas)

**MSO:** medial superior olive (oliva superior medial)

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**PA:** potencial de acción

**PGB:** pregabalina

**PP:** pre-pulso

**Pr:** probabilidad de liberación

**PT:** pulso test

**STD:** short-term depression (depresión a corto término)

**WT:** wild-type

## **Consideraciones generales**

La siguiente tesis ha sido desarrollada en su mayor extensión en el laboratorio dirigido por el Prof. Dr. Osvaldo D. Uchitel. Sin embargo una parte del trabajo (la correspondiente al estudio de las propiedades biofísicas de las corrientes de calcio en el modelo transgénico S218L, Capítulo I) ha sido desarrollado en el laboratorio "Synaptic transmission in the auditory brainstem and midbrain" dirigido por el Prof. Dr. J. Gerard Borst (vicedirector del Departamento de neurociencias, Erasmus MC, Rotterdam, Holanda).

Parte de los resultados desarrollados en el Capítulo II han sido publicados el trabajo titulado: "Pregabalin modulation of neurotransmitter release is mediated by change in intrinsic activation/inactivation properties of Ca(v)2.1 calcium channels", en el Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 336, 973-982. (2011). Di Guilmi, M.N., Urbano, F.J., Inchauspe, C.G., and Uchitel, O.D.



## INDICE GENERAL

<b>Introducción general</b> .....	1
Aspectos generales.....	1
Pooles de vesículas sinápticas.....	2
Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV).....	3
Canales de calcio $Ca_v2.1$ .....	5
Rol de los Canales de calcio en la fisiología sináptica.....	8
Los canales de calcio dependientes de voltaje y el acoplamiento entre la exocitosis y la endocitosis.....	8
Alteraciones sinápticas mediadas por canales de calcio.....	9
Canalopatías.....	9
Neurobiología de la migraña.....	9
Migraña hemipléjica familiar.....	11
Epilepsia.....	15
Modelo de sinapsis.....	17
Función del cáliz de Held en el circuito del tallo cerebral.....	17
La sinapsis del cáliz de Held.....	18
Hipótesis y Objetivos.....	21
<b>Materiales y Métodos</b> .....	23
Modelo biológico.....	23
Rodajas de tallo encefálico.....	23
Tipificación de animales.....	23
Registros electrofisiológicos en rodajas de tallo encefálico.....	24
Farmacología.....	26
<b>Capítulo I: Alteraciones de la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L)</b> .....	27
Introducción I.....	27
Modelos transgénicos KI.....	28

Resultados I.....	30
Alteraciones de las propiedades biofísicas de los canales de calcio Ca <sub>v</sub> 2.1 en KI S218L.....	30
La corriente de calcio generada por un potencial de acción se encuentra reducida en el KI S218L. Implicaciones fisiológicas.....	32
Reducción de la facilitación de la corriente de calcio en el S218L.....	33
La duración del PA limita la aparición de diferencias en la IpCa entre genotipos.....	34
Alteraciones en los eventos sinápticos excitatorios: miniaturas espontáneos y corrientes evocadas.....	35
EPSCs a baja y alta frecuencia de estimulación.....	37
El aumento en calcio residual presináptico acelera la recuperación de las EPSCs luego de STD en los KI S218L.....	41
Probabilidad de liberación vesicular.....	42
La transmisión sináptica en condiciones experimentales similares a la fisiológicas se ve incrementada en el S218L.....	43
Discusión I.....	45
Modelo.....	48
<b>Capítulo II: La liberación de neurotransmisor mediada por pregabalina es mediada por cambios intrínsecos en las propiedades de los canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.1.....</b>	<b>50</b>
Introducción II.....	50
Sitio de unión de la PGB.....	51
Modulación aguda de los canales de calcio por PGB y su acción sobre la transmisión sináptica.....	51
Resultados II.....	54
Efecto agudo de PGB sobre las corrientes post-sinápticas excitatorias (EPSCs).....	54
Modulación aguda de las corrientes de calcio presinápticas (IpCa) por PGB.....	56
Las propiedades de activación de las corrientes de calcio son blanco de acción de la PGB.....	59

Efectos agudos de la PGB sobre las corrientes de calcio generadas por PA.....	63
Efecto de la PGB sobre la neurotransmisión a alta frecuencia: Depresión vs. Recuperación.....	65
Discusión II.....	67
<b>Capítulo III: Modulación presináptica de pregabalina sobre los canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.1 alterados por la mutación R192Q.....</b>	<b>70</b>
Introducción III.....	70
Resultados III.....	73
La inactivación de la IpCa en R192Q es mayor que en el WT y puede ser suprimida por la PGB.....	73
El efecto de la PGB en el KI R192Q está mediado por la forma del PA....	74
Discusión III.....	76
<b>Discusión general.....</b>	<b>77</b>
Consideraciones generales.....	77
Aportes en el campo de las canalopatías.....	77
Desbalance sináptico (excitación/inhibición) como potencial generador de la propagación de la depresión cortical y otras alteraciones corticales.....	79
Mecanismo de acción de la PGB.....	81
Posible acción antiepiléptica de la PGB.....	82
Potencial acción de la PGB en la patología migrañosa.....	83
Perspectivas a futuro.....	84
<b>Referencias.....</b>	<b>85</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>103</b>



## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura I.</b> Estructura general de los canales de calcio sensibles a voltaje.....	3
<b>Figura II.</b> Estructura de subunidades y regulación de los canales de calcio.....	4
<b>Figura III.</b> Secuencia de reacciones que conducen la transmisión sináptica.....	8
<b>Figura IV.</b> Alteraciones en las propiedades biofísicas de los canales de calcio generadas por los sistemas de expresión.....	13
<b>Figura V.</b> Localización de las mutaciones de FHM1 en la estructura secundaria de la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio $Ca_v2.1$ .....	14
<b>Figura VI.</b> Mutaciones del canal $Ca_v2.1$ en pacientes con FHM1.....	14
<b>Figura VII.</b> Componente genético de la epilepsia sobre el canal de sodio.....	16
<b>Figura VIII.</b> La sinapsis del cáliz de Held en el circuito del tallo encefálico auditivo.....	19
<b>Figura IX.</b> Fotografía de la preparación experimental (rodaja y sinapsis).....	19
<b>Figura 1.1.</b> Las propiedades biofísicas de los canales de calcio son diferentes en cálices provenientes del KI S218L.....	31
<b>Figura 1.2.</b> La mutación S218L cambia la inactivación en estado estacionario...	32
<b>Figura 1.3.</b> La $I_pCa$ evocada por un potencial de acción es reducida en KI.....	33
<b>Figura 1.4.</b> Reducción de la facilitación de la corriente de calcio en el modelo S218L.....	33
<b>Figura 1.5.</b> La forma del PA suprime las diferencias en el influjo de calcio entre el WT y KI.....	35
<b>Figura 1.6.</b> La frecuencia de las miniaturas (mEPSC) está aumentadas en el animal transgénico.....	36
<b>Figura 1.7.</b> La respuesta postsináptica esta aumentada en el KI.....	37
<b>Figura 1.8.</b> Depresión y recuperación sináptica a baja (10 Hz) y alta (100-300 Hz) frecuencia de estimulación.....	39
<b>Figura 1.9.</b> Amplitudes absolutas de las EPSCs en los trenes de STD.....	40
<b>Figura 1.10.</b> El calcio residual presináptico se encuentra incrementado en el S218L.....	42
<b>Figura 1.11.</b> El estado sináptico predeprimido induce una mayor facilitación en el S218L que en el WT.....	43
<b>Figura 1.12.</b> Probabilidad de liberación.....	44
<b>Figura 1.13.</b> Modelo propuesto para las alteraciones sinápticas conferidas por la mutación S218L .....	49

<b>Figura 2.1.</b> Fórmula molecular de gabapentoides.....	50
<b>Figura 2.2.</b> La pregabalina (PGB) reduce los EPSCs.....	55
<b>Figura 2.3.</b> La frecuencia de los miniaturas, pero no la amplitud, fue reducida por PGB.....	56
<b>Figura 2.4.</b> Modulación aguda de la corriente de calcio presinápticas por PGB...	57
<b>Figura 2.5.</b> La Isoleucina no tiene efecto ni sobre la amplitud ni sobre la inactivación de la IpCa.....	58
<b>Figura 2.6.</b> Efecto de la PGB (500 $\mu$ M) sobre las constantes cinéticas de activación y desactivación de las corrientes de calcio.....	59
<b>Figura 2.7.</b> PGB recupera de la inactivación las corrientes presinápticas sin alterar su activación voltaje-dependiente.....	61
<b>Figura 2.8.</b> Los procesos calcio-dependientes son modificados en presencia de bario ( $Ba^{2+}$ ) como transportador de carga.....	62
<b>Figura 2.9.</b> PGB cambia la inactivación en estado estacionario de las corrientes de calcio. ....	63
<b>Figura 2.10.</b> La PGB reduce la facilitación de la corriente de calcio durante pulsos pareados y trenes de alta frecuencia de potenciales de acción.....	64
<b>Figura 2.11.</b> La PGB acelera la recuperación de la neurotransmisión excitatoria a alta pero no a baja frecuencia.....	66
<b>Figura 3.1.</b> Curva I-V en el modelo R192Q.....	70
<b>Figura 3.2.</b> Potencial de acción evocando las corrientes de calcio presinápticas en el modelo R192Q y las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) de las células principales del MNTB estudiadas el mismo modelo transgénico.....	71
<b>Figura 3.3.</b> Corriente de calcio en el cáliz de Held evocada por potenciales de acción de larga duración registrados en células piramidales (PCs).....	71
<b>Figura 3.4.</b> PGB remueve la inactivación de la IpCa en el KI R192Q al igual que lo hace en el WT.....	73
<b>Figura 3.5.</b> PGB solo tiene efecto frente a PA anchos.....	75
<b>Figura Anexo 1.1.</b> Generación del ratón KI Cacna1a S218L.....	103
<b>Figura Anexo 1.2.</b> Bando específico del producto de PCR digerido por la enzima de restricción.....	105
<b>Tabla I.</b> Clasificación de los canales de calcio y su rol fisiológico.....	5
<b>Tabla 2.1.</b> Porcentajes de depresión sináptica y constantes de decaimiento de la STD y recuperación.....	38
<b>Tabla 2.2.</b> Constantes de recuperación de la STD en ausencia o presencia de EGTA-AM.....	41



# ***Introducción y Objetivos***



## ***Introducción General***

### ***Aspectos generales***

Las neuronas son células altamente especializadas. Al igual que las células musculares, se las considera excitables dado que frente a la llegada de un estímulo, estas responden cambiando sus propiedades eléctricas de membrana. Las neuronas utilizan dos tipos de señales eléctricas de membrana: potenciales localizados y potenciales de acción (PA). Los potenciales localizados son potenciales graduados que permiten a células nerviosas individuales desarrollar sus funciones de integración e iniciar el potencial de acción. Los PA son impulsos regenerativos que son conducidos rápidamente durante largas distancias sin atenuación. Estos dos tipos de potenciales son el lenguaje universal de las células nerviosas en todos los animales que han sido estudiados.

El cambio eléctrico generado se propaga en la mayoría de los casos a través de sus prolongaciones (dendritas y axones). Las neuronas pueden codificar informaciones complejas dentro de un sistema simple de señales eléctricas. Estas señales consisten en cambios del potencial eléctrico de membrana producido por el flujo de corriente iónica a través de canales ubicados en la membrana plasmática. Estas corrientes son principalmente llevadas a cabo por el movimiento a través de la membrana de iones como el sodio, el potasio y el cloro.

La comunicación entre dos o más neuronas se denomina sinapsis, la cual se define como la relación funcional de contacto entre las terminaciones de una célula nerviosa con otra célula que puede ser tanto nerviosa, glandular o muscular. En el espacio sináptico, las células se aproximan sin que exista una continuidad entre sus membranas plasmáticas donde ocurre la transferencia de la información entre la célula que la emite (presinápsis) y aquella que la recibe (postsinápsis).

Las sinapsis pueden dividirse en eléctricas y químicas de acuerdo al mecanismo de transferencia de información. En las sinapsis eléctricas, las membranas pre y postsinápticas establecen uniones estrechas, sin fusionarse, donde se forman estructuras proteicas que permiten el libre flujo de iones desde el citoplasma del terminal presináptico hacia el citoplasma del terminal postsináptico. De esta manera, el impulso nervioso que llega a la célula nerviosa presináptica estimula directamente a la

célula postsináptica. Por el contrario, las sinapsis químicas establecen la comunicación entre células separadas entre sí por un espacio de unos 20-50 nanómetros llamado hendidura sináptica. El impulso nervioso llega a la célula nerviosa presináptica y desencadena la liberación de una sustancia llamada neurotransmisor que difunde a través de la hendidura sináptica hacia la célula postsináptica. Los receptores proteicos que se encuentran en la membrana postsináptica se unen a los neurotransmisores produciendo la apertura de canales iónicos (ionotrópicos) o desencadenando una cadena de segundos mensajeros (metabotrópicos) a fin de generar la transmisión del impulso nervioso.

En las sinapsis químicas, el terminal presináptico contiene la maquinaria molecular necesaria para funcionar como un compartimento subcelular autónomo altamente especializado en el tráfico local y el reciclado de las vesículas sinápticas que contienen diferentes sustancias o neurotransmisores.

### ***Pooles de vesículas sinápticas***

El concepto de *pooles* vesiculares establece poblaciones de vesículas que se encuentran en diferentes estados de disponibilidad de liberación y que, una vez liberadas, los respectivos *pooles* vesiculares son repuestos a una tasa específica.

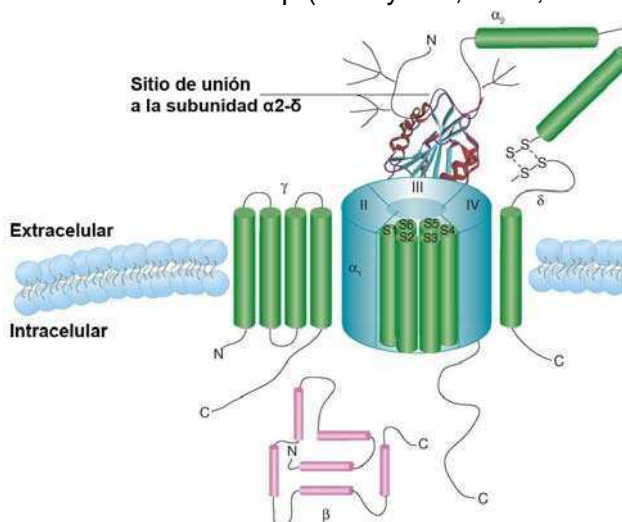
Cuando un terminal nervioso es estimulado repetitivamente a una alta frecuencia, la liberación cae dramáticamente y alcanza eventualmente un nivel bajo de liberación constante (Sudhof, 2004). La depresión sináptica durante la estimulación a alta frecuencia refleja la depleción de aquellas vesículas sinápticas que estaban listas para ser liberadas. El nivel de liberación constante que se alcanza luego de la depresión, corresponde a la tasa de reposición de las vesículas que conformaban ese *pool* vesicular listo para ser liberado (RRP, *readily releasable pool*), ya sea a través de su reciclado o por reclutamiento desde un *pool* vesicular de reserva (RP, *reserve pool*). El número total de vesículas que participan en la exocitosis y endocitosis durante la estimulación prolongada es referido como el *pool* de reciclado. Este *pool* está compuesto por el RRP y el RP. En algunas sinapsis ha sido identificado un tercer *pool* de reposo que contiene vesículas que no son recicladas (Sudhof, 2000). La funcionalidad de este *pool* no ha sido aún determinada.

La tasa de reposición de las vesículas del RRP es un parámetro crítico para determinar la repuesta de la sinapsis ante una estimulación repetitiva. Por lo tanto, la

tasa y la vía por la cual las vesículas del RRP son repuestas determinan la eficacia presináptica y varias formas de plasticidad sináptica a corto y largo término. El número de vesículas que contiene el RRP regula la probabilidad de liberación ( $Pr$ ), la cual es definida como la probabilidad que un potencial de acción presináptico resulte en un evento de exocitosis. Sin embargo, existen discrepancias para definir que *pool* o que parámetros del *pool* de liberación (como ser la  $Pr$ ) se ven alterados durante una estimulación repetitiva (Schneppenburger y col., 2002). Dependiendo de las condiciones experimentales e historia previa de la célula, se postulan diversos mecanismos entre los cuales se propone que durante una fase de depresión sostenida, se movilizan vesículas dentro de un mismo *pool* con distintas  $Pr$  (Wu y Borst, 1999), o como contrapartida, se movilizan diferentes *pooles* (Muller y col., 2010).

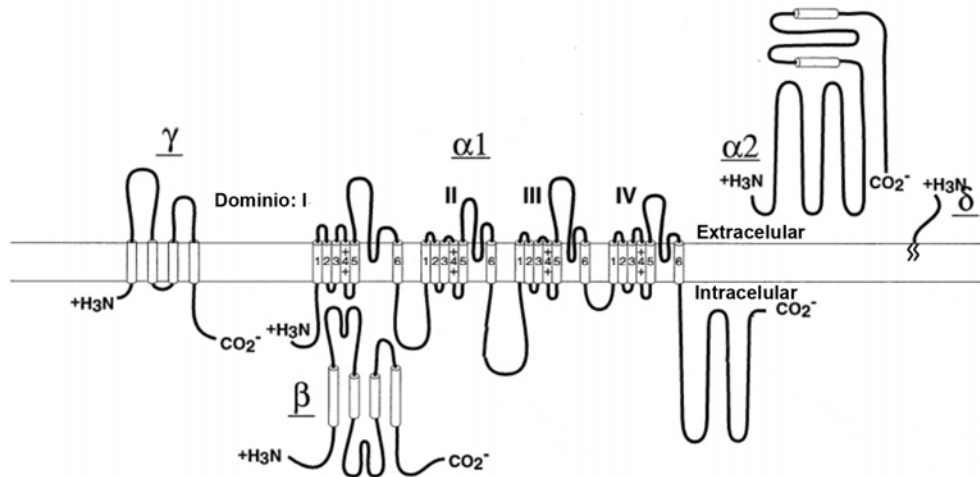
### **Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)**

El calcio entra al terminal sináptico a través de canales de calcio que poseen propiedades biofísicas que dependen del voltaje. Los canales de calcio, son complejos de proteínas heteroméricas formadas por la asociación de múltiples subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , Fig. I) anclados a membrana. En los canales de calcio, al igual que otros canales dependientes de voltaje, estas subunidades (o dominios) pueden ser tanto regulatorias ( $\alpha 1$ ) como accesorias ( $\alpha 2$ - $\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Estas subunidades son responsable de modular las propiedades biofísicas de los canales las cuales comprenden desde el sensado de voltaje por medio del la subunidad regulatorio  $\alpha 1$  (Lacerda y col., 1991, Singer y col., 1991) hasta la expresión en membrana del canal, mediado por la subunidad accesoria  $\beta$  (Felix y col., 1997; Bichet y col., 2000; Sokolov y col., 2000).



**Figura I. Estructura general de los canales de calcio sensibles a voltaje.** Estos canales son proteínas multimericas que comprenden una subunidad principal  $\alpha 1$  y diferentes subunidades auxiliares como la  $\alpha 2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha 2$  es uno de los principales sitios de interacción con otras proteínas o fármacos. La subunidad  $\alpha 1$  constituye el poro permeable a los iones y es donde se encuentra el sensor de voltaje. Esta tiene cuatro dominios homólogos (I-IV) cada uno compuesto por seis hélices transmembrana (S1-S6) donde la cuarta hélice constituye el sensor de voltaje. La subunidad  $\alpha 2$  está altamente N-glicosilada y la unión entre el dominio  $\alpha 2$  y  $\delta$  es mediante dos puentes disulfuro. La subunidad  $\beta$  es una proteína intracelular que media la modulación de los canales de calcio por kinasas intracelulares. La subunidad  $\gamma$  está glicosilada y posee cuatro segmentos transmembrana. (Sacado de Dooley, 2007).

En particular, el poro que forma la subunidad  $\alpha 1$  de los canales de calcio (Fig. II) está constituido por repeticiones de cuatro dominios internos (I-IV), los cuales consisten en seis segmentos trans-membrana  $\alpha$ -hélices (S1-S6) y un *loop* intracelular que conecta los segmentos S5 y S6 (Catterall, 2000). La subunidad  $\alpha 1$  determina la propiedad funcional más importante del canal, el sensado de los cambios de voltaje a través de la membrana, y define al subtipo de canal (Catterall, 2000), mientras que las otras subunidades modulan sus propiedades biofísicas (Walker y De Waard, 1998).



**Figura II. Estructura de subunidades y regulación de los canales de calcio.** La estructura de las subunidades de los canales de calcio está ilustrada como modelos de plegados transmembrana. Las  $\alpha$  hélices están expresadas como cilindros y la longitud de las líneas correlaciona con el tamaño aproximado de las cadenas polipeptídicas. Las líneas en zigzag en la subunidad  $\delta$  representan su anclaje a la membrana mediante glicosfosfatidilinositol. (Adaptado de Catterall, 2000 y 2011).

La clasificación de estos canales puede ser dividida de acuerdo a diferentes criterios que comprenden sus propiedades farmacológicas, genéticas y/o electrofisiológicas.

El estudio farmacológico de los CCDV ha sido realizado utilizando toxinas específicas y compuestos orgánicos o inorgánicos que bloquean los canales selectivamente (Tabla I). Actualmente, los CCDV han sido clasificados de acuerdo a las homologías genéticas de su subunidad  $\alpha 1$ :  $Ca_v1.1$  a 1.4,  $Ca_v2.1$  a 2.3 y  $Ca_v3.1$  a 3.3. Electrofisiológicamente, se clasifican en canales de calcio dependientes de voltaje de alto umbral de activación (en inglés *high voltage activated*, HVA) y de bajo umbral de activación (*low voltage activated*, LVA). Los primeros están constituidos por la asociación de múltiples subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , Fig. I) y a este grupo pertenecen los subtipos  $Ca_v1$  y  $Ca_v2$  (N, L, R y P/Q) mientras que los canales dependientes de voltaje de bajo umbral de activación están formados solamente por la subunidad  $\alpha 1$ , perteneciendo a este grupo el canal tipo  $Ca_v3$  (T).

Tabla I. Clasificación de los canales de calcio y su rol fisiológico

Canales de Calcio	Tipo de corriente de calcio	Localización principal	Bloqueantes específicos	Funciones	Enfermedades Hereditarias
Ca <sub>v</sub> 1.1	L	Músculo esquelético	DHPs	Acople excitación-contracción en músculo esquelético, homeostasis de Ca <sup>2+</sup> , regulación de la transcripción	Parálisis periódica hipocalémica
Ca <sub>v</sub> 1.2	L	Músculo cardíaco Cel. Endócrinas Neuronas	DHPs	Acople excitación-contracción en músculo cardíaco y liso, secreción endócrina, transitorios de calcio en soma y dendritas, regulación de actividad enzimática, regulación de la transcripción	Síndrome de Timothy: arritmia cardíaca con anomalías en el desarrollo y desórdenes de autismo
Ca <sub>v</sub> 1.3	L	Cel. Endócrinas Neuronas	DHPs	Secreción endócrina, marcapaso cardíaco, transitorios de calcio en soma y dendritas, transducción auditiva	-
Ca <sub>v</sub> 1.4	L	Retina	DHPs	Transducción visual	Ceguera nocturna estacionaria
Ca <sub>v</sub> 2.1	P/Q	Terminales nerviosos	ω-Agatoxina	Liberación de neurotransmisor, transitorio de Ca <sup>2+</sup> en las dendritas	Migraña hemiplejica familiar, ataxia cerebelosa
Ca <sub>v</sub> 2.2	N	Terminales nerviosos Dendritas	ω-CTx-GVIA	Liberación de neurotransmisor, transitorio de Ca <sup>2+</sup> en las dendritas	-
Ca <sub>v</sub> 2.3	R	Soma Dendritas Terminales nerviosos	SNX-482	Potenciales de acción dependientes de Ca <sup>2+</sup> , liberación de neurotransmisor	-
Ca <sub>v</sub> 3.1	T	Músculo cardíaco Músculo esquelético Neuronas	2-octanol / mibefradil	Marcapaso y disparo repetitivo	-
Ca <sub>v</sub> 3.2	T	Músculo cardíaco Neuronas	2-octanol / mibefradil	Marcapaso y disparo repetitivo	-
Ca <sub>v</sub> 3.3	T	Neuronas	2-oct / mibef	Marcapaso y disparo repetitivo	Ausencia de conciencia

**Algunas de las toxinas utilizadas para bloquear los CCDV.** ω-agatoxina IVA (ω-Aga-IVA) bloquea selectivamente P/Q. La ω-conotoxina-GVIA (ω-CgTX-GVIA) bloquea específicamente los canales de tipo N). La SNX-482 bloquea selectivamente el canal tipo R. Por otro lado, un grupo de compuestos orgánicos utilizado para el estudio de CCDV es el de las dihidropiridinas (DHPs). Estas drogas poseen una estructura de tipo piridina e incluyen compuestos tales como la nitrendipina, la nifedipina, la nimodipina, la isradipina y el Bay K 8644. Las DHPs son consideradas específicas para los canales de tipo L, sin embargo, otros canales de calcio, en particular los de tipo T, pueden mostrar sensibilidad a ellas (Akaike y col. 1989). Otros compuestos orgánicos como ser el 2-octanol y el mibefradil bloquean con gran eficiencia los canales T. Entre los compuestos inorgánicos utilizados para bloquear los canales de calcio, se encuentran iones divalentes como el níquel, que bloquea indistintamente los canales tipo R y T, y el cobalto y el cadmio que no presentan selectividad (Adaptado de Catterall, 2000 y 2011).

### Canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.1

La subfamilia Ca<sub>v</sub>2 (Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2 y Ca<sub>v</sub>2.3) esta altamente relacionada con la liberación de neurotransmisor en las sinapsis rápidas convencionales (Olivera y col., 1994; Dunlap y col., 1995).

Los canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.1 (P/Q) están localizados en los terminales presinápticos y las membranas somatodendríticas ubicados tanto en el cerebro como en la medula espinal (Westenbroek y col., 1995). El gen *CACNA1A* sufre *splicing* alternativo en múltiples locus de forma edad-, sexo- y especie dependiente (Bourinet y col., 1999; Soong y col., 2002; Chaudhuri y col., 2005; Kanumilli y col., 2006; Chang y col., 2007). Esto trae como resultado múltiples variantes de *splicing* con diferente distribución neuronal, y localización subcelular, diferentes propiedades biofísicas y diferente sensibilidad a la ω-AgatoxinaIVA. Adicionalmente, una mayor diversidad funcional esta dada por las diferentes combinaciones de la subunidad α1 con las distintas subunidades accesorias (Luisetto y col., 2004).

Los canales de calcio P/Q juegan un papel predominante en la iniciación del PA evocando la liberación de neurotransmisor en las sinapsis del sistema nervioso central (Pietrobon, 2005). En muchas sinapsis del SNC los canales de calcio P/Q, N y R cooperan en el control de la liberación de neurotransmisor, pero los canales P/Q tiene un rol predominante particularmente dado por la alta eficiencia en el acople a la maquinaria exocitótica (Mintz y col., 1995; Wu y col., 1999; Qian y Noebels, 2001; Li y col., 2007). De esta manera, no solo la localización preferencial de los canales P/Q cercanos a las vesículas en los sitios de liberación, sino también una mayor eficiencia en la activación de los canales P/Q en forma relativa a lo que se observa en N y R (durante PA cortos) contribuyen a mejorar la eficiencia sináptica durante la liberación de neurotransmisión.

En muchas sinapsis del sistema nervioso central, incluyendo las sinapsis inhibitorias entre las células de Purkinje y las neuronas del núcleo cerebelar profundo (*deep cerebellar nuclei*, DCN), existe un cambio durante el desarrollo relacionado con la expresión de diferentes subtipos de canales de calcio que median la transmisión sináptica aumentando la contribución relativa de los canales P/Q con la edad, hasta volverse exclusivamente dependiente de dichos canales (Iwasaki y col., 2000). Un punto importante para destacar, es que esto ocurre entre P12-P16, ventana temporal en la cual comienzan los síntomas atáxicos en los ratones *knock-out* (KO) de P/Q (Jun y col., 1999; Fletcher y col., 2001).

En el cáliz de Held, la carencia de canal P/Q en el KO es parcialmente compensada por un incremento en la corriente mediada por el canal N lo cual conlleva a una dependencia de la neurotransmisión por el canal N (Inchauspe y col., 2004; Ishikawa y col., 2005), una característica común descrita para otras sinapsis del sistema nervioso central del KO del P/Q (Jun y col., 1999; Piedras-Renteria y col., 2004). Sin embargo, los canales N en los KO de P/Q se localizan a grandes distancias y tiene un acople menos efectivo para la liberación que los canales P/Q en los animales WT (Inchauspe y col., 2007) sugiriendo que es una propiedad específica de los canales P/Q la interacción cercana con la maquinaria de liberación.

Dentro de los canales de calcio, los canales P/Q son los únicos que poseen la capacidad de interactuar y ser modulados por un número de proteínas que unen calcio (Catterall y Few, 2008). Como resultado de esto, los canales P/Q presentan tanto inactivación como facilitación calcio-dependientes. Esta regulación calcio-dependiente de los canales P/Q presinápticos puede jugar un rol crucial en la

plasticidad sináptica de corto termino durante trenes de potenciales de acción (Inchauspe y col., 2004; Mochida y col., 2008). La expresión diferencial de diferentes proteínas reguladoras calcio-dependientes y/o diferentes variantes de splicing de los P/Q, confieren al sistema una regulación neurona-especifica de los canales P/Q y sobre la plasticidad a corto termino.

La localización somatodendrítica de los canales P/Q pone énfasis también en su rol postsináptico (ej. en la excitabilidad neuronal; Pineda y col., 1998; Womack y col., 2004), expresión génica (Sutton y col., 1999), señalización de calcio local (Eilers y col., 1996) y supervivencia celular (Fletcher y col., 2001).

Los canales P/Q se expresan en todas las estructuras cerebrales que han sido implicadas en la patogénesis de migraña y/o en el dolor migrañoso, incluyendo la corteza cerebral, el ganglio trigeminal y el núcleo en el tallo encefálico involucrado en el control central de la nocicepción y su expresión es particularmente alta en el cerebelo (Pietrobon y Striessnig, 2003).

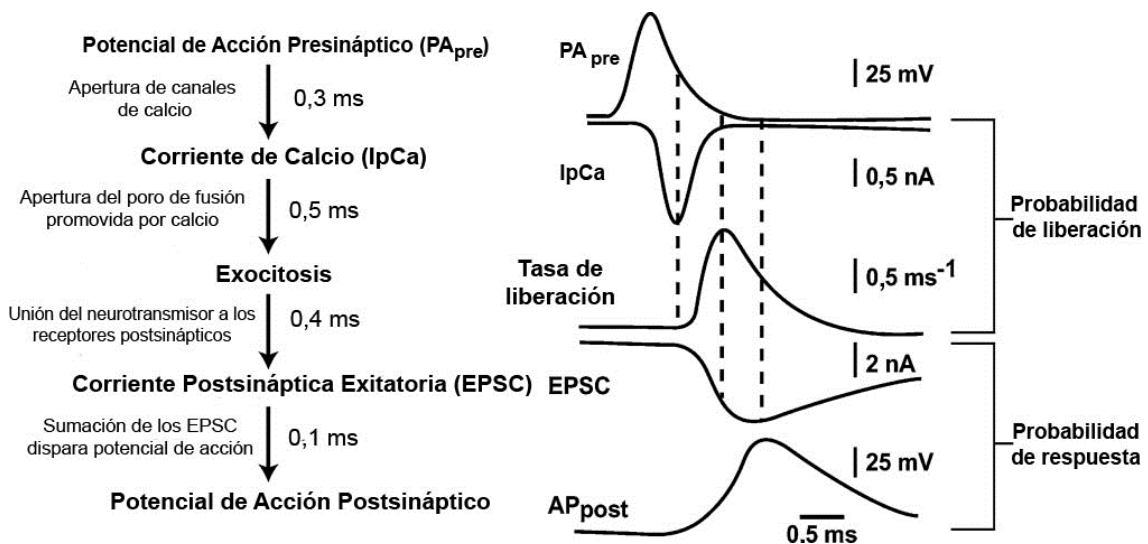
En la corteza cerebral, la neurotransmisión glutamatérgica excitatoria, mayoritariamente procedente de las células piramidales en diferentes áreas corticales, esta predominantemente mediada por los canales P/Q (Iwasaki y col., 2000; Koester y Sakmann, 2000; Rozov y col., 2001; Ali y Nelson, 2006; Zaitsev y col., 2007; Tottene y col., 2009) con la notable excepción de la sinapsis entre la capa 5 de las células piramidales y las interneuronas bipolares de disparo en ráfagas (*burst-firing*) de la corteza motora (Ali y Nelson, 2006). La activación de la corteza seguida de la estimulación talamica en rodajas talamocorticales fue completamente inhibida por el bloqueo de los canales P/Q (Llinas y col., 2007).

Los canales P/Q median alrededor del 40% del influjo de calcio durante la fase de repolarización de los potenciales de acción generados a lo largo de las dendritas y espinas sinápticas de las células piramidales de la corteza de la capa 2/3 (Koester y Sakmann, 2000) y contribuyen a la regulación del nivel umbral de disparo del potencial de acción intrínseco de esas neuronas vía la actuación de conductancias de potasio-calcio dependientes (Pineda y col., 1998).

## Rol de los canales de calcio en la fisiología sináptica

### Los canales de calcio dependiente de voltaje y el acoplamiento entre la exocitosis y la endocitosis

Una vez que el PA se propaga por el terminal presináptico, los canales de calcio dependientes de voltaje se abren en respuesta a la despolarización del potencial de membrana. El influjo de calcio a través de estos canales desencadena la liberación del neurotransmisor y presenta un papel central en la coordinación del reciclado vesicular acoplando las maquinarias de la exocitosis y la endocitosis (Fig. III). Los procesos de exo-endocitosis están vinculados temporalmente, ya que comparten el mismo estímulo (la entrada de calcio extracelular a través de los CCDV) y son completados entre si en el rango de milisegundos o segundos, respectivamente. Además, los CCDV interactúan con proteínas involucradas en la exocitosis y en la endocitosis, acoplando espacialmente estos procesos. El acoplamiento entre la exocitosis y la endocitosis es un elemento crucial y central en el mantenimiento de la transmisión sináptica. Bajo condiciones donde la tasa de fusión vesicular es elevada (como podría ser el caso de una neurona disparando a alta frecuencia durante un período sostenido) es probable que este acoplamiento sea un factor limitante y por lo tanto un punto propenso a ser regulado.



**Figura III. Secuencia de reacciones que conducen la transmisión sináptica.** Las reacciones principales con las constantes de tiempo asociadas se muestran a la izquierda y los trazos de las correspondientes reacciones en el cáliz de Held son ilustradas a la derecha. La barra de calibración temporal es válida para todos los trazos (adaptado de Südhof, 2004).



## ***Alteraciones sinápticas mediadas por canales de calcio***

### *Canalopatías*

El estudio genético de diversas formas de epilepsia, dolor crónico y migraña causado por mutaciones en canales iónicos, han sido de gran utilidad para comprender los mecanismos moleculares, patogénesis y aproximaciones terapéuticas de desordenes neurológicos complejos. La ganancia de función, entendida como un aumento en la conductancia iónica de un canal sensible a voltaje, es la primera causa de la epilepsia generalizada con ataques febriles. Esta fue originalmente descrita por mutaciones *missense* en los canales de sodio  $Na_v1.1$ ,

Al igual que los canales de sodio, los canales de calcio son blancos moleculares para las mutaciones que causan distintas enfermedades hereditarias incluyendo migraña, parálisis periódica, arritmia cardiaca, epilepsia y algunos casos de autismo (Catterall y col, 2008). En particular, la migraña hemipléjica familiar esta causada por mutaciones en los canales de calcio tipo P/Q ( $Ca_v2.1$ ) cuyas corrientes suelen mediar la liberación de neurotransmisor. En muchos casos, estas mutaciones incrementan la activación de los canales de calcio a potenciales de membrana más negativos e incrementar la liberación de neurotransmisor en sinapsis corticales glutamatérgicas (Tottene y col., 2009).

### *Neurobiología de la migraña*

La migraña es un desorden cerebral deshabilitante con una gran incidencia en la población (afecta alrededor del 10-12% de la población occidental, con una prevalencia máxima entre la cuarta y quinta década de la vida). Es caracterizado por ataques recurrentes de jaquecas unilaterales usualmente acompañado por nausea, fonofobia y fotofobia. En al menos un 20% de los pacientes, la jaqueca es precedida por síntomas neurológicos transientes, frecuentemente visuales que pueden también involucrar otros sentidos, denominando a este fenómeno "aura". Esta patología tiene una gran incidencia en la población afectando mayoritariamente a las mujeres (43% de mujeres y 18% en varones; Stewart y col., 2008).

Dentro del cráneo, la sensibilidad al dolor esta principalmente restringida a los vasos sanguíneos meningiales los cuales están densamente inervados por fibras aferentes sensoriales nociceptivas de la división oftalámica de los nervios del trigémino. Se cree

que el desarrollo de la jaqueca migrañosa depende de la activación de estas aferentes (Pietrobon y Striessnig, 2003). Esto último da lugar a la teoría vascular de la migraña, la cual está ampliamente aceptada: considera que los síntomas del “aura” de la migraña están causados por una isquemia transiente que es inducida por la vasoconstricción y que la jaqueca surge como un efecto de la vasodilatación de las arterias intracraneales y consecuente activación mecánica de las fibras sensoriales perivasculares.

La iniciación del dolor relacionado con la migraña requiere la activación de las aferencias trigeminales que inervan las meninges. La activación de estos nociceptores meningiales permite la liberación de péptidos neuroactivos a sus terminales nerviosos periféricas y activación de neuronas de segundo orden en el núcleo trigeminal caudalis, seguido de la activación de estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento y percepción del dolor (Pietrobon, 2010a). La perseverancia del dolor asociado a la migraña por períodos prolongados involucra la sensitización de nociceptores meningiales y sensitización autosostenida de neuronas centrales del sistema trigeminovascular. El área ventrolateral de la sustancia gris periacueductal caudal está involucrado en el dolor craneovascular no solo a través de las proyecciones ascendentes del tálamo, sino también de la modulación descendente (principalmente inhibitoria) de la información aferente nociceptiva (Knight y Goadsby, 2001). Está generalmente aceptado que la primera causa de la migraña se encuentra en el cerebro, pero su naturaleza y mecanismo de disfunción primaria del cerebro relacionado con la activación de los nociceptores en la meninge continua siendo incierto y controversial (Pietrobon y Striessnig, 2003; Charles, 2009; Goadsby y col., 2009).

Desde hace algunos años, se propone a la propagación de la depresión cortical (*cortical spreading depresión*, CSD) como el elemento clave en la patogénesis de la migraña. La CSD puede ser inducida en modelos animales por estimulación focal (eléctrica, mecánica o alto potasio) de la corteza cerebral. La CSD está asociada con una disrupción de los gradientes iónicos en la membrana: por un lado una masiva entrada de calcio y sodio y por otro una masiva salida de potasio siendo estos factores responsables de la liberación de glutamato (Somjen, 2001). Como otros desbalances iónicos, se cree que éste genera la despolarización de neuronas y células glias adyacentes permitiendo la propagación de una onda despolarizante (Leão, 1944; Somjen, 2001; Charles y Brennan, 2009). Diferentes líneas de evidencias, en particular a partir de descubrimientos desarrollados con técnicas de imágenes (*neuroimaging*),

indican que el aura de la migraña esta dado por eventos tipo-CSD en las cortezas sensoriales (Bowyer y col., 2001; Hadjikhani y col., 2001; Ayata, 2009). Estudios desarrollados sobre animales avalan la idea que la CSD podría ser la iniciadora de los mecanismos de jaqueca (Bolay y col., 2002; Ayata y col., 2006; Ayata, 2009) pero la conexión entre la CSD y la jaqueca en pacientes (especialmente en aquellos que presentan migraña sin aura) continua siendo una pregunta abierta. Los mecanismos que hacen del cerebro migrañoso susceptible a episodios “espontáneos” de CSD en respuesta a disparados específicos son aún desconocidos. Los pacientes con migraña son hipersensibles a cualquier tipo de sobrecarga sensorial y ésta es una fuerte evidencia de la excitabilidad cortical alterada y procesamiento anormal de la información sensorial en el cerebro en los períodos entre ataques migrañosos (Welch, 2005; Aurora y Wikinson, 2007; Coppola y col., 2007).

### Migraña hemipléjica familiar

La migraña tiene un fuerte componente genético pero no se han encontrado los genes responsables de esta patología a excepción de la migraña hemipléjica familiar (FHM), un subtipo de migraña monogénica rara con “aura” que se inicia en la infancia. La FHM es caracterizada por síntomas de “aura” motores que consisten en debilidad motora o parálisis, la cual es usualmente, pero no siempre, unilateral. Se describen tres o cuatro síntomas presentes generalmente en los ataques de la FHM: visual, sensorial, motor y síntomas afásicos. En contraste con otros tipos de migraña, algunos pacientes portadores de la FHM pueden tener ataques severos con pérdida de conciencia (coma) y/o hemiplejia prolongada los cuales pueden durar varios días.

La Organización Mundial de la Salud clasifica la migraña como una de las 20 enfermedades más discapacitante. A pesar de los grandes costos personales y sociales, las terapias farmacológicas para prevenir y tratar la migraña resultan insatisfactorias en muchos pacientes. Hasta el momento, las únicas aproximaciones para estudiar esta patología pueden ser logradas por el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de la FHM, un tipo monogénico de migraña heredada, con “aura” y característicos ataques migrañosos asociados con la hemiparesis transiente.

En particular, la FHM tipo 1 (FHM1) es causada por mutaciones en el gen *CACNA1A*, el cual codifica para el poro formado por la subunidad  $\alpha 1$  del canal de calcio tipo P/Q (Figura V; Ophoff y col., 1996). Algunas de las mutaciones generadas en la FHM1 modifican las propiedades biofísicas de los canales destacando entre ellas la

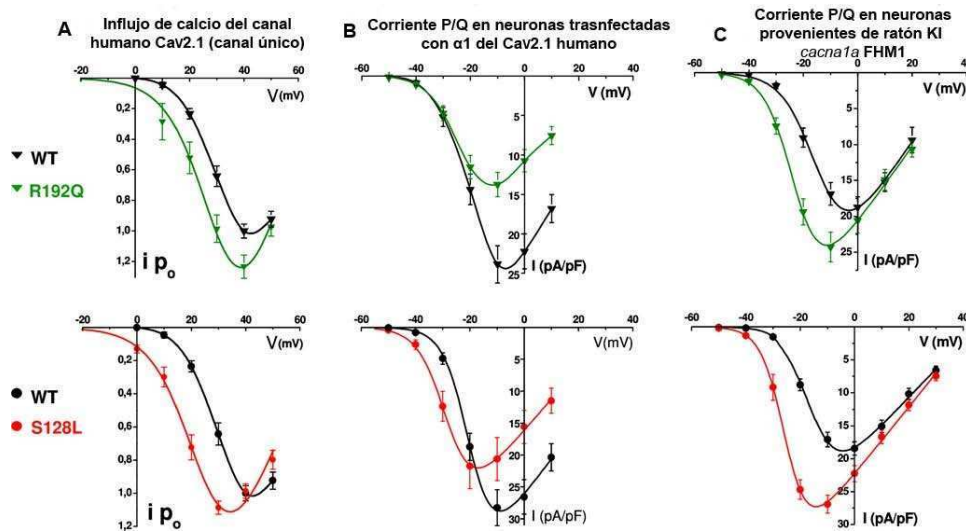
activación del canal a voltajes menores e incrementando el influjo de calcio a través de estos (ganancia de función; Tottene y col., 2002, 2005; Pietrobon, 2007) e incrementan la susceptibilidad a la CSD (van den Maagdenberg y col., 2004), el mecanismo usualmente desarrollado por pacientes migrañosos con “aura” (Lauritzen, 1994).

Las consecuencias funcionales de 13 mutaciones asociadas a la FHM1 (ver letras en rojo en la Fig. V) han sido investigadas en sistemas heterólogos expresando los canales P/Q recombinantes (Kraus y col., 1998; Hans y col., 1999; Kraus y col., 2000; Tottene y col., 2002; Melliti y col., 2003; Mullner y col., 2004; Barret y col., 2005; Tottene y col., 2005; Weiss y col., 2008; Adams y col., 2009; Serra y col., 2009). Cinco de estas mutaciones (las cuales están subrayadas en la Fig. V), han sido estudiadas en neuronas provenientes de ratones transgénicos que expresan la subunidad  $\alpha 1$  del P/Q con las distintas mutaciones (Tottene y col., 2002; Cao y col., 2004; Cao y Tsien 2005; Tottene y col., 2005).

Los estudios realizados en sistemas heterólogos mostraron que las mutaciones FHM1 alteran muchas de las propiedades biofísicas de los canales P/Q, obteniéndose diferentes efectos dependiendo de la mutación. Un ejemplo de dicha variabilidad experimental lo constituye la inactivación del canal en el cual puede resultar incrementada, reducida o inalterada dependiendo del tipo de mutación (Adams y col., 2009). Sin embargo, un efecto que parecería ser consistente, fue revelado estudiando las propiedades mediante registros de canal único de ocho de las mutaciones. Todas estas mutaciones presentaron un incremento en la probabilidad de apertura y un aumento en el influjo de calcio en un gran rango de potenciales despolarizantes dado principalmente por el desplazamiento de la curva I-V hacia potenciales más negativos (Hans y col., 1999; Tottene y col., 2002; Tottene y col., 2005; ver Fig. VIB). De forma sistemática en la mayoría de las 13 mutaciones analizadas, registros de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* revelaron desplazamientos en los voltajes de activación hacia potenciales más negativos tanto en sistemas heterólogos como en neuronas transfectadas (Kraus y col., 1998; Hans y col., 1999; Kraus y col., 2000; Tottene y col., 2002; Melliti y col., 2003; Mullner y col., 2004; Tottene y col., 2005; Weiss y col., 2008; Adams y col., 2009; Serra y col., 2009). Para ciertas mutaciones, la magnitud (o incluso la presencia) del desplazamiento en la activación dependió tanto de la variante de *splicing* como del tipo de subunidad  $\beta$  que se co-expresó (Mullner y col., 2004; Adams y col., 2009). La expresión de diferentes variables de *splicing* y/o subunidades  $\beta$  podría explicar algunas discrepancias existentes en la literatura con respecto a los efectos funcionales de algunas mutaciones de la FHM1. Un ejemplo de esto se

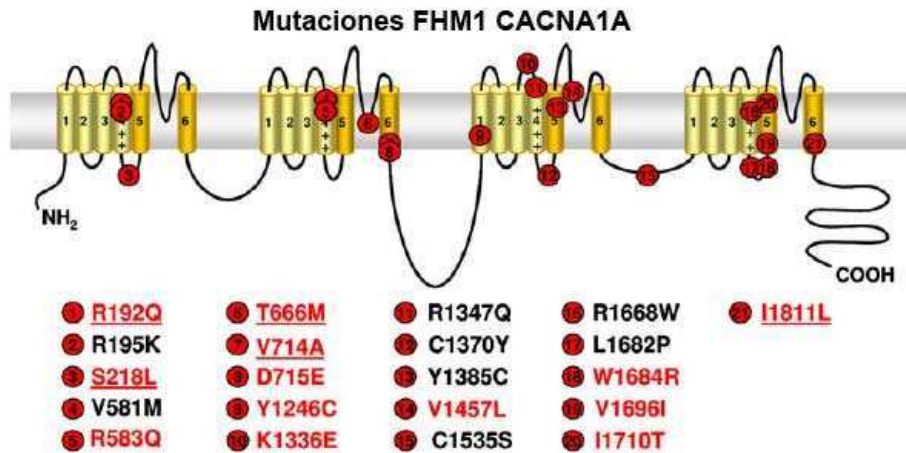
observa analizando la mutación T666M donde Tottene y col. (2002) mostró que la mutación produce un desplazamiento negativo de la activación mientras que Barret y col. (2005) demostró una falta de efecto.

Los estudios donde se realiza expresiones en sistemas heterólogos, demostraron que estos sistemas pueden inducir *per se* cambios en las propiedades biofísicas de los canales de calcio más allá de las propias alteraciones producidas por la mutación (Fig. V). En algunos casos el efecto fue heterogéneo dependiendo de la mutación por ejemplo, observándose diferentes efectos en distintos mutantes de FHM1 sobre las propiedades de inactivación resultado en un incremento, decremento o falta de alteración. Como se mencionó en el párrafo anterior, el desplazamiento de la curva I-V hacia potenciales más negativos en los genotipos mutantes frente a los WT expresados en los distintos sistemas, heterólogos u homólogos, parece ser una cualidad común de los modelos de FHM1 (Fig. IV). Sin embargo resulta interesante destacar, en el caso particular de las mutaciones R192Q y S218L, como la ganancia de función (entendida en términos de mayor corriente) parece estar altamente modulada por el sistema de expresión.

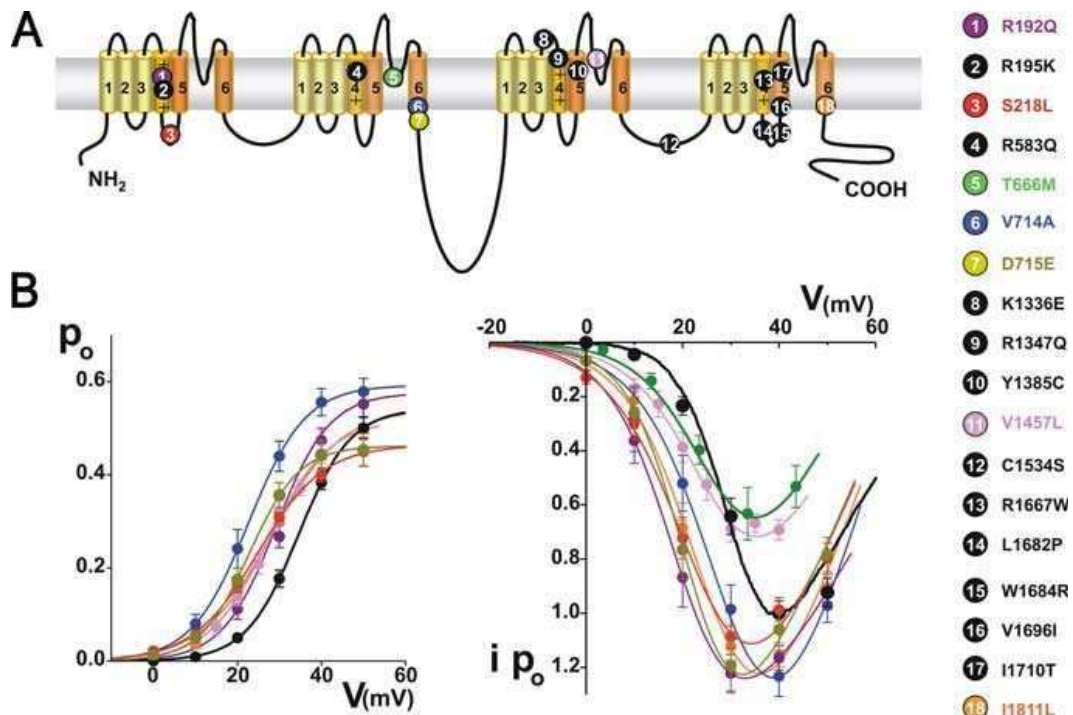


**Figura IV. Alteraciones en las propiedades biofísicas de los canales de calcio generadas por los sistemas de expresión. A.** Registros de canal único (*single channel*) a través de los canales de calcio humanos Cav2.1 medidos por el producto de la corriente en canal único ( $i$ ) y la probabilidad de apertura ( $p_o$ ) provenientes de registros de *cell-attached* (90 mM  $Ba^{2+}$ ) en células HEK293 las cuales expresan los canales WT o mutantes con las mutaciones R192Q (arriba) o S218L (abajo). Todos los valores de  $i p_o$  fueron divididos por el valor máximo de  $i p_o$  en el WT. Los valores de  $i$  y  $p_o$  fueron tomados de Hans (y col., 1999) para R192Q y de Tottene (y col., 2005) para el mutante S218L. **B.** Densidad de corriente de a través del canal P/Q (5mM  $Ba^{2+}$ ) en células granulares de cerebelo provenientes de un ratón KO  $Cav_{2.1}$  trasfectada con la subunidad  $\alpha 1$ . Los datos fueron tomados de Tottene (y col., 2002) para el R192Q (arriba) y de Tottene y col. (2005) para el S218L (abajo). **C.** Densidad de corriente de a través del canal P/Q (5mM  $Ba^{2+}$ ) en células granulares de cerebelo provenientes de un ratón homocigota KI R192Q y S218L. Los datos fueron tomados de van den Maagdenberg y col. (2004) para el R192Q (arriba) y de van den Maagdenberg y col. (2010) para el S218L (abajo).

Un factor adicional a considerar relacionado con la modulación de estos canales, revelaron, sobre tres de estas mutantes, que su modulación por proteína G se encontraba disminuida, un efecto que se encuentra en la misma dirección que la ganancia de función propuesta para estos modelos (Melliti y col., 2003; Weiss y col., 2008; Serra y col., 2009).



**Figura V.** Localización de las mutaciones de FHM1 en la estructura secundaria de la subunidad  $\alpha 1$  de los canales de calcio  $Ca_v2.1$ . Las consecuencias funcionales de los canales recombinantes han sido estudiadas (ver Figura V) expresándose en sistemas heterólogos (letras en rojo) o en células provenientes de animales transgénicos portadores de las mutaciones (subrayado). (adaptado de Pietrobon, 2010b).



**Figura VI.** Mutaciones del canal  $Ca_v2.1$  en pacientes con FHM1. **A.** La posición de las mutaciones que causan la FHM1 relacionadas con los canales de calcio están señaladas con círculos numerados y las mutaciones específicas están alistadas a la derecha. En color se encuentran aquellas mutaciones que han podido ser estudiadas (propiedades de canal único, *single channel*) por la expresión de canales recombinantes en sistemas heterólogos (Hans y col., 1999; Tottene y col., 2002; Tottene y col., 2005; Pietrobon, observaciones no publicadas). **B.** Análisis de canal único (con 90 mM de  $Ba^{2+}$ ) revelaron un incremento en la probabilidad de apertura ( $p_o$ ) y un correspondiente incremento en la corriente de calcio conjuntamente con un desplazamiento de la activación hacia potenciales más negativos. (Tottene y col., 2002). (Adaptado de Catterall y col., 2008)

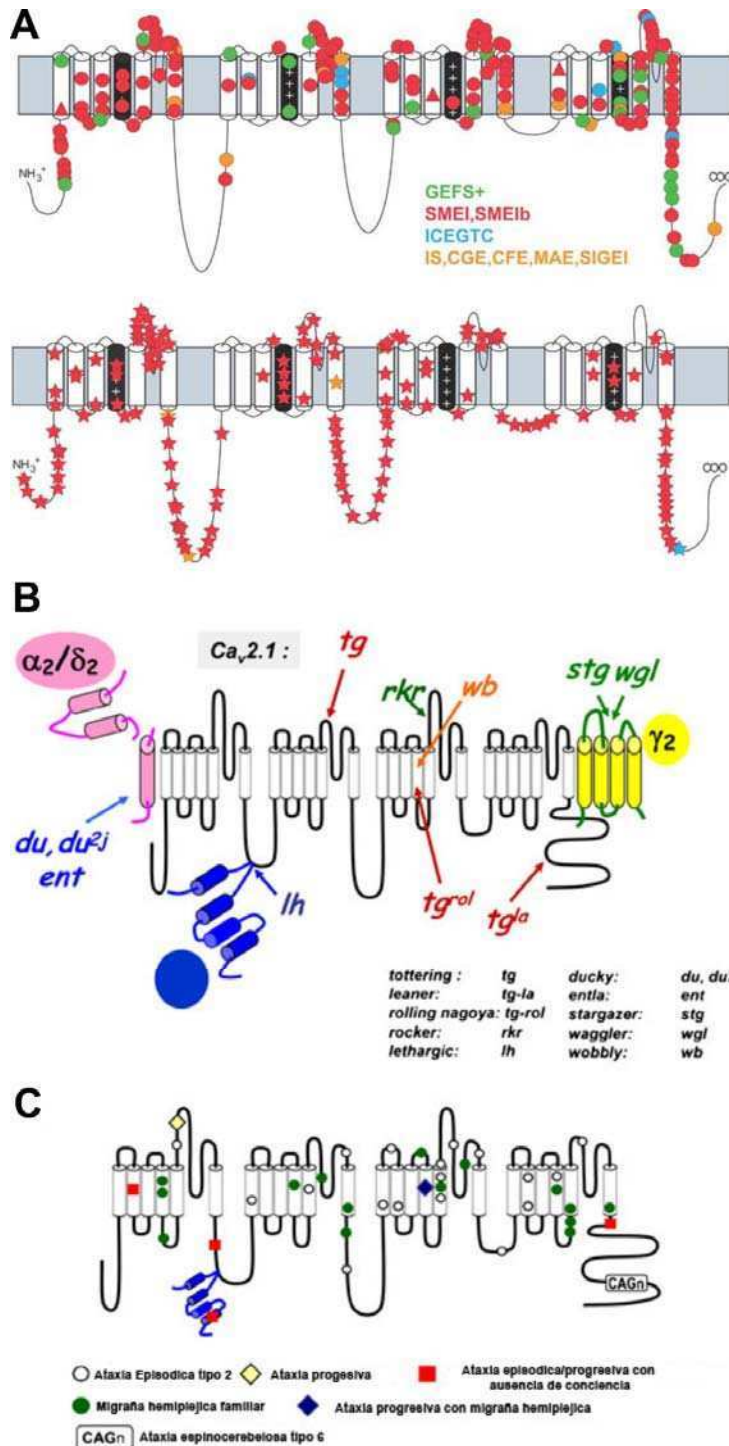
Por otra parte, existen evidencias que las mutaciones de la FHM1 también pueden afectar la densidad de los canales funcionales en membrana. Este dato fue obtenido por la cuantificación de los canales funcionales por parches de membranas (dividido por el área del parche) en registros de *cell-attached* (Hans y col., 1999) y/o indirectamente considerando los cambios en la densidad de corriente producida por las mutaciones a potenciales despolarizantes donde la probabilidad de apertura de los canales P/Q es máxima y similar para el mutante y WT (Tottene y col., 2002; Tottene y col., 2005) o por mediciones de las corrientes de apertura (Barret y col., 2005).

### Epilepsia

Aparte de la migraña, entre los desordenes neurológicos mas comunes se encuentran la epilepsia. La hiperexcitabilidad es uno de los factores vinculantes de estas patologías, pero las alteraciones en la excitabilidad a nivel molecular, celular y de sistemas no han sido totalmente descriptos.

Las mutaciones espontáneas fueron los primeros modelos de epilepsia hereditaria en ratones (Fig. VII). Entre ellos existe un subgrupo que presenta descargas en ráfagas de ondas en electroencefalogramas asociados con el arresto de comportamiento y constituyen un modelo genético para el síndrome clínico de la epilepsia con falta de conciencia. Estos genes pueden ser divididos en tres grupos funcionales. El primero incluye los genes de las subunidades de los canales de calcio (los mutantes *tottering*, *lethargic*, *stargazer* y *ducky*; Fig. VII B). Cada uno de estos modelos porta mutaciones sobre las diferentes subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\alpha 2\text{-}\delta$  (Burgess y Noebels, 1999). Estos modelos proveen evidencias importantes que implican diversos mecanismos de epileptogenesis incluyendo alteraciones en la excitabilidad de membrana, en la transmisión sináptica y expresión de genes los cuales difieren entre los distintos modelos mutantes (Burgess y Noebels, 1999). Estas subunidades de los canales de calcio se expresan difusamente a lo largo de todo el cerebro dando lugar a la pregunta de cuan específicamente algunas neuronas son diferencialmente afectadas para producir un fenotipo neurológico. En los últimos años se ha comenzado a investigar los mecanismos que subyacen los cambios en la excitabilidad de forma neurona-específica observándose un rescate selectivo de las subunidades mutadas por cambios compensatorios (Burgess y col., 1999; Qian y Noebels, 2000).





**Figura VII. Componente genético de la epilepsia sobre el canal de sodio y de calcio.**

**A.** Mutaciones en el canal de sodio SCN1A halladas en pacientes con epilepsia. Arriba: mutaciones *missense* (círculos) y deleciones (triángulos). Abajo: mutaciones que generan truncamiento (estrellas). Muchas de las mutaciones *missense* están localizadas en los segmentos transmembrana y en la mitad proximal de los dominios C-terminales. Los tipos clínicos de epilepsia están indicados en colores: epilepsia generalizada con ataques de fiebre (GEFS); epilepsia mioclónica severa de infantes (SMEI); epilepsia idiopática juvenil con ataques generalizados tónicos/clónicos (ICEGTC); espasmos infantiles (IS); epilepsia criptogénica generalizada (CGE); epilepsia criptogénica focal (CFE); epilepsia astática mioclónica (MAE); epilepsia idiopática severa generalizada de infantes (SIGEI). (Adaptado de Catterall y col., 2008).

Mutaciones en el canal de calcio P/Q en ratón (B) y humanos (C). **B.** Representación esquemática de múltiples mutaciones que afectan varias subunidades de los canales P/Q en ratón y su correspondiente fenotipo. **C.** Localización de las mutaciones humanas sobre la subunidad  $\alpha_1$  del canal P/Q que están relacionadas con la ataxia episódica tipo 2 (EA2), migraña hemiplejica familiar tipo 1 (FHM1), ataxia espinocerebelar tipo 6 (SCA6). También se encuentran señaladas algunas patologías clínicas complejas como la ataxia progresiva con ausencia de conciencia (cubos rojos). (Adaptado de Zamponi y col., 2010)

Un segundo grupo esta constituido por un único modelo, *mocha2J* (*mh2j*), cuyo gen codifica para una adaptina (la subunidad AP3 $\delta$  de un complejo de proteínas involucrado en el tráfico de moléculas destinadas a la incorporación dentro de las vesículas sinápticas. La falta de adaptina AP3 $\delta$  induce la perdida del transportador de zinc ZNT3 y la ausencia del secuestro de zinc vesicular en el cerebro de ratón (Kantheti y col., 1998). Esta ausencia de zinc vesicular, disminuye el umbral de convulsiones inducidos por drogas convulsioygenicas (Cole y col., 2000).



El tercer grupo, el ratón *swe* (*slow wave epilepsy*), es importante porque su genotipo reproduce el patrón epiléptico juvenil. Este ratón porta una mutación que causa una pérdida de función de NHE1, uno de los cinco genes que codifican para el intercambiador sodio/protón a través del plasmalema neuronal (Cox y col., 1997). La función de este gen regulador de pH es interesante, dado que éste acelera la recuperación de las neuronas de una carga ácida y esto podría estar relacionado con la iniciación de las convulsiones por hiperventilación, un fenómeno clínicamente descrito. Los ratones con esta mutación frecuentemente presentan convulsiones tónico-clónicas (Noebels, 2001).

### **Modelo de sinapsis**

#### Función del cáliz de Held en el circuito del tallo cerebral.

El cáliz de Held es un terminal presináptico gigante en el tallo cerebral de mamíferos, perteneciente al sistema auditivo, que forma una sinapsis glutamatérgica axo-somática sobre las neuronas principales del núcleo medio del cuerpo trapezoidal (*medial nucleus of the trapezoid body*, MNTB).

El cáliz de Held (Fig. VIIIA) es el nombre anatómico que designa el terminal presináptico derivado de las células *bushy* (por su aspecto de “arbusto”) ubicadas en el núcleo coclear ventral anterior (*anterior coclear ventral nucleus*, aVCN) el cual proyecta sobre las células principales del MNTB (ver Fig. VIIIB, Schneggenburger y Forsythe, 2006). Las células principales del MNTB proveen proyecciones de inhibición glicinérgica sobre el núcleo vecino del complejo olivo-superior que incluye la oliva lateral superior (LSO, *lateral superior olive*) y la oliva media superior (MSO, *medial superior olive*). Tanto el LSO como el MSO son los primeros núcleos en los que converge la información binaural. La sinapsis cáliz de Held-MNTB constituye una fuente rápida de relevo, en el cual la excitación originada en la cóclea contralateral es convertida en inhibición en el tallo encefálico auditivo ipsilateral. El gran tamaño del cáliz de Held conlleva a un gran número de zonas activas lo cual origina una liberación cuántica masiva frente a un simple PA y dando lugar a una corriente postsináptica excitatoria (*excitatory postsynaptic currents*, EPSCs) de gran amplitud quien induce una rápida despolarización de las células del MNTB.

Por otra parte, el gran tamaño de este terminal presináptico (Fig. IXB y C), garantiza una rápida señalización preservando la información temporal de la señal acústica para

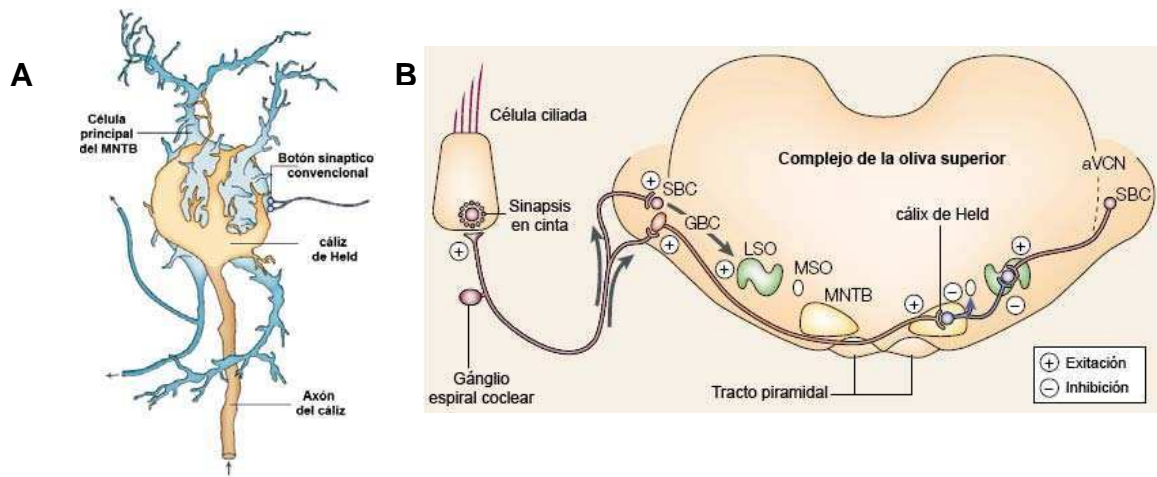
el posterior procesamiento por los circuitos binaurales que sustentan la localización del sonido (Oertel, 1999; Trussell, 1999).

El cáliz se desarrolla tempranamente durante el desarrollo embrionario donde los axones del cuerpo trapezoidal se expanden desde el núcleo coclear cruzando la línea media entre el día 15 embrionario (E15) hasta comenzar a constituir el propio cáliz en día 3 postnatal (P3) (Kandler y Friauf 1993; Hoffpauir y col., 2006). Una única neurona principal del MNTB recibe una única aferencia del cáliz, aunque ocasionalmente se puede observar múltiples aferencias en menos de un 5% de las neuronas principales registradas en ratones (Bergsman y col., 2004) y alrededor de un 20% de fibras aferentes que dan lugar a dos cálices que contactan dos células principales del MNTB diferentes (Kuwabara y col., 1991; Smith y col., 1991; Rodríguez-Contreras y col., 2006). Esta propiedad morfológica permite que cuando se estimula sobre la línea media con un electrodo bipolar, solo se obtenga respuesta sináptica de un único par cáliz-MNTB. A su vez, esto conlleva que la respuesta sea independiente de la intensidad del estímulo por encima del umbral.

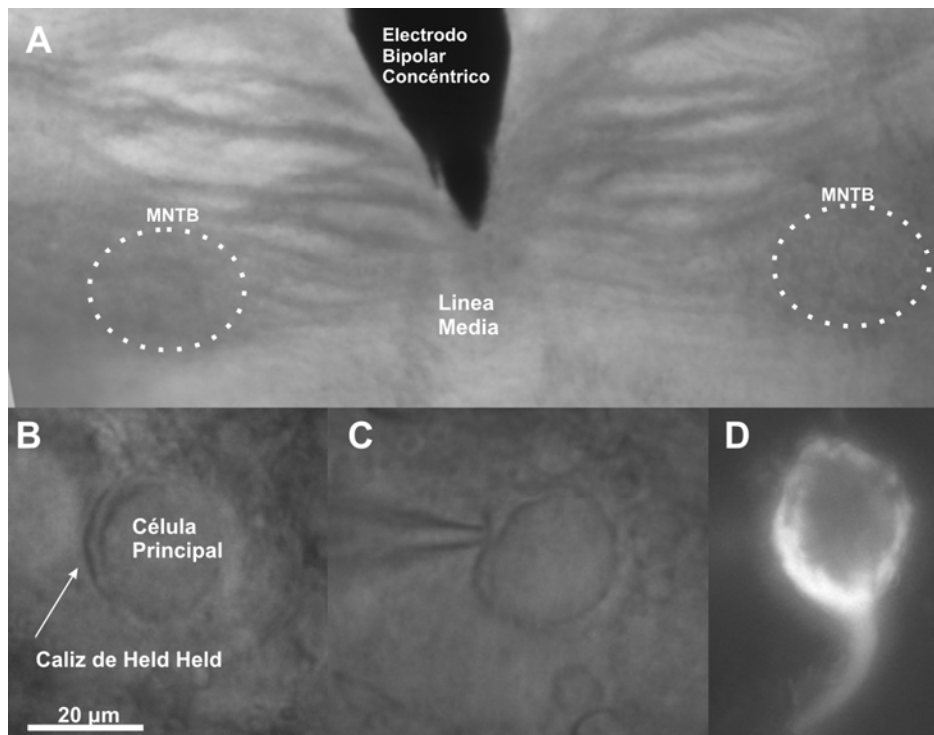
#### La sinapsis del cáliz de Held

La accesibilidad al cáliz de Held (conferida por su gran tamaño) ha sido utilizada para estudiar los canales de calcio presinápticos, los cuales modulan la neurotransmisión excitatoria. Este modelo sináptico ha sido también de gran interés para estudiar los cambios presinápticos durante el desarrollo comparando los estadios anteriores y posteriores al comienzo de la audición. Este fenómeno ocurre tanto en ratas como en ratones alrededor del día post-natal 11 o 12 (P11-12, Blatchley y col., 1987; Geal-Dor y col., 1993). El acceso directo al terminal nervioso por medio de los registros de *patch-clamp* permite la manipulación bioquímica del líquido intracelular como ser indicadores de calcio y quelantes de este ión a fin de cuantificar o modificar las condiciones intracelulares presinápticas de calcio.

Los registros de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* mostraron un componente mixto de las EPSCs con una constante de tiempo rápida mediada por los receptores  $\alpha$ -amino-3-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico (AMPA) y una constante de tiempo lenta mediada por los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Forsythe y Barnes-Davis, 1993).



**Figura VIII. La sinapsis del cáliz de Held en el circuito del tallo encefálico auditivo.** **A.** Diagrama del cáliz de Held adulto. Es importante señalar el ancho del axón (4–12  $\mu\text{m}$  de diámetro; color marrón) que origina el cáliz. La célula postsináptica (azul) tiene dendritas relativamente cortas y un axón con ramificaciones laterales. A modo de comparación morfológica, se muestra un terminal tipo botón típico. **B.** Representación en el plano coronal del tallo encefálico auditivo y la sinapsis del cáliz de Held, la cual forma parte del circuito auditivo al nivel del complejo de la oliva superior (SOC). Las señales auditivas que llegan a la cóclea son transmitidas al núcleo coclear anterior ventral (aVCN) del lado ipsilateral por sinapsis excitatorias sobre las células globulares y las células esféricas bushy (SBC). Los axones de las células bushy globulares (GBCs) cruzan la línea media del tronco del encéfalo y sinaptan con las células principales del núcleo medio del cuerpo trapezoidal (MNTB) en el lado contralateral. Estos axones mielinizados (que dan origen al propio cáliz de Held) al tener un gran diámetro, permiten una rápida velocidad de conducción. Las células principales del MNTB son glicinérgicas y proyectan a la oliva superior lateral (LSO). El LSO también recibe aferencias excitatorias provenientes de las SBSs del aVCN ipsilateral. De esta manera, la descarga de trenes evocados por el sonido en las dos cócleas convergen en las neuronas del LSO como una excitación ipsilateral (a través de aVCN) y contralateral. Tomado de von Gersdorff y Borst (2002).



**Figura IX. Fotografía de la preparación experimental (rodaja y sinapsis).** **A.** Foto de la rodaja del tallo encefálico conteniendo el MNTB. Sobre la línea media se posiciona el electrodo bipolar concéntrico a fin de estimular los axones provenientes del lado contralateral. **B.** Foto a mayor aumento de una sinapsis entre la célula principal del MNTB y el cáliz de Held. **C.** Dado su gran tamaño, es posible de acceder con una pipeta de *patch-clamp* para poder registrar corrientes de calcio presinápticas sobre el cáliz de Held. **D.** Terminal presináptico cargado con un indicador fluorescente (en este caso Lucifer Yellow) para corroborar que la célula a la cual se accedió fue el cáliz. Este colorante puede ser reemplazado por sensores de calcio para poder realizar mediciones de este ión utilizando otra aproximación experimental.

Otra particularidad interesante de este modelo, es que a partir de día postnatal 11, la neurotransmisión es mediada únicamente por los canales P/Q (Iwasaki y Takahashi, 1998; Inchauspe y col., 2004; Fedchyshyn y Wang, 2005).

Dada la propiedad morfológica del gran tamaño del terminal presináptico accesible con una pipeta para realizar *patch-clamp* conjuntamente con la expresión solamente de canales P/Q (en la ventana temporal en la cual se desarrollan los experimentos en este trabajo), hacen de esta sinapsis, un modelo apropiado para estudiar alteraciones sinápticas asociadas a mutaciones en los canales de calcio P/Q.

## Hipótesis y Objetivos

### Hipótesis central del capítulo I

La hipótesis central de este capítulo es que existe una ganancia de función conferida por la mutación S218L, la cual induciría la exacerbación de la neurotransmisión excitatoria. La ganancia de función queda definida en términos de un mayor influjo de calcio a través de los canales P/Q mutados de la terminal presináptica.

### Hipótesis central del capítulo II

La transmisión sináptica es alterada por la PGB modulando directamente los canales de calcio presinápticos de tipo P/Q induciendo en éstos alteraciones en sus propiedades biofísicas.

### Hipótesis central del capítulo III

A partir de los antecedentes de Adams y col. (2009) donde reporta la existencia de cambios sobre las propiedades de activación e inactivación de los canales P/Q en los modelos transgénicos R192Q y S218L, se propone que la PGB modula estos canales a fin de revertir la fisiología sináptica alterada en estos modelos de FHM1.

### Objetivo general

El objetivo central de este trabajo es estudiar las alteraciones en la transmisión sináptica en un ratón transgénico de migraña (S218L) y su modulación por pregabalina.

### Objetivos específicos

- Realizar la caracterización de las corrientes de calcio presinápticas mediadas por el canal de calcio tipo P/Q en el modelo sináptico del cáliz de Held-MNTB provenientes de los animales KI S218L. Sobre este punto se analizarán las corrientes de calcio registradas en el terminal presináptico del cáliz de Held evocadas por pulsos cuadrados (I-V), potenciales de acción o trenes de potenciales de acción. Se prestará especial importancia sobre las propiedades biofísicas de activación e inactivación de los canales mutados, desplazamiento de la curva I-V, amplitud y tasa de la facilitación de la corriente.
- Caracterizar las potenciales alteraciones sinápticas registradas en las células principales del MNTB inducidas por la mutación a nivel presináptico. Para desarrollar este objetivo se estudiarán los eventos espontáneos miniaturas (a fin de evaluar la

frecuencia y amplitud de los mismos) y evocando los fenómenos de facilitación a corto término, focalizado en los fenómenos de depresión y recuperación de dicha depresión. Se analizará también la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias y, utilizando estos datos mencionados, se estimará la probabilidad de liberación y tamaño del pool liberable.

- Examinar la acción farmacológica de la pregabalina sobre el modelo sináptico del cáliz de Held-MNTB. Se analizará la potencial acción moduladora de esta droga sobre los canales de calcio P/Q evaluando presinápticamente las propiedades biofísicas de las corrientes de calcio (poniendo especial atención sobre la inactivación del canal) y postsinápticamente estudiando la depresión a corto término y la liberación espontánea.

- Evaluar la acción farmacológica de la pregabalina sobre el modelo transgénico de migraña. Se pretende dirigir esta aproximación experimental al estudio de cómo las propiedades biofísicas de los canales de calcio alterados pueden revertirse por medio de esta droga en forma total o parcial.

***Materiales y  
Métodos***

## **Materiales y Métodos**

### **Modelo biológico**

El modelo animal utilizado son ratones *wild-type* (WT) de la cepa C57BL/6 y dos modelos *knock-in* (KI, generados combinando la cepas C57BL/6-sv129): R192Q (van den Maagdenberg y col., 2004) y S218L (Pietrobon y col., 2005).

### **Rodajas de tallo encefálico**

Se utilizan ratones postnatales de 11 a 15 días. Luego de la decapitación, el cerebro fue removido y sumergido en un fluido cerebroespinal artificial (aCSF) con bajo contenido de sodio, a 4°C. El tallo encefálico se fijó con pegamento a una platina, y se introdujo ésta en la cámara refrigerante Peltier de un vibrátomo (Integraslice 7550PSDS, Campden Instruments Limited, UK) con pegamento. Se cortaron secuencialmente rodajas transversales de 200-300 µm de espesor, conteniendo el MNTB, y se las transfirió a una cámara conteniendo aCSF normal, con bajo calcio y alto magnesio (0,1mM CaCl<sub>2</sub> y 2,9mM MgCl<sub>2</sub>). Los cortes se incubaron durante 1 hora a 37°C y luego se dejan enfriar a temperatura ambiente. La solución normal contiene (en mM): NaCl 125, KCl 2,5, NaHCO<sub>3</sub> 26, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, glucosa 10, ácido ascórbico 0,5, myo-inositol 3, piruvato de sodio 2, MgCl<sub>2</sub> 1 y CaCl<sub>2</sub> 2. En la solución de bajo sodio el NaCl es reemplazado por 250 mM de sucrosa y las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> son 2,9 mM y 0,1 mM respectivamente. El pH es 7,4 cuando se lo burbujea con 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Para realizar los registros, cada corte se traslada a la cámara de registro montada en un microscopio vertical (Eclipse E600FN, Nikon, Japón). El microscopio está equipado con un sistema óptico de contraste por interferencia Nomarski y las células se visualizan con un objetivo 40X ó 60X de inmersión en agua (Nikon), más una cámara de video CCD para infrarrojo cercano (IR-1000, DAGE-MTI).

### **Tipificación de los animales**

Se toma una muestra de tejido (cola u oreja) de los animales y se procede a la extracción del ADN mediante la utilización de un kit de extracción de ADN (Inbio, Highway, Tandil, Argentina). A partir de este material genético se procede a realizar una PCR utilizando los *primers* 271 y 272 (ver información adicional en Anexo I). El producto de PCR se digiere con la enzima de digestión VspI o AseI a fin de obtener el



bandeo característico para cada genotipo (WT: 216 pb; Het: 216+81+135 pb; KI 81+135 pb).

### **Registros electrofisiológicos en rodajas del tallo encefálico**

Se utiliza la técnica llamada *patch-clamp* en configuración *whole-cell* (célula entera). Básicamente, se accede a la membrana celular con una micropipeta de vidrio y se forma un sello de alta resistencia (en el rango de los gigaohmios, G $\Omega$ ) y estabilidad mecánica. Luego el sello se rompe por succión, tras aplicar un voltaje hiperpolarizante a la punta de la pipeta, permitiendo así el acceso al interior neuronal. Esto permite el intercambio de moléculas entre el citoplasma y la solución interna la pipeta. Las micropipetas se fabrican estirando capilares de borosilicato (Harvard Apparatus, GC150F-15). La resistencia de las pipetas es de 3 a 4 M $\Omega$ , cuando se las llena con una solución interna que similar al citoplasma, particularmente en lo concerniente a sustancias sujetas a transporte y metabolismo celular. La solución para hacer registros en fijación de voltaje (*voltaje-clamp*) contiene (en mM): CsCl 110, Hepes 40, TEA-Cl 10, fosfocreatina 12, EGTA 1, Mg-ATP 2, Li-GTP 0,5 y MgCl<sub>2</sub> 1. El pH se ajusta a 7,3 con CsOH. Para bloquear las corrientes de Na<sup>+</sup> y evitar potenciales de acción postsinápticos, se agrega 10 mM N-(2,6-diethylphenylcarbamoylmethyl)-triethylammonium chloride (QX-314). Se añade también Lucifer Yellow para visualizar el terminal presináptico por fluorescencia.

El sistema de medición consiste esencialmente en un amplificador operacional regenerativo Multiclamp 700 A (Axon Instruments, Union City, CA) que permita controlar el potencial de membrana (en modo, fijación de voltaje o *voltaje-clamp*), siendo capaz de inyectar la corriente necesaria para compensar la apertura de canales iónicos dependientes del voltaje. De esta manera, la corriente inyectada por el amplificador de *patch*, cambiada de signo, corresponde a la corriente total que pasa través de los canales iónicos en estudio (en este trabajo en particular, canales de calcio dependientes de voltaje). Un conversor analógico-digital (Digidata 1320, Axon Instruments) permite enviar las señales de potencial adecuadas al amplificador y digitalizar las señales de corriente recibidas de éste último. El control del amplificador, conversor e instrumentos periféricos de registro de señales se realiza mediante el software pClamp 10 (Axon Instruments). Los datos se adquieren a una frecuencia de 20-100 kHz y se filtran a 4-6 kHz (*low pass besse*l). La resistencia de acceso a la membrana oscila entre 6 y 15 M $\Omega$ , y la capacidad de la membrana, entre 15 y 25 pF. Los transientes capacitivos debidos a este "circuito RC" constituido por la membrana

celular son compensados mediante el software en un 60-80%, al igual que los producidos por la micropipeta.

Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticas ( $I_{\text{pCa}}$ ) son evocadas por despolarización de la membrana a distintos potenciales, desde su potencial de reposo (*holding*, -75 mV). Para aislar las  $I_{\text{pCa}}$  se añade a la solución externa inhibidores de los canales de  $\text{Na}^+$  (TTX [1 mM] y QX-314 [0,5 mM] respectivamente) y de  $\text{K}^+$  (TEA-Cl, 10 mM). Las curvas de activación fueron obtenidas a partir de las corrientes de cola de los pulsos cuadrados que originaron la curva I-V. Para dicho propósito, se midió la amplitud de la corriente de cola y se graficó esta última en función al potencial del pulso despolarizante. Finalmente, la curva de activación fue ajustada a la ecuación de Boltzmann:

$$I(V) = I_{\text{max}} / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$$

La constante de tiempo de activación de las corrientes de calcio fue calculada como *tau* resultante del ajuste a una función exponencial simple

$$I(t) = A_i (\exp(-t/\tau_i)) + C$$

y considerando los primeros 7 ms, se estimó el *tau* de activación. Todas las mediciones de las corrientes de calcio desarrolladas en el capítulo I han sido registradas a ciego.

Los potenciales de acción (PA) presinápticos en los terminales del cáliz de Held fueron medidos en configuración *whole-cell* en el modo de fijación de corriente (*current-clamp*). La solución intracelular de las pipetas para estas mediciones contienen (mM): Gluconato de K 110, KCl 30, Hepes 10,  $\text{Na}_2$ fosfocreatina 10, EGTA 0,2, Mg-ATP 2, Li-GTP 0,5 y  $\text{MgCl}_2$  1. Solo aquellas células cuyo potencial de membrana en reposo se mantuvo entre -60 mV y -75 mV sin inyección de corriente fueron seleccionadas para realizar mediciones. La resistencia en serie y la capacitancia de la micropipeta sellada a la membrana celular después de la ruptura del sello se compensó electrónicamente. Los PAs fueron generados mediante la inyección de un pulso de corriente de 1 nA a 2 nA durante 0,25 ms.

Las EPSCs fueron evocadas por estimulación de los axones que atraviesan la línea media del MNTB, utilizando un electrodo bipolar de platino al que se le aplica una diferencia de potencial (estímulos de 0,1 ms de duración, 4-7 V de amplitud) mediante

una unidad de estimulación aisladora. Esto genera un PA presináptico y la apertura de canales de calcio que disparan la excitación. Para identificar las neuronas postsinápticas a las cuales les ha llegado el estímulo, se registraron en forma extracelular los potenciales de acción. Luego se procedió a registrar las EPSCs al potencial de reposo de -75 mV, en el modo *whole-cell*. Se agregó estricnina 2  $\mu$ M a la aCSF para bloquear las corrientes inhibitorias glicinérgicas. Cuando se estimuló a alta frecuencia se añadió ácido kinurénico (1 mM, Tocris) para minimizar la saturación de los receptores postsinápticos de glutamato. Se estudió los fenómenos de depresión a corto termino (*Short-term depresión*, STD) y la recuperación de ésta (*recovery*) sobre las células principales del MNTB de los S218L y en animales WT en presencia de PGB.

El análisis de datos se realizó con el software Clampfit 10.2, Origin6.0 y SigmaPlot 10.

### **Farmacología**

Los experimentos en los cuales se utiliza EGTA-AM (0,2 mM, disuelto en DMSO 1/1000), se preincubaban las rodajas de cerebro durante 30 min. a temperatura ambiente en aCSF normal. Dado que este éster es fotodegradable, la incubación se realizó protegiendo la preparación de la luz.

En los experimentos de tratamiento con pregabalina (PGB) se utilizó esta droga, cuyo stock se disolvió cada día antes de comenzar los experimentos en la solución aCSF (100 mM). Las concentraciones finales estuvieron en el rango de 10  $\mu$ M a 1 mM. La droga fue generosamente cedida por el laboratorio GADOR.

# ***Capítulo I***

***Alteraciones de la transmisión sináptica en  
ratones transgénicos modelo de migraña  
(S218L)***

## **Alteraciones de la transmisión sináptica en ratones transgénicos modelo de migraña (S218L)**

### **Introducción I**

Se han realizados numerosos estudios para determinar la incidencia de las mutaciones de los canales de calcio sobre las corrientes. Como se ha detallado en la introducción general, para el caso de la FHM1, existen datos experimentales que sugieren tanto un incremento como una reducción en la densidad de corriente de calcio. La mutación R192Q de la FMH1 elimina una carga positiva del sensor de voltaje (Amstrong y Hille, 1998). Cuando esta mutación es introducida en el cDNA de conejo y expresada en oocitos de *Xenopus*, la mutación no tiene ningún efecto en la activación de los canales (Kraus y col., 1998). Sin embargo, mediciones realizadas en células HEK293 transfectadas con la isoforma humana mutada, han mostrado un incremento en la densidad de corriente máxima y en la probabilidad de apertura (Hans y col., 1999). Por el contrario, la mutación TM 666 de la FMH1, la cual genera una sustitución de la treonina por metionina en la posición 666, si es expresada en células HEK293, afecta tanto la corriente iónica como la activación de los canales, resultando en una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  menor (Barret y col., 2005). La expresión de R192Q y TM666, así como otras mutaciones en neuronas de hipocampo de ratones *knock-out* carentes de subunidad  $\alpha 1A$ , resultan en canales menos efectivos que en ratones WT en su habilidad para conducir corrientes de calcio, pero en general no muestran diferencias en la activación dependiente del voltaje (Cao y col., 2004; Cao y Tsien, 2005). En la unión neuromuscular de ratones con la mutación R192Q se observó un incremento importante en la liberación espontánea, mientras que la liberación evocada manifestaba un aumento significativo sólo a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Kaja y col., 2004; van den Maagdenberg y col., 2004). Pietrobon y col. (2005) han descrito un incremento en la liberación de glutamato en autapsis corticales de ratones KI R192Q. En cultivo de células grano de cerebelo esta mutación conduce a un decremento de la densidad de corriente (Tottene y col., 2002). Se debe considerar que el uso de diferentes sistemas de expresión, puede explicar las discrepancias mencionadas en este párrafo.

Recientemente se ha desarrollado otro ratón transgénico con la mutación humana S218L ubicada en el *loop* intracelular que une los dominios IS4-IS5 de la subunidad  $\alpha 1$  de los canales de calcio  $\text{Ca}_v2.1$  (van den Maagdenberg y col., 2010). Esta mutación

*missense* implica una sustitución de una serina por una leucina en el aminoácido 218 de la subunidad  $\alpha 1A$  (ver localización en la Fig. IV en la Introducción general).

Esta alteración produce un fenotipo clínico severo con trauma cerebral que son frecuentemente seguidos por un profundo estado de coma (a veces fatal) o estupor, alta fiebre y edemas cerebrales de largo termino (Fitzsimons y Wolfenden, 1985; Kors y col., 2001).

### Modelos transgénicos KI

La generación de animales KI que portan las mutaciones R192Q y S218L, permitieron realizar los primeros análisis de las consecuencias funcionales de las mutaciones asociadas a FHM1 y la transmisión sináptica en neuronas que expresan estas proteínas en sistemas endógenos (van den Maagdenberg y col., 2004; Tottene y col., 2009; van den Maagdenberg y col., 2010). De estas dos mutaciones, el S218L produce un síndrome clínico dramático más allá de la sintomatología general de migraña. Estos síntomas incluyen ataxia cerebelar progresiva, convulsiones epilépticas, coma o profundo estupor y edema cerebral que muchas veces puede terminar en muerte tras un leve trauma cerebral (Kors y col., 2001; van den Maagdenberg y col., 2010). Mientras que el homocigota R192Q y el heterocigota S218L no exhiben un fenotipo evidente, los homocigotos S218L pueden presentar una leve ataxia cerebelar permanente, ataques espontáneos de hemiparesis (a veces fatal) y/o convulsiones generalizadas y edema después de un leve impacto cerebral (van den Maagdenberg y col., 2004; 2010).

En las células granulares y piramidales de la corteza proveniente de R192Q y S218L, la densidad de la corriente de calcio mediada por los canales P/Q fue mayor que en neuronas WT en un amplio rango de relativas despolarizaciones leves reflejando esto, una activación de los canales mutantes entre 8-9 mV más negativos que los WT. Sin embargo la densidad de corriente P/Q fue similar en los KI y WT a mayores potenciales (van den Maagdenberg y col., 2004; Tottene y col., 2009; van den Maagdenberg y col., 2010). De esta forma, en los dos modelos murinos de FHM1 y en los dos tipos de neuronas (expresando diferentes canales P/Q, con diferentes propiedades de activación entre células de cerebelo y corteza en WT; Tottene y col., 2009) las consecuencias funcionales de las mutaciones FHM1 sobre los canales  $Ca_v2.1$  nativos fueron casi similares a las observadas en registros de canales únicos (Tottene y col., 2002; 2005). En concordancia con un menor umbral de activación de

los canales P/Q S218L comparados con los R192Q (Tottene y col., 2009) la ganancia de función de la corriente P/Q a voltajes más hiperpolarizantes fue mayor en el S218L que en el R192Q (van den Maagdenberg y col., 2004; 2010). El desplazamiento a voltajes más hiperpolarizantes de la activación en los canales P/Q, así como la ganancia de función en el S218L fue alrededor de dos veces mayor en el homocigota comparado el heterocigota revelando un efecto alelo-dosaje específico consistente con la dominancia de la mutación de FHM1 en pacientes (van den Maagdenberg y col., 2010). Las densidades de otras canales de calcio (L, N y R) fueron similares en los KI y WT indicando la ausencia de mecanismos compensatorios (van den Maagdenberg y col., 2004; Tottene y col., 2009; van den Maagdenberg y col., 2010).

El primer indicio que la ganancia de función observada en estas mutaciones de los canales P/Q podría aumentar la liberación de neurotransmisor evocada, se obtuvo de estudios realizados en la placa neuromuscular. La neurotransmisión evocada no presentó alteraciones a concentraciones extracelulares fisiológicas de calcio pero ésta se vio muy incrementada a 0,2 mM de calcio en los animales KI (van den Maagdenberg y col., 2004; Kaja y col., 2005; van den Maagdenberg y col., 2010). Recientemente, la neurotransmisión excitatoria fue estudiada en microcultivos neuronales y en el contexto de circuitos neuronales funcionales en rodajas de cerebro provenientes de ratones homocigotos KI R192Q (Tottene y col., 2009). Los resultados mostraron un incremento en la intensidad sináptica a concentraciones fisiológicas de calcio, dado este aumento, por el influjo de calcio generado por un potencial de acción a través de los canales mutantes y aumentando la probabilidad de liberación de glutamato en las sinapsis de las células piramidales de la corteza. La depresión a corto término (*short term depression*, STD) durante trenes de potenciales de acción fue también aumentada. Sin embargo, ni la amplitud ni la frecuencia de los miniaturas fueron alterados, indicando la ausencia de mecanismos homeostáticos compensatorios en las sinapsis excitatorias de la células piramidales (Tottene y col., 2009).

Las discrepancias halladas en los diferentes modelos de expresión y las distintas mutaciones, muestran la importancia de estudiar los canales  $Ca_v2.1$  mutados en su tejido nativo (presináptico) para reproducir las condiciones fisiológicas y analizar las consecuencias de estas mutaciones en las sinapsis donde estos canales se expresan normalmente. En este primer capítulo de la presente tesis se propone estudiar las consecuencias funcionales de la mutación humana S218L expresada en ratones transgénicos KI sobre el modelo sináptico del cáliz de Held-MNTB.

## Resultados I

### **Alteraciones de las propiedades biofísicas de los canales de calcio $Ca_v2.1$ en KI S218L**

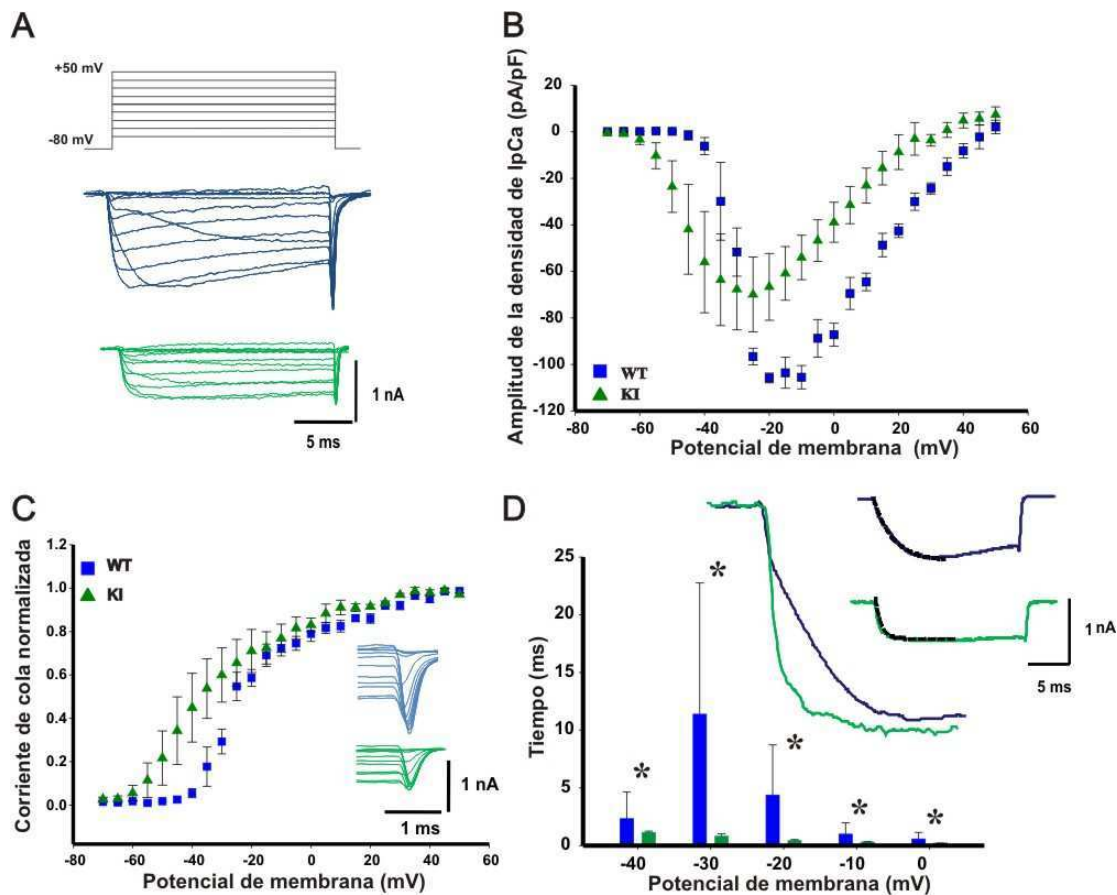
Inicialmente se decidió estudiar los efectos de la mutación S218L que genera FHM1 sobre las propiedades biofísicas de las corrientes de calcio. Primariamente se examinó la relación corriente-voltaje (comúnmente denominada curva I-V) utilizando un protocolo clásico de pulsos cuadrados despolarizantes entre -60 y +50 mV.

La Fig. 1.1A muestra trazos representativos de los registros obtenidos. En los ratones WT la activación de la corriente de calcio comienza alrededor de los -45 mV con un máximo de corriente a los -15 mV (n=10) mostrando un aparente potencial de reversión alrededor de +50 mV. Por el contrario, las corrientes de calcio de los animales KI comienzan a activarse alrededor de los -60 mV con un pico de corriente a los -25 mV (n=5) y un potencial de reversión similar al WT. En la Fig. 1.1B se grafican las densidades de corriente obtenidas a partir de normalizar las amplitudes de las corrientes a la capacitancia de cada célula. Las máximas densidades de corriente medidas al pico de la I-V fueron significativamente diferentes:  $103,6 \pm 6,6$  pA/pF para los WT y  $69,9 \pm 16,1$  pA/pF para KI (ANOVA de medida repetidas,  $F_{2,184}=8,476$ ;  $p < 0,001$ ; Student-Newman-Keuls post-hoc test,  $t < 0,001$ ). Más allá de estas diferencias observadas, cabe resaltar que la curva I-V de los animales transgénicos presenta un claro desplazamiento hacia potenciales más negativos.

Utilizando los mismos registros de las curvas I-V, se pueden analizar otras propiedades funcionales de estos canales iónicos. Las curvas de activación en estado estacionario provenientes de las corrientes de cola de estos registros, mostraron un desplazamiento en el mismo sentido, hacia potenciales más hiperpolarizados (Fig. 1.1C). Ajustando la curva de amplitud de la corriente de cola (normalizada) *versus* el potencial de los pulsos cuadrados correspondientes (de la I-V) con la función de Boltzmann, se pueden obtener la pendiente (m) y el potencial medio de activación ( $V_{1/2act}$ ). En este caso tanto la pendiente (k:  $7,6 \pm 1,2$  para el WT (n=10) y  $12,3 \pm 3,2$  para el KI (n=5)) como el potencial medio de activación ( $V_{1/2act}$ : -23,0  $\pm$  1,7 mV para el WT y -36,7  $\pm$  6,4 mV para el KI) han sido estadísticamente diferentes para ambos genotipos (Student t-test;  $p=0,012$ ). La velocidad de activación de las corrientes de calcio, ajustadas con una función exponencial simple (ver fórmula en materiales y métodos),



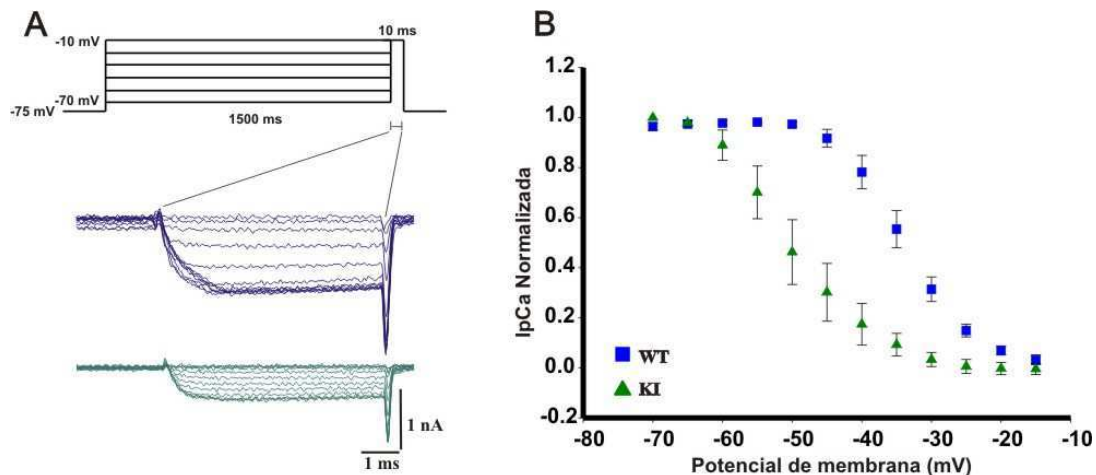
fue significativamente más rápida en los animales KI que los WT en el rango de -40 a 0 mV (Fig. 1.1D, Student t-test,  $p < 0,05$ ).



**Figura 1.1. Las propiedades biofísicas de los canales de calcio son diferentes en cálices provenientes del KI S218L.** **A.** Trazos representativos de las corrientes de calcio presinápticas (IpCa, abajo) evocadas por pulsos cuadrados despolarizantes de 20 ms (arriba). **B.** Relación corriente-voltaje (I-V). Dos características especiales han sido observadas en los S218L: 1) un desplazamiento de la curva I-V hacia potenciales más negativos (WT pico a -15 mV,  $n=10$  y KI S218L pico a -25 mV,  $n=5$ ); 2) un decremento significativo de la densidad de la corriente de calcio (densidad al pico de corriente; WT:  $1330 \pm 100$  y KI:  $920 \pm 300$ ;  $p < 0,05$ ). **C.** Activación de las corrientes de calcio obtenidas a partir de los pulsos despolarizantes de la I-V. Las corrientes fueron ajustadas con una función exponencial. La tasa de activación de las IpCa fue más rápida en el modelo S218L en el rango de -40 a 0 mV,  $p < 0,05$ . **D.** Activación en estado estacionario. Las curvas de activación de las IpCa obtenidas del ajuste de las corrientes de cola registradas en la curva vs el potencial del pulso de la I-V. La corriente de calcio se activa a potenciales más negativos en los S218L (WT:  $V_{1/2} = -23,0 \pm 1,7$  mV y KI:  $-36,7 \pm 6,4$  mV) con diferentes pendientes (WT:  $7,6 \pm 1,2$  y KI:  $12,3 \pm 3,2$ ). Las barras verticales representan S.E.M.

Otra de las propiedades biofísicas de los canales P/Q analizadas fue la inactivación en estado estacionario (*steady-state inactivation*). Para ello se utilizó un protocolo de pulsos cuadrados despolarizantes de larga duración (1,5 seg) y luego un pulso *test* al pico de la I-V (Fig. 1.2A). Si se grafica la corriente de calcio en el pulso *test* versus el potencial al cual fue despolarizado previamente con el pulso de larga duración, se puede ajustar esta curva a una función de Boltzmann y obtener, al igual que se realizó con la activación, la pendiente y el potencial medio de inactivación ( $V_{1/2}$  inac, Fig. 1.2B). De la misma forma que fue observado con la activación, tanto la pendiente ( $k$ :  $-8,81 \pm 0,21$  para WT ( $n=9$ ) y  $-5,29 \pm 0,53$  para KI ( $n=4$ )) como el potencial medio ( $V_{1/2}$  inac

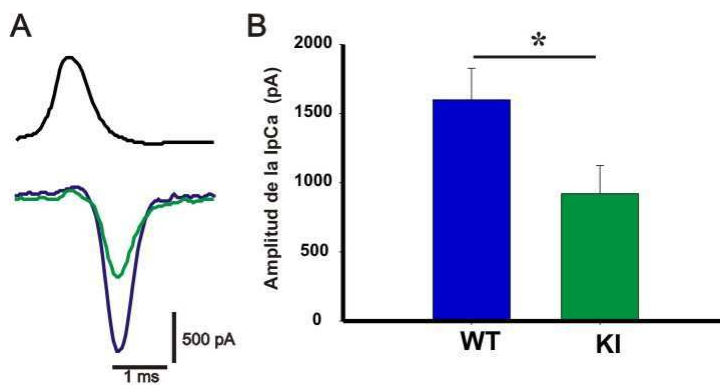
inac:  $-34,4 \pm 1,4$  mV para WT y  $-50,3 \pm 3,0$  mV para KI) presentan cambios significativos entre ambos genotipos (Student t-test;  $p=0,0018$ ). Teniendo en consideración estos datos iniciales, se observa que la mutación S218L afecta las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo P/Q induciendo la apertura de estos más aceleradamente y a potenciales mucho más cercanos al potencial de reposo.



**Figura 1.2. La mutación S218L cambia la inactivación en estado estacionario.** A. Protocolo de estimulación (arriba) y trazos representativos (abajo) de las corrientes de calcio evocadas por un pulso *test* de 10 ms al potencial correspondiente al pico de la I-V luego de la aplicación de un prepulso condicionante de 1,5 seg a diferentes voltajes en el rango de los -75 a los -10 mV (pasos de 10 mV). B. La corriente del pulso *test* esta normalizada al pico máximo de amplitud y luego graficada en función del voltaje del prepulso. Esta curva fue ajustada por la distribución de Boltzmann. Los voltajes medios de inactivación son:  $V_{1/2} = -34,4 \pm 1,4$  mV para WT ( $n=9$ ) y  $-50,3 \pm 3,0$  mV para KI ( $n=4$ , Student t-test;  $p=0,0005$ ). Las pendientes han sido significativamente menores en WT ( $-8,81 \pm 0,21$ ) que en KI ( $-5,29 \pm 0,53$ , Student t-test;  $p=0,002$ ). Las barras verticales representan S.E.M.

**La corriente de calcio generada por un potencial de acción se encuentra reducida en el KI S218L. Implicaciones fisiológicas.**

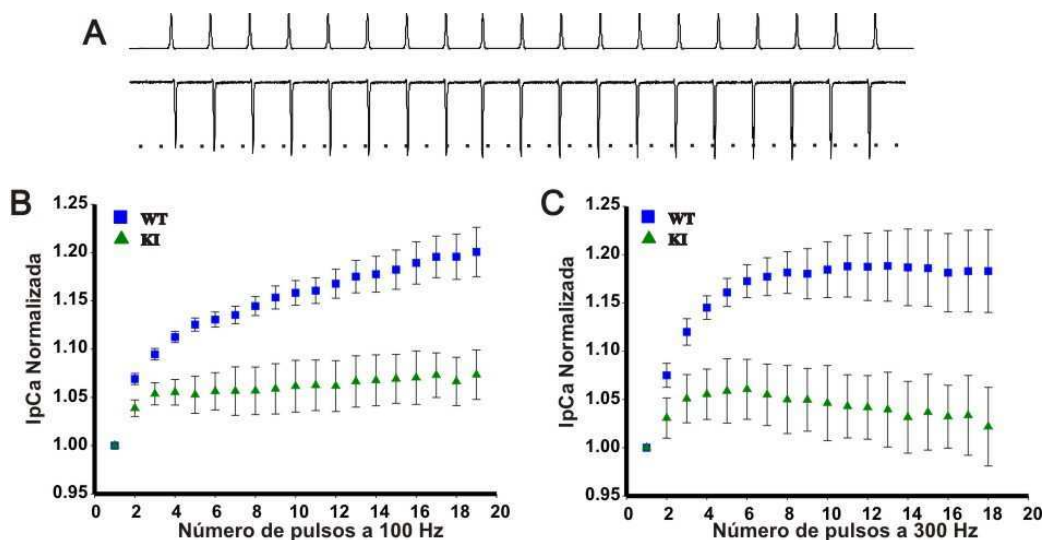
Asumiendo que la cinética de la corriente de calcio puede ser modelada por las ecuaciones de Hodgkin y Huxley (HyH), un desplazamiento de los voltajes de activación hacia potenciales más negativos podría generar una mayor entrada de calcio durante un PA (Borst y Sackmann, 1999). Con el objetivo de abordar este tópico, se propuso estudiar la corriente de calcio en el cáliz de Held evocada por un único PA. Para esto previamente se registró en el modo de fijación de corriente (*current-clamp*) un potencial de acción real en el terminal presináptico generado luego de inyectar un pulso de corriente (duración: 0,1 ms; amplitud: 500-1000 pA). Este potencial de acción registrado, fue utilizado como molde para evocar una IpCa en el propio terminal bajo el modo de fijación de voltaje (*voltaje-clamp*; Fig. 1.3A). Contrariamente a lo esperado en función al modelo de HyH, la corriente de calcio registrada en los animales KI S218L ( $1,6 \pm 0,2$  nA;  $n=9$ ) fue significativamente menor que en los animales WT ( $0,9 \pm 0,2$  nA,  $n=5$ ; Fig. 1.3B; Student t-test;  $p=0,03$ ).



**Figura 1.3. La IpCa evocada por un potencial de acción es reducida en KI. A.** Molde del potencial de acción (arriba) y trazos representativos de las corrientes de calcio evocadas por este potencial. **B.** La corriente de calcio en el modelo transgénico se encuentra reducida en comparación con el WT (WT: 1600±230 pA, n=9 y KI: 920±200 pA, n=5), Student t-test, p=0,03). Barras verticales representan S.E.M.

### Reducción de la facilitación de la corriente de calcio en el S218L

Ha sido reportado, que la corriente de calcio presináptica en el cáliz de Held exhibe una facilitación calcio-dependiente frente a estímulos similares a potenciales de acción (Borst y Sakmann, 1998; Cuttle y col., 1998; Forsythe y col., 1998). Con la finalidad de estudiar si este fenómeno se ve afectado en el genotipo mutante, se generaron trenes de PA a una frecuencia de 100 o 300 Hz (Fig. 1.4A) tomando como molde PA real unitario registrado anteriormente. Como consecuencia de esta estimulación, la tasa de facilitación de IpCa fue abruptamente reducida en el animal transgénico. A 100 Hz (Fig. 1.4B) la tasa de facilitación en WT fue de 20±3% (n=8) mientras que en el KI fue del 7±2% (n=5) (Student t-test; p=0,002). La misma tendencia fue observada a 300 Hz (Fig. 1.4C; WT: 18±4 (n=8) y KI: 2,0±0,4% (n=5); Student t-test; p=0,009).



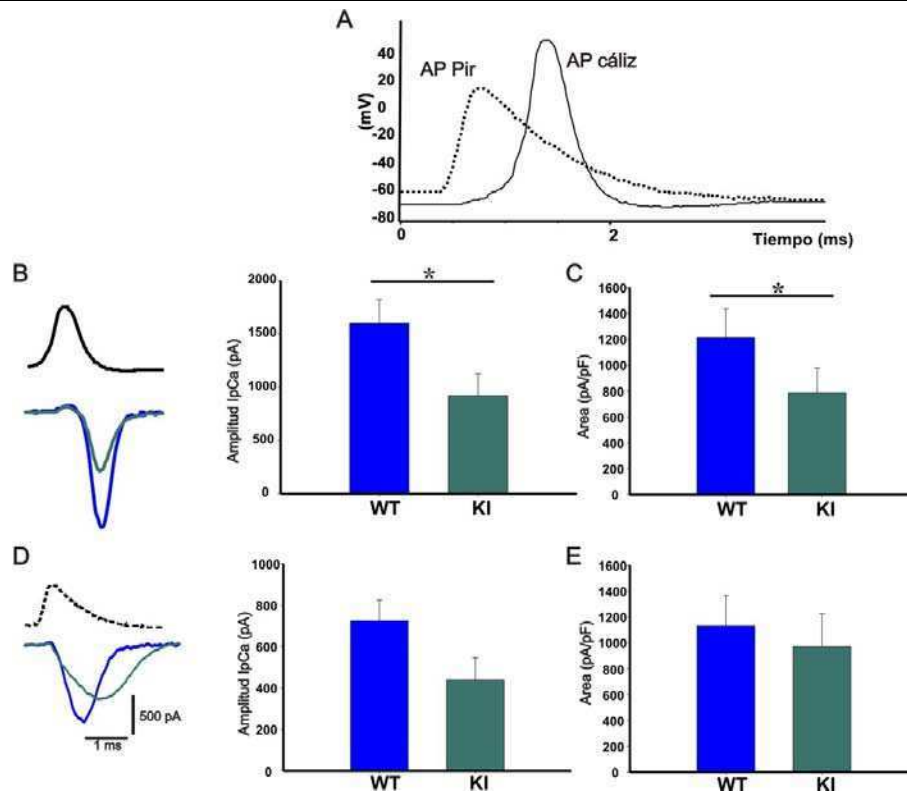
**Figura 1.4. Reducción de la facilitación de la corriente de calcio en el modelo S218L. A.** Trazos representativos de las corrientes de calcio (abajo) generadas por trenes de potenciales de acción a 100 Hz (arriba). Las amplitudes de las corrientes evocadas por los trenes de 100 (B) o 300 Hz (C) fueron normalizadas. A 100 Hz la facilitación fue claramente observada en el WT (alcanzando la saturación a 120±3%, n=8) la cual fue significativamente atenuada en los KI S218L (107±2%, n=5). La misma tendencia se observó a 300 Hz (WT: 118±4% vs. KI: 102±1%). Las barras verticales representan S.E.M.

**La duración del PA limita la aparición de diferencias en la  $I_{pCa}$  entre genotipos**

Dado que la migraña es una patología que involucra principalmente alteraciones en los circuitos corticales (Aurora y Wilkinson, 2007), se decidió estudiar como el PA de las células piramidales de corteza podría actuar en forma diferencial sobre las corrientes de calcio evocadas como se ha demostrado en otro modelo transgénico (R192Q; Inchauspe y col., 2010). La principal diferencia entre el PA de cáliz y el de corteza es el ancho a la mitad de la altura (Fig. 1.5A). A los fines prácticos, en este trabajo se considera un PA angosto (como el que presenta el cáliz de Held; ancho a la mitad de la altura:  $0,44 \pm 0,02$  ms) y un PA ancho (como se ha descrito en neuronas piramidales de la corteza; ancho a la mitad de la altura:  $1,97 \pm 0,08$  ms).

El PA de corteza, al igual que el de cáliz, fue previamente registrado en el modo de *current-clamp* (en rodajas procedentes de animales de la misma edad) y luego ambos fueron utilizados como moldes para evocar las corrientes de calcio en el terminal sináptico del cáliz de Held.

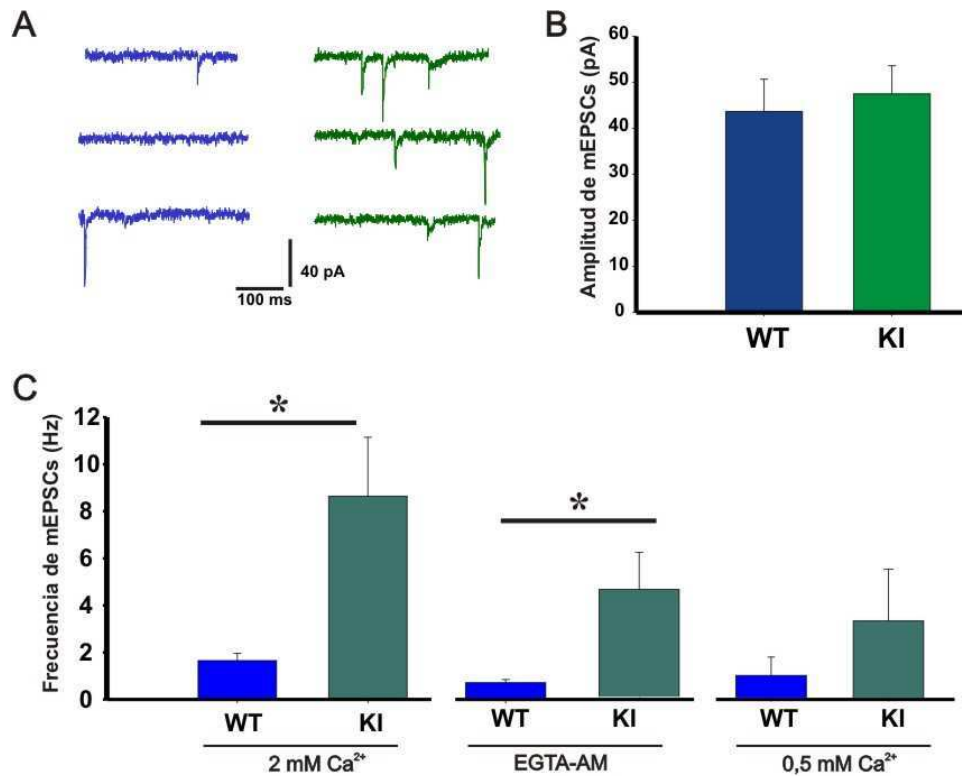
Como se observó anteriormente en este trabajo, la corriente de calcio evocada por el PA de cáliz fue significativamente menor en el KI que en el WT (Fig. 1.5B; WT:  $1600 \pm 230$  pA,  $n=9$  y KI:  $920 \pm 200$  pA,  $n=5$ ; Student t-test;  $p=0,03$ ) y se obtiene el mismo patrón al comparar las áreas (Fig. 1.5C; WT:  $725 \pm 100$  pA.ms; KI:  $438 \pm 108$  pA.ms; Student t-test;  $p=0,04$ ). Sin embargo, cuando se utiliza como molde un PA más ancho, las diferencias tanto en la amplitud de la corriente (Fig. 1.5D; WT:  $1213 \pm 224$  pA,  $n=9$ ; KI:  $788 \pm 193$  pA,  $n=5$ ; Student t-test;  $p=0,07$ ) como en el área desaparecen (Fig. 1.5E; WT:  $1130 \pm 235$  pA.ms; KI:  $970 \pm 253$  pA.ms; Student t-test;  $p=0,3$ ). Estos datos sugieren, que como ocurre en el otro modelo transgénico (R192Q), el ancho del PA podría desempeñar un rol muy importante en la modulación de la ganancia de función descrita en este tipo de patologías.



**Figura 1.5. La forma del PA suprime las diferencias en el influjo de calcio entre el WT y KI.** **A.** Forma de los PA utilizados como moldes para evocar la IpCa en el cáliz de Held. **B.** Trazos representativos de la IpCa generada por un PA angosto (izq) y la cuantificación de la amplitud media de dicha corriente (der). **C.** Al igual que la amplitud media, el área de la corriente fue significativamente menor en el KI utilizando este PA (Student t-test;  $p=0,04$ ). **D.** Trazos representativos de la IpCa generadas por un PA ancho (izq) y la cuantificación de la amplitud media de dicha corriente (der). En este caso no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos ya sea estudiando la amplitud media de la corriente o el área (**E**).

### ***Alteraciones en los eventos sinápticos excitatorios: miniaturas espontáneos y corrientes evocadas***

El primer punto que se decidió estudiar relacionado con la transmisión sináptica fue la liberación espontánea miniatura (mEPSCs, *miniatures excitatory post synaptic currents*, Fig. 1.6A). En presencia de TTX (1  $\mu$ M) se registró tanto la amplitud como la frecuencia de estos eventos. Mientras que la amplitud (Fig. 1.6B) de las mEPSCs fue muy similar entre ambos genotipos ( $-43,66 \pm 6,7$ ;  $n=17$  y  $-47,48 \pm 6,1$ ;  $n=7$ ) la frecuencia (Fig. 1.6C, panel izquierdo) fue mucho mayor en los animales KI S218L ( $8,64 \pm 2,53$  Hz) que en los animales WT ( $1,65 \pm 0,31$  Hz) (Student t-test;  $p=0,0007$ ). Sin embargo cuando se estudio la amplitud de estos eventos en bajo calcio extracelular (0,5 mM  $Ca^{2+}/2$  mM  $Mg^{2+}$ ) la frecuencia de las mEPSCs disminuyó en el KI (Fig. 1.6C, panel central). Cuando se preincuba la preparación con EGTA-AM (200  $\mu$ M) la frecuencia en el WT fue de  $0,70 \pm 0,1$  ( $n=6$ ) y en el KI  $4,78 \pm 1,64$  ( $n=4$ ) siendo estas diferencias estadísticamente distinguibles (Student t-test;  $p=0,038$ ), (Fig. 1.6C).

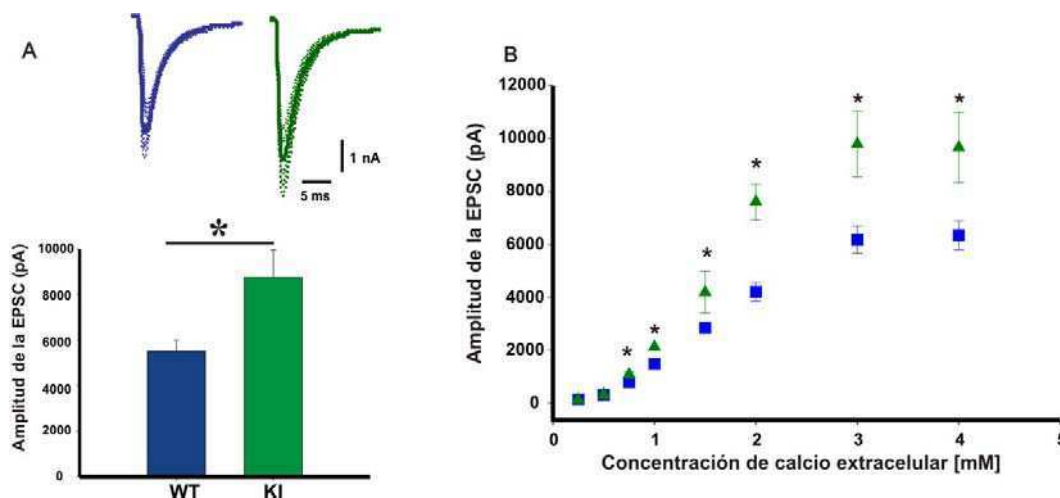


**Figura 1.6.** La frecuencia de las miniaturas (mEPSC) está aumentada en el animal transgénico. **A.** Trazos representativos de los miniaturas en presencia de TTX (1  $\mu$ M) a 2 mM Ca<sup>2+</sup>/1 mM Mg<sup>2+</sup>. **B.** La amplitud de los eventos miniaturas fue similar para ambos genotipos (WT: 43 $\pm$ 7, n=17 y KI: 47 $\pm$ 6, n=7). **C.** Frecuencia de las mEPSCs. En la condición control (panel izquierdo; 2 mM Ca<sup>2+</sup>/1 mM Mg<sup>2+</sup>) la frecuencia fue significativamente mayor en los S218L (WT: 1,65 $\pm$ 0,31 Hz, n=17 vs KI: 8,6 $\pm$ 2,5 Hz, n=7; Student t-test; p=0,0007). Cuando se adiciona EGTA-AM (200  $\mu$ M; panel medio), la frecuencia en el WT fue de 0,70 $\pm$ 0,1 (n=6) y en el KI 4,78 $\pm$ 1,64 (n=4) siendo estas diferencias estadísticamente distinguibles (Student t-test; p=0,038). Por el contrario, si se disminuye la concentración extracelular de calcio (panel derecho; 0,5 mM Ca<sup>2+</sup>/2 mM Mg<sup>2+</sup>) se observa la misma tendencia sin arrojar diferencias estadísticas. Las barras verticales representan S.E.M.

Utilizando un electrodo bipolar ubicado en la línea media (zona por donde cruzan los axones del cáliz de Held, Fig. IX de la introducción), se estimuló con pulsos simples a fin de generar un único PA en el terminal presináptico y registrar la corriente post-sináptica excitatoria (EPSC, *excitatory post synaptic current*) en la célula postsináptica. Contrariamente a lo esperado por los registros anteriores de corrientes de calcio, la amplitud de las EPSC (Fig. 1.7A) fue mayor en los KI que en los WT (WT: 5,5 $\pm$ 0,5 nA, n=15 y KI: 8,7 $\pm$ 1 nA, n=8; Student t-test; p=0,002). Utilizando este mismo tipo de protocolo de pulso simple, se procedió a analizar la amplitud de las EPSCs en función a la concentración extracelular de calcio en el rango de 0,25 a 4 mM manteniendo constante la concentración de magnesio en 2 mM (Fig. 1.7B). Para concentraciones mayores a 0,75 mM se obtuvieron amplitudes significativamente mayores en los KI que en los WT (Student t-test; p<0,05). Más allá de este resultado en el cual se registran mayores corrientes en los animales S218L que en los WT para un amplio espectro de calcio extracelular, esta figura es de gran importancia para introducir los resultados de este trabajo en un contexto fisiológico. Si bien aún no fue testado empíricamente, se supone que la concentración de calcio en el líquido cefalorraquídeo



*in-vivo* esta alrededor de 1,2 mM (Borst, 2010), concentración a la cual en esta línea experimental, se observan diferencias significativas.



**Figura 1.7. La respuesta postsináptica esta aumentada en el KI.** A. (arriba) Trazos representativos de las respuestas sinápticas. (abajo) Se evaluó la amplitud de las EPSCs en la condición normal de aCSF (2 mM de Ca<sup>2+</sup> / 1 mM de Mg<sup>2+</sup>). La amplitud de las EPSC fue significativamente mayor en los KI S218L (8770±480 pA, n=8) que en los WT (5520±480 pA, n=15), Student t-test; p=0,002. B. Amplitud de las EPSCs en función de la concentración extracelular de calcio. La amplitud de las EPSCs fue normalizada al valor de la EPSC correspondiente a 1 mM a fin de disminuir la variabilidad. Las amplitudes han sido registradas en aCSF conteniendo 2 mM de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> entre 0,25 a 4 mM. Diferencias significativas (evaluadas mediante Student t-test con un p<0,05) han sido observadas en un amplio rango de concentraciones a partir de los 0,75 mM de Ca<sup>2+</sup>. Las barras verticales representan S.E.M.

### EPSCs a baja y alta frecuencia de estimulación

A fin de poder estudiar la actividad sináptica en los animales WT y KI S218L, se procedió a evocar la respuesta sináptica con un tren de estimulación a baja (10 Hz) o altas (100 – 300 Hz) frecuencias. Para minimizar la saturación de los receptores de glutamato por su ligando, se añadió al aCSF ácido kinurénico (1mM). Como ha sido previamente descrito (Wong y col., 2003), la estimulación sináptica con trenes en este tipo de sinapsis en condiciones normales de calcio y magnesio (2 mM Ca<sup>2+</sup>/1 mM Mg<sup>2+</sup>) genera un fenómeno conocido como depresión a corto termino de las EPSCs (STD, *short-term depresión*, Fig. 1.8A izquierda). Se sabe que este fenómeno esta principalmente causado por la depleción de las vesículas sinápticas como así también por la desensibilización de los receptores AMPA (von Gersdorff y Borst, 2002). La amplitud de las EPSCs evocados luego de un tren a 10 Hz durante una estimulación de 3 seg (20 pulsos) indujo una tasa de depresión mayor en los animales WT que en los KI (WT: 32,2±2,7; n=17 y KI: 55,4±3,1; n=7; Fig. 1.8B; Student t-test; p=0,0007). Del ajuste de estos valores de depresión a una función exponencial simple surgen las constantes de tiempo: 164,4±42,1 ms para el WT y 147,8±22,3 ms para el KI (Student t-test; p>0.05).

La eficiencia de la transmisión sináptica durante la estimulación repetitiva puede ser determinada por la tasa de recuperación posterior a la depresión sináptica la cual depende de la tasa de relleno de las vesículas sinápticas del *pool*/ liberable. El curso temporal de esta recuperación fue estudiado aplicando un único pulso *test* a diferentes intervalos de tiempo desde 0,25 a 14 seg. (Fig. 1.8A derecha). La fracción de recuperación fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Fracción de recuperación} = (I_{\text{test}} - I_{\text{ss}}) / (I_1 - I_{\text{ss}})$$

donde  $I_1$  y  $I_{\text{ss}}$  son la primera y última amplitudes del tren de depresión de las EPSCs y  $I_{\text{test}}$  es la amplitud de las EPSCs del pulso *test*. La fracción de recuperación como función del tiempo puede ser ajustada a una función exponencial simple. En este caso, el  $\tau$  ( $t$ ) de recuperación de la depresión a 10 Hz para el WT fue de  $4,04 \pm 0,26$  s ( $n=4$ ) y  $2,17 \pm 0,7$  s ( $n=7$ ) para el KI (Student t-test;  $p=0,013$ ).

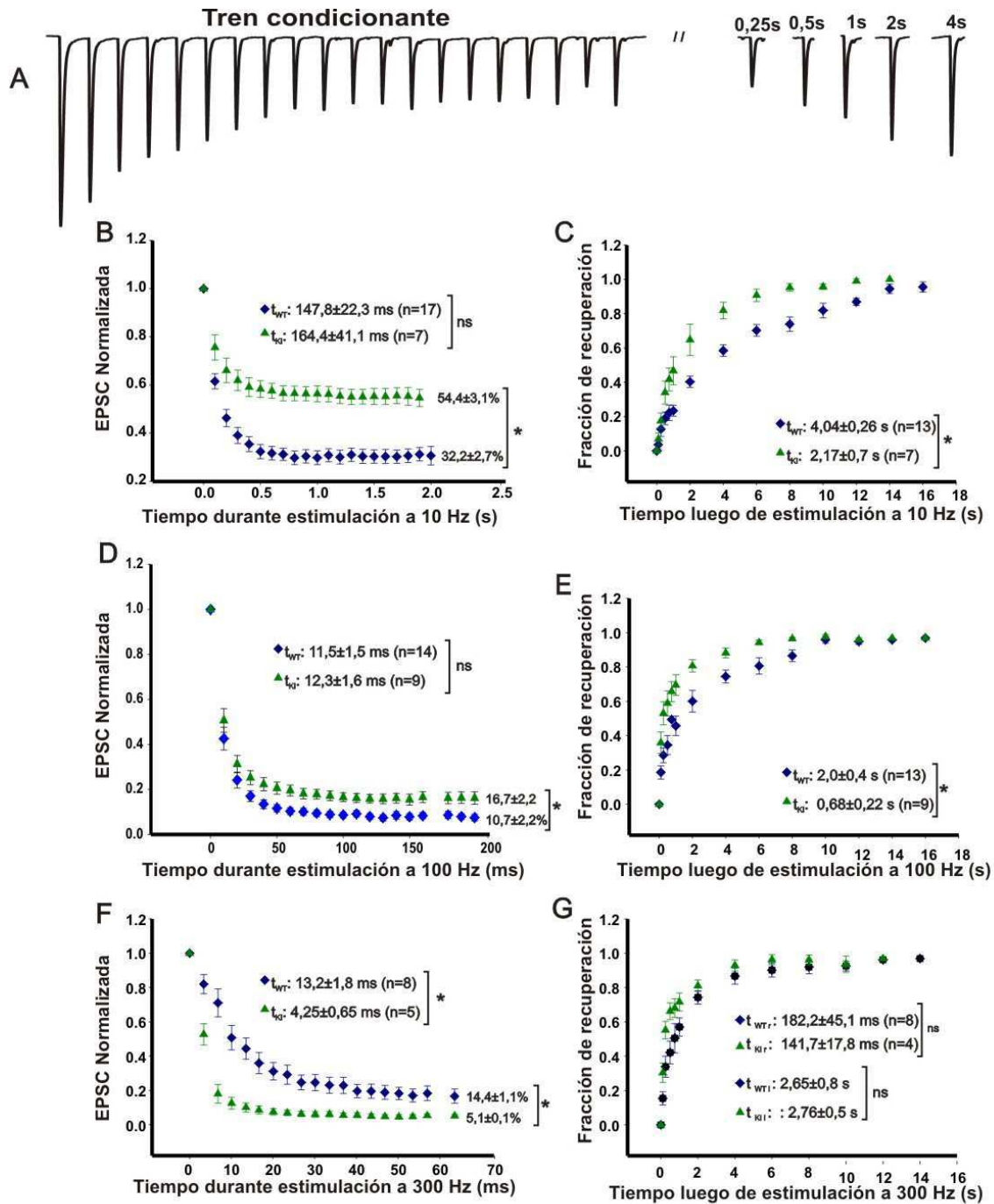
Los mismos fenómenos de depresión y recuperación han sido estudiados a alta frecuencia. Estimulando durante 0,2 segundos (100 Hz) con el tren condicionante, se obtuvo que la tasa de depresión (Fig. 1.8D) alcanzó el  $10,7 \pm 2,2\%$  ( $n=13$ ) en los WT mientras que en los KI alcanzo el  $16,7 \pm 2,25\%$  ( $n=9$ ) (Student t-test;  $p=0,001$ ). Al igual que lo observado a baja frecuencia, la recuperación de la depresión a 100 Hz (Fig. 1.8E) se mostró acelerada (esto es, presentando menor  $\tau$ ) en los animales KI ( $t_{\text{WT}}$ :  $2,0 \pm 0,4$  s y  $t_{\text{KI}}$ :  $0,68 \pm 0,22$  s; Student t-test;  $p=0,003$ ).

A diferencia de lo ocurrido a 10 o 100 Hz, a 300 Hz se observo que la tasa de depresión fue mayor en los animales KI (Fig. 1.7F; WT:  $14,4 \pm 1,11$ ;  $n=8$  y KI:  $5,1 \pm 1,1$ ;  $n=5$ ; Student t-test;  $p=0,02$ ) sin verse alterada significativamente la tasa de recuperación. A esta frecuencia, el curso temporal de la recuperación se ajusta mejor a una función bi-exponencial con un  $\tau$  rápido ( $t_r$ ) y otro lento ( $t_l$ ). Para el genotipo WT los  $\tau$ s fueron  $t_r$   $182,2 \pm 45,1$  ms y  $t_l$   $2,77 \pm 0,5$  s. mientras que para el KI fueron  $t_r$   $141,7 \pm 17,8$  ms y  $t_l$   $2,77 \pm 0,45$  s. Todos los valores de depresión y recuperación se encuentran resumidos en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Porcentajes de depresión sináptica y constantes de decaimiento de la STD y recuperación

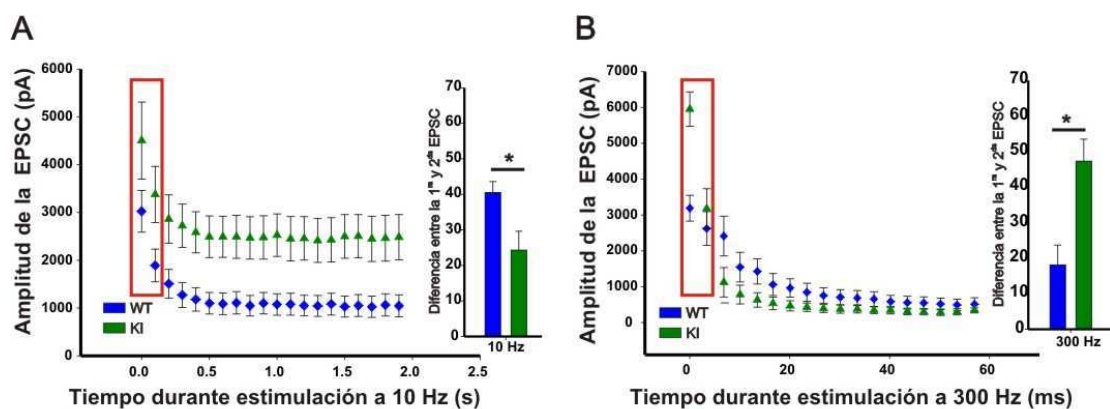
	Decaimiento				Recuperación	
	yo		tau		tau	
	WT	S218L	WT	S218L	WT	S218L
10 Hz	32,2±2,7%	55,4±3,1% (*)	147,8±22,3 ms (n=17)	164,4±42,1 ms (n=7) (ns)	4,04±0,26 s (n=13)	2,17±0,7 s (n=7) (*)
100 Hz	7,4±0,8 %	16,7±0,2 % (*)	11,5±1,5 ms (n=14)	12,3±1,6 ms (n=9) (ns)	2,0±0,4 s (n=13)	0,68±0,22 s (n=9) (*)
300 Hz	14,4±0,1%	5,1±0,1% (*)	13,2±1,8 ms (n=8)	4,25±0,65 ms (n=5) (*)	taur 182,2±45,1 ms (n=8)	141,7±17,8 ms (n=4) (ns)
					taul 2,65±0,8 s	2,76±0,5 s (ns)





**Figura 1.8. Depresión y recuperación sináptica a baja (10 Hz) y alta (100-300 Hz) frecuencia de estimulación. A.** Trazos representativos mostrando la depresión en la amplitud de las EPSCs durante 200 ms aplicando trenes de 100 Hz y la recuperación de la depresión a diferentes tiempos. Se estudió la depresión de las EPSCs durante un tren de estimulación a 10 (B), 100 (D) y 300 Hz (F). Las amplitudes están normalizadas a la primer EPSCs del tren. Los datos fueron ajustados a una función exponencial simple obteniendo como resultado los valores descriptos en la tabla (H). En los paneles de la derecha se grafican el curso temporal de la recuperación de la depresión sináptica medida como la amplitud de la EPSCs del pulso test normalizada a la amplitud de la primer EPSCs del tren condicionante. Los datos fueron ajustados a una función exponencial de primer orden tanto a 10 (C) como a 100 Hz (E) mientras que a 300 Hz se ajusto a una función biexponencial (G).

Los resultados de la STD sugieren que el S218L depleta inicialmente un mayor número de vesículas que el WT a pesar de tener un menor influjo de calcio evocado por un PA (Fig. 1.3). A fin de dilucidar el mecanismo que media este fenómeno, se propuso estudiar como es el comportamiento de una segunda EPSC evocada a diferentes intervalos de tiempo. Los datos normalizados de las EPSCs en la Figura 1.8 muestran como es el curso temporal de la STD y la recuperación, pero la amplitud absoluta de la primera EPSC es un indicador de la liberación inicial. Como se observa en la Figura 1.9, el S218L presentó una mayor EPSCs que el WT, siendo esto consistente con lo detallado en la Fig. 1.7. Sin embargo, la segunda EPSC exhibió un comportamiento distinto en cada genotipo en función a la frecuencia de estimulación. La tasa de depresión (entendida como la  $[1^{ra} EPSC_{normalizada} - 2^{da} EPSC_{normalizada}] * 100$ ) puede ser un buen indicador de cómo el influjo de calcio afecta diferencialmente la liberación. La depresión observada a 10 Hz fue de  $40,5 \pm 3,1$  (n=17) para el WT y  $24,3 \pm 5,3$  (n=7) para el KI (recuadro inserto en la Fig. 1.9A; Student t-test,  $p=0,014$ ) y esta diferencia se invierte en la STD a 300 Hz donde el WT alcanzó una depresión de  $18,1 \pm 5,6$  (n=8) y el KI de  $47,3 \pm 6,2$  (n=5), (recuadro inserto en la Fig. 1.9B; Student t-test,  $p=0,0018$ ). Sin embargo, a 100 Hz, la diferencia de las dos primeras EPSC no resultó ser diferente entre ambos genotipos (WT:  $57,5 \pm 5,1$  (n=14); KI:  $49,4 \pm 5,3$  (n=9); (Student t-test,  $p=0,14$ ). Estos datos sugieren que tanto la calcio-dependencia como la relación exo/endocitosis en función a la frecuencia de estimulación se encuentran incrementadas en el terminal sináptico portador de los canales de calcio S218L. Este mecanismo será analizado en la discusión I.



**Fig. 1.9. Amplitudes absolutas de las EPSCs en los trenes de STD.** Los gráficos representan el curso temporal de la STD a partir de las amplitudes absolutas de las EPSC tanto a 10 Hz (A) como a 300 Hz (B). A partir de las amplitudes normalizadas (como se mostró en la Fig. 1.8) se procedió a realizar la diferencia entre la primera y segunda EPSC (ver recuadro rojo;  $[1^{ra} EPSC_{normalizada} - 2^{da} EPSC_{normalizada}] * 100$ ) a fin de estimar el grado de depresión generado en la segunda EPSC como producto del influjo de calcio. La diferencia obtenida a 10 Hz fue de  $40,5 \pm 3,1$  (n=17) para el WT y  $24,3 \pm 5,3$  (n=7) para el KI (recuadro inserto Fig. 1.9A; Student t-test,  $p=0,014$ ). Esta tendencia se invierte a 300 Hz donde el WT alcanzó una diferencia de  $18,1 \pm 5,6$  (n=8) y el KI de  $47,3 \pm 6,2$  (n=5), (recuadro inserto Fig. 1.9B; Student t-test,  $p=0,0018$ ).

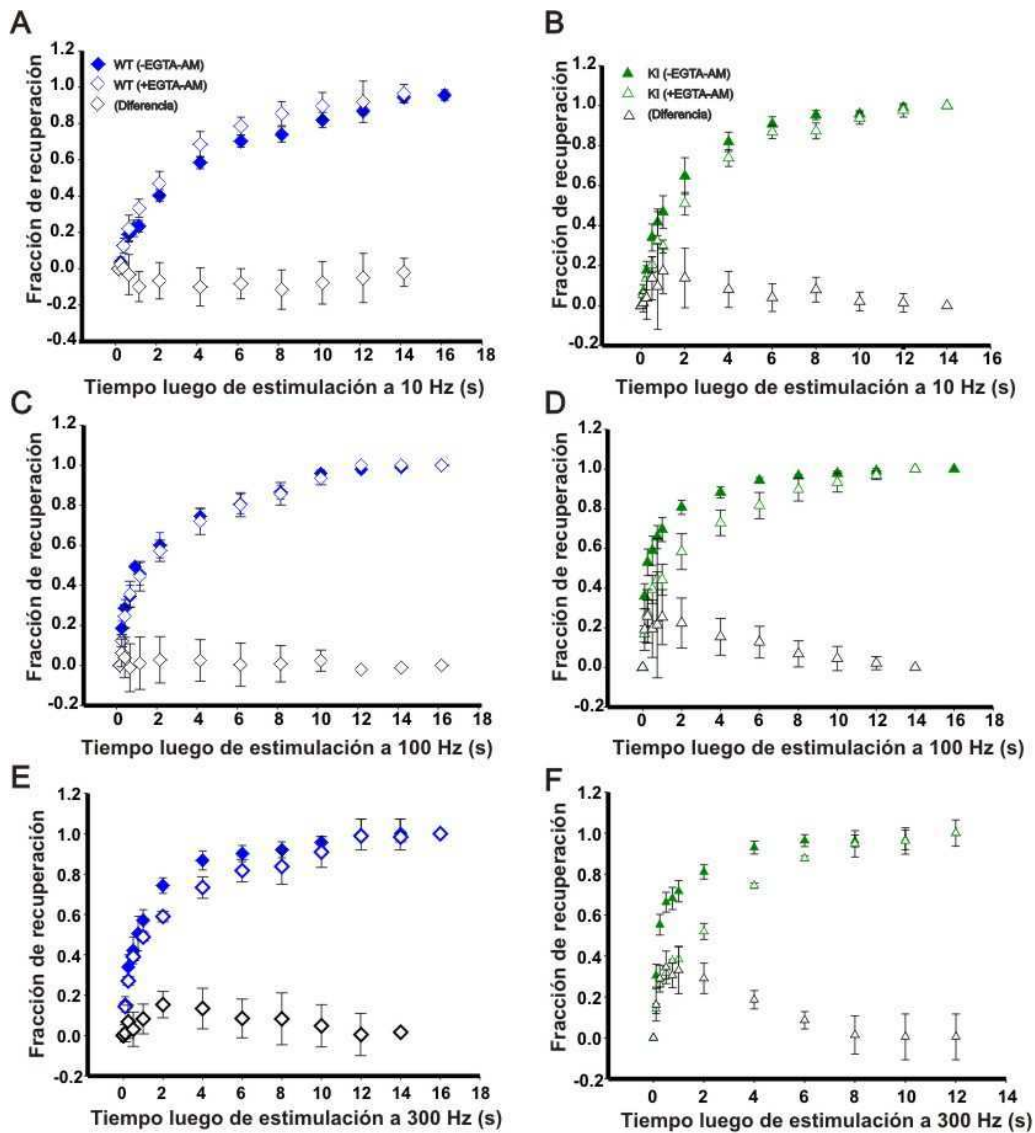
**El aumento en calcio residual presináptico acelera la recuperación de las EPSCs luego de STD en los KI S218L**

Luego se continuó estudiando el efecto de un *buffer* de calcio lento en el terminal presináptico a fin de estudiar el rol del calcio residual sobre la cinética de recuperación de la STD. Las rodajas fueron preincubadas con EGTA en su forma tetra-acetoxymethyl ester (EGTA-AM; 0,1 mM).

La recuperación de las EPSCs ha sido afectada considerablemente por el EGTA-AM en los animales S218L (Fig. 1.10 paneles izquierdos). A 10 Hz (Fig. 1.10A y B), el EGTA-AM no generó cambios en las constantes cinéticas de recuperación ni en el WT ( $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $4.04 \pm 0,25$ ;  $n=13$ ;  $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $3.78 \pm 1,36$ ;  $n=4$ ; Student t-test,  $p > 0,05$ ) ni en el KI ( $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $2,17 \pm 0,7$ ;  $n=7$ ;  $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $2,97 \pm 0,52$ ;  $n=4$ ; Student t-test,  $p > 0,05$ ). Sin embargo a 100 Hz (Fig. 1.10 C y D), mientras no indujo cambios en el WT ( $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $2,0 \pm 0,4$ ;  $n=13$ ;  $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $2,8 \pm 0,9$ ;  $n=4$ ; Student t-test,  $p > 0,05$ ), el KI sufrió un severo enlentecimiento de su recuperación ( $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $0,68 \pm 0,22$ ,  $n=9$ ;  $t_{\text{EGTA-AM}}$ :  $2,7 \pm 0,9$ ,  $n=4$ ; Student t-test,  $p > 0,0027$ ). Como se analizó en la Figura 1.8, el curso temporal de la recuperación a 300 Hz se ajusta mejor a una función bi-exponencial. Sin embargo, el EGTA-AM genera un enlentecimiento de la recuperación ajustándose ésta a una función mono-exponencial (Wang y Kaczmarek, 1998). Como se observa en la Figura 1.10E y F y se detalla en la Tabla 2.1, la pre-incubación con EGTA-AM permitió un mejor ajuste de la recuperación a una mono-exponencial en ambos genotipos.

Tabla 2.2. Constantes de recuperación de la STD en ausencia o presencia de EGTA-AM

	Recuperación			
	tau			
	WT		S218L	
	(-) EGTA-AM	(+) EGTA-AM	(-) EGTA-AM	(+) EGTA-AM
10 Hz	4,04±0,26 s (n=13)	3,78±1,36 s (n=4) (ns)	2,17±0,7 s (n=7)	2,97±0,52 s (n=4)
100 Hz	2,0±0,4 s (n=13)	2,8±0,9 s (n=5) (ns)	0,68±0,22 s (n=9)	2,7±0,9 s (n=4) (*)
300 Hz	taur 182,2±45,1 ms (n=8) taul 2,65±0,8 s (n=5)	2,68±0,64 s (n=5)	141,7±17,8 ms (n=4) 2,76±0,5 s (n=4)	2,56±0,13 s (n=3)



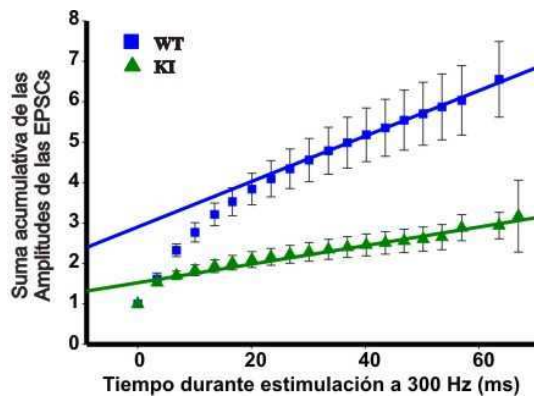
**Figura 1.10. El calcio residual presináptico se encuentra incrementado en el S218L.** Las rodajas fueron preincubadas con EGTA-AM (0,1 mM) a fin de incrementar el quelado de calcio intracelular en el cáliz. Las figuras representan el curso temporal de la recuperación de la STD en ausencia (-EGTA-AM; símbolos llenos) o presencia (+EGTA-AM; símbolos vacíos) del quelante. Los símbolos vacíos en color negro representan la sustracción de las curvas para cada genotipo. La recuperación a 10Hz no presentó diferencias ni en el WT (A) ni en el KI (B). A 100 Hz, el EGTA no indujo cambios en la cinética de recuperación en el WT (C) mientras que enlenteció el KI (D). La componente rápida observada típicamente a 300 Hz en ausencia de EGTA, desaparece en ambos genotipos (E y F). Los datos se encuentran en la Tabla 2.2.

**Probabilidad de liberación vesicular**

La probabilidad de la liberación de vesículas ( $P_r$ ) puede ser estimada por la fracción del *pool* de vesículas liberado por un único potencial de acción. A fin de estimar el tamaño del *pool* liberable, se puede asumir que la depresión de las EPSCs en un tren de estimulación, esta en mayor medida causada por un decremento transiente en el número de cuantos del *pool* liberable (Schneppenburger y col., 1999). Se midió las amplitudes acumuladas de las EPSCs durante un tren de 300 Hz con la finalidad de estimar, entre otros parámetros la  $P_r$ . Las amplitudes de las EPSCs fueron sumadas

en forma acumulativa obteniendo un gráfico de amplitudes acumuladas en función del tiempo del tren a 300 Hz (Fig. 1.11A). Del ajuste de los últimos 10 puntos con una función lineal, se puede obtener una estimación de la Pr a partir de la inversa de la ordenada al origen de esta función lineal (ver Anexo 2). Considerando esta aproximación, la Pr resultó ser significativamente mayor en los KI 218L que en los WT (WT:  $0,32 \pm 0,03$ ,  $n=8$ ; KI:  $0,53 \pm 0,05$ ,  $n=5$ ; Student t-test;  $p=0,004$ ).

Teniendo en cuenta estos datos de la Pr y mediante algoritmos matemáticos que contemplan el tamaño de las mEPSCs, se puede estimar el tamaño real del pool liberable (ver Anexo 2). A partir de los trenes a 300 Hz el tamaño del pool liberable no resultó ser significativamente distinto entre ambos genotipos (WT:  $421.8 \pm 33.3$  y KI:  $356.4 \pm 4$ ; Student t-test; ns).



**Figura 1.11. Probabilidad de liberación.** Amplitudes acumuladas de las EPSCs durante la estimulación a 300 Hz. Las amplitudes de las EPSCs se normalizaron a la amplitud del primer estímulo. Los últimos 10 datos de la curva fueron ajustados con una regresión lineal y extrapolada a tiempo cero para estimar el *pool* de vesículas liberables (N) multiplicado por la amplitud media de un cuanto (q). Los valores normalizados de  $N \cdot q$  obtenidos para WT y KI a partir de los trenes de 300 Hz fueron de  $3,27 \pm 0,28$  ( $n=8$ ) para WT y  $1,92 \pm 0,19$  ( $n=5$ ) para KI (student t-test;  $p=0,0006$ ). La probabilidad de liberación (Pr) puede ser estimada dividiendo la amplitud de la primera EPSCs por  $N \cdot q$ . De este modo, la Pr fue significativamente mayor en los KI ( $0,54 \pm 0,05$ ) que en los WT ( $0,32 \pm 0,03$ , Student t-test  $0,002$ ).

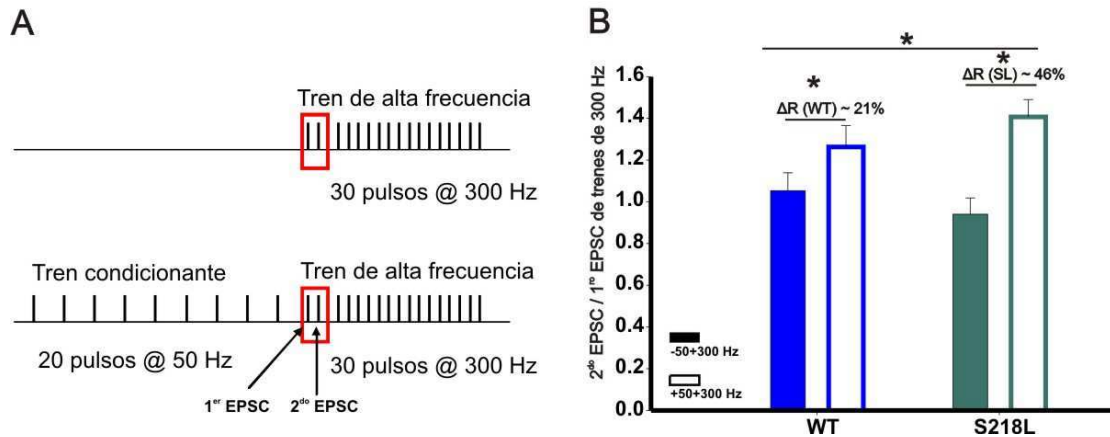
### ***La transmisión sináptica en condiciones experimentales similares a la fisiológicas se ve incrementada en el S218L***

Hasta el momento, todos los experimentos se han desarrollado en las condiciones experimentales clásicas en este tipo de preparación (con una relación de  $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$  en la aCSF de 2:1 y sin estimulación de las fibras aferentes previo a los registros sinápticos). Sin embargo, la intensidad sináptica puede variar durante la actividad presináptica repetitiva y depende en mayor medida de la actividad previa de la sinapsis (Zucker y Regehr, 2002).

*In-vivo*, las neuronas en el tallo encefálico disparan espontáneamente a una frecuencia media de  $\sim 10$ -30 Hz incluso en ausencia de sonido y la estimulación sonora puede incrementar transcientemente la frecuencia de disparo de PA en el orden de los cientos de hertz (Sommer y col., 1993; Kopp-Scheinpflug y col., 2003; Hermann y col., 2007; Sonntag y col., 2009). En este apartado se utilizó un protocolo a fin de mimetizar la actividad espontánea a baja frecuencia compuesto por un tren condicionante corto



(50 Hz) con el objetivo de predeprimir la transmisión sináptica, seguido inmediatamente de un tren de alta frecuencia (300 Hz; Fig. 1.12A; ver Hermann y col 2007 y Muller y col., 2010). Por otra parte, tratando de generar condiciones más cercanas al entorno fisiológico del tallo encefálico, se utilizó en la aCSF una relación de  $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$  de 1,2/1 mM dado que se estima que esta relación es la detectada en el líquido cefalorraquídeo en preparaciones *in-vivo* en ratones (Borst, 2010).



**Figura 1.12. El estado sináptico predeprimido induce una mayor facilitación en el S218L que en el WT. A.** Protocolo de estimulación sináptica en el cual se aplica solo un tren de alta frecuencia (30 pulsos a 300 Hz; condición -50+300) o se aplica un tren condicionante de baja frecuencia (20 pulsos a 50 Hz) e inmediatamente después el tren de alta frecuencia (condición +50+300). En el recuadro rojo indica que para la cuantificación se realiza el cociente R de la amplitud de la 2<sup>do</sup> EPSC sobre la 1<sup>er</sup> EPSC. Las relación de  $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$  en la aCSF en este experimento fue de 1,2/1 mM. **B.** Representación de la relación R para cada genotipo en las condiciones -50+300 (barras llenas) y +50+300 (barras vacías). Mientras que en el WT el cociente R fue de  $1,05 \pm 0,08$  y  $1,26 \pm 0,10$  en ausencia y presencia del tono condicionante respectivamente ( $n=10$ ; Student t-test;  $p=0,02$ ), para el KI fue de  $0,94 \pm 0,08$  y  $1,4 \pm 0,1$  ( $n=9$ ; Student t-test;  $p=0,0003$ ). Es importante destacar que la diferencia en la relación R en ausencia o presencia del tren condicionante ( $\Delta=(R_{+50+300})-(R_{-50+300})$ ) fue significativamente mayor en el S218L alcanzando un  $46,6 \pm 0,7$  mientras que en el WT alcanzó un  $20,9 \pm 0,9$  (Student t-test;  $p=0,02$ ).

Registrando las EPSCs en las células principales del MNTB, se estimuló los axones con un electrodo bipolar (ver Materiales y Métodos). A fin de comparar como es el comportamiento de la facilitación sináptica, solo se comparó la relación R (cociente entre la 2<sup>do</sup> EPSC y la 1<sup>er</sup> EPSC) entre la condición sin el tren condicionante (-50+300) y la condición con el tren condicionante (+50+300) para ambos genotipos (Fig. 1.12B). El genotipo WT presentó un R de  $1,05 \pm 0,08$  y  $1,26 \pm 0,10$  en ausencia y presencia del tren condicionante respectivamente ( $n=10$ ; Student t-test;  $p=0,02$ ) mientras que el KI fue de  $0,94 \pm 0,08$  y  $1,4 \pm 0,1$  ( $n=9$ ; Student t-test;  $p=0,0003$ ). Sin embargo, más allá de estos valores, si se analiza el cociente de las relaciones entre el estado en presencia o ausencia del tren condicionante ( $\Delta=(R_{+50+300})-(R_{-50+300})$ ), este valor es fue significativamente mayor en el S218L. Mientras el WT alcanzando un  $\Delta=20,9 \pm 0,9$ , en el S218L fue  $\Delta=46,6 \pm 0,7$  (Student t-test;  $p=0,02$ ). Este valor podría estar indicando la presencia de un calcio basal incrementado en el terminal presináptico del S218L reflejado esto en un “salto” mayor en la relación R entre el estado normal (sin tren condicionante) y predeprimido (con tren condicionante).

## Discusión I

Utilizando los ratones modificados genéticamente a los cuales se les ha introducido la mutación humana S218L en la subunidad principal de los canales de calcio P/Q, se pudo establecer que ésta mutación juega un rol importante no solo a nivel de las corrientes de calcio presinápticas sino que induce además importantes alteraciones a nivel sináptico a diferencia de lo que ocurre en el R192Q (Inchauspe y col., 2010).

Presinápticamente se ha demostrado un desplazamiento de las propiedades biofísicas básicas (I-V, activación e inactivación) hacia potenciales más hiperpolarizados, cercanos al potencial de reposo. Este comportamiento conjuntamente con la menor densidad de corriente de calcio evocada por un pulso cuadrado despolarizante o un único potencial de acción, demuestran grandes alteraciones sobre las corrientes de calcio mediadas por los canales P/Q S218L. Usualmente, en los modelos transgénicos de FHM1 se describe el fenómeno de “ganancia de función” como un mayor influjo de calcio a través del canal alterado genéticamente tal como se observa en la Fig. V y VI. En general se considera la exacerbación de la corriente máxima de la curva I-V. En este sentido, la hipótesis propuesta originalmente debería ser replanteada. El fenómeno de “ganancia de función” en el S218L debería ser interpretado como un incremento de la corriente a potenciales de membrana en los cuales los canales deberían encontrarse cerrados o inactivados, así como un aumento significativo de la “*window-current*” de los canales mutados a potenciales de membrana cercanos al reposo.

Como se ha mencionado en la parte de resultados, asumiendo que la cinética de la  $I_{pCa}$  puede ser modelada por las ecuaciones de Hodgkin y Huxley (HyH), un desplazamiento de los voltajes de activación y su correspondiente “*window-current*” hacia potenciales más negativos podría generar una mayor entrada de calcio durante un potencial de acción (Borst y Sackmann, 1999). Contrariamente a lo esperado en función a este modelo, la corriente de calcio presináptica registrada en los animales KI S218L ( $0,9 \pm 0,2$  nA; n=5) fue significativamente menor que en los animales WT ( $1,6 \pm 0,2$  nA; n=9; Fig. 1.3B).

A pesar del decremento en las corrientes de calcio, la amplitud de las EPSCs fue mayor en los animales KI que en los WT. Los resultados presentados en este capítulo avalan la idea de que las alteraciones halladas en el S218L tienen un origen presináptico siendo indicadores de ésto la mayor amplitud de las EPSCs, el

incremento en la frecuencia de las mEPSCs y la mayor depresión de la STD observada a 300 Hz. Sin embargo, la aparente contradicción de una menor IpCa con una mayor EPSCs plantea múltiples escenarios. Por un lado esta discrepancia podría ser explicada parcialmente por mecanismos de inhibición calcio-dependiente tales como alteraciones en la facilitación de la corriente de calcio donde el incremento del calcio basal sería el responsable de esta inhibición (ver modelo, Fig. 1.13). Por otra parte se puede postular la siguiente situación. Con intervalos de estimulación sináptica muy cortos (3,3 ms; 300 Hz) el S218L presenta un incremento de la EPSC inicial (con lo cual depleta más el *pool* de vesículas; Fig. 1.9B) y una reducción de la facilitación de la IpCa (Fig. 1.4C). Ambos fenómenos llevan a una mayor tasa de depresión en el S218L (Fig. 1.8E). En el WT a esta misma frecuencia, la amplitud de la EPSC inicial es menor (con lo cual depleta menos) y el segundo EPSCs (Fig. 1.9B) no es tan pequeño porque se contrarresta con una mayor tasa de facilitación de la IpCa. En ambos casos, el calcio intracelular no estaría afectando la endocitosis en ninguno de los genotipos dada la escala temporal de la estimulación. Como contrapartida, a intervalos de estimulación muy grandes (100 ms; 10 Hz), la liberación es mayor proporcionalmente en el KI que en el WT por la rápida recuperación del *pool*.

La probabilidad de liberación calculada según el método propuesto por Schneggenburger y col. (1999) utilizando trenes de 100 Hz, no considera que pueda llevarse a cabo la recuperación parcial del reciclado vesicular en ese período. Este punto es el que llevó a considerar analizar la Pr a partir de los trenes de 300 Hz en los cuales se asume que al final del tren, la depresión de los últimos EPSCs esta dada principalmente por la depleción vesicular sin considerar contribución alguna de la recuperación vesicular. Como se mostró en la Figura 1.11, la Pr es significativamente mayor en los animales KI 218 que en el WT. Estos datos son consistentes con las observaciones tanto de una mayor amplitud de los EPSCs como una incrementada frecuencia de mEPSCs en los animales transgénicos. Por otra parte, el hecho de que se observen diferencias en la Pr entre el WT y el S218L con una corriente sináptica incrementada en este último, llevaría a pensar una mayor eficiencia en la liberación que podría esta dada por un mayor numero de vesículas disponibles. Sin embargo la medición del *pool* vesicular no arrojó diferencias significativas. Una posible explicación para este fenómeno es que existan distintos *pool*es de vesículas (Schneggenburger y col., 2002) o que se encuentre incrementada la probabilidad de liberación de las vesículas relativamente lejanas al sitio de liberación.



La recuperación de la STD fue significativamente más rápida en los animales KI tanto a 10 como a 100 Hz pero no así a 300 Hz. Mientras que las diferencias a 10 y 100 Hz podrían explicarse con el aumento de la probabilidad de liberación, la no diferencia a 300 Hz puede interpretarse como una “saturación” del sistema de liberación vesicular. Vale mencionar que el término “saturación” se relaciona con que a esta frecuencia el sistema exocitótico se encuentra en su máxima tasa de funcionamiento, por tanto, no puede ser acelerado mas allá de estos límites. Este fenómeno de recuperación está estrechamente relacionado con la entrada de calcio relativa a cada frecuencia (Wang y Kaczmarek, 1998) donde a medida que se va aumentando la frecuencia de estimulación, la dependencia del influjo de calcio sobre la tasa de recuperación también va aumentando. Los resultados obtenidos en presencia de EGTA-AM, avalarían la teoría de un incremento en los niveles de calcio basal, dado que tanto los fenómenos de recuperación de la STD (Fig. 1.10) como las mEPSCs (Fig. 1.6C) se encuentran reducidos en presencia del quelante de calcio, similarmente a lo previamente descrito en sinapsis neuromusculares (Urbano y Uchitel, 1999). Este potencial incremento en los niveles de calcio basal en el terminal presináptico, podrían desempeñar un rol fundamental en la aceleración de la maquinaria exocitótica (ver modelo, Fig. 1.13). Otro dato importante a tener en cuenta, orientado en la misma dirección, son los resultados de la facilitación de la sinapsis en estado predeprimido (Fig. 1.12B) donde la diferencia en la relación R entre el estado normal (sin tren condicionante) y predeprimido (con tren condicionante) fue mucho mayor en el S218L que en WT sugiriendo la presencia de un calcio basal incrementado en el terminal presináptico del genotipo mutante.

En relación al estado predeprimido descrito en el párrafo anterior, cabe mencionar también que la facilitación en el estado predeprimido es causada por mecanismos presinápticos y depende del incremento del calcio residual presináptico, en forma similar a lo que ocurre en la facilitación por doble pulso (Muller y col., 2008; Hori y Takahashi, 2009; Muller y col., 2010). Mientras en los animales WT, el tren condicionante proporciona un “escalón” de calcio sobre el cual se suma la potenciación sináptica del tren de alta frecuencia, se propone que en el S218L ese primer “escalón” está proporcionado por el influjo de calcio basal incrementado (por el desplazamiento de la I-V). En esta nueva situación, el tren condicionante aportará un incremento en el calcio basal y de esta forma la potenciación sináptica evocada por el tren de alta frecuencia será mucho mayor que la obtenida en el WT. Esto podría explicar porque se observa cambios en el salto en la relación de facilitación (R) desde un  $\Delta \sim 21$  en el WT y  $\Delta \sim 46$  en S218L, siendo estos valores consistentes con la teoría

de un incremento en los niveles basales de calcio en el terminal presináptico. Planteada esta situación, la dinámica del calcio intracelular puede verse afectada generando por ejemplo saturación de los *buffers* intracelulares de este ión (Blatow y col., 2003; Felmy y col., 2003; Muller y col., 2008). Asimismo, podría ocurrir que este calcio incrementado acelere la maduración de vesículas relativamente lejanas al sitio de liberación, incrementando la probabilidad de liberación de las vesículas liberables en un fenómeno conocido como “*superpriming*” (Schluter y col., 2006; Muller y col., 2010) lo cual podría explicar el incremento en la frecuencia de las mEPSC, la mayor amplitud de la EPSC y en la Pr del modelo S218L. Dada la gran heterogeneidad en los mecanismos involucrados en la depresión, sería de gran interés futuro poder determinar si este incremento en la liberación es debido a la movilización de vesículas con diferente localización respecto los canales de calcio o por diferencias cinéticas intrínsecas (relativas a la liberación) dentro del mismo *pool* como se describe en Muller y col. (2010).

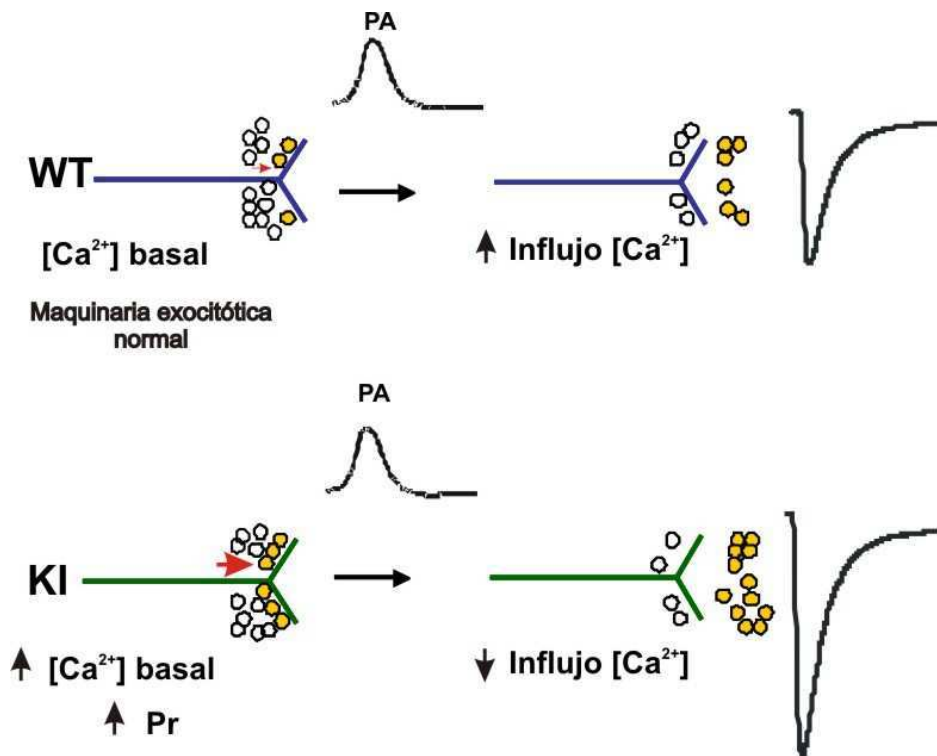
La mutación S218L redujo significativamente la tasa de facilitación de la corriente de calcio presináptica (Fig. 1.4B y C). Por un lado, este efecto puede estar mediado por un fenómeno de inhibición calcio-dependiente y por otro lado, puede ser consecuencia de que el canal esté tónicamente facilitado. Esta última afirmación se desprende del trabajo de Adams y col. (2010) donde se demuestra que el canal S218L, a diferencia del R192Q, expresado en un sistema heterólogo o en células piramidales de cerebelo disociadas, presenta una notoria facilitación intrínseca permanente.

### Modelo

En base a los resultados anteriormente mencionados, se propone un modelo que intenta explicar el posible rol funcional de la mutación S218L (Fig. 1.13).

Partiendo de la observación que el desplazamiento en la activación de los canales de calcio ocurre hacia potenciales muy cercanos al potencial de reposo, se estima que este desplazamiento estaría incrementando el influjo de calcio al potencial de reposo. Este aumento en el influjo de calcio podría desempeñar un rol dual sobre las corrientes de calcio y la actividad sináptica: **1)** por un lado inducir fenómenos de inhibición calcio-dependientes los cuales se verían reflejados en la reducción de la tasa de facilitación de la IpCa y la menor amplitud de la corriente de calcio evocada tanto por un pulso cuadrado como por un PA (Fig. 1.1 y 1.4); **2)** por otro, el aumento en el tono basal de calcio, podría inducir una aceleración de toda la maquinaria de exocitosis dando lugar

a un mayor tamaño del *pool* de liberación (“*superpriming*”), aumento de la probabilidad de liberación, aumento de la EPSC e incremento en la tasa de recuperación de STD.



**Figura 1.13. Modelo propuesto para las alteraciones sinápticas conferidas por la mutación S218L.** Considerando el cambio en las propiedades biofísicas de los canales P/Q en el modelo KI 218 (activación a potenciales más negativos) se espera que el calcio basal esté aumentado en comparación con la sinapsis del ratón WT. Ya sea por una menor expresión de los *buffers* intracelulares de calcio o por una saturación de los mismos, el calcio incrementado en el terminal presináptico permanece elevado por muy largo tiempo. Este estado basal llevaría a acelerar procesos calcio-dependientes los cuales podrían estar desempeñando roles antagónicos. Por un lado, el fenómeno de *priming* de las vesículas sinápticas se podría ver acelerado (ver flecha roja, lo cual podría justificar el aumento en la frecuencia de las mEPSCs, Pr y amplitud de las EPSCs) y como contrapartida, los fenómenos de inhibición por calcio los cuales pueden estar desempeñando un rol importante sobre la disminución de la corriente de calcio presináptica y en la tasa de facilitación de la misma evocada por trenes de potenciales de acción a alta frecuencia.

# ***Capítulo II***

***La liberación de neurotransmisor modulada por pregabalina es mediada por cambios intrínsecos en las propiedades de los canales de calcio  $Ca_v2.1$***

## **La liberación de neurotransmisor modulada por pregabalina es mediada por cambios intrínsecos en las propiedades de los canales de calcio $Ca_v2.1$**

### **Introducción II**

La pregabalina (PGB) [S-(+)-3-isobutil-GABA], comercialmente conocido como Lyrica, es una droga analgésica y anticonvulsionante utilizada en el tratamiento de diversos desordenes neurológicos y psiquiátricos incluidos la fibromialgia, desordenes de ansiedad generalizados y como un complemento en algunas terapias de epilepsias parciales en adultos (Striano y col., 2008). Tanto la PGB como la gabapentina (análogo estructural, Fig. 2.1) han sido sintetizados como análogos estructurales del neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) con la finalidad de incrementar su lipofilicidad a fin de mejorar la penetración en el sistema nervioso central conservando su farmacología. Sin embargo, se ha demostrado que estas dos moléculas no actúan sobre los receptores GABA-A y GABA-B (Taylor y col., 1998; Maneuf y col., 2003). También se ha demostrado en los mismos trabajos que tanto PGB como gabapentina no pueden ser convertidas a GABA o agonistas GABAérgicos ni tampoco poseen efectos inhibitorios sobre la recaptación o degradación de GABA. Un aspecto diferencial importante de destacar, es que ambos compuestos difieren de GABA dado que estos pueden cruzar las barrera hematoencefálica vía el transportador de aminoácidos L (Cunningham y col., 2004; Su y col., 2005). Este mecanismo asegura el paso continuado y activo de PGB hacia el líquido cefalorraquídeo, llegando a alcanzar concentración sub-milimolar.

Las subunidades auxiliares  $\alpha 2\gamma$  y  $\beta$  están fuertemente relacionadas con el tráfico de la subunidad principal  $\alpha$  a la superficie celular (Felix y col., 1997). Asimismo, estas subunidades auxiliares modifican algunas propiedades biofísicas de los canales de calcio como ser apertura, activación e inactivación (Felix y col., 1997; Hobom y col., 2000; Sokolov y col., 2000).



**Fig. 2.1. Fórmula molecular de gabapentoides.** Estructura de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), gabapentina (1-(aminoetil) ácido acético ciclohexano) y pregabalina (S-(+)-3-isobutil GABA).

**Sitio de unión de la PGB**

Los estudios realizados las últimas décadas, han demostrado que la PGB ejerce su rol farmacológico a través de su unión de alta afinidad a la subunidad accesoria  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio voltaje-dependientes (Gee y col., 1996; Bellioti y col., 2005; Taylor y col., 2007).

El blanco farmacológico de esta droga de este tipo de drogas fue inicialmente analizado mediante la unión de gabapentina-[ $H^3$ ] en membranas de cerebros de rata (Suman-Chauban y col., 1993) y autoradiografías de cerebros marcados con este isótopo (Hill y col., 1993). La unión de gabapentina-[ $H^3$ ] no solo queda reducida a tejido cerebral, sino que también se une a músculo esquelético (Gee y col., 1996; Joshi y Taylor, 2006).

De los cuatro subtipos de subunidades  $\alpha 2\delta$  conocidos, solo  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2, pero no la  $\alpha 2\delta$ -3 y  $\alpha 2\delta$ -4, son capaces de unir PGB o gabapentina. El dominio estructural en la subunidad  $\alpha 2$  correspondiente al factor von Willebrand tipo-A, ha sido identificado por homología de secuencias, como el sitio de interacción de cationes divalentes con la matriz extracelular (Whittaker y Hynes, 2002), el cual se encuentra ausente en las subunidades  $\alpha 2\delta$ -3 y  $\alpha 2\delta$ -4, lo cual sugiere su rol imprescindible para la acción de estas drogas (Wang y col., 1999; Marais y col., 2001).

***Modulación aguda de los canales de calcio por PGB y su acción sobre la transmisión sináptica***

Diferentes trabajos indicaron que tanto PGB como gabapentina reducen el influjo de calcio vía CCDV en fracciones de sinaptosomas (Fink y col., 2000; 2002; van Hooft y col., 2002). La aplicación de gabapentina sobre cultivos neuronales resulto en una inhibición aguda de las corrientes de calcio, particularmente la del tipo L (Stefani y col., 1998; Martin y col., 2002). Sin embargo, en muchos otros estudios, la inhibición aguda por gabapentina fue descrita como menor o incluso inexistente (Dolphin, 2003). Se ha demostrado que la aplicación crónica de ambos, PGB (un análogo estructural de la PGB) o gabapentina, reduce las corrientes de calcio (ver Taylor y col., 2007) por interacción con la subunidades  $\alpha 2\delta$ 1-2 (Stefani y col., 1998; Martin y col., 2002; Sutton y col., 2002; McClelland y col., 2004). Estudios similares con CCDV recombinantes han fallado en mostrar efectos agudos de la gabapentina sobre la funcionalidad de los

canales. Mas aún, Kang y col. (2002) mostró, a través de la expresión de canales P/Q recombinantes en oocitos de *Xenopus*, que las corrientes de calcio mediadas por bario no se ven afectadas por tratamientos agudos de gabapentina (30  $\mu$ M). Sin embargo, la gabapentina alteró algunos parámetros de su cinética. Esta falta de efecto podría estar relacionada con el hecho que los canales recombinantes carecen de la interacción con proteínas que usualmente se encuentran en entornos sinápticos (ej., syntaxina, sinaptotagmina y subunidad  $\beta$ , etc.). Alternativamente, el uso de bario en lugar de calcio como transportador de carga se sabe altera las propiedades biofísicas dependiente de calcio (Hille, 2001), posiblemente enmascarando el efecto de la gabapentina.

Registros electrofisiológicos han fallado en detectar algún efecto agudo mediado por gabapentina sobre las corrientes de calcio registradas en neuronas del hipocampo provenientes de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Schumacher y col., 1998). Tampoco se observaron efectos de la gabapentina sobre las corrientes de bario en las células de Purkinje mas allá que estas células expresan predominantemente la  $\alpha 2\delta$ -2 como representante de la familia de las  $\alpha 2\delta$  (Sokolov y col., 2000; Dolphin, 2003). De forma similar, si bien no se ha observado una inhibición pronunciada sobre las corrientes de calcio en tratamientos agudos efectuado en células PC12, la gabapentina si fue efectiva en reducir la amplitud de las corrientes de calcio en exposiciones crónicas (Vega-Hernandez y col., 2002).

A pesar de los efectos contradictorios de la pregabalina sobre las corrientes de calcio, se han mostrando reducciones de la liberación de varios neurotransmisores mediadas por pregabalina en distintos tejidos neuronales (Taylor y col., 2007). La PGB reduce las respuestas postsinápticos evocadas demostrado en sinapsis de la corteza entorrinal (Cunningham y col., 2004), placa neuromuscular (Joshi y Taylor, 2006) y en cultivo de neuronas de hipocampo (Micheva y col., 2006). Como contrapartida, estudios realizados con canales de calcio recombinantes, no presentan ningún efecto agudo de la PGB sobre la función de los canales (Hendrich y col., 2008).

Tratamientos crónicos con PGB podrían jugar un rol activo en el tráfico de canales de calcio (Hendrich y col., 2008). Utilizando subunidades mutadas de la  $\alpha 2\delta$  que no unen gabapentina, Hendrich y col. (2008) demostró que los efectos sobre el tráfico de canales de esta droga eran vía las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2. Más aún, gabapentina ha sido relacionada con la maduración de sinapsis corticales en ratones (Eroglu y col., 2009) en la cual los receptores de gabapentina (subunidades  $\alpha 2\delta$ ) fueron requeridos

durante los estadios de desarrollo temprano en la transmisión sináptica excitatoria cortical.

Por otra parte, existen evidencias directas como indirectas que muestran una falta de efecto de estas drogas. Si bien se ha demostrado que la aplicación aguda de PGB y gabapentina inhibe las corrientes de calcio tipo L en cultivos de neuronas aisladas de rata (Stefani y col., 2001), estos hallazgos no han podido ser confirmados en neuronas del giro dentado de rata (Stringer y Taylor, 2000), miotúbulos esqueléticos de ratón (Alden y Garcia, 2001) o cultivos de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal analizando las corrientes del tipo N (Lanneau y col., 2001).

El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos de acción de la PGB en forma aguda sobre la neurotransmisión excitatoria en las células principales del núcleo medio del cuerpo trapezoidal (MNTB). Se propuso estudiar la modulación de la pregabalina tanto de las corrientes de calcio mediadas por los canales P/Q ( $Ca_v2.1$ ) como así también sobre las corrientes post-sinápticas excitatorias.



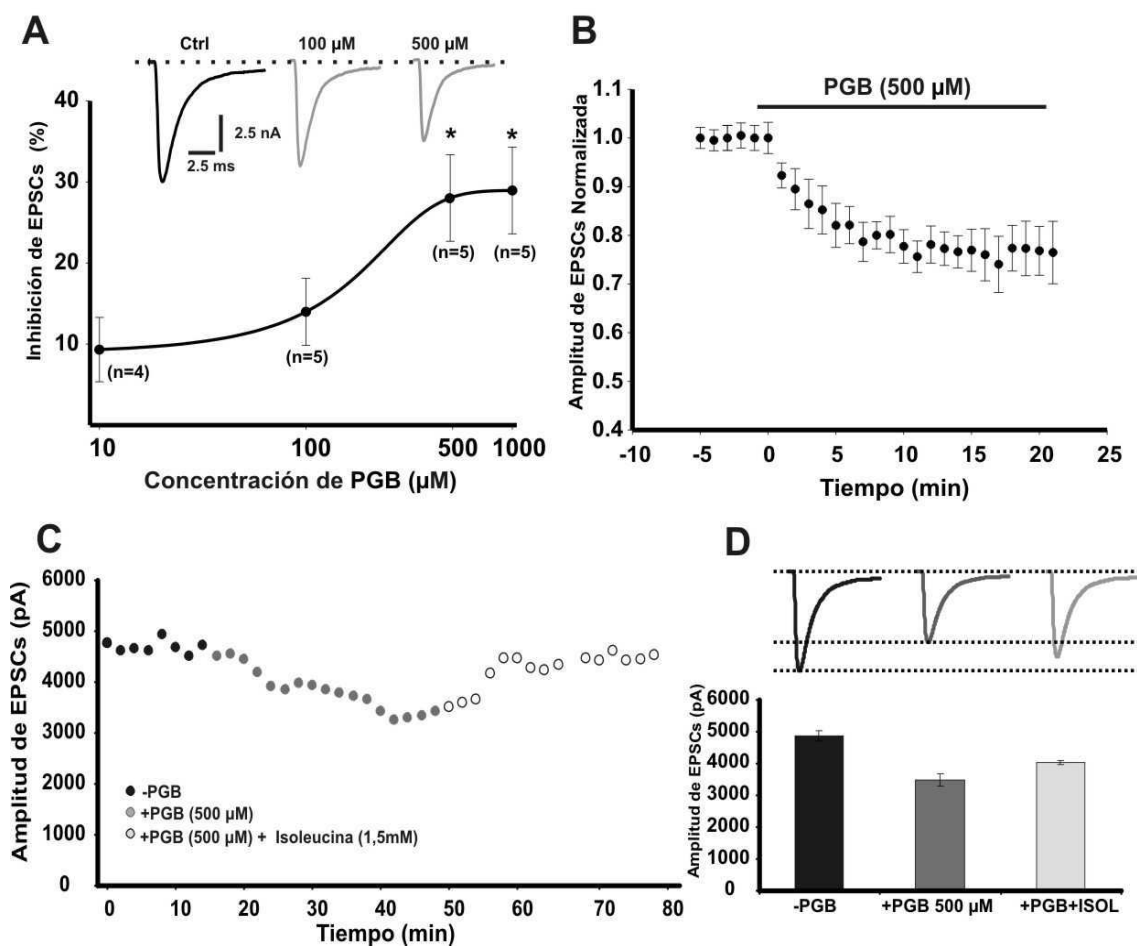
## Resultados II

### Efecto agudo de PGB sobre las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs)

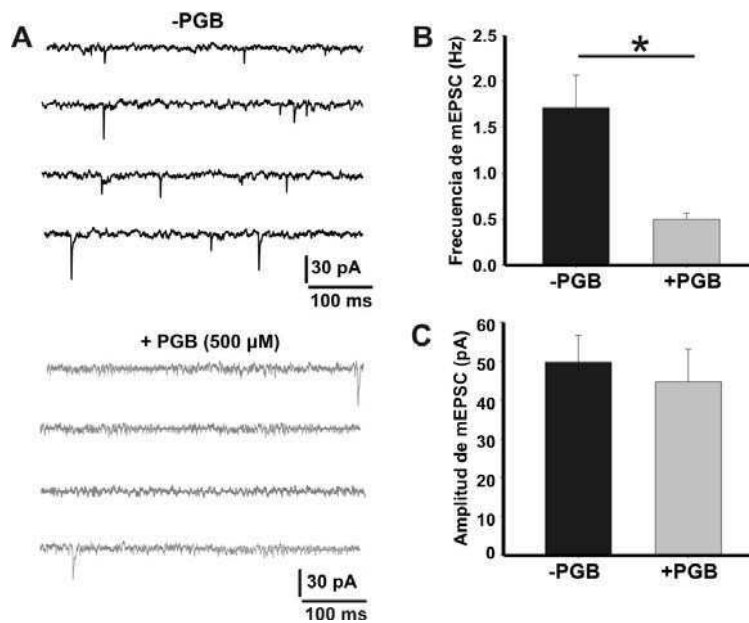
Un amplio espectro de concentraciones de PGB han sido utilizados en trabajos previos (McClelland y col., 2004; Beydoun y col., 2005; Micheva y col., 2006). Luego de una única administración de PGB *in-vivo*, se ha reportado que la concentración en plasma esta cercana a los 120  $\mu\text{M}$  (Johannessen y col., 2003), mientras que con una vida media en plasma  $\sim 6$  hs, concentraciones cercanas a los 500  $\mu\text{M}$  son esperables luego de múltiples administraciones de PGB (Beydoun y col., 2005). A fin de determinar la concentración máxima de PGB con efecto sobre la transmisión sináptica en la preparación *in-vitro* del cáliz de Held-MNTB, primero se decidió estudiar la curva dosis-respuesta de PGB sobre la EPSC registrada en las células principales del MNTB (Fig. 2.2A). Se registró la amplitud de las EPSCs durante la incubación aguda de las rodajas con PGB a distintas concentraciones: 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1 mM (como ya se mencionó en la introducción general, las amplitudes de las EPSCs son independientes de la intensidad del estímulo por encima del umbral). Aunque 100  $\mu\text{M}$  no produce un efecto significativo sobre la respuesta sináptica *in-vitro* (Fig. 2.2A, ANOVA de medidas repetidas;  $p > 0,05$ ), la amplitud de las EPSCs fue significativamente reducida tanto por 500  $\mu\text{M}$  como 1 mM de PGB (Fig. 2.2A, ANOVA de medidas repetidas  $F[2,16]=10.60$ ;  $p < 0,003$ , Student-Newman-Keuls post hoc test;  $t < 0,05$ ). De hecho, la amplitud media de las EPSCs fue reducida a un  $30 \pm 3\%$  en presencia de 500  $\mu\text{M}$  de PGB (Fig. 2.2A y B;  $10,1 \pm 0,6$  nA,  $n=12$  y  $7,1 \pm 0,2$  nA,  $n=7$ , para los controles y luego de la incubación con PGB 500  $\mu\text{M}$  respectivamente; Student t-test,  $p=0,024$ ). No se encontraron diferencias significativas en la amplitud de las EPSCs durante 20 minutos de incubación con la solución de perfusión aCSF utilizando esto como control negativo frente a un posible efecto de *rundown*.

La L-Isoleucina es ampliamente utilizada como herramienta farmacológica para revertir el efecto de la PGB dada su conocida alta afinidad de unión al mismo sitio de la subunidad  $\alpha 2\delta$  que PGB, aunque sin esperarse un efecto sobre las corrientes de calcio (Stewart y col., 1993; Su y col., 2005). Si bien la reversión del efecto de la PGB en nuestras manos no fue total, la reducción en la amplitud de los EPSCs fue parcialmente recuperada ( $\sim 10\%$ ) por L-Isoleucina (1,5 mM) (Fig. 2.2C, círculos abiertos y 2.2D).

La amplitud de miniaturas (mEPSCs) en presencia de TTX ( $1\mu\text{M}$ ) puede ser considerada un buen estimador del tamaño cuántico (Fig. 2.3). En base a esto, se encontró que la frecuencia de los eventos espontáneos fue drásticamente reducida en presencia de PGB (+PGB) en comparación a la ausencia de la droga (-PGB) (Fig 2.3B,  $0,5\pm 0,1$  Hz en la condición +PGB  $500\mu\text{M}$  comparado con  $1,7\pm 0,4$  Hz en la condición -PGB, Student t-test;  $p=0,004$ ) mientras que no se han encontrado diferencias en la amplitud media de los eventos espontáneos (Fig. 2.3C,  $39\pm 2$  pA en -PGB,  $n=11$  y  $38\pm 2$  pA en +PGB,  $n=10$ ). Estos resultados sugieren una acción presináptica aguda de la PGB reduciendo la liberación espontánea del neurotransmisor en la sinapsis del cáliz de Held-MNTB.



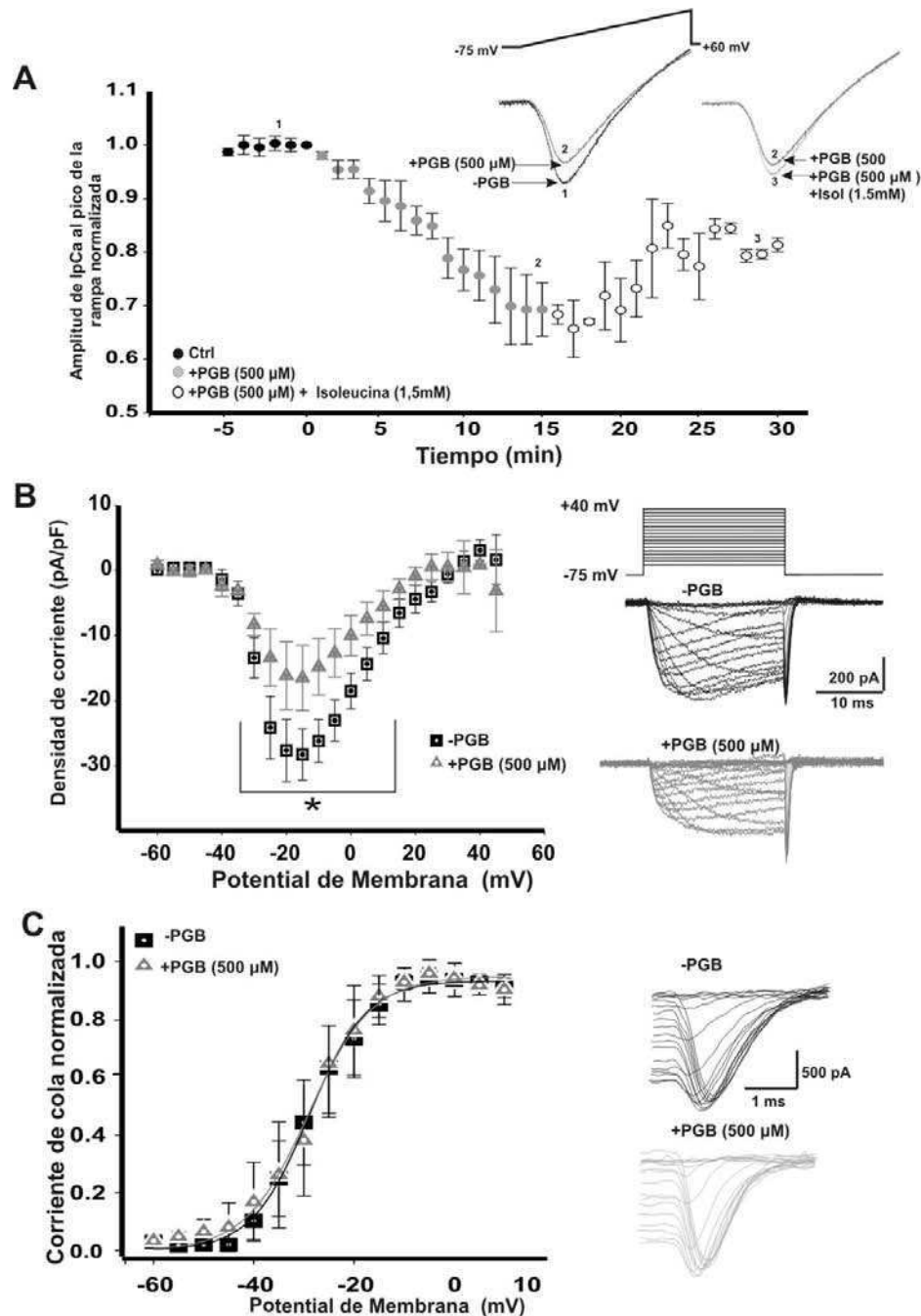
**Figura 2.2. La pregabalina (PGB) reduce la amplitud de las EPSCs.** **A.** Curva dosis-respuesta ajustada a la ecuación de Hill ( $IC_{50}=161,13\mu\text{M}$ , pendiente de Hill:  $-2,4663$ ). La amplitud de los EPSC luego del efecto inhibitorio de la PGB tanto a  $500\mu\text{M}$  como a  $1\text{mM}$ , fueron significativamente diferentes respecto a la condición control (ANOVA de medidas repetidas  $F[2,16]=10,60$ ;  $p<0,003$ , Student-Newman-Keuls post hoc test,  $t<0,05$ ). En la parte superior de la figura se muestran los trazos representativos de los EPSCs en la condición control y luego de la incubación durante 15 min con PGB a dos concentraciones diferentes. **B.** Transcurso temporal del efecto de PGB sobre la amplitud de los EPSCs en las células del MNTB (potencial de holding  $-75\text{mV}$ ) antes y después de la perfusión con  $500\mu\text{M}$  PGB. La amplitud media de los fue reducida un  $30\pm 3\%$  (Student t-test;  $p=0,024$ ). **C.** Amplitud de los EPSC en ausencia (puntos negros) o presencia de PGB ( $500\mu\text{M}$ , puntos grises) y luego de la aplicación de L-Isoleucina ( $1,5\text{mM}$ , puntos grises abiertos). **D.** EL efecto de la PGB fue parcialmente rescatado (alrededor de un  $10\%$ ) por la aplicación de L-Isoleucina. Los valores se representan como la media $\pm$ sem.



**Figura 2.3. La frecuencia de los miniaturas, pero no la amplitud, fue reducida por PGB.** A. Trazos representativos de los eventos espontáneos miniature (mEPSCs,) en presencia de TTX 1 μM en ausencia (arriba) o presencia (abajo) de PGB 500 μM. B, C. Frecuencia y amplitud media de los mEPSCs, respectivamente. Los mEPSCs fueron registrados durante 3 minutos. Las amplitudes medias fueron 39±2 pA en -PGB (n=11) y 38±2 pA en +PGB (n=10), mientras que las frecuencias fueron 1,7±0,4 Hz y 0,5±0,1 Hz, respectivamente (\*, Student t-test; p=0,004). Los valores se representan como la media±sem.

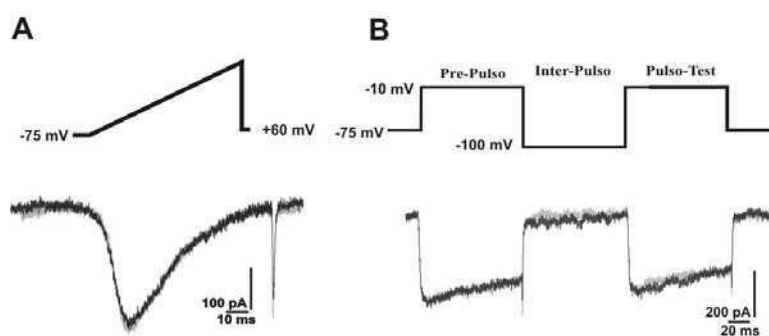
### **Modulación aguda de las corrientes de calcio presinápticas (IpCa) por PGB.**

Tomando en consideración los datos presentados anteriormente de la curva dosis-respuesta en la transmisión sináptica, se decidió usar la concentración de PGB de 500 μM sobre las corrientes de calcio. Dicha concentración es aproximadamente el doble de la concentración de bloqueo al 50% y alcanza un estado estacionario de bloqueo cercano al 30%. Como primera aproximación, se utilizó el protocolo de rampa (rampa de voltaje despolarizante desde -75 mV a +60 mV durante 50 ms) a fin de evocar las corrientes de calcio utilizando una solución normal del aCSF (Fig. 2.4A, recuadro interno de la figura). Este protocolo permite estudiar el efecto de la PGB tanto sobre la amplitud como la activación voltaje-dependiente de las corrientes de calcio minimizando el efecto del *rundown*. Vale recordar que en el rango de edades que se utiliza en este trabajo (entre los 11-15 días postnatales) los canales de calcio que median la liberación de neurotransmisor son únicamente del tipo P/Q en el cáliz de Held (Iwasaki y Takahashi, 1998; Inchauspe y col., 2004; Fedchyshyn y Wang, 2005). El pico de amplitudes de la corriente de calcio luego de la aplicación de la PGB durante 15 min, fue reducido un 30% (Fig. 2.4A, círculos grises) la cual fue parcialmente recuperada (~10%) por la acción de L-Isoleucina (1,5 mM; Fig. 2.4A, círculos vacíos). Por otra parte, la L-Isoleucina en si misma no afecta las corrientes de calcio (Fig. 2.5, A y B). Por lo tanto, la incubación aguda de PGB fue capaz de reducir las corrientes de calcio por un mecanismo que involucra las interacciones con el receptor de PGB y L-Isoleucina que es la subunidad α2δ de los canales de calcio.



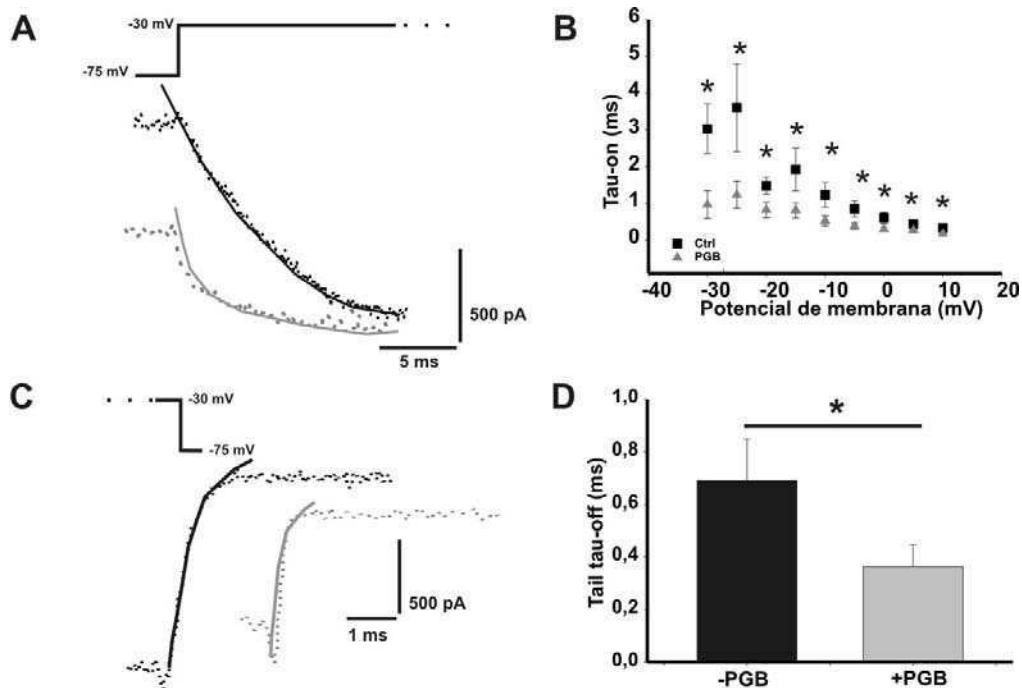
**Figura 2.4. Modulación aguda de la corriente de calcio presináptica por PGB.** **A.** Amplitud máxima de la IpCa evocada por rampas depolarizantes (desde -75 a +60 mV) de 50 ms de duración en ausencia (círculos negros) o presencia (círculos grises) de PGB 500  $\mu$ M (n = 7). La aplicación de L- Isoleucina 1,5 mM revirtió parcialmente el efecto de PGB (círculos grises vacíos, n = 3). La PGB redujo la IpCa en un 30% mientras que la Isoleucina indujo una recuperación de 10%. En la parte superior de la figura se muestran los trazos representativos de las IpCa. Los números del 1 al 3 indican los puntos de la curva de los cuales se han obtenidos los trazos. **B.** Densidad de corriente vs voltaje comparando la condición control y luego de la aplicación de PGB. La IpCa comenzó a activarse aproximadamente a los -35 mV con un aparente potencial de reversión a +40 mV. El pico máximo de la densidad de corriente fue alcanzado a los -15 mV con valores medios de -28,3 $\pm$ 3,9 pA/pF para -PGB y -16,5 $\pm$ 5,0 pA/pF para +PGB (\*, ANOVA de medidas repetidas F[2,214]= 19.594, p<0.001, Student-Newman-Keuls post hoc test, t<0.01). El protocolo de estimulación y los trazos representativos para cada condición se muestran a la derecha de la figura (potencial de holding a -75 mV, pulsos cuadrados de 20 ms de duración desde -60 a + 50 mV con pasos de 5 mV). Las amplitudes de las corrientes son la media de los últimos 5 ms de cada registro. **C.** Curvas de activación de la IpCa obtenida a partir de las Corrientes de cola (ver trazos de las corrientes de cola a la derecha del gráfico). Las curvas de activación fueron ajustadas a la ecuación de Boltzmann. Las IpCa se activan al mismo voltaje en ambas condiciones. Los voltajes medios de activación ( $V_{1/2}$ ) fueron 28,9 $\pm$ 0,4 mV para -PGB (n=11) y 28,3 $\pm$ 0,5 mV para +PGB (n=11, Student's t-test, p>0.05,). Las pendientes (k) fueron 5,7 $\pm$ 0,4 mV y 5,4 $\pm$ 0,4 mV (Student's t-test, p>0.05) para -PGB y +PGB, respectivamente. Los valores son representados como la media $\pm$ sem.

Por otra parte, se examinó los efectos de la PGB sobre la relación corriente-voltaje (I-V) de la corriente de calcio. Se observó que la densidad de la corriente de calcio (valores al pico de la I-V a -15 mV) fueron significativamente reducidos por 500  $\mu\text{M}$  de PGB (Fig. 2.4B, izquierda; trazos representativos en el panel de la derecha). La densidad media de la corriente de calcio fueron  $-28,3 \pm 3,9 \text{ pA/pF}$  para -PGB y  $-16,5 \pm 5,0 \text{ pA/pF}$  para +PGB (ANOVA de medida repetidas,  $F[2,214]=19,594$ ;  $p < 0,001$ , Student-Newman-Keuls post-hoc test;  $t < 0,01$ ). Las curvas de estado estacionario, que surgen después de graficar la amplitud de las corrientes de cola *versus* el voltaje del pulso despolarizante (Fig. 2.4C), no han presentado diferencias significativas cuando se compararon las condiciones en presencia o ausencia de PGB. Los voltajes medios de activación ( $V_{1/2}$ ) fueron de  $-28,9 \pm 0,4 \text{ mV}$  ( $n=11$ ) en la condición control (-PGB) y  $-28,3 \pm 0,5 \text{ mV}$  ( $n=11$ ) en presencia de PGB. Las pendientes ( $k$ ) de estas curvas también han sido similares:  $k=5,7 \pm 0,4 \text{ mV}$  (-PGB) y  $5,4 \pm 0,4 \text{ mV}$  (+PGB) (Student t-test;  $p > 0,05$ ,  $n=11$ ).



**Figura 2.5. La Isoleucina no tiene efecto ni sobre la amplitud ni sobre la inactivación de la  $I_{\text{pCa}}$ .** **A.** Pico de la  $I_{\text{pCa}}$  observada luego de una rampa de voltaje depolarizante de 50 ms tanto en la condición control (trazo negro) o luego de la perfusión con Isoleucina 1,5 mM (trazo gris,  $n=3$ ). **B.** Protocolo de inactivación (arriba) el cual consiste en pulsos cuadrados pareados separados por un interpulso a -100 mV. Las corrientes de calcio (abajo) se muestran para el control (trazo negro) y + Isoleucina 1,5 mM (gris).

Continuando con el estudio de la modulación de las propiedades biofísicas de los canales de calcio, se analizó las cinéticas de activación (*tau-on*) y de desactivación (*tau-off*) de estas corrientes. Para el *tau-on* se consideró la parte inicial (10 ms) de las corrientes evocadas por los pulsos cuadrados despolarizantes y para el *tau-off* la fase repolarizante de las corrientes de cola (Fig. 2.6). Tanto la cinética de activación como la de desactivación fueron más rápidas en presencia de 500  $\mu\text{M}$  de PGB, sugiriendo un doble efecto de PGB. Por un lado mediante la reducción de la amplitud de la corriente de calcio mientras que por otro lado induciendo una aceleración de la cinética de apertura y cierre de los canales de calcio.



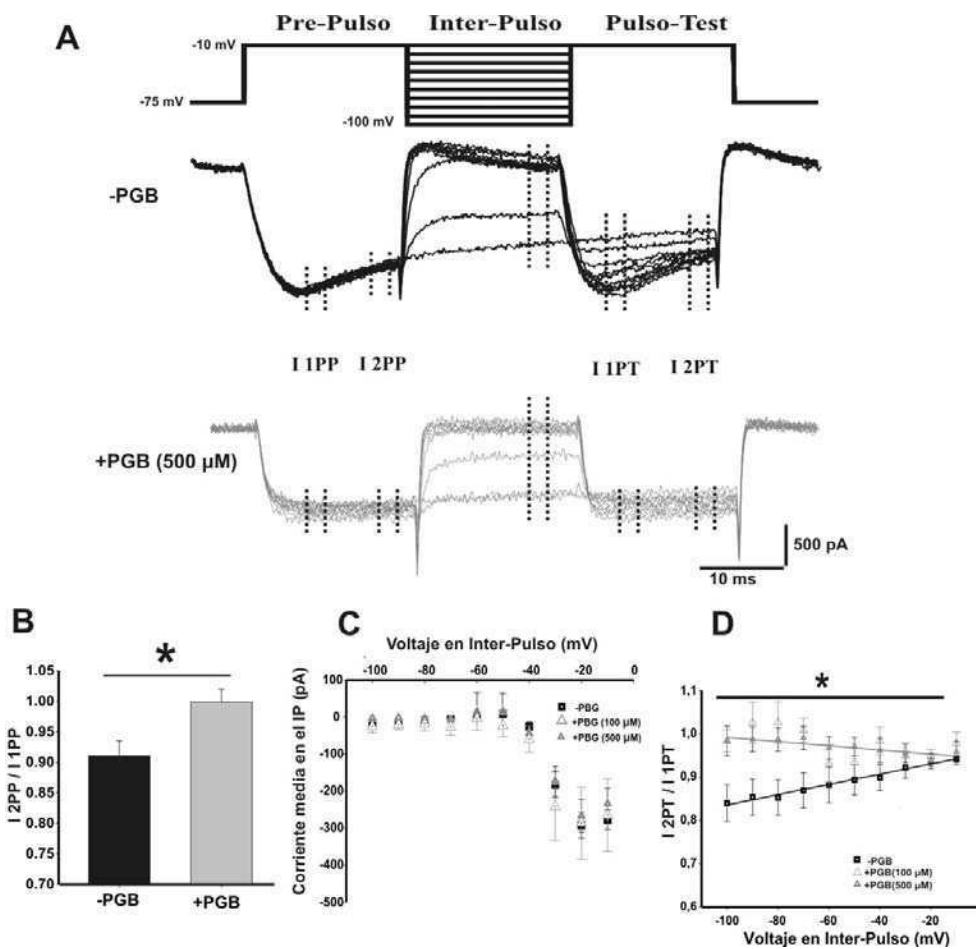
**Figura 2.6. Efecto de la PGB (500  $\mu$ M) sobre las constantes cinéticas de activación y deactivación de las corrientes de calcio.** **A.** Trazos representativos (línea punteada) de las corrientes de calcio a -30 mV en ausencia (negro) y presencia (gris) de PGB obtenidas del protocolo de la I-V. Los trazos de las corrientes fueron ajustados (línea completa) con una función exponencial simple. **B.** Las constantes de tiempo de activación ( $\tau$ -on) fueron graficadas en función al voltaje comando. Se observaron diferencias significativas entre -PGB (n=10) y +PGB (n= 5; 500  $\mu$ M) en todo el rango de voltajes estudiado desde -30 mV a +10 mV (\*; Student t-test;  $p < 0,05$ ). **C.** Trazos representativos (línea punteada) de las corrientes de cola luego de la repolarización a -75 mV habiendo partido de los -10 mV en ausencia (negro) o presencia (gris) de PGB. Las corrientes fueron ajustadas (línea completa) con una función exponencial simple. **D.** Las constantes cinéticas de deactivación a -10 mV ( $\tau$ -off) presentaron diferencias significativas entre ambas condiciones (-PGB (n=12) y +PGB (n=4) (\*; Student t-test;  $p < 0,05$ ). Los valores están representados como la media  $\pm$  sem.

**Las propiedades de inactivación de las corrientes de calcio son blanco de acción de la PGB**

Como se mencionó anteriormente, la aplicación aguda de PGB indujo la remoción parcial de la inactivación de la corriente de calcio durante un pulso cuadrado despolarizante (Fig. 2.4B, derecha, +PGB). En base a esto, se continuó caracterizando los efectos agudos de PGB sobre las propiedades de inactivación de los canales de calcio tipo P/Q. Para dicho estudio se utilizó un protocolo de inactivación de tres pulsos cuadrados (Fig. 2.7A; ver Patil y col., 1998). Un primer pre-pulso (PP) genera corrientes de calcio al mismo tiempo que produce la inactivación de una proporción de canales activados durante el mismo. De esta forma, la relación de la corriente de calcio medida al inicio y al final del pre-pulso (I1 e I2 PP, respectivamente) brinda información sobre la inactivación ocurrida durante el pre-pulso (Fig. 2.7B). Al igual que ocurre en el pre-pulso, comparamos las corrientes de calcio al inicio y al final del pulso-test (PT, I1 e I2 respectivamente). Se usó un pulso (o también llamado inter-pulso, IP) para modular la deactivación/inactivación de los canales de calcio antes del

pulso-test. En este último caso, se midieron las corrientes de calcio al final del inter-pulso (Fig. 2.7C). El nivel de despolarización del inter-pulso cambió desde -100 a -10 mV, permitiendo la apertura y posterior deactivación de una amplia población de canales de calcio.

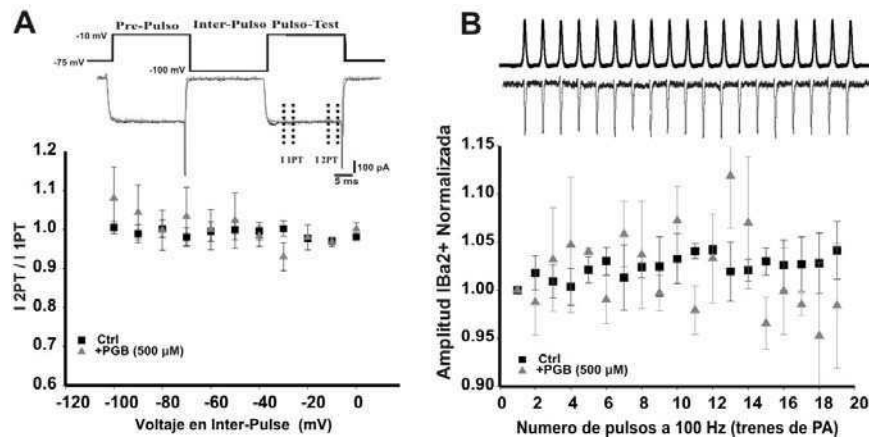
En la condición control, la tasa de inactivación en el pre-pulso (I2PP/I1PP) alcanzó un 10%, la cual fue significativamente reducida en presencia de PGB (Fig. 2.7B,  $0,90 \pm 0,03$  para -PGB (n=16) y  $0,99 \pm 0,01$  para + PGB (n=6); Student t-test,  $p=0,042$ ). Tal efecto se caracterizó además por el análisis de la tasa de inactivación del pulso test (I2PT/I1PT). Mientras que una clara inactivación fue observada en ausencia de PGB, en presencia de 500  $\mu\text{M}$  de PGB se observaron grandes diferencias sobre la inactivación de la corriente (Fig. 2.7D,  $\square$  vs.  $\blacktriangle$ ). Se observaron diferencias significativas en la dependencia de voltaje en la relación I2PT/I1PT (pendientes: -PGB= $9 \pm 3 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  y +PGB= $2 \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$ , Student t-test;  $p=0,025$ ). Un dato muy importante de destacar es que 100  $\mu\text{M}$  de PGB (concentración plasmática de la droga dentro del rango clínico), fue capaz de rescatar la corriente de calcio de la inactivación (Fig. 2.7D, triángulos abiertos  $\Delta$ , pendiente  $-6 \pm 3 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$ , Student t-test,  $p=0,001$ ). La inactivación previamente observada en la condición control fue abolida cuando el calcio se reemplazó por el bario como transportados de carga (Figura 2.8A). La similitud en la media de la relación corriente-voltaje en estado estacionario observada durante el interpulso para los controles (Fig. 2.7C, -PGB; cuadrados) y para PGB (Fig. 2.7C, triángulos; 100 y 500  $\mu\text{M}$ , ANOVA de medidas repetidas;  $p>0,05$ ) avalan la hipótesis de un rol dual de bloqueo/recuperación de la corriente de calcio por la PGB empleada en forma aguda. La pérdida de los canales de calcio por el efecto del bloqueo de la PGB puede ser inmediatamente compensado por el rescate de otros canales que se encontraban inactivados.



**Figura 2.7. PGB recupera de la inactivación las corrientes presinápticas sin alterar su activación voltaje-dependiente.** **A.** Protocolo de inactivación (arriba) el cual consiste en dos pulsos cuadrados despolarizantes al pico de la I-V separados por pulsos despolarizantes a distintos voltajes (inter-pulso (IP) desde los -75 mV a -10 mV, pasos de a 10 mV) y trazos representativos de corrientes (abajo) para las condiciones -PGB (negro) y + PGB 500 μM (gris). Notar como la inactivación en estado estacionario durante el pre-pulso y el pulso test fue reducida por PGB. **B.** La tasa de inactivación durante el pre-pulso ( $I_{2PP}/I_{1PP}$ ) fue de un 10% en la condición control la cual fue ampliamente reducida por la aplicación de PGB en el baño. **C.** Relación entre la corriente media en el estado estacionario y el voltaje en el inter-pulso para la condición control (-PGB, cuadrados) y +PGB 100 μM (triángulos abiertos) o 500 μM (triángulos cerrados). Se debe notar la similitud entre las curvas en las tres condiciones experimentales ( $p > 0.05$ , ANOVA de medidas repetidas). **D.** Tasa de inactivación durante el pulso-test ( $I_{2PT}/I_{1PT}$ ) versus IP. La pendiente (ajustada a una función lineal) fue  $9 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  para -PGB,  $-6 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  para +PGB 100 μM (Student t-test;  $p = 0,001$ ) y  $2 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  para +PGB 500 μM (Student t-test;  $p = 0,025$ ).

Luego se continuó utilizando un protocolo de pre-pulso condicionante de larga duración a fin de caracterizar los efectos de la PGB sobre la inactivación en estado estacionario de los canales de calcio. Se usaron pre-pulsos despolarizantes desde -75 a -15 mV (pasos de 2,5 mV) de 2,5 segundos de duración para permitir la inactivación de los canales de calcio (Fig. 2.9A), seguido de un pulso *test* de 50 ms para cuantificar la tasa de canales disponibles para ser abiertos. La Fig. 2.9A muestra los trazos representativos de las corrientes de calcio del cáliz de Held en ausencia de PGB (Fig. 2.9A, trazos negros superiores) y en la condición de 500 μM de PGB (Fig. 2.9A, trazos grises inferiores). La corriente de calcio generada por el pulso *test* de voltaje fue normalizada al pico máximo de amplitud, esto fue graficado en función del voltaje del pre-pulso y ajustado a una función de distribución de Boltzmann (Fig. 2.9B).

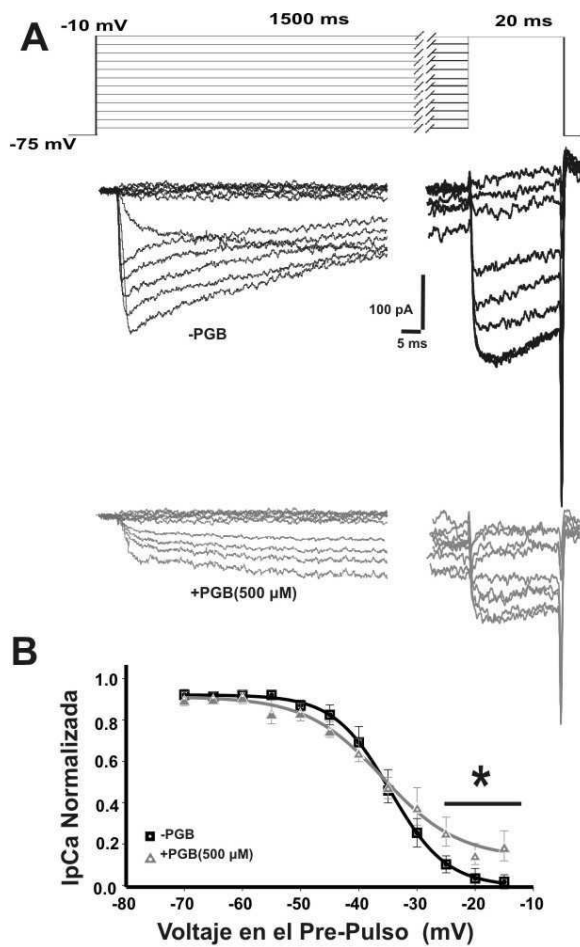




**Figura 2.8. Los procesos calcio-dependientes son modificados en presencia de bario ( $Ba^{2+}$ ) como transportador de carga.** El  $Ca^{2+}$  fue reemplazado por el  $Ba^{2+}$  (2 mM) en la solución extracelular. **A.** El protocolo de inactivación (arriba) consiste en dos pulsos cuadrados pareados a -15 mV (pre-pulso, PP, y pulso test, PT) separados por un pulso despolarizante a diferentes voltajes (voltaje del inter-pulso VIP desde -75 mV a -10 mV, incrementos de 10 mV). En el trazo de corriente (debajo del protocolo) se ilustra solo el los trazos para las dos condiciones experimentales (- vs. + PGB) solo en el VIP de -100 mV. La relación  $I_{2PT}/I_{1PT}$  en el pulso-test (PT) en función del VIP es graficada (abajo). No se han encontrado diferencias significativas entre el ctrl. y +PGB (500  $\mu$ M). **B.** Amplitudes de las corrientes de calcio normalizadas durante un tren de PA a 100 Hz. La facilitación de la corriente de  $Ba^{2+}$  observada en ausencia de PGB (máxima a  $104 \pm 3\%$ ,  $n=3$ ) fue similar a la observada en presencia de 500  $\mu$ M PGB ( $106 \pm 6\%$ ,  $n=3$ ).

Los voltajes medios de inactivación ( $V_{1/2}$ ) fueron similares en ambas condiciones (-  $34,1 \pm 0,9$  mV ( $n=9$ ) para -PGB y  $-35,9 \pm 1,4$  mV ( $n=6$ ) para +PGB, Student t-test;  $p > 0,05$ ), pero la pendiente ( $k$ ) fue significativamente reducida en presencia de PGB ( $k$ :  $-4,8 \pm 0,4$  mV y  $-4,1 \pm 0,2$  mV para -PGB y +PGB respectivamente, Student t-test;  $p = 0,05$ ). Además, en presencia de PGB, el pico de la corriente evocada por el pre-pulso despolarizante mayores a -25 mV llegaron a un *plateau* de mayor amplitud (Fig. 2.9B). Este resultado indica que la PGB no afecta el voltaje medio de inactivación pero permite que haya más canales de calcio por ser abiertos de acuerdo a resultados previos de este trabajo.

En conclusión, tanto a baja (100  $\mu$ M) como a alta concentración (500  $\mu$ M), la PGB facilita la recuperación de las corrientes de calcio de la inactivación en estado estacionario permitiendo luego estar disponibles para abrirse en sucesivas despolarizaciones.

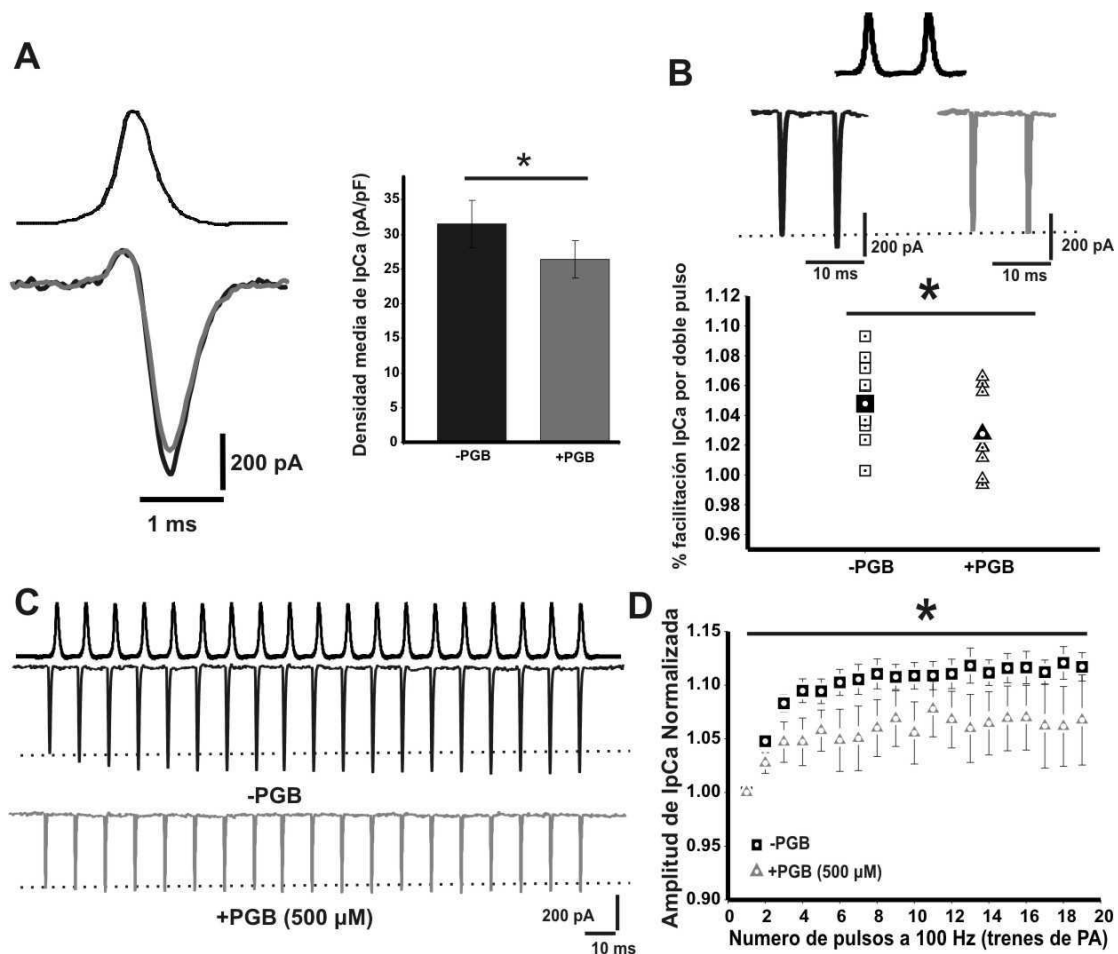


**Figura 2.9. PGB cambia la inactivación en estado estacionario de las corrientes de calcio.** **A.** Protocolo de estimulación y trazos representativos de las corrientes de calcio en ausencia (negro) o presencia de PGB (gris) evocada por un pulso cuadrado al pico de la I-V de 20 ms de duración luego de la aplicación de un pulso condicionante de 1,5 seg de duración en el rango de los -75 a los -10 mV (pasos de a 10 mV). **B.** Inactivación en estado estacionario de los terminales presinápticos en ausencia o presencia de PGB. La corriente de calcio del pulso test es normalizada al pico máximo de corriente y graficada en función del voltaje del pulso condicionante. Del ajuste con la distribución de Boltzmann se obtuvieron los parámetros de voltaje medio de activación ( $V_{1/2}$  = -34,1 $\pm$ 0,9 mV para -PGB (n=9) y -35,9 $\pm$ 1,4 mV para +PGB (n=6, Student t-test; p>0,05), como la pendiente la cual fue significativamente menor en presencia de PGB: -4,1 $\pm$ 0,2 mV y -4,8 $\pm$ 0,4 mV para -PGB y +PGB, respectivamente (Student t-test; p=0,05). Los valores son representados como la media $\pm$ sem.

### Efectos agudos de la PGB sobre las corrientes de calcio generadas por PA

A fin de probar el efecto de la PGB sobre el influjo de calcio durante los potenciales de acción presinápticos, se estudió el efecto agudo de la PGB sobre las corrientes de calcio evocadas por PAs previamente registrados en el modo de *patch-clamp* en fijación de corriente (*current-clamp*, I-Clamp, ver capítulo I), (Fig. 2.10A). Se encontró que la densidad media de la corriente de calcio evocada por un único PA se encuentra reducida en un 14 $\pm$ 5% en presencia de PGB (31,5 $\pm$ 3,4 pA/pF para -PGB y 26,4 $\pm$ 2,7 pA/pF para +PGB (n=14), Student t-test pareado; p=0,006).

Por otra parte, se ha demostrado que la corriente de calcio facilita durante la estimulación repetitiva (Borst y Sackmann, 1998; Cuttle y col., 1998; Inchauspe y col., 2004). En este trabajo se decidió estudiar los efectos agudos de la aplicación de PGB sobre la facilitación de la corriente de calcio mediante dos tipos de protocolos, pulsos pareados o trenes de PA a 100 Hz (Fig. 2.10, B y C). La facilitación de la corriente de calcio generada por pulsos pareados de PAs fue ligeramente reducida por 500  $\mu$ M de PGB (tasas medias de facilitación: 1,05 $\pm$ 0,01 (n=8) y 1,03 $\pm$ 0,01 (n=7) para -PGB y



**Figura 2.10. La PGB reduce la facilitación de la corriente de calcio durante pulsos pareados y trenes de alta frecuencia de potenciales de acción.** **A.** Trazos representativos de las corrientes de calcio (izquierda, trazo de abajo) evocados por un único potencial de acción (izquierda, trazo de arriba) registrado en el terminal presináptico del cáliz de Held. La densidad media de la corriente de calcio (derecha) fue  $31,5 \pm 3,4$  pA/pF para -PGB y  $26,4 \pm 2,7$  pA/pF para +PGB (500  $\mu$ M.). La densidad de la corriente se redujo un  $14 \pm 5\%$  en presencia de PGB (Student t-test pareado,  $p = 0,006$ ,  $n=14$ ). **B.** Trazos representativos de las corrientes de calcio evocados por potenciales de acción pareados (a 100Hz) registrados en la configuración de *current clamp* (arriba), tanto en ausencia (al medio sobre la izquierda, trazos negros) y en presencia de PGB (500  $\mu$ M, al medio sobre la derecha, trazos grises). La tasa de facilitación de la corriente de calcio en obtenida de potenciales de acción pareados se grafica (abajo) para la condición -PGB (cuadrados, media:  $1,05 \pm 0,01$ ) y +PGB (triángulos, media:  $1,03 \pm 0,01$ , Student t-test;  $p=0,03$ ). **C.** Trazos representativos de las corrientes de calcio generadas por trenes de potenciales de acción a 100 Hz previo (arriba) o posterior (abajo) a la aplicación de PGB. **D.** Amplitudes de las corrientes normalizadas durante 100 Hz. La facilitación de la corriente de calcio observada en ausencia de PGB (máxima a  $112 \pm 2\%$ ,  $n=15$ ) fue atenuada en presencia de PGB 500  $\mu$ M ( $106 \pm 4\%$  luego del tercer potencial de acción ( $n=9$ ); ANOVA de medidas repetidas,  $F[2, 284]=36,99$ ;  $p<0,001$ ; Student-Newman-Keuls post hoc test,  $t<0,001$ ).

+PGB respectivamente, Student t-test;  $p=0,03$ ; Fig. 2.10B). Esta reducción en la tasa de facilitación fue claramente observada durante la estimulación de 20 pulsos de PA a 100 Hz. La Fig. 2.10D muestra el curso temporal de las amplitudes de las corrientes de calcio *versus* el número de los PAs, normalizados a la amplitud del primer pico de corriente evocado por el tren. En condiciones control, la facilitación de la corriente de calcio fue aproximadamente de un 12% ( $112 \pm 2\%$ ,  $n=15$ ) la cual fue reducida en presencia de PGB ( $106 \pm 4\%$ ,  $n=9$ , ANOVA de medidas repetidas  $F[2,284]=36,99$ ;  $p<0,001$ , Student-Newman-Keuls post hoc test;  $t<0,001$ ; Fig. 2.10D). Nuevamente, a fin de estimar la calcio-dependencia de esta modulación, se utilizó bario como transportador de carga. La misma tasa de facilitación fue obtenida a 100 Hz utilizando

calcio o bario en presencia de PGB (Fig. 2.8B). Mas aún, la facilitación de la corriente de bario fue similar en ausencia (máximo a  $104\pm 3\%$ ,  $n=3$ ) o en presencia de  $500\ \mu\text{M}$  de PGB ( $106\pm 6\%$ ,  $n=3$ ). Estos resultados sugieren que la reducción PGB-dependiente de la facilitación intrínseca de los canales de calcio fue calcio-dependiente.

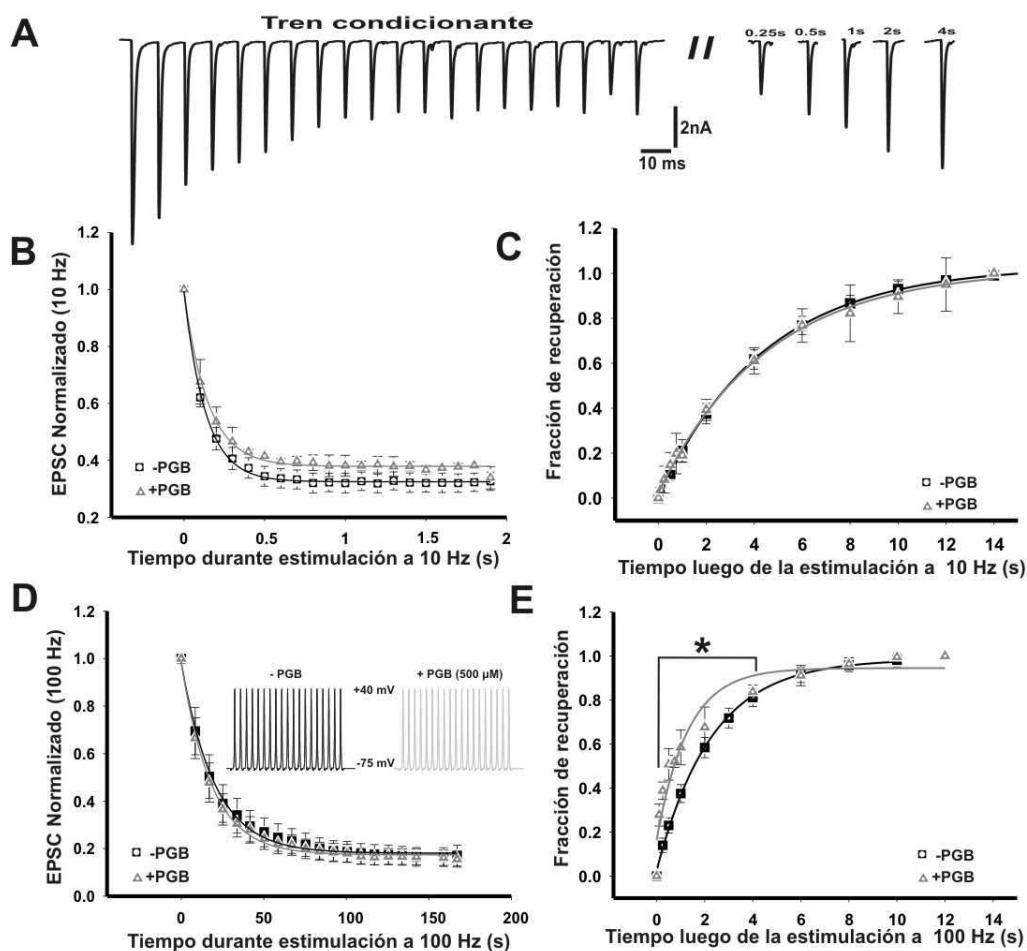
### ***Efecto de la PGB sobre la neurotransmisión a alta frecuencia: Depresión vs. Recuperación***

Finalmente, se decidió estudiar el desempeño de la PGB en la transmisión sináptica a baja (10 Hz) o alta (100 Hz) frecuencia de estimulación. Para ello se registro las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) en las células principales del MNTB mientras se realizaba la estimulación de los axones presinápticos con trenes mediante un electrodo bipolar ubicado en la línea media. A diferencia de lo reportado al inicio de este capítulo, en esta última sección no se estudió el efecto de un único EPSCs, sino que se analizó la depresión de los EPSCs al cabo de un tren de estimulación (STD, 20 pulsos) y la recuperación de los mismos.

La PGB ( $500\ \mu\text{M}$ ) no produjo cambios en las constantes de tiempo o en la magnitud de la depresión a ninguna de las frecuencias de estimulación analizadas (10 o 100 Hz). La amplitud de las EPSCs evocados a 10 Hz luego de la estimulación durante 2 seg. deprimió (es decir, produjo una disminución en la amplitud de las EPSCs durante el tren) hasta un  $33\pm 3\%$  ( $n=15$ ) y un  $37\pm 3\%$  ( $n=8$ , Student t-test;  $p>0,05$ ) para las condiciones de  $-$ PGB y  $+$ PGB respectivamente. Las constantes de tiempo para el decaimiento a esta frecuencia (10 Hz) fue  $142\pm 15$  ms para  $-$ PGB y  $148\pm 57$  ms para  $+$ PGB (Fig. 2.11B, Student t-test;  $p>0,05$ ). Durante 200 ms de estimulación a 100 Hz (Fig. 2.11D), el decaimiento de las EPSCs en ausencia de PGB ( $t=26\pm 5$  ms) presentó un curso temporal similar al obtenido en presencia de PGB ( $t=22\pm 4$  ms). La tasa de depresión también fue similar entre ambas condiciones deprimiendo a un  $17,0\pm 0,3\%$  ( $n=8$ ) en  $-$ PGB y  $17,0\pm 0,5\%$  en  $+$ PGB ( $n=7$ ). Mas aún, no se observaron diferencias en las amplitudes de los potenciales de acción durante los trenes en ambas condiciones (recuadro inserto Fig. 2.11D,  $-$ PGB a la izquierda y  $+$ PGB a la derecha, Student t-test;  $p>0,05$ ).

La eficiencia de la transmisión sináptica durante la estimulación repetitiva puede ser estimada por la tasa de recuperación de la depresión sináptica, la cual depende de la tasa de llenado del *pool* de vesículas sinápticas listas para ser liberadas. De esta forma, se decidió estudiar el curso temporal de la recuperación de la depresión

sináptica aplicando un pulso simple a intervalos de tiempos variables (desde los 100 ms a 12 seg) luego del tren condicionante (Fig. 2.11A). La fracción de recuperación se calculó como fue descrito en el capítulo I. La recuperación a 10 hz presentó constantes de tiempo similares entre la condición -PGB ( $3,8\pm 0,3$  seg,  $n=15$ ) y la condición +PGB ( $4,1\pm 0,4$  seg,  $n=8$ ; Fig. 2.11C, Student t-test,  $p>0,05$ ). Contrariamente a lo ocurrido a baja frecuencia, a 100 Hz (Fig. 2.11E) la constante de recuperación fue mucho más rápida en presencia de PGB ( $0,6\pm 0,3$  seg) que en ausencia de la misma ( $2,3\pm 0,4$  seg), (ANOVA de medidas repetidas,  $F[2,68]=22,845$ ;  $p<0,001$ , Student-Newman-Keuls post-hoc test;  $t<0,001$ ;  $n=7$ ). Estos resultados sugieren que le PGB incrementa la recuperación de neurotransmisión glutamatergica.



**Figura 2.11. La PGB acelera la recuperación de la neurotransmisión excitatoria a alta pero no a baja frecuencia.** **A.** Trazos representativos mostrando la depresión de las EPSCs durante un tren condicionante de 200 ms de duración (20 pulsos a 100 Hz) y la recuperación de esa depresión a diferentes intervalos de tiempo luego del tren condicionante. **B.** Curso temporal normalizado de las EPSCs durante 2 seg a 10 Hz (20 pulsos). Los datos fueron ajustados a una función exponencial simple (ver las constantes de tiempo en el texto). Los porcentajes de depresión fueron  $33\pm 3\%$  y  $38\pm 3\%$ , para -PGB y +PGB, respectivamente. **C.** Curso temporal de la recuperación luego de la STD a 10 Hz. La curva fue ajustada a una función exponencial simple (ver valores en el texto). **D.** Transcurso temporal de la depresión a 100 Hz. La amplitud de las EPSC al final de la estimulación alcanzó los  $17,0\pm 0,3\%$  y  $17,0\pm 0,5\%$  del primer pulso para -PGB ( $n=6$ ) y +PGB ( $n=6$ ) respectivamente. **Recuadro interno.** PA representativos registrados durante la estimulación a 100 Hz. Notar la ausencia de cambios en la amplitud de los PA tanto en -PGB (arriba) y +PGB (abajo). **E.** Curso temporal de la recuperación a 100 Hz.

## Discusión II

Los resultados expuestos en este segundo capítulo, sugieren que la PGB modula la neurotransmisión glutamatérgica en la sinapsis cálix de Held-MNTB de cuatro formas: 1) reduciendo el influjo de calcio presinápticos a través de los canales de calcio tipo P/Q; 2) reduciendo el número de canales de calcio  $Ca_v2.1$  inactivados; 3) reduciendo la facilitación de la corriente de calcio presinápticas y 4) acelerando la velocidad de apertura (*tau-on*) de los canales de calcio.

Existen trabajos que muestran efectos de bloqueo agudo por PGB sobre las corrientes de calcio tanto en cultivo de neuronas (Martin y col., 2002; Sutton y col., 2002), como en sistemas heterólogos (Hendrich y col., 2008). Otros trabajos han informado acerca de su efecto sobre de la transmisión sináptica no solo en cultivo de neuronas de hipocampo (Micheva y col., 2006) sino también sobre la placa neuromuscular (Joshi y Taylor, 2006). Eroglu y colaboradores (2009) demostraron que la subunidad  $\alpha_2\delta$  esta involucrada en la formación de sinapsis excitatorias y sugieren un rol terapéutico de la gabapentina (análogo estructural de la PGB) mediado por el bloqueo de la formación de una nueva de sinapsis. No obstante, no está claro el mecanismo por el cual la PGB ha sido propuesta como droga antiepiléptica.

Los resultados presentados en este trabajo proveen un mecanismo novedoso de acción de la PGB sobre la transmisión sináptica. Primero, la PGB bloquea las corrientes mediadas por los canales de calcio P/Q y por lo tanto la amplitud de las EPSCs. De acuerdo con trabajos previos (Sutton y col., 2002), la PGB no produce ningún desplazamiento en el pico de la curva I-V o sobre la curva de activación en estado estacionario mientras que es capaz de bloquear la corriente de calcio presináptica. Segundo, un rescate de la inactivación inducido por la PGB, no solo a 500  $\mu\text{M}$  (concentración plasmática esperada dentro del rango clínico después de múltiples dosis de PGB), sino también a 100  $\mu\text{M}$  (concentración plasmática esperada luego de una única dosis). A partir de estos resultados, se puede considerar que la PGB actúa como un neuromodulador en lugar de un bloqueante clásico de canales de calcio por tres razones: 1) la presencia de una gran magnitud de la corriente de cola observada tanto luego de la aplicación de un pulso cuadrado (Fig. 2.4B y C, paneles de la derecha) como a partir del protocolo utilizado en los experimentos de inactivación por doble pulso (Fig. 2.7A); 2) el tamaño de la corriente de calcio (Hori y Takahashi, 2009) incluso en presencia de PGB; y 3) el hecho de que la PGB mantiene inalterado

del potencial medio de inactivación de los canales P/Q (Fig. 2.9B) pero modificando tanto la cinética de activación, inactivación y deactivación (Fig. 2.7D y 2.9B).

Un amplio rango de concentraciones (desde los 0,25  $\mu\text{M}$  a 1 mM) ha sido utilizado en trabajos previos (Bayer y col., 2004; McClelland y col., 2004; Micheva y col., 2006; Hendrich y col., 2008). Más aún, se describió que para gabapentina la concentración en el cerebro fue entre 4 y 8 veces mayor la concentración plasmática (Taylor y col., 1998; Blake y col., 2007). En el presente trabajo, la curva dosis-respuesta de PGB *in-vitro* alcanzó su máxima tasa de bloqueo de la respuesta sináptica a los 500  $\mu\text{M}$ . Considerando este resultado, se decidió utilizar la concentración en el baño de 500  $\mu\text{M}$  dado que esta mostró un máximo efecto sináptico sin ningún efecto tóxico asociado.

La acumulación de PGB en plasma puede ser esperada luego de múltiples administraciones (entre 100 y 500  $\mu\text{M}$ ) (Johannessen y col., 2003; Beydoun y col., 2005). Las discrepancias entre la concentración extracelular de PGB utilizada en este trabajo sobre rodajas conteniendo el MNTB y las utilizadas en otras preparaciones (rodajas de hipocampo, núcleo trigeminal y sistemas heterólogos) pueden estar relacionadas con la interacción particular de la PGB con el tipo de subunidad  $\alpha 2\delta$  que se esté expresando y con su ambiente intracelular. En este sentido, distintos estudios con canales de calcio recombinantes han fallado en demostrar algún efecto agudo de la PGB sobre la función de los canales (Taylor, 2009) como se espera por el hecho que los canales de calcio recombinantes carecen de interacción con proteínas que normalmente se encontrarían en las sinapsis (ej. syntaxina y sinaptotagmina).

Pregabalina (500  $\mu\text{M}$ ) redujo las amplitudes de las EPSCs mediados por AMPA en un 30% durante baja frecuencia de estimulación sin afectar su curso temporal tal como fue observado previamente en otros modelos entre ellos cultivos de ganglios de la raíz dorsal (Sutton y col., 2002) y placa neuromuscular (Joshi y Taylor, 2006). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los histogramas del tiempo de apertura (*rise time*) y cierre (*decay time*) de los eventos miniaturas en ambas condiciones (datos no presentados), sugiriendo la falta de efecto postsináptico de la PGB. De este modo, dado el efecto de cooperatividad del calcio sobre la neurotransmisión glutamatérgica en la sinapsis cáliz de Held-MNTB (Fedchyshyn y Wang, 2005), la reducción de las amplitudes de las EPSCs mediadas por PGB fueron consistentes con el pequeño decremento de las corrientes de calcio (~10-14%) (Fig. 2.10A y B).

La doble acción de la PGB sobre las corrientes de calcio (es decir, el efecto inhibitorio sobre las amplitudes de las corrientes de calcio *versus* la capacidad de reducir la inactivación de los canales) parecería estar relacionado con la población de canales de calcio que puedan estar disponibles para ser activados. El número total de canales de calcio activados utilizando un protocolo de pulsos cuadrados fue mayor si se compara con los potenciales de acción. Mientras que utilizando el pulso cuadrado despolarizante, la PGB tiene un efecto predominante sobre la recuperación de la inactivación de los canales de calcio presinápticos (Fig. 2.7D), cuando se aplica un estímulo de PA esta droga juega un efecto más importante sobre la inhibición de la corriente de calcio (Fig. 2.10A). Las corrientes de calcio evocadas por un PA son comparables con las corrientes de cola, las cuales se ven menos afectadas por la PGB que las registradas con largos pulsos despolarizantes. Una posible explicación subyacente a este efecto podría estar relacionada con la reducción observada en las constantes de tiempo de activación de las corrientes de calcio luego del tratamiento con PGB. Por otra parte, pero en menor medida, podría estar contribuyendo a la reducción de la inactivación en estado estacionario luego de la aplicación de PGB. De hecho, un 30% en la reducción en la amplitud de las EPSCs y un 10% de reducción en la amplitud de la  $I_{pCa}$  evocada por PA, son consistentes con una cooperatividad de 3 (Schneppenburger y Forsythe, 2006).

Más allá de la modulación de PGB sobre los canales de calcio P/Q, su acción sobre la actividad sináptica sigue siendo aún controversial. Bajo condiciones normales de  $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$ , la estimulación a alta frecuencia genera la depresión de las amplitudes de las EPSCs y se sabe que este fenómeno es causado por la combinación de dos efectos: la depleción de vesículas y la desensibilización de los receptores AMPA postsinápticos (Schneppenburger y col., 2002; Wong y col., 2003). Frente a esto, se podría postular que la aceleración inducida por la PGB en la recuperación a 100 Hz, podría ser una consecuencia directa de esta misma modulación de la inactivación de los canales de calcio, donde una mayor recuperación de la inactivación conlleva a una mayor disponibilidad de los mismos lo cual podría inducir una aceleración de la actividad sináptica a alta frecuencia. En conjunto, estos resultados sugerirían que la PGB modifica parcialmente la transmisión sináptica a alta frecuencia, sin embargo es necesario un mayor estudio de estos procesos a fin de dilucidar su acción sináptica.



# ***Capítulo III***

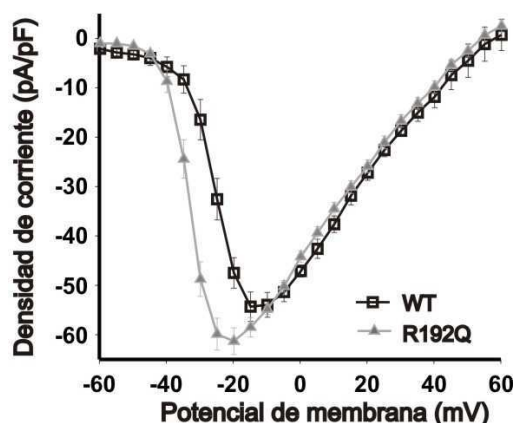
***Modulación presináptica de pregabalina  
sobre los canales de calcio  $Ca_v2.1$  alterados  
por la mutación R192Q***

## Modulación presináptica de pregabalina sobre los canales de calcio $Ca_v2.1$ alterados por la mutación R192Q

### Introducción III

En este último capítulo se decidió estudiar el efecto de la PGB sobre las corrientes de calcio y la transmisión sináptica en el modelo transgénico portador de la mutación S218L. Dada la altísima complejidad para obtener colonias estables y descendencia numerosa de esta línea, se decidió estudiar el efecto neuromodulador de la droga antiepiléptica sobre otro modelo transgénico previamente utilizado en el laboratorio, el R192Q. Este modelo de FHM1 también involucra una mutación puntual sobre el canal de calcio  $Ca_v2.1$  (como se describió en la introducción general) y es aceptado como un modelo de migraña tan relevante como el generado por la mutación S218L. Mientras que en el S218L la mutación se encuentra en el *loop* intracelular entre los dominios S4-S5 de la subunidad principal  $\alpha_1$ , en el R192Q se localiza en el propio sensor de voltaje (Fig. V y VI). En este último caso, la mutación sustituye una arginina por una glutamina.

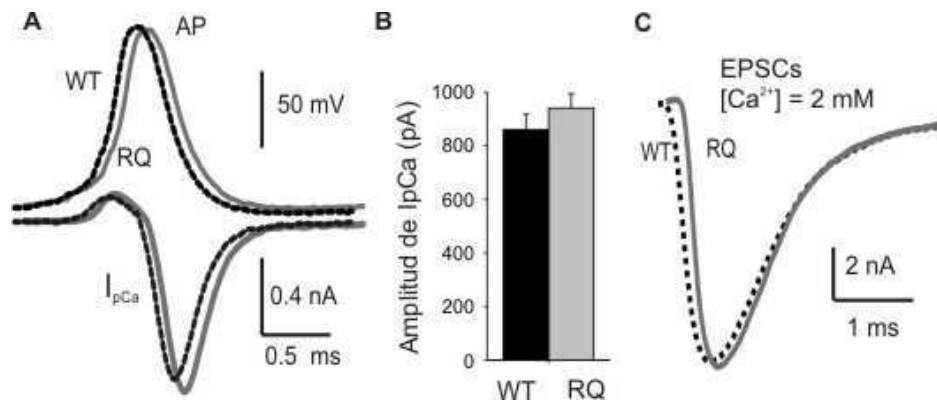
Tomando como principal modelo sináptico el cáliz de Held y complementando algunos resultados con células piramidales de la corteza de la capa 2/3, Inchauspe y col (2010) han demostrado que la ganancia de función de esta mutación (R192Q), perteneciente al grupo de la FHM1, está relacionada con la forma del potencial de acción. Los resultados obtenidos en la sinapsis del cáliz de Held mostraron que los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q se activan a potenciales de membrana más hiperpolarizados en los ratones KI R192Q respecto de los WT (-20 mV; Fig. 3.1) aunque el desplazamiento de la curva I-V es menor al observado para los KI S218L (-25 mV).



**Fig. 3.1. Curva I-V en el modelo R192Q.**

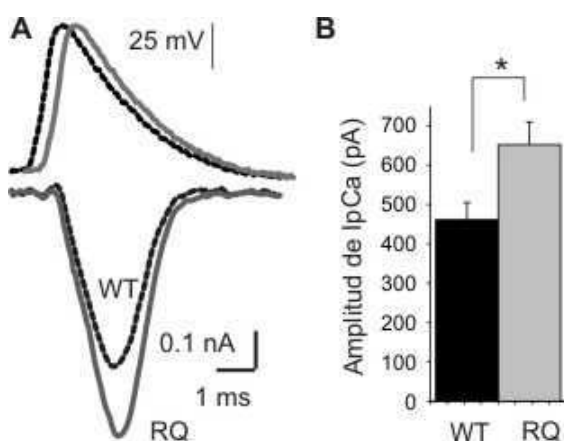
En el WT la  $I_pCa$  se activa alrededor de -45 mV con un pico máximo de densidad de corriente a -15 mV. Por el contrario, la  $I_pCa$  en el R192Q se activa a potenciales más hiperpolarizados con un pico de máxima densidad de corriente a -20 mV. (Adaptado de Inchauspe y col., 2010). Notar que el pico de la I-V en el modelo S218L se encuentra en -25 mV (ver Fig. 1.1)

Cuando los autores estudiaron la corriente de calcio generada por un PA angosto (ancho a la mitad de la altura:  $0,44 \pm 0,02$  ms) característico del cáliz de Held (Fig. 3.2A) sobre el mismo cáliz, no se observó diferencias significativas entre ambos genotipos (Fig. 3.2B). En esta condición experimental, tampoco se vio afectada la liberación de glutamato mediada por los receptores AMPA dado que se obtuvo en ambos casos el mismo valor de la EPSC (Fig. 3.2C).



**Figura 3.2. Potencial de acción evocando la corriente de calcio presináptica en el modelo R192Q y la corriente postsináptica excitatoria de las células principales del MNTB estudiadas el mismo modelo transgénico.** A. Los trazos superiores representan los moldes de los potenciales de acción utilizados para evocar las corrientes de calcio presinápticas en el cáliz tanto del WT (línea negra punteada) como en el KI R192Q (RQ) (línea llena gris). B. Las amplitudes medias de las corrientes de calcio no fueron significativamente diferentes entre ambos genotipos. C. Trazos representativos de las EPSCs evocados en las células principales del MNTB tanto en el WT (línea negra punteada) como en el KI R192Q KI (línea llena gris) al potencial de holding de  $-70$  mV en  $2$  mM  $[Ca^{2+}]/1$  mM  $[Mg^{2+}]$  en la solución de registro.

Se continuó estudiando la posibilidad de que un PA de larga duración (ancho a la mitad de la altura:  $1,97 \pm 0,08$  ms) podría manifestar diferencias entre ambos genotipos. En este punto, se registró los PAs en las células piramidales de la capa 2/3 de la corteza y se utilizó éste como molde para evocar corrientes de calcio en los terminales presinápticos del cáliz de Held (Fig. 3.3A). De esta forma, los ratones KI R192Q presentan una amplitud de corriente de calcio significativamente mayor correspondiente al 41% de incremento (Fig. 3.3B; R192Q:  $650 \pm 58$  pA ( $n=24$ ); WT:  $460 \pm 44$  pA ( $n=11$ ); Student t-test,  $p=0,018$ ).



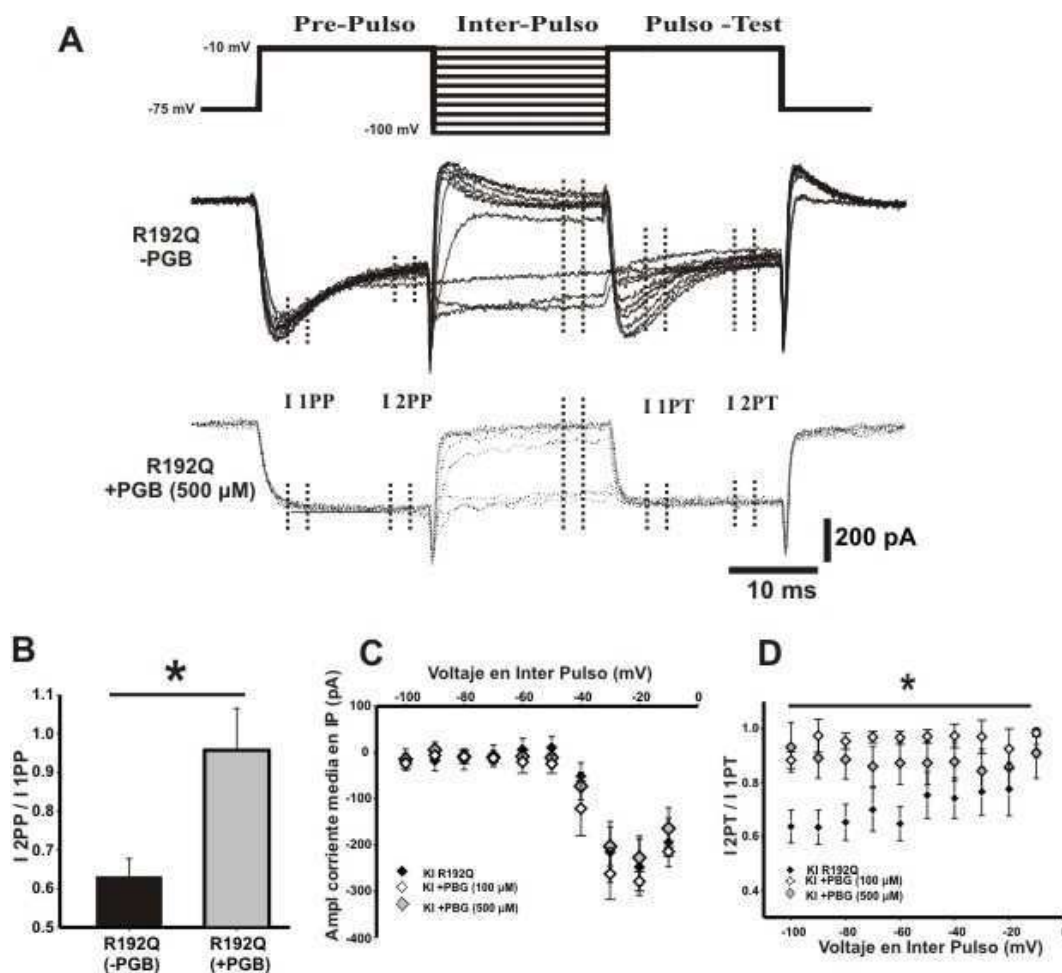
**Figura 3.3. Corriente de calcio en el cáliz de Held evocada por potenciales de acción de larga duración registrados en células piramidales (PCs).** A. Los trazos superiores representan los potenciales de acción registrados en las células piramidales de la corteza tanto para el WT (línea negra punteada) como para los KI R192Q (RQ) (línea llena gris). Los trazos inferiores corresponden a las corrientes de calcio evocadas en el cáliz de Held utilizando como molde el potencial de acción de las células piramidales. B. Las amplitudes medias de las corrientes de calcio fueron 41% mas grandes en el modelo R192Q que el WT (KI:  $650 \pm 58$  pA ( $n=24$ ); WT:  $460 \pm 44$  pA ( $n=11$ ); Student t-test,  $p=0,018$ ).

Adams y col. (2009) reportó la existencia de cambios sobre las propiedades de activación e inactivación de los canales P/Q en los modelos transgénicos R192Q y S218L. Por otra parte, en el trabajo de Inchauspe y col. (2010) se ha realizado una minuciosa descripción de las alteraciones biofísicas de los canales P/Q portadores de la mutación R192Q, poniendo especial interés en su activación y actividad modulada por los PAs. Sin embargo, resulta interesante estudiar, entre otros aspectos, si la inactivación del canal se encuentra alterada en el modelo KI R192Q. A partir de los hallazgos desarrollados en esta tesis sobre los efectos mediados por PGB y los antecedentes aportados por Adams y col. (2009) e Inchauspe y col. (2010), surge el interrogante si la PGB podría desempeñar su efecto neuromodulador sobre la inactivación de los canales P/Q R192Q de la misma forma en que lo desarrollo en los animales WT.

Resultados III

**La inactivación de la  $I_{pCa}$  en R192Q es mayor que en el WT y puede ser suprimida por la PGB**

Ya se ha demostrado que la PGB reduce muy eficientemente la tasa de inactivación de la corriente de calcio mediada por P/Q en los animales WT (capítulo II de esta tesis; Di Guilmi y col., 2011). Sin embargo, no se ha analizado si la inactivación se ve afectada en el modelo de migraña R192Q y menos aún si la PGB podría revertir en forma total o parcial algún efecto. Por este motivo, se procedió a estudiar inicialmente si existen alteraciones a nivel de la inactivación de la corriente de calcio en el cáliz de Held.



**Figura 3.4. PGB remueve la inactivación de la  $I_{pCa}$  en el KI R192Q al igual que lo hace en el WT.** A. Protocolo de inactivación (arriba) y trazos representativos de corrientes de calcio en el KI R192Q (abajo) para las condiciones -PGB (negro) y +PGB 500  $\mu$ M (línea de puntos grises); (ver detalle en el Cap. II, Fig. 2.7). B. La tasa de inactivación durante el pre-pulso ( $I_{2PP}/I_{1PP}$ ) fue de un  $30,3 \pm 5\%$  en la condición control la cual fue ampliamente reducida por la aplicación de PGB en el baño ( $4,3 \pm 1\%$ ). C. Relación entre la corriente media en el estado estacionario y el voltaje en el inter-pulso para la condición control (-PGB, rombos negros) y +PGB 100  $\mu$ M (rombos abiertos) o 500  $\mu$ M (rombos grises). Se debe notar la similitud entre las curvas en las tres condiciones experimentales ( $p > 0,05$ , ANOVA de medidas repetidas). D. Tasa de inactivación durante el pulso-test ( $I_{2PT}/I_{1PT}$ ) versus IP. La pendiente (ajustada a una función lineal) fue  $2 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  para -PGB,  $4 \times 10^{-4} \pm 7 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  para +PGB 100  $\mu$ M (Student t-test;  $p = 0,05$ ) y  $-8 \times 10^{-4} \pm 8 \times 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$  para +PGB 500  $\mu$ M (Student t-test;  $p = 0,009$ ).

Al igual que lo detallado en el capítulo II, se analizó la inactivación de la corriente de calcio utilizando un protocolo de 3 pulsos descrito previamente por Patil y col. (1998). Para caracterizar esta propiedad biofísica de la corriente de calcio, se procedió a estudiar en primer lugar, la tasa de inactivación generada por un pulso cuadrado al pico de la I-V (pre-pulso, PP) de 20 ms de duración. Se estimó la tasa de inactivación a partir de la relación de amplitudes de corrientes durante los últimos 5 ms sobre la amplitud en el mismo período al inicio del pulso (Fig. 3.4A). De esta forma, la relación de la corriente de calcio medida al inicio y al final del pre-pulso (I1 e I2 PP, respectivamente) brinda información sobre la inactivación ocurrida durante el pre-pulso (Fig. 3.4B). En el genotipo R192Q, la tasa de inactivación en el pre-pulso (I2PP/I1PP) alcanzó un  $30,3 \pm 5\%$  (n=16), la cual fue significativamente reducida en presencia de PGB  $500 \mu\text{M}$  ( $4,3 \pm 1\%$ , (n=7); Student t-test;  $p=0,023$ ; Fig. 3.4B). Esta misma cuantificación de la inactivación en el WT alcanzó un valor del 10% (ver Fig. 2.7). Si se compara con el valor obtenido en el capítulo I, el WT presenta una tasa de inactivación (I2PP/I1PP) significativamente menor que el R192Q (Student t-test;  $p=0,0005$ ).

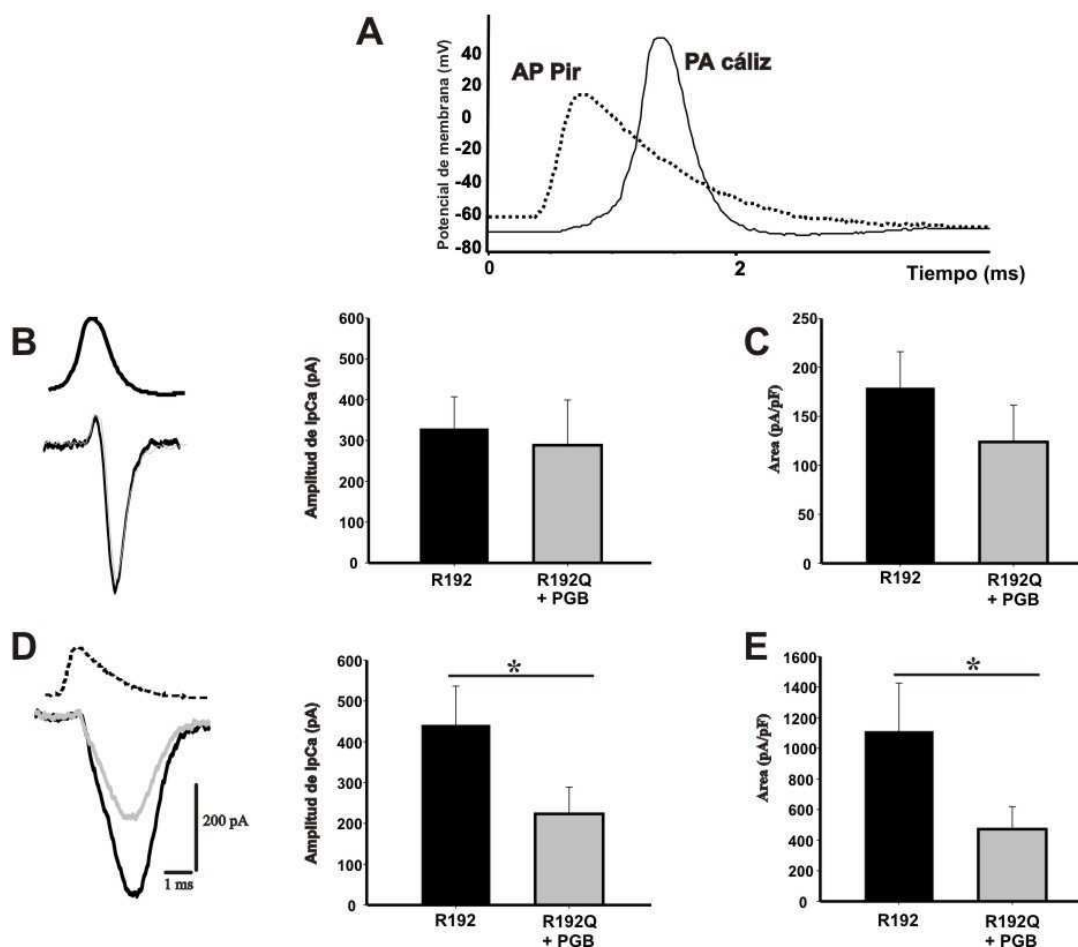
El efecto de la inactivación queda mejor caracterizado analizando la tasa de inactivación del pulso test (I2PT/I1PT). Mientras que una clara inactivación fue observada en ausencia de PGB, en presencia de PGB se observó que ésta se redujo (Fig. 3.4D). Un dato muy importante de destacar es que  $100 \mu\text{M}$  de PGB (concentración plasmática de la droga dentro del rango clínico), fue capaz de rescatar la corriente de calcio de la inactivación (Fig. 3.4D).

#### ***El efecto de la PGB en el KI R192Q esta mediado por la forma del PA***

Como se ha desarrollado en el capítulo I sobre el KI S218L y en el modelo transgénico R192Q (Inchauspe y col., 2010), el ancho del potencial de acción puede modular el influjo de calcio, siendo éste uno de los potenciales desencadenantes de *la cortical spreading depression* (CSD, ver Introducción General). Bajo esta premisa, se decidió estudiar si la PGB actúa de forma diferencial en el KI R192Q frente a diferentes PAs.

Utilizando como molde el PA de cáliz, no se han observado diferencias significativas entre ambos genotipos ni sobre la amplitud de la IpCa (Fig. 3.5B; R192Q:  $328,3 \pm 78,8$  pA, (n=7); R192Q+PGB:  $288,3 \pm 110,7$  pA, (n=3); Student t-test; ns) ni sobre el área de la corriente (Fig. 3.5C; R192Q:  $178,8 \pm 37,3$  pA.ms; R192Q+PGB:  $123,9 \pm 37,7$  pA.ms; ns). Sin embargo, al evocar la IpCa mediante PAs de corteza, la PGB produjo una

reducción significativa tanto de la amplitud (Fig. 3.5D; R192Q:  $440,3 \pm 96,1$  pA (n=6); RQ+PGB:  $223,3 \pm 65,4$  pA (n=3); Student t-test;  $p=0,036$ ) como del área (Fig. 3.5E; R192Q:  $1109,6 \pm 316,1$  pA.ms; R192Q+PGB:  $471,6 \pm 147,1$  pA.ms; Student t-test;  $p=0,04$ ) de la corriente de calcio en el genotipo mutante KI R192Q. Estos resultados en los cuales se evaluó el efecto neuromodulador de la PGB sobre la IpCa generada por un PA, resaltan que los efectos de la mutación R192Q están conducidos por el ancho del PA y que este efecto puede ser revertido solo en el caso en el cual la mutación presenta diferencias entre el WT y el R192Q.



**Figura 3.5. PGB solo tiene efecto frente a PA anchos.** **A.** Forma de los PA utilizados como moldes para evocar la IpCa en el cáliz de Held. **B.** Trazos representativos de las IpCs generadas por un PA angosto (izq) y la cuantificación de la amplitud media de dicha corriente (der). **C.** Al igual que la amplitud media, el área no presentó diferencias en ausencia o presencia de PGB en el R192Q. **D.** Trazos representativos de las IpCas generadas por un PA ancho (izq) y la cuantificación de la amplitud media de dicha corriente (der). En este caso se observan diferencias estadísticamente significativas entre la condición -PGB vs. +PGB en el KI ya sea estudiando la amplitud media de la corriente o el área (**E**).

### **Discusión III**

Desde hace algunos años, la PGB y otras drogas antiepilépticas, están siendo utilizadas en el tratamiento de pacientes con migraña (Mathew y col., 2001; Puppe y Limmroth, 2007; Calandre y col., 2010). Sin embargo, la falta de conocimiento acerca del mecanismo de acción de la PGB, hacía difícil evitar los efectos adversos secundarios en pacientes.

A partir de ratones transgénicos portadores de una de las mutaciones de FHM1, la R192Q, en este último capítulo se propuso estudiar si la PGB podría modular las corrientes de calcio en el modelo transgénico en forma similar a lo observado en los animales WT, descrito en el segundo capítulo de esta tesis.

Al comparar la tasa de inactivación luego de la aplicación de un pulso cuadrado, se observó que ésta es mucho mayor en el modelo R192Q que en el WT, alcanzando un porcentaje de inactivación de aproximadamente un 30%. Luego de la aplicación de PGB 500  $\mu$ M durante 15 min, este fármaco logró revertir la inactivación al igual que lo estudiado sobre los animales WT en el capítulo II (Fig. 2.7B). Más aún, la reversión de la inactivación ha sido observada para un amplio rango de voltajes (Fig. 3.4D) tanto para 500  $\mu$ M (dosis estimada para aplicaciones acumulativas, Beydoun y col., 2005) como 100  $\mu$ M (dosis estimada en una única toma, Johannessen y col., 2003).

Al estudiar la dependencia del efecto modulador de la PGB en función a la forma del PA que evoca la corriente de calcio presináptica, se observó que esta droga solo tiene efecto cuando la  $I_pCa$  se encuentra aumentada. Esta primera aproximación experimental permitiría pensar que si el ancho del PA es el que determina la “ganancia de función” (Inchauspe y col., 2010) y esta ganancia a su vez conllevaría a una disminución del umbral de la CSD, la PGB podría estar actuando inhibitoriamente a fin de compensar el aumento en el influjo de calcio. Al evidenciarse una acción exacerbada de la PGB en sinapsis con PA anchos y corrientes de gran magnitud (por ej., entre algunas interneuronas y células piramidales de la capa 2/3 de la corteza), las células corticales (donde se originaría la CSD) serían entonces los blancos principales de acción de esta droga.



# ***Discusión general***

## **Discusión general**

### **Consideraciones generales**

Aunque se considera a la sinapsis constituida por el cáliz de Held y las células principales del MNTB como un modelo ideal para estudiar alteraciones sinápticas relacionadas con alteraciones en los canales de calcio del tipo P/Q, dicha sinapsis *per se* no está directamente implicada en la patología de migraña o epilepsia. Dentro de las ventajas de este modelo no solo se encuentra su gran tamaño (lo cual permite un acceso físico para realizar registros electrofisiológicos tanto en el terminal pre como postsináptico), sino también en la ventana temporal en la cual se desarrolló este trabajo, la única subpoblación de canales de calcio representados en el terminal presináptico es del tipo P/Q (Iwasaki y Takahashi, 1998; Inchauspe y col., 2004; Fedchyshyn y Wang, 2005).

### **Aportes en el campo de las canalopatías**

Como se ha mencionado en la introducción del capítulo I, la migraña hemipléjica familiar tipo 1 (FHM1) es inducida por mutaciones en el gen *CACNA1A* que codifica para la subunidad  $\alpha 1$  de los canales de calcio tipo P/Q. Los ataques típicamente migrañosos en pacientes con FHM están asociados con hemiparesis transientes y son usualmente modelo de estudio de los mecanismos patogénicos de formas comunes de migraña (Ferrari y col., 2008). Estudios biofísicos de los canales P/Q portadores de la FHM1 en sistemas heterólogos han sido controversiales dado que se ha observado tanto una ganancia como una pérdida de función (Kraus y col., 1998, Hans y col., 1999; Kraus y col., 2000; Tottene y col., 2002; Barrett y col., 2005; Cao y Tsien, 2005). Sin embargo, el análisis de las propiedades biofísicas estudiadas con la configuración de canal único sobre los canales portadores de las mutaciones humanas de FHM1, mostró un consistente incremento en la probabilidad de apertura y una entrada de calcio a voltajes más negativos principalmente causado por un desplazamiento de la activación del canal hacia potenciales más hiperpolarizados (Tottene y col., 2002, 2005).

En sistemas heterólogos, se ha observado que la mutación R192Q (la cual constituye una mutación en el sensor de voltaje sustituyendo una arginina por una glutamina) también presenta el desplazamiento de la activación de los canales de calcio P/Q

hacia potenciales más negativos observándose efectos de “ganancia de función” en células granulares del cerebelo (van der Maagdenberg y col., 2004). En ese mismo trabajo se observó un incremento en la transmisión sináptica en la placa neuromuscular y un aumento en la susceptibilidad a la CSD, un mecanismo usualmente relacionado con el “aura” característico en pacientes con migraña (Lauritzen, 1994).

Este trabajo constituye uno de los primeros antecedentes del estudio de la mutación S218L sobre rodajas de cerebro en sistemas homólogos. Hasta el momento, existen muchas discrepancias entre los resultados obtenidos mediante sistemas heterólogos (transfección de líneas celulares, oocitos, o incluso rodajas transfectadas en cultivo) y los evaluados en sistemas homólogos (Pietrobon, 2010b). Se especula que estas controversias podrían originarse por las diferencias en el ambiente intracelular las cuales comprenden la interacción de los canales de calcio con proteínas de la maquinaria de liberación, acople a proteínas G e incluso a otro tipo de mecanismo modulador.

Es interesante considerar las diferencias obtenidas en el modelo S218L y el R192Q utilizado en el último capítulo de esta tesis. Mientras que en el R192Q la mutación se encuentra en el propio sensor de voltaje de la subunidad  $\alpha 1$  (ver Fig. V), en el S218L se encuentra en el *loop* intracelular entre el dominio S4-S5. Contrariamente a lo esperado *a priori* para estas dos mutaciones, la mutación ubicada en el *loop* intracelular indujo muchas más alteraciones biofísicas sobre el propio canal de calcio P/Q y sobre la transmisión sináptica que la ubicada en el sensor de voltaje. Estas observaciones concuerdan también cuando se comparan estos genotipos en humanos, donde la S218L produce una fisiopatología más severa que la R192Q (Kors y col., 2001; van den Maagdenberg y col., 2004 y 2010).

En el modelo R192Q no se ha observado una diferencia en la amplitud de la  $I_pCa$ , y las modificaciones sobre las propiedades biofísicas (activación/inactivación de la  $I_pCa$ ), así como el desplazamiento en la curva I-V, es menor que en el S218L. Tampoco se ha observado que el PA del propio cáliz genere una mayor corriente de calcio en el genotipo mutante. Sin embargo, la forma del PA es el principal factor que dirige la “ganancia de función” en este modelo (Inchauspe y col., 2010), dado que al utilizar el PA de una célula piramidal de la corteza, el R192Q generó un mayor influjo de calcio que el WT. Como contrapartida, todas las propiedades biofísicas básicas

estudiadas sobre el S218L (amplitud de la IpCa, curva I-V, activación e inactivación) han mostrado grandes diferencias entre el genotipo homocigota con la mutación y el WT.

Partiendo de la base de que el desplazamiento en la activación de los canales de calcio S218L ocurre hacia potenciales muy cercanos al potencial de reposo, se estima que este desplazamiento estaría incrementando el influjo de calcio al potencial de reposo. Este aumento en el influjo de calcio podría desempeñar un rol dual sobre las corrientes de calcio y la actividad sináptica: 1) por un lado inducir fenómenos de inhibición calcio-dependientes los cuales se verían reflejados en la reducción de la tasa de facilitación de la IpCa y la menor amplitud de la corriente de calcio evocada tanto por un pulso cuadrado como por un PA; 2) por otro, el aumento en el tono basal de calcio, podría inducir una aceleración de toda la maquinaria de exocitosis dando lugar a una mayor cantidad de vesículas disponibles para ser liberadas, aumento de la EPSC e incremento en la tasa de recuperación de depresión a corto termino.

El ancho del PA afecta diferencialmente la IpCa en cada genotipo. Mientras que en el R192Q un PA ancho aumenta el influjo de calcio más de lo que cambia en el WT, en el S218L este mismo PA borra diferencias entre el mutante y el WT. Este hecho, conjuntamente con los resultados discutidos anteriormente, permitirían pensar que mientras en el R192Q el mecanismo principalmente relacionado con la ganancia de función es el ancho del PA, en el S218L coexistirían al menos dos mecanismos: el ancho del PA conjuntamente con el aumento del calcio basal (inducido principalmente por el desplazamiento de la I-V).

### ***Desbalance sináptico (excitación/inhibición) como potencial generador de la propagación de la depresión cortical y otras alteraciones corticales***

Los desórdenes neurológicos como la migraña, epilepsia con ausencia de conciencia y ataxia, parecerían tener una etiología común originada posiblemente en un desbalance entre la excitación e inhibición en circuitos neuronales de áreas específicas del cerebro: la corteza (en el caso de la migraña), el tálamo (en el caso de la epilepsia con ausencia de conciencia) y el cerebelo (en el caso de la ataxia) (Uchitel y col., 2011). En estos casos, las sinapsis se verían afectadas en distinto grado dependiendo de diferencias intrínsecas que contemplan la dependencia para la liberación del canal de calcio y la onda despolarizante que lo activa (por ej. la amplitud y forma de PA).

A partir de microcultivos y rodajas de cerebro, Tottene y col. (2009) demostró que existe un aumento en la probabilidad de liberación de glutamato en las células piramidales de la capa 2/3 de la corteza. Sin embargo, la neurotransmisión inhibitoria entre las células piramidales y las interneuronas *fast-spiking* (al igual que la anterior, también mediada por canales P/Q) no resultó alterada.

Las diferencias en los PA que conducen la excitación o inhibición de las sinapsis corticales puede ser una posible explicación de por qué la neurotransmisión inhibitoria no se ve afectada en la sinapsis entre las interneuronas *fast-spiking* y las células piramidales según observó Tottene y col. (2009). La hipótesis con mayor consenso considera un desbalance entre la excitación e inhibición cortical resultando esto en un estado persistente de hiperexcitabilidad de las neuronas en la corteza cerebral que a su vez podría estar asociado a una mayor susceptibilidad a la CSD. Se cree que la CSD es la responsable de la iniciación de los episodios de migraña con “aura” (Flippen y Welch 1997; Lauritzen, 1994; Haerter y col., 2005; Pietrobon, 2005; Tottene y col., 2009; van den Maagdenberg y col., 2010).

El modelo R192Q presentó un gran aumento de la corriente de calcio y exacerbación de la transmisión sináptica cuando las corrientes de calcio fueron originadas por PA anchos (Inchauspe y col., 2010). A su vez, se puede aumentar el ancho del PA y la fase de decaimiento mediante bloqueantes de las conductancias de potasio (con TEA o 4-aminopiridina), responsables de la repolarización del PA. Esta aproximación experimental resultó efectiva en evocar mayores EPSCs en el R192Q que en el WT (Inchauspe y col., resultados no publicados). Estos datos sugieren que las sinapsis con PA de gran amplitud pero de corta duración (ej. cáliz de Held, interneuronas) se verán menos afectadas por las mutaciones que inducen el desplazamiento hacia potenciales más hiperpolarizados de la activación calcio-dependiente de los canales de calcio que aquellas con PA de mayor duración (ej. neuronas piramidales de la corteza). Estas observaciones también pueden ser extrapolables al modelo S218L dado que el ancho del PA moduló la  $I_{pCa}$ . En este último caso, la corriente de calcio generada por un PA angosto es menor en el S218L que en el WT, sin embargo cuando se aplica un PA ancho, la  $I_{pCa}$  en el genotipo mutante incrementa al mismo valor que en el WT. Quedaría por probar que la prolongación del PA (mediante el bloqueo de los canales de potasio) pone de manifiesto una diferencia aún mayor entre las corrientes sinápticas evocadas en el 218 y su control.

Las conductancias de potasio-calcio dependiente (SK) deberían ser activadas durante los trenes de PA (Hille, 2001). En la estimulación a alta frecuencia, la inactivación de los canales de calcio a potenciales hiperpolarizados (por el desplazamiento de la I-V) puede impedir la activación estos canales SK. Considerando el incremento en la corriente de calcio generado por un PA ancho y el decremento en la activación de las corrientes SK durante descargas repetitivas de PA, se puede estimar que la excitabilidad de las redes corticales puede sufrir un incremento de dos veces (Inchauspe y col., 2010). Estas alteraciones podrían facilitar la inducción y propagación de la CSD en los modelos de FHM1.

### ***Mecanismo de acción de la PGB***

Al igual que lo analizado en los modelos transgénicos, este trabajo constituye uno de los primeros aportes acerca del mecanismo de acción de la PGB. Si bien se ha descrito detalladamente que esta droga se une a la subunidad accesoria  $\alpha 2\delta$ , no se han demostrado acciones directas sobre las corrientes de calcio y la neurotransmisión excitatoria. De hecho, la mayoría de los estudios realizados se han desarrollado sobre sistemas heterólogos.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la pregabalina reduce la amplitud de las EPSCs en el cáliz de Held en una forma dosis-dependiente alcanzando una inhibición máxima del 30 %. La amplitud de la corriente de calcio del tipo P/Q fue disminuida por la pregabalina, aunque en menor grado, sin alterar las propiedades de activación voltaje-dependiente. Una gran recuperación de la inactivación de los canales P/Q fue inducida por 100 o 500  $\mu$ M de PGB (dosis de PGB esperadas para una simple dosis o administración clínica repetitiva, respectivamente). Entre otras características evaluadas, los resultados indican que la pregabalina altera significativamente la neurotransmisión glutamatérgica por intermedio de la modulación de los canales de calcio.

A partir de los hallazgos mencionados en este trabajo, se puede proponer a la PGB como una herramienta importante para comprender el rol fisiológico de la subunidad accesoria  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio sensibles a voltaje. Diferentes procesos calcio-dependientes como la inactivación de las corrientes de calcio y la facilitación fueron abolidos usando bario en lugar de calcio como transportador de carga. Estos

resultados ponen de manifiesto los efectos de la subunidad  $\alpha 2\text{-}\delta$  sobre las propiedades biofísicas de los canales de calcio y su función fisiológica.

### ***Posible acción antiepiléptica de la PGB***

Muchos artículos han reportado una estrecha relación entre alteraciones en los canales iónicos y diferentes patologías neurológicas (canalopatías). En particular, condiciones patológicas como la migraña, ataxia o epilepsia han sido asociadas con mutaciones en la subunidad principal ( $\alpha 1$ ) de los canales de calcio  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q; Terwindt y col., 1997; Burgess y Noebels, 1999; Pietrobon, 2005). De esta manera, la migraña y la epilepsia no solo pueden estar relacionadas por su etiología (por ejemplo su componente genético; Fletcher y col., 1996; Terwindt y col., 1997; Noebels, 2001), sino también por su tratamiento (Welch, 2005; Masdrakis y col., 2008). Por lo tanto, una modulación directa de PGB sobre la subunidad  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio puede tener un impacto en la reducción de la corriente de potasio-calcio dependiente y puede también tener efectos antiepilépticos. En el giro dentado del hipocampo, alteraciones en el ajuste fino entre las conductancias de potasio-calcio dependiente grandes (BK, *big conductance*) y pequeñas (SK, *small conductance*), pueden inducir sincronización hipocampal, lo cual conduciría a una epilepsia en el lóbulo temporal (Brenner y col., 2005). De hecho, un incremento de los canales BK sobre los SK podría impedir que las células granulares del giro dentado actúen como un filtro pasabajos (es decir, en última instancia, previniendo las convulsiones del lóbulo frontal; Brenner y col., 2005). Dado que los canales SK son más sensibles al calcio intracelular que los canales BK, los resultados presentados aquí se ajustan con un posible modelo de acción antiepiléptico mediado por PGB a través de la reducción de la activación de los canales BK por bloqueo de las corrientes de calcio durante un potencial de acción. Al mismo tiempo, la reducción de la inhibición de los canales de calcio por medio de la acción de PGB, podría secundariamente favorecer el reclutamiento de los canales SK, reduciendo la tasa de disparo neuronal. En conjunto, la modulación de las propiedades de activación/inactivación de los canales de calcio  $\text{Ca}_v2.1$  mediadas por PGB, están de acuerdo con los efectos antiepilépticos clínicos observados previamente con esta droga (Taylor y col., 2007). Aunque los presentes resultados describen un novedoso mecanismo agudo de acción de la PGB, se podría especular de la misma manera que las acciones crónicas de PGB sobre áreas corticales podría controlar la excitación por un bloqueo parcial de los eferentes excitatorios mediados por  $\text{Ca}_v2.1$  provenientes de las células piramidales, al mismo tiempo que evita que los canales  $\text{Ca}_v2.1$  sean

inactivados durante la descarga repetitiva de potenciales de acción de las interneuronas. Por lo tanto, PGB podría prevenir los desbalances presentes en patología como la epilepsia sobre la relación excitación/inhibición en los sistemas tálamo-corticales. Finalmente, es necesaria una mayor caracterización de los efectos de la PGB tanto sobre el hipocampo como sobre los circuitos corticales dado que estos podrán ser centrales para comprender su acción farmacológica en el tratamiento de las condiciones patológicas tanto de epilepsia como de migraña.

### ***Potencial acción de la PGB en la patología migrañosa***

Pequeños cambios en la cinética de activación de los canales de calcio presinápticos pueden tener un gran impacto sobre la transmisión sináptica evocada por un PA (Borst y Sakmann, 1998). También se ha demostrado que la cinética de activación de los canales de calcio presinápticos determina la apertura de estos canales durante un PA corto y consecuentemente modula la corriente de calcio y la liberación de neurotransmisor (Sabatini y Regehr, 1999; Inchauspe y col. 2010). Liu y col. (2003) demostraron que diferentes cinéticas de inactivación, y especialmente las voltaje-dependientes, tienen un fuerte impacto sobre la cantidad y el curso temporal del influjo de calcio en respuesta a disparos repetitivos. Adams y col. (2009) reportó la existencia de cambios sobre las propiedades de activación e inactivación de los canales P/Q en los modelos transgénicos R192Q y S218L. Estos antecedentes muestran que existen múltiples factores que relacionan el ancho del PA, cambios en las propiedades biofísicas de los canales de calcio (sobre la activación y especialmente de inactivación) y la liberación de neurotransmisor. Muchos de estos parámetros se encuentran alterados en los modelos de FHM1. Por otra parte la PGB ejerce su acción neuromodulatoria a través de la acción directa sobre los mecanismos de inactivación de los canales de calcio. Esto último plantea una potencial acción de la PGB sobre las propiedades biofísicas de los canales de calcio revirtiendo en forma total o parcial algunas de las alteraciones mencionadas.

El efecto modulador de la PGB en función a la forma del PA que evoca la corriente de calcio presináptica demostró que esta droga solo tiene efecto cuando la  $I_{pCa}$  se encuentra aumentada. Esta observación permitiría pensar que si el ancho del PA es el que determina la “ganancia de función” (Inchauspe y col., 2010) y esta ganancia a su vez resultara en una disminución del umbral de la CSD, la PGB podría estar actuando inhibitoriamente a fin de compensar el aumento en el influjo de calcio. Es posible



postular que la PGB tenga una acción predominante sobre las células corticales (donde se origina la CSD) al evidenciarse la acción exacerbada de la PGB en sinapsis con PA anchos y corrientes de gran magnitud (Fig. 3.5). Un potencial ejemplo serían las sinapsis entre algunas interneuronas y células piramidales de la capa 2/3 de la corteza).

### ***Perspectivas a futuro***

Como se mencionó anteriormente, la sinapsis del cáliz de Held-células principales del MNTB no están intrínsecamente relacionada con las patologías desarrolladas en este trabajo, pero sin embargo constituye un modelo simple para realizar la primera aproximación experimental.

A fin de continuar con el estudio farmacológico de la PGB, se propone estudiar el efecto neuromodulador de la PGB sobre la neurotransmisión excitatoria en los animales KI S218L como así también su acción sobre la inactivación de la corriente de calcio presináptica. Posteriormente, se pretende evaluar el efecto de esta droga en sinapsis corticales o hipocampo.

Por otra parte, se pretende analizar en los modelos transgénicos de migraña, los mecanismos presinápticos y la modulación hormonal, que conllevan a esta patología en dos modelos sinápticos accesibles a la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* y de imágenes de calcio: en el cáliz de Held-MNTB (en tallo encefálico) y las *mossy fibers*-células piramidales (en hipocampo). La complementación entre estas dos técnicas (*patch-clamp* e imágenes) permitirá develar los mecanismos intrínsecos de las alteraciones ya analizadas durante esta tesis doctoral.

# ***Referencias***

## A

- Adams, P.J., Garcia, E., David, L.S., Mulatz, K.J., Spacey, S.D. y Snutch, T.P. (2009). Ca(V)<sub>2</sub>.1 P/Q-type calcium channel alternative splicing affects the functional impact of familial hemiplegic migraine mutations: implications for calcium channelopathies. *Channels (Austin)* 3, 110-121.
- Adams, P.J., Rungta, R.L., Garcia, E., van den Maagdenberg, A.M., Macvicar, B.A. y Snutch, T.P. (2010). Contribution of calcium-dependent facilitation to synaptic plasticity revealed by migraine mutations in the P/Q-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Akaike, N., Kostyuk, P.G. y Osipchuk, Y.V. (1989). Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *Journal of Physiology* 412, 181-195.
- Alden, K.J. y Garcia, J. (2001). Differential effect of gabapentin on neuronal and muscle calcium currents. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 727-735.
- Ali, A.B. y Nelson, C. (2006). Distinct Ca<sup>2+</sup> channels mediate transmitter release at excitatory synapses displaying different dynamic properties in rat neocortex. *Cereb Cortex* 16, 386-393.
- Armstrong, C.M. y Hille, B. (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20, 371-380.
- Aurora, S.K. y Wilkinson, F. (2007). The brain is hyperexcitable in migraine. *Cephalalgia* 27, 1442-1453.
- Ayata, C., Jin, H., Kudo, C., Dalkara, T. y Moskowitz, M.A. (2006). Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol* 59, 652-661.
- Ayata, C. (2009). Spreading depression: from serendipity to targeted therapy in migraine prophylaxis. *Cephalalgia* 29, 1095-1114.

## B

- Barrett, C.F., Cao, Y.Q. y Tsien, R.W. (2005). Gating deficiency in a familial hemiplegic migraine type 1 mutant P/Q-type calcium channel. *J Biol Chem* 280, 24064-24071.
- Bayer, K., Ahmadi, S. y Zeilhofer, H.U. (2004). Gabapentin may inhibit synaptic transmission in the mouse spinal cord dorsal horn through a preferential block of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuropharmacology* 46, 743-749.

- Belliotti, T.R., Capiris, T., Ekhato, I.V., Kinsora, J.J., Field, M.J., Heffner, T.G., Meltzer, L.T., Schwarz, J.B., Taylor, C.P., Thorpe, A.J., y col. (2005). Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the alpha(2)-delta protein. *J Med Chem* 48, 2294-2307.
- Bergsman, J.B., De Camilli, P. y McCormick, D.A. (2004). Multiple large inputs to principal cells in the mouse medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurophysiol* 92, 545-552.
- Beydoun, A., Uthman, B.M., Kugler, A.R., Greiner, M.J., Knapp, L.E. y Garofalo, E.A. (2005). Safety and efficacy of two pregabalin regimens for add-on treatment of partial epilepsy. *Neurology* 64, 475-480.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. y De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177-190.
- Blake, M.G., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Hocht, C. y Baratti, C.M. (2007). Opposite effects of a single versus repeated doses of gabapentin on retention performance of an inhibitory avoidance response in mice. *Neurobiol Learn Mem* 87, 192-200.
- Blatchley, B.J., Cooper, W.A. y Coleman, J.R. (1987). Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Brain Res* 429, 75-84.
- Blatow, M., Caputi, A., Burnashev, N., Monyer, H. y Rozov, A. (2003). Ca<sup>2+</sup> buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* 38, 79-88.
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A. y Moskowitz, M.A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8, 136-142.
- Borst, J.G. y Sakmann, B. (1998). Facilitation of presynaptic calcium currents in the rat brainstem. *J Physiol* 513 ( Pt 1), 149-155.
- Borst, J.G. y Sakmann, B. (1999). Effect of changes in action potential shape on calcium currents and transmitter release in a calyx-type synapse of the rat auditory brainstem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 347-355.
- Borst, J.G. (2010). The low synaptic release probability in vivo. *Trends Neurosci* 33, 259-266.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J. y Snutch, T.P. (1999). Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2, 407-415.

- Bowyer, S.M., Aurora, K.S., Moran, J.E., Tepley, N. y Welch, K.M. (2001). Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann Neurol* 50, 582-587.
- Brenner, R., Chen, Q.H., Vilaythong, A., Toney, G.M., Noebels, J.L. y Aldrich, R.W. (2005). BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci* 8, 1752-1759.
- Burgess, D.L. y Noebels, J.L. (1999). Voltage-dependent calcium channel mutations in neurological disease. *Ann N Y Acad Sci* 868, 199-212.
- Burgess, D.L., Biddlecome, G.H., McDonough, S.I., Diaz, M.E., Zilinski, C.A., Bean, B.P., Campbell, K.P. y Noebels, J.L. (1999). beta subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 13, 293-311.

## C

- Calandre, E.P., Garcia-Leiva, J.M., Rico-Villademoros, F., Vilchez, J.S. y Rodriguez-Lopez, C.M. (2010). Pregabalin in the treatment of chronic migraine: an open-label study. *Clin Neuropharmacol* 33, 35-39.
- Cao, Y.Q., Piedras-Renteria, E.S., Smith, G.B., Chen, G., Harata, N.C. y Tsien, R.W. (2004). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels compete for channel type-preferring slots in altered neurotransmission arising from Ca<sup>2+</sup> channelopathy. *Neuron* 43, 387-400.
- Cao, Y.Q. y Tsien, R.W. (2005). Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2590-2595.
- Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-555.
- Catterall, W.A. y Few, A.P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59, 882-901.
- Catterall, W.A., Dib-Hajj, S., Meisler, M.H. y Pietrobon, D. (2008). Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *J Neurosci* 28, 11768-11777.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Chang, S.Y., Yong, T.F., Yu, C.Y., Liang, M.C., Pletnikova, O., Troncoso, J., Burgunder, J.M. y Soong, T.W. (2007). Age and gender-dependent alternative splicing of P/Q-type calcium channel EF-hand. *Neuroscience* 145, 1026-1036.

- Charles, A. (2009). Advances in the basic and clinical science of migraine. *Ann Neurol* 65, 491-498.
- Charles, A. y Brennan, K. (2009). Cortical spreading depression-new insights and persistent questions. *Cephalalgia* 29, 1115-1124.
- Chaudhuri, D., Alseikhan, B.A., Chang, S.Y., Soong, T.W. y Yue, D.T. (2005). Developmental activation of calmodulin-dependent facilitation of cerebellar P-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Neurosci* 25, 8282-8294.
- Cole, T.B., Robbins, C.A., Wenzel, H.J., Schwartzkroin, P.A. y Palmiter, R.D. (2000). Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Res* 39, 153-169.
- Coppola, G., Pierelli, F. y Schoenen, J. (2007). Is the cerebral cortex hyperexcitable or hyperresponsive in migraine? *Cephalalgia* 27, 1427-1439.
- Cox, G.A., Lutz, C.M., Yang, C.L., Biemesderfer, D., Bronson, R.T., Fu, A., Aronson, P.S., Noebels, J.L. y Frankel, W.N. (1997). Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell* 91, 139-148.
- Cunningham, M.O., Woodhall, G.L., Thompson, S.E., Dooley, D.J. y Jones, R.S. (2004). Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *Eur J Neurosci* 20, 1566-1576.
- Cuttle, M.F., Tsujimoto, T., Forsythe, I.D. y Takahashi, T. (1998). Facilitation of the presynaptic calcium current at an auditory synapse in rat brainstem. *J Physiol* 512 ( Pt 3), 723-729.

## D

- Di Guilmi, M.N., Urbano, F.J., Inchauspe, C.G. y Uchitel, O.D. (2011). Pregabalin modulation of neurotransmitter release is mediated by change in intrinsic activation/inactivation properties of ca(v)2.1 calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 973-982.
- Dolphin, A.C. (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35, 599-620.
- Dooley, D.J., Taylor, C.P., Donevan, S. y Feltner, D. (2007). Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta ligands: novel modulators of neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci* 28, 75-82.
- Dunlap, K., Luebke, J.I. y Turner, T.J. (1995). Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18, 89-98.

## E

- Eilers, J., Plant, T. y Konnerth, A. (1996). Localized calcium signalling and neuronal integration in cerebellar Purkinje neurones. *Cell Calcium* 20, 215-226.
- Eroglu, C., Allen, N.J., Susman, M.W., O'Rourke, N.A., Park, C.Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S.B., Annis, D.S., Huberman, A.D., y col. (2009). Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380-392.

## F

- Fedchyshyn, M.J. y Wang, L.Y. (2005). Developmental transformation of the release modality at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 25, 4131-4140.
- Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M. y Campbell, K.P. (1997). Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 17, 6884-6891.
- Felmy, F., Neher, E. y Schneggenburger, R. (2003). Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37, 801-811.
- Ferrari M.D., van den Maagdenberg A.M.J.M., Frants R.R. y Goadsby P.J. (2008) *Molecular Neurology. Migraine as a cerebral ionopathy with impaired central sensory processing.* Waxman, S.G. (editor): 439-461.
- Fink, K., Meder, W., Dooley, D.J. y Gothert, M. (2000). Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. *Br J Pharmacol* 130, 900-906.
- Fink, K., Dooley, D.J., Meder, W.P., Suman-Chauhan, N., Duffy, S., Clusmann, H. y Gothert, M. (2002). Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology* 42, 229-236.
- Fitzsimons, R.B. y Wolfenden, W.H. (1985). Migraine coma. Meningitic migraine with cerebral oedema associated with a new form of autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 108 ( Pt 3), 555-577.
- Fletcher, C.F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D., Jr., Hawkes, R., Frankel, W.N., Copeland, N.G. y Jenkins, N.A. (1996). Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 87, 607-617.
- Fletcher, C.F., Tottene, A., Lennon, V.A., Wilson, S.M., Dubel, S.J., Paylor, R., Hosford, D.A., Tessarollo, L., McEnery, M.W., Pietrobon, D. y col. (2001).

Dystonia and cerebellar atrophy in *Cacna1a* null mice lacking P/Q calcium channel activity. *FASEB J* 15, 1288-1290.

Flippen, C. y Welch, K.M. (1997). Imaging the brain of migraine sufferers. *Curr Opin Neurol* 10, 226-230.

Forsythe, I.D. y Barnes-Davies, M. (1993). The binaural auditory pathway: excitatory amino acid receptors mediate dual timecourse excitatory postsynaptic currents in the rat medial nucleus of the trapezoid body. *Proc Biol Sci* 251, 151-157.

Forsythe, I.D., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M., Cuttle, M.F. y Takahashi, T. (1998). Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20, 797-807.

## G

Geal-Dor, M., Freeman, S., Li, G. y Sohmer, H. (1993). Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69, 236-242.

Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U., Offord, J., Thurlow, R. y Woodruff, G.N. (1996). The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha_2\delta$  subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 271, 5768-5776.

Goadsby, P.J., Charbit, A.R., Andreou, A.P., Akerman, S. y Holland, P.R. (2009). Neurobiology of migraine. *Neuroscience* 161, 327-341.

## H

Hadjikhani, N., Sanchez Del Rio, M., Wu, O., Schwartz, D., Bakker, D., Fischl, B., Kwong, K.K., Cutrer, F.M., Rosen, B.R., Tootell, R.B. y col. (2001). Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4687-4692.

Haerter, K., Ayata C. y Moskowitz, M.A. (2005). Cortical spreading depression: A model for understanding migraine biology and future drug targets. *Headache Currents* 2, 97-103.

Hans, M., Luvisetto, S., Williams, M.E., Spagnolo, M., Urrutia, A., Tottene, A., Brust, P.F., Johnson, E.C., Harpold, M.M., Stauderman, K.A. y Pietrobon, D. (1999). Functional consequences of mutations in the human  $\alpha_1A$  calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 19, 1610-1619.

Hendrich, J., Van Minh, A.T., Heblich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A. y Dolphin, A.C. (2008). Pharmacological disruption of



- calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3628-3633.
- Hermann, J., Pecka, M., von Gersdorff, H., Grothe, B. y Klug, A. (2007). Synaptic transmission at the calyx of Held under in vivo like activity levels. *J Neurophysiol* 98, 807-820.
- Hill, D.R., Suman-Chauhan, N. y Woodruff, G.N. (1993). Localization of [3H]gabapentin to a novel site in rat brain: autoradiographic studies. *Eur J Pharmacol* 244, 303-309.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd ed.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates. ISBN 0-87893-321-2.
- Hobom, M., Dai, S., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F. y Klugbauer, N. (2000). Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci* 12, 1217-1226.
- Hoffpauir, B.K., Grimes, J.L., Mathers, P.H. y Spirou, G.A. (2006). Synaptogenesis of the calyx of Held: rapid onset of function and one-to-one morphological innervation. *J Neurosci* 26, 5511-5523.
- Hori, T. y Takahashi, T. (2009). Mechanisms underlying short-term modulation of transmitter release by presynaptic depolarization. *J Physiol* 587, 2987-3000.

## I

- Inchauspe, C.G., Martini, F.J., Forsythe, I.D. y Uchitel, O.D. (2004). Functional compensation of P/Q by N-type channels blocks short-term plasticity at the calyx of held presynaptic terminal. *J Neurosci* 24, 10379-10383.
- Inchauspe, C.G., Forsythe, I.D. y Uchitel, O.D. (2007). Changes in synaptic transmission properties due to the expression of N-type calcium channels at the calyx of Held synapse of mice lacking P/Q-type calcium channels. *J Physiol* 584, 835-851.
- Inchauspe, C.G., Urbano, F.J., Di Guilmi, M.N., Forsythe, I.D., Ferrari, M.D., van den Maagdenberg, A.M. y Uchitel, O.D. (2010). Gain of function in FHM-1 Ca(V)2.1 knock-in mice is related to the shape of the action potential. *J Neurophysiol* 104, 291-299.
- Ishikawa, T., Kaneko, M., Shin, H.S. y Takahashi, T. (2005). Presynaptic N-type and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice. *J Physiol* 568, 199-209.

Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O.D. y Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20, 59-65.

Iwasaki, S. y Takahashi, T. (1998). Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* 509 ( Pt 2), 419-423.

## J

Johannessen, S.I., Battino, D., Berry, D.J., Bialer, M., Kramer, G., Tomson, T. y Patsalos, P.N. (2003). Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 25, 347-363.

Joshi, I. y Taylor, C.P. (2006). Pregabalin action at a model synapse: binding to presynaptic calcium channel alpha2-delta subunit reduces neurotransmission in mice. *Eur J Pharmacol* 553, 82-88.

Jun, K., Piedras-Renteria, E.S., Smith, S.M., Wheeler, D.B., Lee, S.B., Lee, T.G., Chin, H., Adams, M.E., Scheller, R.H., Tsien, R.W. y Shin, H.S. (1999). Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15245-15250.

## K

Kaja, S., van de Ven, R.C., Broos, L.A., Veldman, H., van Dijk, J.G., Verschuuren, J.J., Frants, R.R., Ferrari, M.D., van den Maagdenberg, A.M. y Plomp, J.J. (2005). Gene dosage-dependent transmitter release changes at neuromuscular synapses of CACNA1A R192Q knockin mice are non-progressive and do not lead to morphological changes or muscle weakness. *Neuroscience* 135, 81-95.

Kandler, K. y Friauf, E. (1993). Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 328, 161-184.

Kang, M.G., Felix, R. y Campbell, K.P. (2002). Long-term regulation of voltage-gated Ca(2+) channels by gabapentin. *FEBS Lett* 528, 177-182.

Kanethi, P., Qiao, X., Diaz, M.E., Peden, A.A., Meyer, G.E., Carskadon, S.L., Kapfhamer, D., Sufalko, D., Robinson, M.S., Noebels, J.L. y Burmeister, M. (1998). Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to

- storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* 21, 111-122.
- Kanumilli, S., Tringham, E.W., Payne, C.E., Dupere, J.R., Venkateswarlu, K. y Usowicz, M.M. (2006). Alternative splicing generates a smaller assortment of CaV2.1 transcripts in cerebellar Purkinje cells than in the cerebellum. *Physiol Genomics* 24, 86-96.
- Knight, Y.E. y Goadsby, P.J. (2001). The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *Neuroscience* 106, 793-800.
- Koester, H.J. y Sakmann, B. (2000). Calcium dynamics associated with action potentials in single nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the young rat neocortex. *J Physiol* 529 Pt 3, 625-646.
- Kopp-Scheinpflug, C., Fuchs, K., Lippe, W.R., Tempel, B.L. y Rubsamen, R. (2003). Decreased temporal precision of auditory signaling in *Kcna1*-null mice: an electrophysiological study in vivo. *J Neurosci* 23, 9199-9207.
- Kors, E.E., Terwindt, G.M., Vermeulen, F.L., Fitzsimons, R.B., Jardine, P.E., Heywood, P., Love, S., van den Maagdenberg, A.M., Haan, J., Frants, R.R. y Ferrari, M.D. (2001). Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the *CACNA1A* calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol* 49, 753-760.
- Kraus, R.L., Sinnegger, M.J., Glossmann, H., Hering, S. y Striessnig, J. (1998). Familial hemiplegic migraine mutations change  $\alpha 1A$  Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 273, 5586-5590.
- Kraus, R.L., Sinnegger, M.J., Koschak, A., Glossmann, H., Stenirri, S., Carrera, P. y Striessnig, J. (2000). Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2+) channel kinetics. *J Biol Chem* 275, 9239-9243.
- Kuwabara, N., DiCaprio, R.A. y Zook, J.M. (1991). Afferents to the medial nucleus of the trapezoid body and their collateral projections. *J Comp Neurol* 314, 684-706.

## L

- Lacerda, A.E., Kim, H.S., Ruth, P., Perez-Reyes, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., Birnbaumer, L. y Brown, A.M. (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* 352, 527-530.

- Lanneau, C., Green, A., Hirst, W.D., Wise, A., Brown, J.T., Donnier, E., Charles, K.J., Wood, M., Davies, C.H. y Pangalos, M.N. (2001). Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology* 41, 965-975.
- Lauritzen, M. (1994). Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 ( Pt 1), 199-210.
- Leão, A.A.P. (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7: 359-390.
- Li, L., Bischofberger, J. y Jonas, P. (2007). Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27, 13420-13429.
- Liu, Z., Ren, J. y Murphy, T.H. (2003). Decoding of synaptic voltage waveforms by specific classes of recombinant high-threshold Ca(2+) channels. *J Physiol* 553, 473-488.
- Llinas, R.R., Choi, S., Urbano, F.J. y Shin, H.S. (2007). Gamma-band deficiency and abnormal thalamocortical activity in P/Q-type channel mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17819-17824.
- Luisetto, S., Fellin, T., Spagnolo, M., Hivert, B., Brust, P.F., Harpold, M.M., Stauderman, K.A., Williams, M.E. y Pietrobon, D. (2004). Modal gating of human CaV2.1 (P/Q-type) calcium channels: I. The slow and the fast gating modes and their modulation by beta subunits. *J Gen Physiol* 124, 445-461.

## M

- Maneuf, Y.P., Gonzalez, M.I., Sutton, K.S., Chung, F.Z., Pinnock, R.D. y Lee, K. (2003). Cellular and molecular action of the putative GABA-mimetic, gabapentin. *Cell Mol Life Sci* 60, 742-750.
- Marais, E., Klugbauer, N. y Hofmann, F. (2001). Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol* 59, 1243-1248.
- Martin, D.J., McClelland, D., Herd, M.B., Sutton, K.G., Hall, M.D., Lee, K., Pinnock, R.D. y Scott, R.H. (2002). Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression. *Neuropharmacology* 42, 353-366.
- Masdrakis, V.G., Oulis, P., Karakatsanis, N.A., Potagas, C., Kouzoupis, A.V. y Soldatos, C.R. (2008). Remission of migraine attacks in a patient with depression who is taking pregabalin. *Clin Neuropharmacol* 31, 238-240.

- Mathew, N.T., Rapoport, A., Saper, J., Magnus, L., Klapper, J., Ramadan, N., Stacey, B. y Tepper, S. (2001). Efficacy of gabapentin in migraine prophylaxis. *Headache* 41, 119-128.
- McClelland, D., Evans, R.M., Barkworth, L., Martin, D.J. y Scott, R.H. (2004). A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. *BMC Pharmacol* 4, 14.
- Melliti, K., Grabner, M. y Seabrook, G.R. (2003). The familial hemiplegic migraine mutation R192Q reduces G-protein-mediated inhibition of P/Q-type (Ca(V)2.1) calcium channels expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 546, 337-347.
- Micheva, K.D., Taylor, C.P. y Smith, S.J. (2006). Pregabalin reduces the release of synaptic vesicles from cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 70, 467-476.
- Mintz, I.M., Sabatini, B.L. y Regehr, W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15, 675-688.
- Mochida, S., Few, A.P., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (2008). Regulation of presynaptic Ca(V)2.1 channels by Ca<sup>2+</sup> sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron* 57, 210-216.
- Muller, M., Felmy, F. y Schneggenburger, R. (2008). A limited contribution of Ca<sup>2+</sup> current facilitation to paired-pulse facilitation of transmitter release at the rat calyx of Held. *J Physiol* 586, 5503-5520.
- Muller, M., Goutman, J.D., Kochubey, O. y Schneggenburger, R. (2010). Interaction between facilitation and depression at a large CNS synapse reveals mechanisms of short-term plasticity. *J Neurosci* 30, 2007-2016.
- Mullner, C., Broos, L.A., van den Maagdenberg, A.M. y Striessnig, J. (2004). Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel gating: evidence for beta-subunit isoform-specific effects. *J Biol Chem* 279, 51844-51850.

## N

- Noebels, J. L. (2001). "Modeling human epilepsies in mice." *Epilepsia* 42 Suppl 5: 11-5.

## O

- Oertel, D. (1999). The role of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Annu Rev Physiol* 61, 497-519.
- 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.
- Ophoff, R.A., Terwindt, G.M., Vergouwe, M.N., van Eijk, R., Oefner, P.J., Hoffman, S.M., Lamerdin, J.E., Mhrenweiser, H.W., Bulman, D.E., Ferrari, M. y col. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 87, 543-552.

## P

- Patil, P.G., Brody, D.L. y Yue, D.T. (1998). Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20, 1027-1038.
- Piedras-Renteria, E.S., Pyle, J.L., Diehn, M., Glickfeld, L.L., Harata, N.C., Cao, Y., Kavalali, E.T., Brown, P.O. y Tsien, R.W. (2004). Presynaptic homeostasis at CNS nerve terminals compensates for lack of a key Ca<sup>2+</sup> entry pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3609-3614.
- Pietrobon, D. y Striessnig, J. (2003). Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 4, 386-398.
- Pietrobon, D. (2005). Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol* 15, 257-265.
- Pietrobon, D. (2007). Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4, 274-284.
- Pietrobon, D. (2010a). Insights into migraine mechanisms and CaV2.1 calcium channel function from mouse models of familial hemiplegic migraine. *J Physiol* 588, 1871-1878.
- Pietrobon, D. (2010b). CaV2.1 channelopathies. *Pflugers Arch* 460, 375-393.
- Pineda, J.C., Waters, R.S. y Foehring, R.C. (1998). Specificity in the interaction of HVA Ca<sup>2+</sup> channel types with Ca<sup>2+</sup>-dependent AHPs and firing behavior in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 79, 2522-2534.
- Puppe, A. y Limmroth, V. (2007). GABAergic drugs for the treatment of migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6, 247-250.

## Q

- Qian, J. y Noebels, J.L. (2000). Presynaptic Ca(2+) influx at a mouse central synapse with Ca(2+) channel subunit mutations. *J Neurosci* 20, 163-170.
- Qian, J. y Noebels, J.L. (2001). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J Neurosci* 21, 3721-3728.

## R

- Rodriguez-Contreras, A., de Lange, R.P., Lucassen, P.J. y Borst, J.G. (2006). Branching of calyceal afferents during postnatal development in the rat auditory brainstem. *J Comp Neurol* 496, 214-228.
- Rozov, A., Burnashev, N., Sakmann, B. y Neher, E. (2001). Transmitter release modulation by intracellular Ca<sup>2+</sup> buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *J Physiol* 531, 807-826.

## S

- Sabatini, B.L. y Regehr, W.G. (1999). Timing of synaptic transmission. *Annu Rev Physiol* 61, 521-542.
- Schluter, O.M., Basu, J., Sudhof, T.C. y Rosenmund, C. (2006). Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 26, 1239-1246.
- Schneggenburger, R., Meyer, A.C. y Neher, E. (1999). Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 23, 399-409.
- Schneggenburger, R., Sakaba, T. y Neher, E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci* 25, 206-212.
- Schneggenburger, R. y Forsythe, I.D. (2006). The calyx of Held. *Cell Tissue Res* 326, 311-337.
- Schumacher, T.B., Beck, H., Steinhauser, C., Schramm, J. y Elger, C.E. (1998). Effects of phenytoin, carbamazepine, and gabapentin on calcium channels in hippocampal granule cells from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 39, 355-363.

- Serra, S.A., Fernandez-Castillo, N., Macaya, A., Cormand, B., Valverde, M.A. y Fernandez-Fernandez, J.M. (2009). The hemiplegic migraine-associated Y1245C mutation in CACNA1A results in a gain of channel function due to its effect on the voltage sensor and G-protein-mediated inhibition. *Pflugers Arch* 458, 489-502.
- 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.H., Joris, P.X., Carney, L.H. y Yin, T.C. (1991). Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 304, 387-407.
- Sokolov, S., Weiss, R.G., Timin, E.N. y Hering, S. (2000). Modulation of slow inactivation in class A Ca<sup>2+</sup> channels by beta-subunits. *J Physiol* 527 Pt 3, 445-454.
- Somjen, G.G. (2001). Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81, 1065-1096.
- Sommer, I., Lingenhohl, K. y Friauf, E. (1993). Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body: an intracellular in vivo study of their physiology and morphology. *Exp Brain Res* 95, 223-239.
- Sonntag, M., Englitz, B., Kopp-Scheinpflug, C. y Rubsamen, R. (2009). Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: an in vivo study in mice. *J Neurosci* 29, 9510-9520.
- Soong, T.W., DeMaria, C.D., Alvania, R.S., Zweifel, L.S., Liang, M.C., Mittman, S., Agnew, W.S. y Yue, D.T. (2002). Systematic identification of splice variants in human P/Q-type channel alpha1(2.1) subunits: implications for current density and Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation. *J Neurosci* 22, 10142-10152.
- Stefani, A., Spadoni, F. y Bernardi, G. (1998). Gabapentin inhibits calcium currents in isolated rat brain neurons. *Neuropharmacology* 37, 83-91.
- Stefani, A., Spadoni, F., Giacomini, P., Lavaroni, F. y Bernardi, G. (2001). The effects of gabapentin on different ligand- and voltage-gated currents in isolated cortical neurons. *Epilepsy Res* 43, 239-248.
- Stewart, B.H., Kugler, A.R., Thompson, P.R. y Bockbrader, H.N. (1993). A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. *Pharm Res* 10, 276-281.
- Stewart, W.F., Wood, C., Reed, M.L., Roy, J. y Lipton, R.B. (2008). Cumulative lifetime migraine incidence in women and men. *Cephalalgia* 28, 1170-1178.



- Striano, P. y Striano, S. (2008). Gabapentin: a Ca<sup>2+</sup> channel alpha 2-delta ligand far beyond epilepsy therapy. *Drugs Today (Barc)* 44, 353-368.
- Stringer, J.L. y Taylor, C.P. (2000). The effects of gabapentin in the rat hippocampus are mimicked by two structural analogs, but not by nimodipine. *Epilepsy Res* 41, 155-162.
- Su, T.Z., Feng, M.R. y Weber, M.L. (2005). Mediation of highly concentrative uptake of pregabalin by L-type amino acid transport in Chinese hamster ovary and Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 1406-1415.
- Sudhof, T.C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320.
- Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27, 509-547.
- Suman-Chauhan, N., Webdale, L., Hill, D.R. y Woodruff, G.N. (1993). Characterisation of [<sup>3</sup>H]gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *Eur J Pharmacol* 244, 293-301.
- Sutton, K.G., McRory, J.E., Guthrie, H., Murphy, T.H. y Snutch, T.P. (1999). P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* 401, 800-804.
- Sutton, K.G., Martin, D.J., Pinnock, R.D., Lee, K. y Scott, R.H. (2002). Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* 135, 257-265.

## T

- Taylor, C.P., Gee, N.S., Su, T.Z., Kocsis, J.D., Welty, D.F., Brown, J.P., Dooley, D.J., Boden, P. y Singh, L. (1998). A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res* 29, 233-249.
- Taylor, C.P., Angelotti, T. y Fauman, E. (2007). Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res* 73, 137-150.
- Taylor, C.P. (2009). Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin--calcium channel alpha2-delta [Cavalpha2-delta] ligands. *Pain* 142, 13-16.
- Terwindt, G.M., Ophoff, R.A., Lindhout, D., Haan, J., Halley, D.J., Sandkuijl, L.A., Brouwer, O.F., Frants, R.R. y Ferrari, M.D. (1997). Partial cosegregation of familial hemiplegic migraine and a benign familial infantile epileptic syndrome. *Epilepsia* 38, 915-921.
- Tottene, A., Fellin, T., Pagnutti, S., Luvisetto, S., Striessnig, J., Fletcher, C. y Pietrobon, D. (2002). Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca(2+)

influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13284-13289.

Tottene, A., Pivotto, F., Fellin, T., Cesetti, T., van den Maagdenberg, A.M. y Pietrobon, D. (2005). Specific kinetic alterations of human CaV2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *J Biol Chem* 280, 17678-17686.

Tottene, A., Conti, R., Fabbro, A., Vecchia, D., Shapovalova, M., Santello, M., van den Maagdenberg, A.M., Ferrari, M.D. y Pietrobon, D. (2009). Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61, 762-773.

Trussell, L.O. (1999). Synaptic mechanisms for coding timing in auditory neurons. *Annu Rev Physiol* 61, 477-496.

## U

Urbano, F.J. y Uchitel, O.D. (1999). L-type calcium channels unmasked by cell-permeant Ca<sup>2+</sup> buffer at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 437, 523-528.

Uchitel, O.D., Inchauspe, C.G., Urbano, F.J. y Di Guilmi, M.N. (2011). Ca(V)2.1 voltage activated calcium channels and synaptic transmission in familial hemiplegic migraine pathogenesis. *J Physiol Paris*, *en prensa*.

## V

van den Maagdenberg, A.M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T., Kaja, S., Broos, L.A., Cesetti, T., van de Ven, R.C., Tottene, A., van der Kaa, J., Plomp, J.J. y col. (2004). A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41, 701-710.

van den Maagdenberg, A.M., Pizzorusso, T., Kaja, S., Terpolilli, N., Shapovalova, M., Hoebeek, F.E., Barrett, C.F., Gherardini, L., van de Ven, R.C., Todorov, B. y col. (2010). High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice. *Ann Neurol* 67, 85-98.

van Hooft, J.A., Dougherty, J.J., Endeman, D., Nichols, R.A. y Wadman, W.J. (2002). Gabapentin inhibits presynaptic Ca(2+) influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex. *Eur J Pharmacol* 449, 221-228.

- Varela, J.A., Sen, K., Gibson, J., Fost, J., Abbott, L.F. y Nelson, S.B. (1997). A quantitative description of short-term plasticity at excitatory synapses in layer 2/3 of rat primary visual cortex. *J Neurosci* 17, 7926-7940.
- Vega-Hernandez, A. y Felix, R. (2002). Down-regulation of N-type voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels by gabapentin. *Cell Mol Neurobiol* 22, 185-190.
- von Gersdorff, H. y Borst, J.G. (2002). Short-term plasticity at the calyx of held. *Nat Rev Neurosci* 3, 53-64.

## W

- Wang, L.Y. y Kaczmarek, L.K. (1998). High-frequency firing helps replenish the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Nature* 394, 384-388.
- Wang, M., Offord, J., Oxender, D.L. y Su, T.Z. (1999). Structural requirement of the calcium-channel subunit alpha2delta for gabapentin binding. *Biochem J* 342 ( Pt 2), 313-320.
- Walker, D. y De Waard, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21, 148-154.
- Weiss, N., Sandoval, A., Felix, R., Van den Maagdenberg, A. y De Waard, M. (2008). The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes deinhibition of Ca(v)2.1 calcium channels during direct G-protein regulation. *Pflugers Arch* 457, 315-326.
- Welch, K.M. (2005). Brain hyperexcitability: the basis for antiepileptic drugs in migraine prevention. *Headache* 45 Suppl 1, S25-32.
- Westenbroek, R.E., Sakurai, T., Elliott, E.M., Hell, J.W., Starr, T.V., Snutch, T.P. y Catterall, W.A. (1995). Immunohistochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* 15, 6403-6418.
- Whittaker, C.A. y Hynes, R.O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 13, 3369-3387.
- Womack, M.D., Chevez, C. y Khodakhah, K. (2004). Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 24, 8818-8822.
- Wong, A.Y., Graham, B.P., Billups, B. y Forsythe, I.D. (2003). Distinguishing between presynaptic and postsynaptic mechanisms of short-term depression during action potential trains. *J Neurosci* 23, 4868-4877.

Wu, L.G., y Borst, J.G. (1999). The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron* 23, 821-832.

Wu, L.G., Westenbroek, R.E., Borst, J.G., Catterall, W.A. y Sakmann, B. (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19, 726-736.

## Z

Zaitsev, A.V., Povysheva, N.V., Lewis, D.A. y Krimer, L.S. (2007). P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 97, 3567-3573.

Zamponi, G.W., Lory, P. y Perez-Reyes, E. (2010) Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch* 460, 395-403.

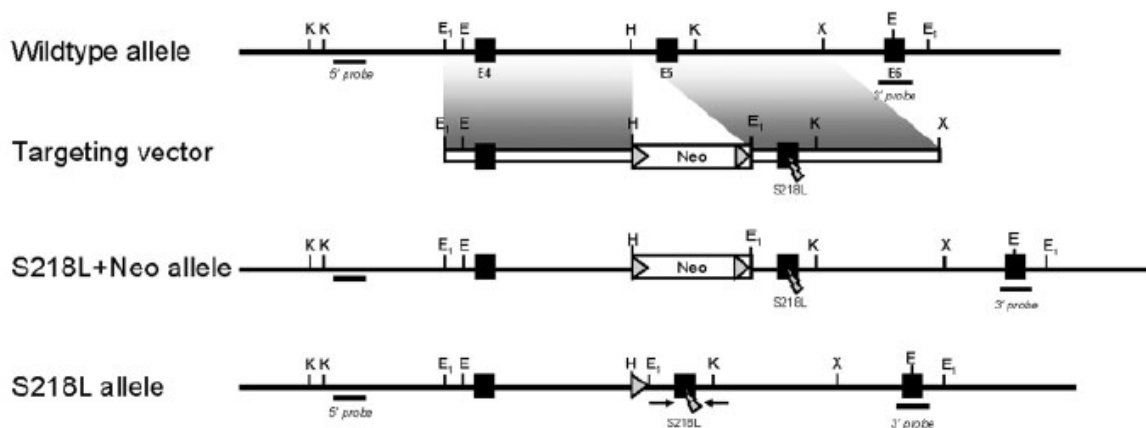
Zucker, R.S. y Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405.

***Anexo***

## Anexo 1

### Ratones transgénicos S218L

En esta sección solo se incluye el esquema general de generación del modelo transgénico S218L. El protocolo con el desarrollo detallado se encuentra en el trabajo “High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice” (van den Maagdenberg y col, 2010)



**Figura Anexo 1.1. Generación del ratón KI *CACNA1A* S218L.** (A) Estructura genómica del alelo del gen *CACNA1A* en el WT, vector blanco (*targeting vector*) y estructura esperada luego de la recombinação homóloga (*S218L Neo allele*), y luego de la deleción mediada por Cre del cassette de neomicina (*S218L allele*). Los sitios LoxP están indicados por triángulos. Los rectángulos negros numerados indican los exones respectivos con la mutación S218L en E5. Las líneas indican las sondas utilizadas para el análisis por Southern blot. Los primers utilizados para la tipificación y conformación del mutante S218L están marcados esquemáticamente con flechas. Los sitios de restricción en el alelo son E, *Eam1105I*; E1, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; X, *XbaI*.

### Tipificación de los animales

El primer paso en el proceso de tipificación es la extracción de ADN genómico la cual se realiza mediante un kit de extracción comercial (Inbio, Highway, Tandil, Argentina). A partir de este material genético se procede a realizar una PCR cuyo protocolo se detalla a continuación:

#### Programa de la PCR

3 min	94°C	
30 seg	92°C	} 35 ciclos
30 seg	54°C	
30 seg	72°C	
5 min	72°C	
fin		

Las soluciones utilizadas para realizar la PCR se detallan en la tabla:

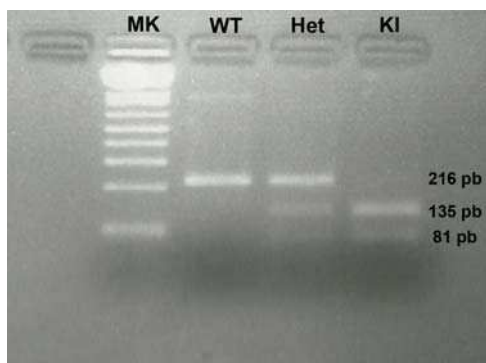
Agua	15.4 µl
Mg <sup>2+</sup> 50 mM	1.2 µl
Buffer	3 µl
dntp 10 mM	0.6 µl
Primer 271	0.75 µl
Primer 272	0.75 µl
taq	0.3 µl
ADN	5 µl
Vol. final	30 µl

Los primers 271 y 272 tienen la siguiente secuencia:

primer 271 5' – CTCCATGGGAGGCACTTG – 3'

primer 272 5' – ACCTGTCCCCTCTTCAAAGC – 3'

El producto de PCR se digiere con la enzima de digestión VspI o AseI a fin de obtener el bandeo característico para cada genotipo (WT: 216 pb; Het: 216+81+135 pb; KI 81+135 pb). Para ello se corre el producto de la digestión en un gel de agarosa 3%.



**Figura Anexo 1.2. Bando específico del producto de PCR digerido por la enzima de restricción.** Los fragmentos de la PCR se digirieron con la enzima VspI o AseI (según disponibilidad) las cuales reconocen el mismo sitio. Luego de la incubación en las condiciones detalladas en el texto, se corren en un gel de agarosa al 3% durante 30 min a 120 V. El bandeo específico corresponde a WT: 216 pb; Het: 216+81+135 pb; KI (218L) 81+135 pb. La primera calle de la izquierda del gel corresponde al marcador de peso molecular (MK) que comprende desde los 100 a los 1000 pb.

La mezcla en la cual se realiza la digestión se compone de

Producto de PCR	10 µl
Agua	16.7 µl
Buffer	3,3 µl
AseI/VspI	0,3 µl
1 hora de incubación	37°C

## Anexo 2

### ***Estimación de la probabilidad de liberación***

A partir de los trenes de depresión a 100 o 300 Hz, se puede estimar tanto la probabilidad de liberación (Pr) como el tamaño del pool liberado (Schneppenburger y col., 1999). Para ello se debe realizar la suma acumulativa de estas amplitudes y graficar éstas en función al tiempo durante el tren de 100 o 300 Hz. Considerando que la depresión al final del tren se encuentra en estado estacionario, se pueden ajustar los últimos 10 pulsos a una función lineal y a partir de la extrapolación de esta función a tiempo cero, se puede estimar la Pr a partir de la ordenada al origen. La ordenada al origen equivale al producto  $N \cdot q$  donde N es el tamaño del pool de vesículas disponibles para ser liberadas y q la amplitud media del cuanto. De esta manera, la Pr se calcula como el cociente entre la amplitud media del primer EPSC del tren y  $N \cdot q$ . Considerando el valor medio de los eventos miniaturas, se puede estimar el valor del pool liberado a partir del cociente entre  $N \cdot q$  y la amplitud media de los mEPSCs.

Cabe señalar, que este método constituye una estimación y no el valor real de la Pr o el tamaño cuantico. Los valores obtenidos por esta aproximación pueden ser sobrestimados dado que el influjo de calcio en el primer estímulo es menor que durante los últimos pulsos y la concentración de calcio se incrementa con la estimulación. Sin embargo, cuando se calcula la Pr utilizando otra aproximación experimental mediante el método de Varela y col. (1997) las Pr obtenidas para el KI fue de 0.45 y para el WT de 0.3 (valores muy similares a los estimados en este trabajo por el método de Schneppenburger y col. (1999). Los datos estimados por el método de Varela han sido reportados oralmente por el Prof. Dr. J. Gerard Borst en función a un análisis que él mismo ha desarrollado realizando un protocolo en el programa Igor tomando como fuente de su análisis los datos obtenidos en la presente tesis a partir de los trenes de STD.