



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis Doctoral

Título:

"Modulación por testosterona de la expresión funcional de canales de calcio en la sinapsis neuromuscular"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Fisiología y Biología Molecular y Celular

Autor: **Silvana Iris Nudler**

Director: **Oswaldo Daniel Uchitel**

73495

Lugar de trabajo:

**Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA**

Buenos Aires, 2006

"Modulación por testosterona de la expresión funcional de canales de calcio en la sinapsis neuromuscular "

Jurado

Firma

Puntaje otorgado al tesista

Jurado

Firma

Puntaje otorgado al tesista

Jurado

Firma

Puntaje otorgado al tesista

A mis padres

*A la memoria de mi queridísimo
tío Julio Nudler*

Resumen

"Modulación por testosterona de la expresión funcional de canales de calcio en la sinapsis neuromuscular "

Resumen

En la unión neuromuscular (UNM) de mamíferos adultos la liberación de neurotransmisor frente a un estímulo nervioso se produce por la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) de tipo P/Q exclusivamente. En la UNM del levator ani (LA), en cambio, la liberación evocada de neurotransmisor se produce por la entrada de Ca^{2+} por tres CCDV diferentes: el P/Q el N y el R.

Como la UNM del LA es altamente dependiente de la testosterona tanto para su supervivencia como para su mantenimiento, en este trabajo se estudió el efecto de la gonadectomía sobre el perfil farmacológico de los canales que median la liberación en esta sinapsis. Los resultados indican que la gonadectomía desacopla a los canales N y R de la liberación de neurotransmisor, mientras que la suplementación con testosterona de los animales gonadectomizados recupera la función de estos canales.

Estudios inmunohistoquímicos analizados con microscopía confocal nos han permitido estimar la cantidad de canales N y R presentes en cada situación fisiológica (control, gonadectomía y gonadectomía con reemplazo exógeno de testosterona): los resultados indican que no hay modificaciones significativas en la cantidad de canales presentes en la UNM del LA en cualquiera de estas condiciones. Esto nos permite sugerir que la modulación por testosterona observada no obedece a un efecto genómico de la hormona sobre la expresión de las subunidades principales de los canales N y R.

Palabras claves: canales de calcio, unión neuromuscular, liberación de neurotransmisor, levator ani, núcleo espinal del bulbocavernoso, toxinas bloqueantes de canales de calcio, gonadectomía, testosterona, regulación hormonal.

"Modulation of calcium channels functional expression by testosterone at neuromuscular synapse"

Summary

Neurotransmitter release evoked by neural stimulation at adult mammals neuromuscular junction (NMJ) is sustained by calcium influx through calcium dependent calcium channels (VDCC) of P/Q-type only. In contrast, at levator ani (LA) NMJ neural evoked transmitter release is caused by calcium influx through three different types of VDCC: P/Q, N and R.

As the LA NMJ is highly dependent on testosterone as much for their survival as for their maintenance, we have studied the effect of gonadectomy on the pharmacological profile of calcium channels that mediates transmitter release at this synapse. These results indicate that gonadectomy uncouples N and R channels to transmitter release whereas testosterone supply to gonadectomized animals recovers the function of these channels.

Immunohistochemistry studies analyzed with confocal microscopy in order to estimate the amount of N and R calcium channels indicate that there are no significant modifications in the amount of channels presents in LA NMJ in each experimental condition (control, gonadectomy and gonadectomy with exogenous replacement of testosterone). These results indicate that modulation by testosterone is not a genomic effect on the expression of N and R channels main subunit.

Key words: calcium channels, neuromuscular junction, neurotransmitter release, levator ani, spinal nucleus of bulbocavernosus, calcium channels blockers, gonadectomy, testosterone, hormonal regulation.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Osvaldo Uchitel, le dedico mi principal agradecimiento. Son muchas las cosas que tengo para agradecerle, pero quiero resumir las principales: haberme dado la oportunidad de empezar mi formación científica en su laboratorio, haberme sostenido en un número nada pequeño de situaciones difíciles, haber confiado en mi capacidad intelectual de forma implícita y explícita, haber estado siempre abierto a discutir mis ideas y mis resultados y haberme dado las soluciones para los problemas experimentales que tantas veces se presentaron. Muchas gracias Osvaldo!!

En lo personal, mi agradecimiento infinito hacia mis padres, Telma Barreiro y Oscar Nudler, sin cuyo sostén permanente, su amor y su ayuda sin límites jamás habría llegado a escribir ni un solo capítulo de todo este período de mi vida. No abundo en detalles porque tendría que escribir un libro tan largo como esta Tesis.

Con respecto a las técnicas utilizadas en esta Tesis, mi más grande agradecimiento hacia el flamante Dr. Rafael Pagani: por haber puesto a punto de manera excelente las inmunohistoquímicas y por su ayuda concreta en este trabajo.

Agradezco al Dr. Omar Pignataro y al Lic. Julio Bayona por su generosa ayuda con el RIA.

Quiero dedicar una línea muy importante a los dos técnicos que ha tenido el laboratorio durante mi doctorado, Silvina Estévez y Ezequiel Nuguer. Ambos han sido extremadamente generosos y compañeros conmigo, ayudándome a resolver infinidad de problemas en casi todo lo que he emprendido: desde las operaciones, las fijaciones de

los tejidos, los cortes de los slices, las perfusiones de los animales y tantas cosas que si las sigo mencionando se va a poner en duda mi trabajo en esta Tesis.

Quiero agradecer de manera muy especial a las amigas del laboratorio con las que he contado durante este tiempo, que siempre han estado para escucharme y ayudarme (o sea, infinitas veces): Laura Maskin, Verónica Rodríguez, Itatí Ibáñez, Paula Perissinotti y Silvina Estévez.

También he contado en más de una ocasión con la escucha atenta y la mano amiga de Tamara Tanos, Bárbara Giugovaz Tropper y Yanina Álvarez.

Lamento no haber podido compartir más tiempo de laboratorio con la recientemente incorporada Elisa Filevich: estoy segura que habría sido una muy buena amiga.

Quiero dedicarle un agradecimiento muy especial al Dr. Ernesto Marceca por su ayuda enorme con el dichoso aparato para obtener los últimos puntos del doctorado: creo que es el profesor más paciente y generoso que he conocido en toda mi carrera. También quiero incluir en este agradecimiento a mi compañero Mariano "Mario" Rodríguez sin quien tampoco hubiera sido posible el milagro de Bobby.

Mi super agradecimiento hacia Roberto Fernández por su imprescindible y gran ayuda con el mundo de la confocalidad.

Al Dr. Fernando Marengo, por haber estado siempre dispuesto a escucharme y a brindarme sus muy oportunos consejos, y por haber podido compartir su amistad y su alegría todos estos años. Nunca olvidaré los almuerzos y los tecitos compartidos.

A todos mis compañeros de laboratorio: Itatí, Dana, Carlota, Paula, Rafa, Elisa, Barbie, Ezequiel, Rafa y los "Marengos" Andrés y Yani.

¡A todos los compañeros de almuerzos! Damián Bellio, Gustavo, Nico, Mariano, todo el grupo Uchitel, Marcelo (la más reciente incorporación) y muchos más.

A Danita, por haberme facilitado constantemente mi trabajo: con el bioterio, con las compras, con el CONICET y con tantas otras cosas.

A Ramona, por su cariño, su preocupación por mi persona y por su gran ayuda con las copias de la tesis.

A todos los directores del laboratorio, por brindarnos un excelente lugar para trabajar y, en especial al Dr. Omar Coso por siempre estar dispuesto a brindarme su ayuda y a la Dra. Lidia Szczupak porque siempre supe que puedo contar con ella.

A Lore Rela, Vale, Damián Refojo, Nacho, Hoch, Lore Franco, Anabella, Paula Cramer, Damián Bellio, Manu, Mariano, Sergio, Bernie y María Ana Calviño, por su buena onda de siempre y a María Ana en especial por su gran ayuda con la Discusión de la Tesis.

A mis queridas amigas de todos estos años, Patito, Vale, Pauli y Marina.

A mi prima Ceci y mi sobrinita Camila, por tantos años de cariño y por los momentos compartidos. A mi tía Elsa y a mi prima Edith.

A Javi y Silvina por ser tan buenos conmigo y por nombrarme madrina de mi primer ahijadito.

Al otro brazo de mi familia, Marcela y Juanfri por ser tan cariñosos conmigo y por querer y cuidar tanto a mi papá.

A quienes tanto quise, mi abuelito y mi tío Julio, y a mi tía Hilda y a mi primo Darío, con quienes espero poder compartir momentos cuando cierre un poco el gran dolor que todos sentimos.

A los dos grandes soles de mi vida, mi hermana Alicia Nudler y mi sobrinito Pedrito, quienes a pesar de la distancia están en mi corazón y en mi pensamiento todos los días de mi vida.

A Esteban, por haber llegado a mi vida y hacerme feliz.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	2
ASPECTOS GENERALES DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA.....	2
LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR.....	3
LOS CANALES DE CALCIO.....	4
Naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor.....	11
Relación de cooperatividad entre la $[Ca^{2+}]$ y la liberación.....	12
HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE CANALES DE CALCIO.....	14
Compuestos inorgánicos.....	14
Compuestos orgánicos.....	15
Bloqueantes peptídicos: una pequeña introducción.....	15
Conotoxinas: toxinas peptídicas provenientes de caracoles marinos dirigidas contra canales de calcio.....	16
Toxinas provenientes del veneno de arañas.....	18
CANALES DE Ca^{2+} Y LIBERACION EN LA PLACA NEUROMUSCULAR.....	19
MODULACION POR PROTEÍNA G DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	21
LA ADENOSINA.....	24
CANALES DE CALCIO Y HORMONAS ESTEROIDEAS.....	27
LA TESTOSTERONA.....	28
LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR DEL LEVATOR ANI.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
ANIMALES.....	39
Experimentos sobre el levator ani.....	39
Experimentos sobre el diafragma.....	39
PREPARACIONES.....	41
LEVATOR ANI DE RATA.....	41
DIAFRAGMA DE RATÓN.....	42
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS INTRACELULARES.....	42
ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO CUÁNTICO.....	46
Método de fallas.....	46
Método de varianza.....	48
GONADECTOMÍA Y TRATAMIENTO HORMONAL DE LOS ANIMALES.....	49
Gonadectomía.....	49
Tratamiento hormonal.....	50
TEJIDOS E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	52
Microscopía y fotografía.....	54
Anticuerpos policlonales y α -Bungarotoxina.....	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	55
Compuestos químicos y toxinas.....	56

RESULTADOS.....	58
Canales de calcio de tipo N y de tipo P/Q acoplados a la liberación en la sinapsis neuromuscular del levator ani.....	58
Canales de calcio de tipo R acoplados a la liberación en la sinapsis neuromuscular del levator ani.....	61
Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre la neurotransmisión evocada y espontánea del LA de ratas gonadectomizadas.....	64
Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre la neurotransmisión evocada en el LA de ratas gonadectomizadas y tratadas crónicamente con testosterona.....	66
Expresión de los canales $Ca_v2.2$ en las sinapsis del LA de ratas controles, gonadectomizadas o gonadectomizadas y tratadas con testosterona.....	70
Efecto de la SNX-482 sobre la neurotransmisión evocada del LA de ratas gonadectomizadas.....	72
Efectos de la SNX-482 sobre la liberación neuralmente evocada en el LA de ratas gonadectomizadas y tratadas crónicamente con testosterona.....	74
Expresión de los canales $Ca_v2.3$ en las sinapsis del LA de ratas controles, gonadectomizadas o gonadectomizadas y tratadas con testosterona.....	77
Inhibición por adenosina de la liberación de neurotransmisor en la UNM.....	79
Inhibición por adenosina de la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA.....	80
Efecto de la adenosina sobre la transmisión neuromuscular en la sinapsis del diafragma de los ratones $\alpha_{1A}(-/-)$ (carentes del P/Q).....	86
DISCUSIÓN.....	94
Regulación de la expresión de canales de calcio por andrógenos.....	94
Regulación de la actividad de canales de calcio por andrógenos.....	96
Efectos no genómicos de la testosterona a nivel de la membrana plasmática....	97
Desarrollo de la placa neuromuscular del LA y su probable interacción con la presencia de diversos canales de calcio presinápticos.....	100
Canales de calcio presinápticos en la UNM del LA y adenosina.....	101
Ubicación diferencial de los canales de calcio.....	104
Modulación de canales de calcio.....	107
Resultados diferenciales sobre inhibición por adenosina obtenidos en el KO de P/Q.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	111

Introducción

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS GENERALES DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

A finales del siglo XIX, Charles Sherrington introdujo el término *sinapsis* para definir las zonas de contacto entre dos neuronas o entre una célula nerviosa y una célula efectora (e.g. célula muscular, glándula), como el punto en el cual se producía la transmisión de información de una célula a la otra.

La célula que está transmitiendo una señal se denomina presinapsis, mientras que la receptora se denomina postsinapsis. La habilidad de las neuronas para transportar señales a través de grandes distancias depende de la característica autoregenerativa del impulso nervioso. El potencial de acción es un cambio en el potencial de membrana producido por un movimiento de iones a través de ella (un influjo de Na^+ despolariza la membrana y un eflujo de K^+ luego la repolariza restaurando la distribución inicial de cargas) (Hodgkin y Huxley, 1952); y es el mensaje eléctrico que se propaga rápidamente a través de los axones del sistema nervioso y sobre la superficie de ciertas células musculares y glandulares. En los axones los potenciales de acción son breves, viajan a velocidad constante y mantienen una amplitud constante (Hille, 1984).

En los años '20 Otto Lewi demostró que un componente químico, la acetilcolina, transportaba señales desde el nervio vago hacia el corazón. Esto desencadenó una discusión entre fisiólogos que decían que la transmisión era eléctrica y los farmacólogos que argumentaban que la transmisión era química (Dale *et al.*, 1936). Posteriormente, con el avance de las técnicas fisiológicas, quedó claro que ambos tipos de transmisión existen, y que si bien la mayoría de las sinapsis utilizan un transmisor químico, algunas operan exclusivamente por medios eléctricos o por ambos.

LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR

La sinapsis nervio-músculo es el sistema de transmisión sináptica mejor estudiado en los vertebrados. Esto se debe a que es muy accesible para la experimentación directa porque la célula muscular es lo suficientemente grande como para acomodar en ella varios microelectrodos para realizar registros electrofisiológicos. Además, a diferencia de las sinapsis del sistema nervioso central, la región de la sinapsis donde el terminal presináptico se acerca a la membrana postsináptica puede ser vista al microscopio óptico en una célula viviente.

La placa neuromuscular (o unión neuromuscular) de vertebrados está formada por regiones específicas de tres tipos celulares: la neurona motora, la fibra muscular y la célula de Schwann (revisado en Couteaux, 1973; Ogata, 1988; Engel, 1994) y cada célula postsináptica está innervada por un solo axón presináptico.

La principal característica de esta estructura es que las porciones sinápticas de estos tres tipos celulares se encuentran altamente especializadas, pues contienen altas concentraciones de organelas y moléculas, que a su vez se encuentran en muy bajas concentraciones en las regiones extrasinápticas. El terminal nervioso del axón adopta, en su porción final (zona de contacto con el músculo), una forma ovalada de unos 30 a 35 micrones de amplitud. En esta zona final del axón se hallan mitocondrias y otros elementos que participan en la formación y almacenaje del neurotransmisor, en este caso, la acetilcolina (ACh). Al otro lado del terminal axónico se encuentra la membrana celular de la fibra muscular. A esta zona se la denomina placa motora. El espacio intermedio entre el terminal nervioso y la placa motora se denomina *hendidura sináptica* y mide, aproximadamente, 500 Å. Cuando el axón de la neurona motora se aproxima a la placa motora pierde su vaina de mielina y se divide en finas ramas. Los extremos de cada una de estas ramas forman múltiples expansiones o varicosidades, llamadas *botones sinápticos*, a

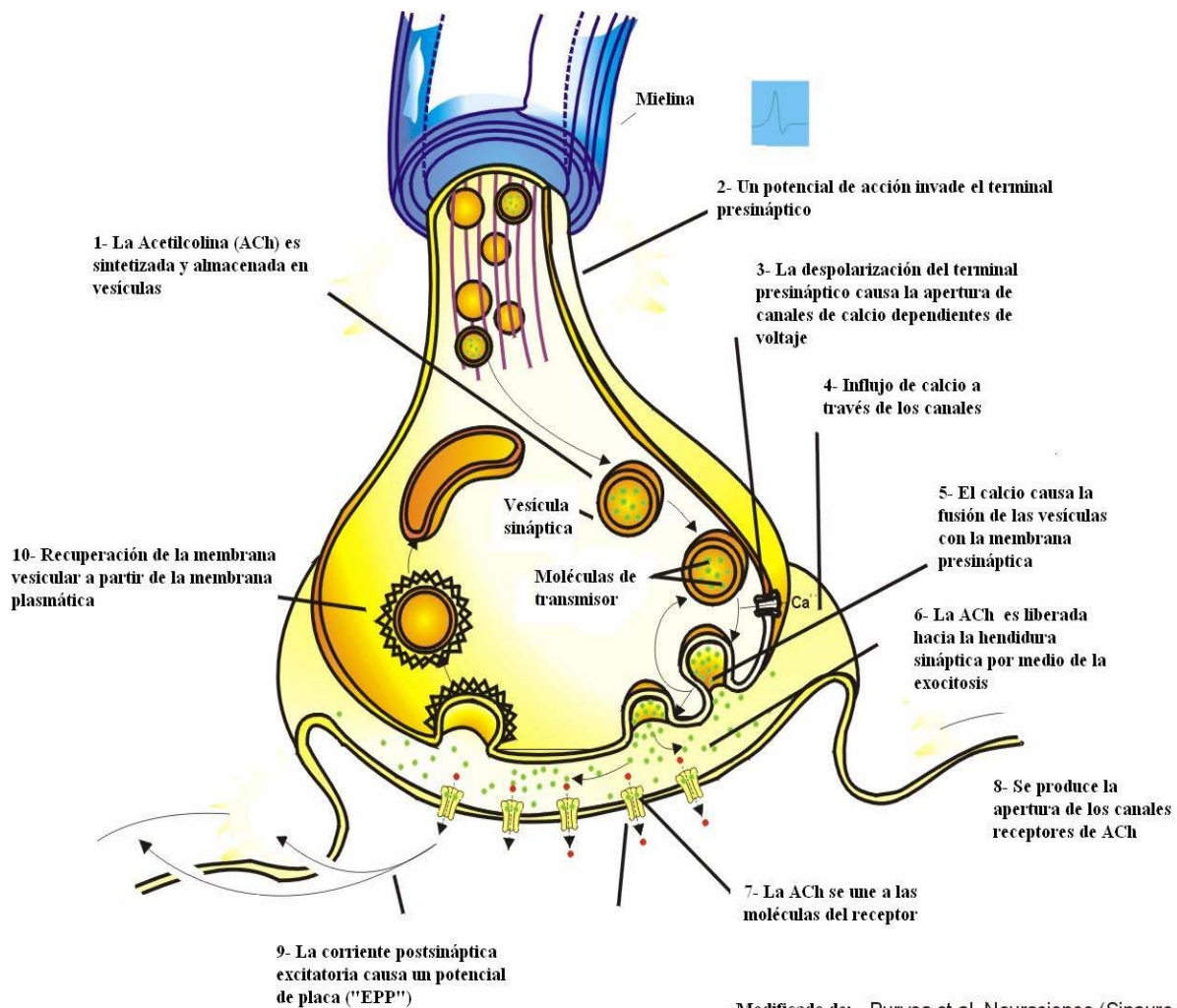
partir de los cuales se libera el neurotransmisor: cada botón presináptico contiene toda la maquinaria necesaria para dicha liberación. Esto incluye a las vesículas sinápticas cargadas con ACh y a la denominada zona activa, una parte de la membrana especializada en la liberación. En esta zona también hay cúmulos de canales de calcio dependientes de voltaje que permiten que, cuando un potencial de acción invade el terminal presináptico, se produzca un influjo de Ca^{2+} a través de ellos lo que produce la fusión de las vesículas (cargadas con ACh) con la zona activa, permitiendo la liberación del contenido de las mismas. Cada zona activa está posicionada opuesta a un pliegue postsináptico. En la cresta de estos pliegues los receptores de ACh se encuentran agrupados con una densidad de aproximadamente 10.000 receptores por micrómetro cuadrado. Los canales de calcio en la zona activa se ubican exactamente enfrentados con los receptores de ACh. La unión de la ACh a su receptor (receptor ionotrópico denominado receptor "nicotínico" de acetilcolina) produce un influjo de Na^+ que lleva a una despolarización excitatoria del potencial postsináptico en la célula muscular: este potencial es denominado *potencial de placa* o *E.P.P.* (del inglés "end-plate potential").

La amplitud del E.P.P. es extremadamente grande: una sola célula motora produce un potencial postsináptico de aproximadamente 70 mV. Este cambio en el potencial es lo suficientemente grande como para disparar un potencial de acción en la fibra muscular. Por el contrario, la mayoría de las neuronas en el sistema nervioso central producen potenciales sinápticos de menos de 1 mV, de forma tal que se necesita el *input* de muchas neuronas presinápticas para generar un potencial de acción.

LOS CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) median la entrada de calcio a las células inducida por despolarización de la membrana celular, actuando de esta

manera como transductores de señales eléctricas en señales químicas. En el sistema nervioso estos canales controlan la mayoría de los procesos dependientes de calcio, incluyendo la liberación de neurotransmisor, la excitabilidad y la plasticidad neuronal, la



expresión génica dependiente de actividad, el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis y la diferenciación y la supervivencia neuronales (Pietrobon, 2005).

Los CCDV están compuestos de una subunidad transmembrana (formadora del poro) denominada α_1 , la cual se asocia con subunidades auxiliares: una subunidad intracelular β y una subunidad extracelular α_2 que se encuentra unida por puentes disulfuro

con una subunidad transmembrana δ . Los canales de calcio del músculo esquelético también copurifican con una subunidad γ .

La subunidad α_1 está estructuralmente organizada en cuatro dominios (I-IV), cada uno de los cuales contiene seis regiones transmembrana (S1-S6) y un "loop" (del inglés, lazo) asociado a la membrana entre los segmentos S5 y S6 que tapiza la cara interna del poro del canal (Catterall, 1998). Los dominios están conectados unos con otros por loops peptídicos, los cuales son zonas aptas para interacciones proteína-proteína y, por lo tanto, para la modulación del canal, para el direccionamiento del canal hacia su lugar de inserción final y para el agrupamiento de distintos canales entre sí.

La expresión de la subunidad α_1 , en sistemas heterólogos, es suficiente para producir un canal de calcio funcional, pero con bajo nivel de expresión y cinéticas y dependencia del voltaje anormales (Perez-Reyes et al., 1989). Numerosos estudios de la relación estructura-función de las subunidades formadoras del poro, han permitido la identificación, en cada segmento homólogo, del segmento S4 como el sensor de voltaje involucrado en la activación del canal.

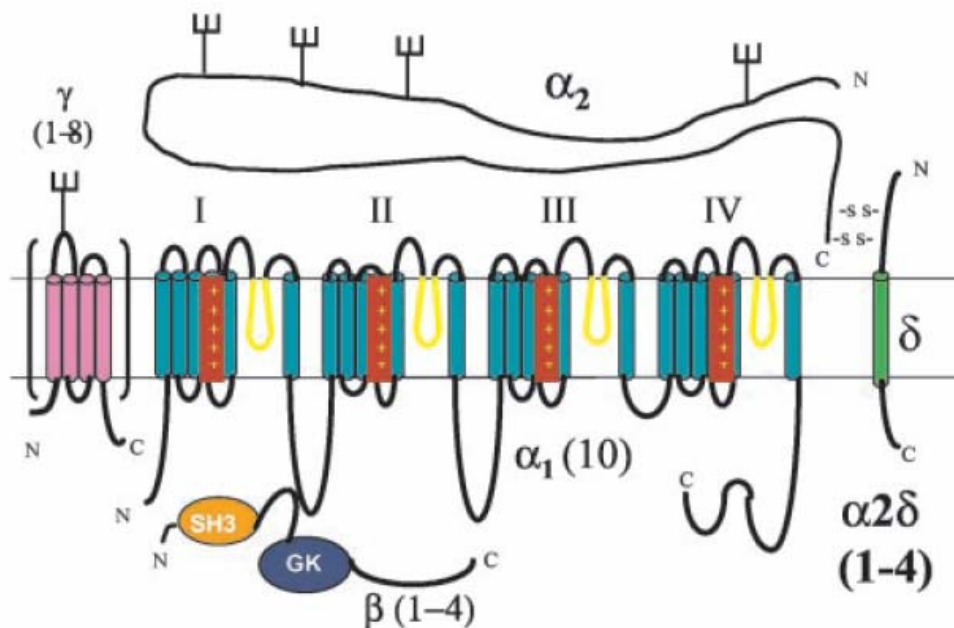


Figura tomada de: AC Dolphin (2003) ; *Pharmacological Reviews*, 607-627.

El clonado molecular de las subunidades del canal de calcio ha identificado diez genes diferentes ($Ca_v1.1$ hasta $Ca_v3.3$) que codifican para la subunidad α_1 (llamadas α_{1A} , α_{1B} , ..., α_{1S}) y sus variantes de splicing, la mayoría de las cuales se expresan en el cerebro: un problema central de la neurobiología de los canales es comprender la significancia funcional de esta complejidad genética (Pietrobon, 2005). También se han clonado cuatro genes diferentes codificando para la subunidad β (β_1 - β_4), tres genes que codifican el complejo α_2 - δ , y ocho genes que codifican para la subunidad γ . La subunidad β se une con muy alta afinidad a la región de unión intracelular entre los dominios I y II de la subunidad α_1 . La mayoría de las investigaciones indican que todas las subunidades β incrementan la expresión funcional de las subunidades α_1 (ver Dolphin, 2003). Por otra parte, las subunidades β incrementan unas diez veces la conductancia máxima de los CCDV (Berrow et al., 1997; Stephens et al., 1997; Meir y Dolphin, 1998). Este aumento en la densidad de corriente puede deberse a una cantidad de efectos sobre las propiedades

biofísicas que produce la subunidad β sobre la α_1 : todas las subunidades β hiperpolarizan la dependencia de voltaje de la activación y producen un incremento en el tiempo de apertura promedio del canal (Wakamori *et al.*, 1999; Meir *et al.*, 2000).

Basándose en sus propiedades farmacológicas y en sus perfiles biofísicos, los CCDV han sido clasificados en los tipos T, L, N, P/Q y R (Bean, 1989; Hess, 1990; McCleskey, 1994; Nowycky *et al.*, 1985; Randall y Tsien, 1995; Tsien *et al.*, 1988, 1991; Zhang *et al.*, 1993). La nomenclatura actual para designarlos los agrupa en tres familias: Ca_v1 (a la que pertenecen los tres subtipos de canales L); Ca_v2 (a la que pertenecen los canales P/Q, N y R) y Ca_v3 (a la que pertenecen los canales de tipo T) (Ertel *et al.*, 2000).

Canales Iónicos Activados por Voltaje

	Canal Nativo	Subunidad α_1	Farmacología
Activados por Voltajes Altos	Tipo L Cav 1.1 Cav 1.2 Cav 1.3 Cav 1.4	α_{1S} α_{1C} α_{1D} α_{1F}	DIHIDROPIRIDINAS
	Tipo P/Q Cav 2.1	α_{1A}	ω -AGATOXINA IVA
	Tipo N Cav 2.2	α_{1B}	ω -CONOTOXINA GVIA
	Tipo R Cav 2.3	α_{1E}	SNX-482
Activados por Voltajes Bajos	Tipo T Cav 3.1 Cav 3.2 Cav 3.3	α_{1G} α_{1H} α_{1I}	MIBEFRADIL

Los canales T son activados por bajos voltajes (-70 a -50 mV) (Akaike *et al.*, 1989; Bean, 1989; Takahashi *et al.*, 1991). Por su lado, la familia de los canales de calcio activados a potenciales de membrana más positivos incluye a los tipos L, N, P/Q y R (Catterall, 2000; Fox *et al.*, 1987). Si bien estos canales muestran propiedades biofísicas similares, ellos

pueden ser distinguidos por sus propiedades farmacológicas únicas: los de tipo L son altamente sensibles a dihidropiridinas (Bean, 1984; Droogmans y Callewaert, 1986; Striessnig, 1999); los canales de tipo N ($Ca_v2.2$) son identificados por su sensibilidad única a ω -conotoxina GVIA (Sano *et al.*, 1987; Protti *et al.*, 1991); los canales de tipo P/Q ($Ca_v2.1$) por su sensibilidad específica a ω -Agatoxina IVA (Mintz *et al.*, 1992). Los canales de tipo R ($Ca_v2.3$) fueron originalmente definidos por su resistencia a todos estos antagonistas (Zhang *et al.*, 1993), pero actualmente existen péptidos específicos para bloquearlos selectivamente, tales como la toxina SNX-482 (Tottene *et al.*, 1996).

Si bien las subunidades auxiliares de los CCDV pueden modular las propiedades farmacológicas de los canales, el perfil farmacológico general de un determinado canal de calcio está definido primariamente por la subunidad α_1 . Esta subunidad contiene sitios de unión para cationes multivalentes (Cloues *et al.*, 2000; Zamponi *et al.*, 1996), sitios de interacción para bloqueantes peptídicos (Bourinet *et al.*, 2001; Ellinor *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 2001) y, lo que es probablemente más importante desde un punto de vista terapéutico, una cantidad de sitios receptores para pequeñas moléculas orgánicas (Glossmann y Striessnig, 1990; Striessnig *et al.*, 1991).

Con respecto a sus acciones bloqueantes, los bloqueantes peptídicos de los CCDV parecen actuar de dos maneras diferentes: modificando la apertura del canal o bloqueando el poro. Las toxinas que modifican la apertura del canal probablemente previenen la activación del mismo antagonizando los movimientos del sensor de voltaje. Esta clase de toxinas incluyen a la ω -Agatoxina IVA (McDonough *et al.*, 1997) y al SNX-482 (Bourinet *et al.*, 2001). El bloqueo por estas toxinas es pobremente reversible por lavados, pero la actividad del canal puede ser casi completamente recuperada luego de despolarizaciones de membrana repetitivas, sugiriendo que el movimiento del sensor de voltaje podría desalojar físicamente a la toxina de su sitio de anclaje (Bourinet *et al.*,

2001). Por su parte, la ω -Conotoxina GVIA parece actuar ocluyendo físicamente el poro del canal (Lampe *et al.*, 1993).

En el sistema nervioso, diferentes tipos de canales de calcio cumplen funciones celulares especializadas y tienen distribuciones subcelulares variadas. Por ejemplo, los canales de calcio de tipo L están típicamente confinados a los cuerpos celulares (Hell *et al.*, 1993) donde regulan la actividad de las enzimas dependientes de calcio y la expresión génica. Los canales de tipo N y P/Q muestran su mayor nivel de expresión en terminales presinápticos y están directamente acoplados a la liberación de neurotransmisor (Wheeler *et al.*, 1994; Westenbroek *et al.*, 1992; 1995). Los canales de tipo R se expresan en dendritas proximales y pueden, en ciertas neuronas, participar de la liberación de neurotransmisor (Hanson y Smith, 2002).

En vista de su importancia neurofisiológica, se podría esperar que la pérdida de la actividad de un canal de calcio resulte en graves consecuencias para la función neuronal. Esto ha quedado claramente demostrado en el caso de los ratones transgénicos que carecen del canal P/Q ($\alpha_{1A}/-$) (Jun *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 2001). La eliminación de estos canales induce un rápido y progresivo síndrome neurológico aproximadamente 10 días después del nacimiento, caracterizado por una pérdida del balance y de los movimientos de los miembros, incluyendo espasmos de las patas traseras consistentes con distonía. Los episodios de caídas y de ataxia se incrementan con la edad hasta que el ratón es incapaz de caminar y muere (aproximadamente en el día postnatal 20). El cuadro de ataxia y distonía de los ratones $\alpha_{1A}/-$ pone de relevancia la importancia de la subunidad α_{1A} para el normal funcionamiento del sistema nervioso central, lo que queda en evidencia con las enfermedades humanas provenientes de defectos en esta subunidad, como lo son ciertos tipos de migraña, epilepsia y ataxia (Jen, 2000; Fletcher *et al.*, 2001).

La unión neuromuscular (UNM) es un sistema muy interesante para estudiar el impacto de la remoción de la subunidad α_{1A} , teniendo en cuenta que la UNM ha sido el foco de los trabajos pioneros sobre la naturaleza cuántica de la transmisión sináptica (Katz, 1969), la dependencia aguda de la liberación de transmisor con respecto a la entrada de calcio (Dodge y Rahamimoff, 1967), la estructura fina del terminal presináptico (Heuser *et al.*, 1974; Heuser *et al.*, 1979; Harlow *et al.*, 2001), y muchas otras características de las sinapsis (Sanes y Lichtman, 1999).

En la UNM madura de mamíferos, el canal P/Q ($Ca_v2.1$) es completamente responsable del control de la liberación de acetilcolina (Uchitel *et al.*, 1992; Protti *et al.*, 1993; Protti y Uchitel, 1993; Westenbroek *et al.*, 1995; Day *et al.*, 1997). Cuando estos canales están ausentes, la liberación de transmisor se vuelve fuertemente dependiente de los canales $Ca_v2.2$ (tipo N) y de los $Ca_v2.3$ (tipo R) (Urbano *et al.*, 2002).

Sin embargo, por técnicas inmunocitoquímicas, se han identificado las subunidades α_1 A, B, E y D de los canales de calcio $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$ y $Ca_v1.3$ (Day *et al.*, 1997; Pagani *et al.*, 2004) en la UNM de ratón. Llamativamente $Ca_v1.3$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$ se expresan en la zona sináptica de la UNM de mamíferos adultos pero no están ligados a la maquinaria de liberación de neurotransmisor (Protti *et al.*, 1991; Pagani *et al.*, 2004), estando posiblemente asociados a señales de calcio no involucradas en la transmisión sináptica.

Naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor

El neurotransmisor es liberado en forma de paquetes o "cuantos". Cada cuanto de transmisor produce un potencial postsináptico unitario de tamaño fijo. El potencial sináptico total está constituido por un múltiplo de potenciales unitarios. En 1952, Paul Fatt y Bernard Katz, descubrieron la naturaleza cuántica de la neurotransmisión. Basándose en sus estudios de la actividad sináptica *espontánea* en la placa neuromuscular de rana

observaron que, en ausencia de estimulación presináptica, existían pequeños potenciales postsinápticos de ocurrencia aleatoria (de aproximadamente 1 mV de amplitud) a los que denominaron potenciales de placa miniatura o *M.E.P.P.s* (del inglés "miniature end-plate potentials"). El curso temporal de estos eventos y el efecto de varias drogas sobre ellos eran indistinguibles de lo que sucedía con los E.P.P.s. Los potenciales de placa miniatura son los potenciales postsinápticos unitarios mencionados. El E.P.P. evocado es causado por la liberación sincronizada de varios cuantos, debido a un gran aumento transitorio de la probabilidad de liberación de cuantos individuales. La evidencia morfológica, electrofisiológica y química indica que cada uno de estos cuantos representa el contenido de una vesícula sináptica. Cada vesícula almacena un cuanto de neurotransmisor (compuesto por varios miles de moléculas) que liberan su contenido a la hendidura sináptica por exocitosis.

Relación de cooperatividad entre la $[Ca^{2+}]$ y la liberación

La dependencia cuantitativa de la liberación de neurotransmisor, respecto de la concentración extracelular de calcio, ha sido estudiada por primera vez por Dodge y Rahamimoff en 1967 en la placa neuromuscular de rana utilizando registros intracelulares y tomando la amplitud del potencial de placa (e.p.p.) como un índice del número de cuantos liberados. En dichos experimentos ellos encontraron que la relación entre la $[Ca^{2+}]$ y el tamaño del e.p.p. es altamente no lineal. En coordenadas doble logarítmicas, la parte inicial de esta relación da una línea recta con una pendiente cercana a cuatro ($3,78 \pm 0,2$ en 28 experimentos). La adición de una cantidad constante de Mg^{2+} reduce la amplitud del e.p.p. sin alterar la pendiente de la relación $\log \text{e.p.p.} / \log Ca^{2+}$. La pendiente de esta relación logarítmica disminuye cuando la $[Ca^{2+}]$ se aumenta hasta valores cercanos al nivel normal.

Estos resultados son explicados cuantitativamente bajo la hipótesis de que los iones Ca^{2+} se combinan con un sitio específico X sobre el terminal nervioso, formando un complejo CaX, y que el número de cuantos de acetilcolina liberados es proporcional al cuarto poder de la [CaX]. El análisis sugiere que una acción cooperativa de aproximadamente cuatro iones calcio es necesaria para la liberación de paquetes cuánticos de transmisor por el impulso nervioso.

Estas observaciones han sido replicados en la mayoría de las especies (Smith *et. al.* 1985; Heidelberger, 1994 y Jan y Jan, 1976), obteniéndose en la mayoría coeficientes de poder de entre 3 y 4, sugiriendo que ésta es una propiedad fundamental de la transmisión sináptica.

Los mecanismos moleculares precisos que gobiernan la cooperatividad del Ca^{2+} en la transmisión sináptica se desconocen. Una proteína de la vesícula sináptica denominada sinaptotagmina I (Syt) parecía un buen candidato para ser la molécula sensora de Ca^{2+} que regula la fusión de las vesículas sinápticas. Ella une múltiples iones calcio y una fosfolípidos y proteínas de la vesícula y de la membrana plasmática que tienen que ver con la fusión de la vesícula sináptica. Sin embargo la unión de la Syt no parece ser cooperativa, ya que el segundo sitio de unión del calcio tiene una constante de afinidad menor que el primer sitio. En un trabajo de Stewart *et al.* publicado en el año 2000, se examina la contribución de las proteínas del complejo "SNARE" (las proteínas SNAREs están representadas por la sinaptobrevina / VAMP, una proteína que se encuentra en la membrana de las vesículas sinápticas (v-SNAREs), y por la syntaxina y la SNAP-25, que son proteínas asociadas a la membrana del terminal sináptico (t-SNAREs) (Söllner *et al.*, 1993; Rothman, 1994) a la cooperatividad del Ca^{2+} . El resultado de este trabajo indica que tanto la syntaxina como la sinaptobrevina estarían vinculadas con este fenómeno.

HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE CANALES DE CALCIO

Existen diversos tipos de bloqueantes específicos para los distintos canales de calcio: compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos y toxinas peptídicas. Los bloqueantes peptídicos provienen del veneno de determinados animales que los utilizan para paralizar a sus presas. De todas formas, en la actualidad, estos péptidos se sintetizan artificialmente en laboratorios que se dedican a su comercialización.

La existencia de estos bloqueantes específicos ha permitido un gran avance en el estudio de la neurotransmisión, ya que permite "disecar" la contribución de cada uno de los distintos canales de calcio y estudiar en detalle las características y aportes particulares de cada subtipo: esto ha permitido, por ejemplo, desentrañar el origen de uno de los tipos de migraña hemipléjica familiar: mutaciones en la subunidad α_{1A} del canal P/Q (Ophoff *et al.*, 1996). También son importantes los bloqueantes generales de canales de calcio porque permiten estudiar, por ejemplo, si un determinado fenómeno se relaciona con la entrada de calcio a la célula a partir del medio extracelular.

Compuestos inorgánicos

La habilidad de iones metálicos para bloquear canales de calcio disparados por voltaje es muy conocida. Los iones cadmio son una herramienta muy útil para bloquear de manera no específica todos los canales de calcio activados por voltajes altos (ver Akaike *et al.*, 1978; Byerly *et al.*, 1985; Lansman *et al.*, 1986). Por el contrario, los iones níquel son bloqueantes considerados específicos para canales de tipo T (familia Ca_v3) (Fox *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1999; Mlinar y Enyeart, 1993) y son ampliamente utilizados para discriminar corrientes de tipo T de otras corrientes de calcio. No obstante, hay subtipos de canales de calcio activados por altos voltajes que son potentemente inhibidos por el níquel.

Por ejemplo, los canales de tipo R (Ca_v3.1) son potentemente inhibidos por Ni²⁺ tanto en sistemas nativos (Tottene *et al.*, 1996) como en sistemas de expresión transitoria (Zamponi *et al.*, 1996). En consecuencia, el uso de iones níquel para discriminar entre canales de tipo T de aquellos que no lo son no es recomendable.

El flujo de Ca²⁺ a través de los CCDV también puede ser inhibido por varios cationes entre los que se encuentran el Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, La³⁺ y Gd³⁺, los cuales en muchos casos pueden unirse a sitios dentro del poro y competir con el Ca²⁺ (Lansman *et al.*, 1986).

Compuestos orgánicos

Existen tres tipos principales de compuestos orgánicos que bloquean a los CCDV: las fenilalquilaminas, las dihidropiridinas y las benzodiazepinas. La mayor parte de estos compuestos bloquean principalmente los canales de tipo L, y varios de ellos se utilizan comúnmente en el tratamiento de distintos desórdenes cardiovasculares. De estos tres grupos de drogas, las dihidropiridinas (DHPs), tanto antagonistas (ej., nifedipina, nitrendipina, nimodipina) como agonistas (ej., BayK 8644, PN 202-791), son los compuestos más selectivos que permitieron purificar, caracterizar y clonar los canales de calcio de tipo L (revisado en Catterall y Striessnig, 1992).

Existe consenso acerca de que los canales de tipo L no están involucrados en la liberación de neurotransmisores de acción rápida a nivel del SNC dada la ineficacia de las DHPs en bloquear el proceso de liberación en todos los sistemas estudiados (Takahashi y Momiyama, 1993; Mintz *et al.*, 1995; Reuter, 1996), mientras que cumplirían un papel importante en la secreción de catecolaminas de los terminales gigantes de la neurohipófisis (Lemos y Nowicky, 1989) y de las células cromafines de la médula adrenal (Artalejo *et al.*, 1994).

Bloqueantes peptídicos: una pequeña introducción

La mayoría de los canales iónicos activados por ligando por voltaje son inhibidos por bloqueantes peptídicos que existen en la naturaleza, en el veneno de animales predadores tales como serpientes, escorpiones, arañas y caracoles marinos. Los canales de calcio no son la excepción. Este tipo de bloqueantes son ampliamente utilizados para la identificación y el aislamiento de subtipos específicos de CCDV. De hecho, la mayoría de los inhibidores específicos de los canales de calcio son toxinas peptídicas aisladas a partir de caracoles marinos (por ejemplo, las conotoxinas) y de arañas (por ejemplo, las agatoxinas).

Conotoxinas: toxinas peptídicas provenientes de caracoles marinos dirigidas contra canales de calcio

A partir del veneno de distintas especies de caracoles marinos se han aislado numerosos péptidos bloqueantes (constituídos por 20-30 aminoácidos) de canales de calcio (Olivera *et al.*, 1985). Todos ellos poseen múltiples puentes disulfuro entre residuos de cisteínas lo que genera la formación de pequeños "loops" o rulos en su estructura terciaria lo cual los provee de un gran potencial para interactuar con un alto grado de especificidad con distintos sitios "blanco" determinados. Además de los bloqueantes de CCDV, la familia de conotoxinas incluye: las μ -conotoxinas, que bloquean selectivamente los canales de Na^+ del músculo esquelético (esto permite la discriminación entre los canales de tipo muscular y los de tipo neuronal); las α -conotoxinas, las cuales poseen una alta afinidad por los receptores nicotínicos de acetilcolina y otras (revisado por Uchitel, 1997).

El bloqueante más difundido, la ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA), es un péptido de 27 aminoácidos aislado a partir del caracol marino cazador de peces *Conus geographus* (Olivera *et al.*, 1994). Esta toxina es altamente selectiva para los canales de tipo N ($\text{Ca}_v2.2$) de una variedad de especies y de tejidos nerviosos, causando un bloqueo

virtualmente irreversible en todos ellos (por ej., ver Boland *et al.*, 1994; Ellinor *et al.*, 1994).

Utilizando tanto rodajas como sinaptosomas preparados a partir de distintas regiones del cerebro de mamífero, se ha observado que la ω -CgTx GVIA es capaz de bloquear parcialmente la liberación de glutamato (Luebke *et al.*, 1993), de acetilcolina (Wessler *et al.*, 1990), de dopamina (Turner *et al.*, 1993) y de noradrenalina (Dooley *et al.*, 1988).

La ω -CgTx GVIA ha sido sintetizada artificialmente y se ha demostrado que esta toxina sintética es capaz de actuar exactamente igual que la toxina natural. Esto generó la aparición de una gran variedad de derivados de la toxina, como toxinas fluorescentes por incorporación de fluoróforos en determinados residuos químicos, que han sido utilizados en la caracterización bioquímica del canal de tipo N y en estudios sobre su distribución celular y aparición durante el desarrollo (Robitaille *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1994). Asimismo, mediante la utilización de la ω -CgTx GVIA como marcador se ha podido purificar al canal de tipo N en sí mismo (McEnery *et al.*, 1991) y se ha determinado el sitio de pegado de la toxina fuera del poro del canal.

Por otra parte, mediante la medición del influjo de calcio y la transmisión sináptica en neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de rata, Mintz y col. (1995) demostraron que los CCDV de tipo N median la liberación de neurotransmisor en forma parcial y sinérgica con los CCDV de tipo P/Q.

El caracol *Conus magus* también produce varios bloqueantes de canales de calcio, incluyendo a las ω -conotoxinas MVIIC y MVIIA (Olivera *et al.*, 1994). Similarmente a lo observado con GVIA, MVIIA (de 25 aminoácidos) bloquea selectiva y casi irreversiblemente a los canales de tipo N (Woppmann *et al.*, 1994). Una versión sintética de MVIIA (denominada SNX-111 o más recientemente, Zinocotida por Elan

Pharmaceuticals) se encuentra actualmente en la fase tres de los ensayos clínicos para el tratamiento del dolor severo.

La ω -CgTx MVIIC es un péptido de 26 aminoácidos que es capaz de inhibir los canales de calcio de tipo N y de tipo P/Q presentes en neuronas piramidales del hipocampo de rata (Hillyard *et al.*, 1992) como así también los canales de tipo P/Q presentes en las células de Purkinje y en las células grano del cerebelo de rata (Hillyard *et al.*, 1992; Sather *et al.*, 1993).

Toxinas provenientes del veneno de arañas

La araña americana *Agelenopsis aperta* produce un potente veneno paralizante. Su efecto está asociado con la presencia de una mezcla de toxinas dirigidas contra distintos "blancos" moleculares. Este veneno contiene dos grupos principales de componentes neurotóxicos, las poliaminas y los polipéptidos (ver Uchitel, 1997).

Las poliaminas incluyen a la "funnel web toxin" (FTX), un bloqueante de canales de calcio de bajo peso molecular (Llinás *et al.*, 1992) y a las acipoliaminas (α -agatoxinas), la mayoría de las cuales son bloqueantes dependientes del uso de los receptores de glutamato (Adams *et al.*, 1989).

Los polipéptidos han sido divididos en dos grupos: las ω -agatoxinas, las cuales son antagonistas selectivos de canales de calcio activados por voltaje, y las μ -agatoxinas, las cuales son activadoras de los canales de sodio neuronales.

Entre las agatoxinas inhibitoras de los canales de calcio se han identificado cuatro subclases, tres de las cuales (ω -agatoxina II, III y IV) inhiben canales de calcio neuronales (Adams *et al.* 1993, Olivera *et al.*, 1994).

La ω -agatoxina IVA (48 aminoácidos) es considerada un bloqueante específico de los canales de calcio P y Q (Mintz, 1994; Mintz *et al.*, 1991). Mientras los canales P son

bloqueados a concentraciones nanomolares, los canales Q requieren concentraciones aproximadamente 100 veces superiores para ser bloqueados (Bourinet et al., 1999). Esta toxina permanece como el único bloqueante selectivo para los canales de calcio de tipo P/Q.

Por otra parte, se ha reportado una baja sensibilidad para bloquear a los canales de tipo N (Sidach y Mintz, 2000) y un muy pequeño grado de bloqueo de los canales R humanos (Williams *et al.*, 1994).

Sitios de unión a ω -Aga IVA en el cerebro: La distribución de sitios de unión a esta toxina en el cerebro de ratón fue estudiada utilizando ω -Aga IVA sintetizada químicamente y biotinilada, en combinación con la utilización de microscopía confocal (Nakanishi *et al.*, 1995). Se encontró una unión ampliamente distribuída en rodajas de cerebro de ratón, incluyendo la capa de células grano y de Purkinje del cerebelo, la corteza cerebral, el tálamo y el hipocampo. Los sitios de unión probablemente representan la unión tanto a los canales P como a los Q ya que para estos ensayos se utilizaron altas concentraciones de ω -Aga IVA.

CANALES DE Ca^{2+} Y LIBERACION EN LA PLACA NEUROMUSCULAR

Canales de calcio presinápticos en la unión neuromuscular: Mientras las ω -conotoxinas tienen poco efecto sobre las uniones neuromusculares de mamíferos pero son muy efectivas en vertebrados inferiores, la ω -Aga IVA muestra una selectividad inversa. La ω -Aga IVA es un potente bloqueante de la transmisión neuromuscular en mamíferos, incluyendo a ratones y a humanos (Bowerox *et al.*, 1995; Protti y Uchitel, 1993; Protti *et al.*, 1996; Uchitel y Protti, 1994). Además, en el diafragma de ratón, la ω -Aga IVA es un potente e irreversible inhibidor de las corrientes de calcio presinápticas y de la liberación de acetilcolina inducida por estimulación eléctrica o por despolarización por altas

concentraciones de K^+ (Uchitel y Protti, 1994) indicando que los canales de calcio P/Q median la liberación de transmisor en la unión neuromuscular de mamíferos.

Con respecto a la ω -CgTx GVIA, un importante ejemplo de su acción en la unión neuromuscular es su efecto inhibitorio sobre la transmisión sináptica en la placa neuromuscular de rana (Katz *et al.*, 1995). Por el contrario, este bloqueante no es capaz de afectar ni la liberación del neurotransmisor ni las corrientes de calcio presinápticas en la placa neuromuscular de ratón y de humano (Sano *et al.*, 1987; Uchitel y Protti, 1994), aunque si se ha reportado su efecto sobre la frecuencia de los MEPPs en la placa neuromuscular de ratón (Protti *et al.*, 1991).

Muchos cambios fisiológicos y farmacológicos han sido descriptos durante el curso de la maduración de la unión neuromuscular. Entre ellos, han sido identificados cambios en la farmacología de los CCDV acoplados a la liberación de neurotransmisor: por ejemplo, en la UNM de rata, los CCDV sufren un cambio durante el período postnatal temprano: en embriones y en neonatos de 0 a 4 días de edad, la ω -CgTx GVIA causa una reducción significativa en el contenido cuántico, indicando la participación los canales de tipo N en la liberación (Rosato Siri y Uchitel, 1999). Este proceso también ha sido observado en varias sinapsis del sistema nervioso central (Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki *et al.*, 2000).

La ω -Aga IVA, por su parte, reduce el contenido cuántico tanto en UNM recién formadas como en las pertenecientes a animales maduros, indicando la participación permanente del canal de tipo P/Q en la liberación en la UNM de mamíferos.

También se han reportado cambios en la farmacología de los CCDV acoplados a la liberación de neurotransmisor en aves (Gray *et al.*, 1992) y en la UNM de anfibios (Fu y Huang, 1994).

Asimismo, tanto durante el proceso de reinervación (Katz et al, 1996), como durante el proceso de recuperación funcional de los terminales motores luego de un envenenamiento con toxina botulínica de tipo A (Santafé et al, 2000) se observa la aparición de componentes de tipo L en el primer caso y de tipo L y N en el segundo caso (que se suman a la participación del canal P/Q).

Por otra parte, también ha sido demostrado el acoplamiento a la liberación del canal L en terminales nerviosas tratadas con un inhibidor de fosfatasas y cargadas con BAPTA, el buffer intracelular de Ca^{2+} de acción rápida (Urbano et al, 2001).

MODULACION POR PROTEINA G DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

El influjo de calcio a las células requiere un delicado control para garantizar el correcto balance entre la activación de procesos dependientes de calcio, tales como la contracción muscular o la liberación de neurotransmisor, y el daño celular inducido por calcio. Existen receptores de membrana (de la familia de los constituidos por siete pasos transmembrana) acoplados a proteínas G que, entre otras acciones, juegan un rol crítico en la retroalimentación negativa que modula la actividad de los CCDV de la subfamilia Ca_v2 , los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en las células neuronales y neuroendócrinas (Dolphin, 2003).

Los primeros datos de una inactivación mediada por receptores ligados a proteína G provienen de la década del '70, cuando se encontró que la activación de esta proteína reducía la duración del potencial de acción en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Dunlap y Fischbach, 1978). Posteriormente se encontró que este efecto era el resultado de una inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (Dunlap y Fischbach, 1981).

Actualmente se sabe que muchos neurotransmisores y neuromoduladores regulan procesos dependientes de calcio en las neuronas, y una gran cantidad de ellos requiere la activación obligatoria de una proteína de unión a GTP en la transducción de la señal del transmisor. Varias líneas de evidencia sugieren que el acoplamiento entre la activación de las proteínas G y la inhibición de los canales de calcio ocurre de manera directa y no a través de mensajeros intracelulares solubles (ver en Hille, 1992).

Las proteínas G son proteínas de membrana heterotriméricas (α , β , γ) que unen GTP y tienen actividad enzimática de GTPasa. La proteína G heterotrimérica consta de una subunidad α de 45-47 kD, una subunidad β de 35 kD y una subunidad γ de 7-9 kD. Se han identificado también isoformas de cada una de las tres subunidades, lo cual permite que exista una amplia variedad de proteínas G diferentes. La subunidad α es la que le confiere la especificidad al oligómero, que actúa como un eslabón intermedio entre complejos hormona-receptor y diversas enzimas y proteínas de membrana. Las proteínas de membrana que inducen la activación de una determinada proteína G son todas proteínas receptoras de siete dominios transmembrana. Los receptores típicamente involucrados en este tipo de modulación son los α_2 -adrenoreceptores, los receptores opioides μ y δ , los receptores de GABA-B y los receptores de adenosina de tipo A_1 (Dunlap y Fischbach, 1978; Dolphin *et al.*, 1986; Scott y Dolphin, 1986).

En la célula en reposo la proteína G está en forma de heterotrímero inactivo, con GDP asociado a la subunidad α . En mamíferos se conocen más de 20 subunidades α diferentes (Kaziro *et al.*, 1991). La unión del ligando al receptor de siete dominios transmembrana induce en la proteína G un cambio conformacional que estimula el recambio de GDP por GTP, seguido de la separación de las subunidades α por un lado y $\beta\gamma$ por el otro. La subunidad $G\alpha$ unida a GTP estimula la actividad catalítica de la adenilato ciclasa que convierte ATP en AMPc. La actividad GTPasa intrínseca de $G\alpha$

hidroliza GTP, que permite el reagrupamiento de las subunidades α con $\beta\gamma$ para devolver el sistema al estado de reposo y en disposición de iniciar un nuevo ciclo (Tresguerres 2a Edición, 1999).

La modulación de los CCDV neuronales en la mayoría de las neuronas nativas está generalmente mediada por receptores acoplados a proteínas G sensibles a la toxina pertussis (los subtipos G_i y G_o) (Holz *et al.*, 1986; Scott y Dolphin, 1987). La toxina pertussis es una proteína producida por la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta toxina se fija a la membrana de las células, penetra y, utilizando el NAD del citoplasma celular, produce la ADP-ribosilación de la subunidad α de G_i/Go . La ADP-ribosilación de G_i/Go conduce al bloqueo de su actividad (Gilman, 1984). La respuesta sensible a la toxina pertussis puede ser mimetizada con análogos no hidrolizables de GTP y en un menor grado por el GTP en sí mismo. Los análogos de GDP también se oponen a la respuesta a los neurotransmisores.

No obstante lo mencionado, hay autores que han encontrado que otras proteínas G como G_s o G_q producen una modulación similar (Shapiro y Hille, 1993; Golard *et al.*, 1994). Esto llevó a la hipótesis de que la inhibición debería estar mediada por el motivo común a todas estas proteínas G, es decir por la $G\beta\gamma$, más que por algún tipo particular de $G\alpha$ (Herlitze *et al.*, 1996). De hecho, actualmente es aceptado que la inhibición de la actividad de los canales de calcio mediada por proteína G requiere dímeros $G\beta\gamma$ libres (Logothetis *et al.*, 1987; Kurachi *et al.*, 1989; Clapham y Neer, 1993).

Las principales características de esta inhibición son un enlentecimiento en la cinética de activación de la corriente y una recuperación también enlentecida de la inhibición dependiente de voltaje (Bean, 1989). La remoción de la inhibición puede ser inducida por un prepulso despolarizante aplicado inmediatamente antes del pulso test (Ikeda, 1991). En varios tipos celulares han sido descritos mecanismos adicionales no

dependientes de voltaje, puestos de manifiesto por la incapacidad del prepulso despolarizante para revertir la inhibición (por ej., ver Diversé-Pierluissi y Dunlap, 1993).

La zona de unión entre los dominios I y II de la subunidad α_1 de los CCDV une dímeros $G\beta\gamma$. Además, el dominio intracelular N-terminal del α_1 de la familia Ca_v2 provee determinantes esenciales para la modulación por proteína G.

La modulación directa de los CCDV de tipo N por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G es considerada un factor clave en la regulación de la neurotransmisión. Se han identificado algunos de los determinantes moleculares que gobiernan la interacción de los canales N con $G\beta\gamma$ (ver Zamponi *et al.*, 1997). Además, se ha reportado que una proteína del complejo de liberación de las vesículas presinápticas, la syntaxina 1A, juega un rol crucial en esta interacción, mediando una colocalización de la syntaxina con las subunidades $G\beta\gamma$, de lo cual resulta un acoplamiento más efectivo de la proteína G para la modulación del canal (Jarvis *et al.*, 2000).

LA ADENOSINA

La adenosina es un amplio modulador de la función celular y su acción puede ser ejercida a través de diferentes receptores. La unión neuromuscular de roedores ha sido un modelo de estudio muy importante para comprender la modulación de la liberación de neurotransmisor por receptores, como el de adenosina, acoplados a proteínas G (Ginsborg & Hirst, 1972; Silinsky, 1980, 1981, 1984; Meriney y Grinnell, 1991; Hamilton y Smith, 1991; Nagano *et al.*, 1992; Slutsky *et al.*, 2003). Luego del descubrimiento de su acción en la UNM, se encontró que la adenosina podía inhibir la transmisión sináptica tanto en nervios periféricos como en el sistema nervioso central (SNC).

Hasta el momento se han caracterizado por clonado y herramientas farmacológicas los subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Fredholm *et al.*, 1996; Ralevic y Burnstock, 1998) del receptor de adenosina.

La adenosina es uno de los moduladores inhibitorios más importantes del SNC y juega un rol en una variedad de procesos, incluyendo el sueño, la ansiedad, la protección de una excesiva liberación de glutamato (y su subsiguiente toxicidad) y también en modulaciones sinápticas más sutiles (Williams, 1987). La modulación inhibitoria está mediada por el receptor A₁ y puede ser tanto presináptica como postsináptica (Dolphin, 1995; Fredholm y Dunwiddie, 1988). En contraste, el receptor A₂ aumenta las respuestas sinápticas. La adenosina inhibe la liberación de neurotransmisor de los terminales presinápticos vía una proteína G sensible a toxina pertussis (Dolphin, 1995; Dolphin y Prestwich, 1985).

La señalización celular debida a la adenosina puede llevar a efectos opuestos dependiendo del receptor activado. Mientras que los receptores A₁ y A₃ inhiben a la adenilato ciclasa a través de proteínas Gi/o, disminuyendo los niveles de AMP cíclico, los receptores A_{2A} y A_{2B} causan los efectos opuestos (Daly, 1985; Palmer y Stiles, 1995). Cuando diferentes receptores de adenosina coexisten en la misma célula, la concentración de adenosina extracelular y/o su origen (producción intracelular y liberación o producción extracelular a partir de ATP) juegan un rol determinante en la respuesta celular final.

En el ratón que carece del gen para el receptor A₁ (A₁^{-/-}), se pierde el efecto de la administración intratecal de adenosina y se observa una hiperalgesia térmica. La ausencia de estos receptores no afecta el desarrollo normal de los animales y, si bien éstos tienen una influencia significativa en la actividad sináptica, no juegan un rol esencial en la fisiología normal del ratón. Estos animales se alimentan y ganan peso normalmente, y tienen un ritmo cardíaco, una presión sanguínea y una temperatura corporal normales. Sin

embargo, bajo condiciones patofisiológicas, ellos demuestran ser importantes. La adenosina actúa tónicamente para activar receptores A_1 pre y postsinápticos deprimiendo la transmisión sináptica y reduciendo la señalización nociceptiva. En presencia de los niveles elevados de adenosina que se producen durante la hipoxia, la misma actúa sobre los receptores A_1 deprimiendo la actividad neuronal. Cuando el receptor está ausente se pierde esta depresión y esto resulta en un impedimento de la recuperación funcional. Por otra parte, a nivel comportamental, los ratones $A_1^{-/-}$ muestran signos de una ansiedad incrementada. (Johansson B *et al.*, 2001).

En la UNM se coliberan, en forma simultánea y en cantidades similares, la acetilcolina y el ATP. En la hendidura sináptica el ATP es rápidamente hidrolizado por ecto-nucleotidasas (Gordon *et al.*, 1989) a adenosina 5'- difosfato (ADP), adenosina 5' monofosfato (AMP) y finalmente a adenosina, el neuromodulador que puede interactuar con un grupo de receptores específicos pre y post-sinápticos (Scanziani *et al.*, 1992; Wu y Saggau, 1994).

La adenosina modula la liberación de acetilcolina en los terminales nerviosos motores de la rata. La activación tónica del receptor inhibitorio presináptico A_1 y/o la activación facilitatoria del receptor A_{2A} están reguladas por la concentración del nucleósido en la sinapsis. Con pulsos excitatorios de corta duración y baja frecuencia (5 Hz, 40 μ s de duración), predomina el tono inhibitorio. En cambio, cuando se aplican "trenes" de alta frecuencia prevalece la respuesta excitatoria por sobre la inhibitoria (Correia-De-Sá *et al.*, 1996).

Con respecto al mecanismo de acción de la adenosina, los resultados en la UNM de ratón indican que la inhibición de la secreción evocada de neurotransmisor está asociada con una reducción de la entrada de calcio a través de los canales de tipo P/Q (Silinsky, 2004). Estos resultados se obtuvieron mediante la medición de las corrientes perineurales

(presinápticas) de calcio: en presencia de adenosina se observa el bloqueo de la corriente de Ca^{2+} de tipo P/Q. En la literatura se han descrito ampliamente efectos inhibitorios de la adenosina sobre corrientes de Ca^{2+} de tipo N en sinapsis centrales y periféricas de roedores (por ej., ver Huang *et al.*, 2004; Manita *et al.*, 2004; Rebola *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2001).

CANALES DE CALCIO Y HORMONAS ESTEROIDEAS

Muchas hormonas y neurotransmisores regulan en forma aguda o rápida la actividad de los CCDV en neuronas y en células endocrinas. Además de estos efectos agudos, las señales extracelulares pueden ejercer también efectos a largo término sobre la excitabilidad afectando la expresión de los CCDV.

Las hormonas esteroideas, sintetizadas en glándulas periféricas o centralmente en el cerebro, ejercen un rol importante como moduladores de la actividad neuronal, por interacción con distintos receptores o con canales iónicos. Se han descrito efectos genómicos de estas hormonas sobre la expresión de las subunidades que conforman los canales de calcio en diversos tejidos. Por ejemplo, en el tejido cardíaco el tratamiento con estradiol produce un incremento en la densidad de los canales de calcio aórticos (Bowling *et al.*, 1997). Dicho aumento también se observa en ratas con hipotiroidismo, lo que indica una acción de las hormonas tiroideas en este sentido (Hawthorn *et al.*, 1988).

Por su parte, en el cerebro los glucocorticoides incrementan la expresión del mRNA que codifica para la subunidad principal del canal de calcio de tipo L en las neuronas de la amígdala basolateral (Karst *et al.*, 2002). En células hipofisarias, la dexametasona regula positivamente la expresión del mismo canal (Fomina *et al.*, 1996).

En la glándula suprarrenal también hay una relación entre los esteroides y la cantidad de canales de calcio: en células de la glomerulosa adrenal, la aldosterona cambia

el nivel de expresión del canal de calcio activado por bajos voltajes, el canal de tipo T (Rossier *et al.*, 2003). Este tipo de canales también son regulados por en el tejido óseo: en células del estroma óseo en cultivo, la dexametasona induce la expresión de canales de calcio de tipo T (Publicover *et al.*, 1994).

Por su parte, en el útero, la administración de estrógenos *in vivo* puede incrementar la densidad de los canales de calcio. (Helguera *et al.*, 2002).

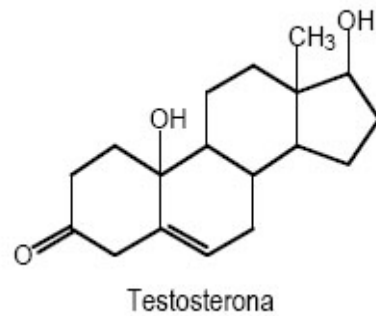
LA TESTOSTERONA

Todos los andrógenos son compuestos esteroideos y pueden ser sintetizados a partir del colesterol o directamente a partir de la acetilcoenzima A.

El término andrógeno se refiere a cualquier hormona esteroidea que posea efectos masculinizantes, incluida desde luego la testosterona, pero también las hormonas sexuales masculinas producidas a partir de zonas del cuerpo distintas de los testículos.

Las células de Leydig del testículo son el lugar de síntesis principal de la testosterona. También se puede sintetizar en la zona rugosa de la corteza suprarrenal, en las células tecales del ovario y en la placenta.

El AMPc activa la captación de acetato procedente de la glucosa o del metabolismo lipídico y la síntesis del colesterol en el retículo endoplásmico liso. El colesterol es transformado por enzimas mitocondriales en pregnenolona, que es el precursor de la testosterona, vía 17-alfa-pregnenolona, dihidroepiandrosterona, androstenediona y finalmente testosterona.



Esta hormona, producida en grandes cantidades por los testículos, tiene un rol muy importante en el crecimiento y diferenciación de muchos tejidos además de los órganos reproductivos. Históricamente, las respuestas asociadas con la masculinización del tracto reproductivo fueron definidas como "androgénicas", mientras aquellas caracterizadas por el crecimiento de tejidos no reproductivos, tales como el hueso, el músculo, el riñón y el hígado fueron definidas como acciones "anabólicas".

Después de su secreción por los testículos, la mayor parte de la testosterona se fija de forma laxa a la albúmina plasmática o con más afinidad a una beta-globulina, circulando en la sangre durante 30 a 60 minutos. En este intervalo se une a distintos tejidos o se degrada hasta productos inactivos que a continuación se excretan.

La testosterona es el principal andrógeno circulante en la sangre del hombre y de la mayoría de los mamíferos y entra a las células por difusión. Dentro de las células puede actuar directamente o ser metabolizada. Dependiendo del tejido, la testosterona puede ser convertida a esteroides que son más androgénicos, estrogénicos o que no son activos sobre el tracto reproductivo. Dado que algunos de los efectos órgano-específicos de la testosterona son producidos por sus metabolitos, los efectos de esta hormona son la suma de su acción directa y la de sus metabolitos. En una de las vías más importantes del metabolismo androgénico, la biopotencia de la testosterona es amplificada por la enzima 5α -reductasa que reduce la testosterona a 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT), un esteroide

que resulta 2,5 veces más potente que la testosterona en varios sistemas de bioensayo. Tanto la testosterona como la 5α -DHT se unen y ejercen su efecto vía el receptor de andrógenos. La cantidad de 5α -DHT en un dado tejido está determinada por su velocidad de formación y por su conversión reversible en 5α -androstenedioles.

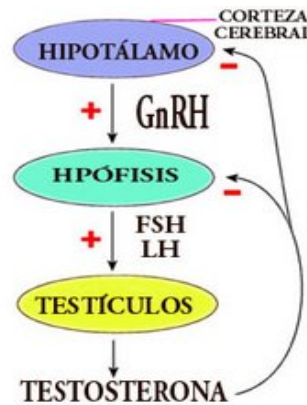
Testosterona \rightarrow 5α -DHT \leftrightarrow 5α -androstenedioles

Si bien los androstenedioles también son andrógenos potentes, su actividad biológica en la mayoría de los tejidos depende de su reconversión a 5α -DHT, la cual está favorecida por la dirección de la reacción in vivo.

La testosterona que no es fijada por los tejidos se transforma con rapidez (principalmente en el hígado) en androsterona y dihidroepiandrosterona, que son conjugados como glucorónidos o sulfatos. Estas sustancias se excretan al intestino con la bilis o a la orina.

La producción normal de andrógenos requiere la intervención del eje hipotalámico-hipofisario. La gonadotropina hipofisaria LH, hormona luteinizante, es la hormona reguladora específica de la producción de la testosterona. A su vez, la secreción de LH está regulada por el hipotálamo mediante la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

La testosterona a través de un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe la secreción de gonadotropinas, siendo evidente que disminuye la liberación del factor de liberación gonadotrópico. Asimismo, la administración parenteral de testosterona y de andrógenos anabólicos, sobre todo si estos últimos son usados durante períodos prolongados de tiempo, produce la supresión, por retroalimentación negativa, de la secreción de LH.



Los estudios de acción de hormonas sobre el sistema nervioso a nivel celular han sido posibles gracias a la localización de grupos celulares sensibles a hormonas específicas mediante técnicas de bioquímica y de autorradiografía. Las neuronas sensibles a andrógenos son difíciles de ubicar debido a que la testosterona es ampliamente convertida en estradiol así como en 5α -dihidrotestosterona (DHT) en el sistema nervioso central. El estradiol y la DHT se unen al receptor de estrógenos y al de andrógenos, respectivamente. Un problema al usar la DHT para estudiar al receptor de andrógenos es que la DHT es extensamente metabolizada cuando se administra sistémicamente (Lieberburg *et al.*, 1977). No obstante, si suficiente DHT alcanza el cerebro es posible obtener información acerca de la distribución de los sitios donde se encuentra localizado el receptor de andrógenos: dichos estudios han revelado un patrón de neuronas sensibles a andrógenos (Lieberburg y McEwen, 1977).

Con respecto al propionato de testosterona, la esterificación de la testosterona en la posición del Carbono 17 aumenta la liposolubilidad de la testosterona y prolonga su acción. Los ésteres son convertidos a testosterona libre en la circulación.

La actividad biológica de la testosterona y de la dihidrotestosterona ocurre principalmente a través de su unión al receptor de andrógenos (AR) que se encuentra en el citoplasma y en el núcleo y pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Estos

receptores funcionan como un factor de transcripción activado por ligando. En ausencia del ligando se encuentran formando parte de un complejo con múltiples chaperoninas que los mantienen en una conformación apta para unir al ligando pero no para unirse al ADN: cuando se unen a su ligando, sufren un cambio conformacional que los activa para reconocer y unir secuencias de nucleótidos específicas. Subsecuentemente estos receptores se translocan al núcleo donde se unen como homo o heterodímeros a secuencias que se denominan elementos de respuesta a hormona (HRE: "hormone response elements") y que están localizadas en regiones regulatorias de promotores blanco. Los complejos formados de andrógeno-AR interactúan con varios factores (coactivadores o correpresores) para modular la transcripción de dichos genes blanco. Cuando estos complejos interactúan con el ADN alteran el nivel transcripcional (activándolo o reprimiéndolo) del gen correspondiente (Beato *et al.*, 1996).

No obstante, también hay evidencias de acciones rápidas, no genómicas, de los esteroides, incluidos los andrógenos. Estas acciones se diferencian de los efectos genómicos por: 1) inicio rápido (segundos a minutos); 2) insensibilidad a la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas; 3) efectos reproducidos por esteroides incapaces de acceder al núcleo (típicamente un esteroide unido a una proteína, macromolécula que no puede permear la membrana plasmática); 4) generalmente no son bloqueados por los antagonistas clásicos de los receptores de andrógenos. Estos efectos producen la rápida inducción de la cascada de transducción de señales mediada por segundos mensajeros, incluyendo aumentos en el calcio citosólico y activación de las proteinquinasas A y C y de la proteinquinasa activada por mitógenos (MAPK), con diversos efectos celulares, entre ellos relajación del músculo liso, transmisión de señales neuromusculares y plasticidad neuronal.

LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR DEL LEVATOR ANI

Las hormonas esteroideas juegan un rol crucial en la formación de ciertos circuitos neuronales (Arnold y Gorski, 1984; Fishman y Breedlove, 1988). Usualmente, dichos sistemas neuronales sensibles a esteroides son sexualmente dimórficos y funcionan durante el comportamiento reproductivo. Por ejemplo, en las ratas, el núcleo espinal del bulbocavernoso (SNB, del inglés "Spinal Nucleus of Bulbocavernosus"), ubicado en los segmentos quinto y sexto de la médula espinal, y los músculos por él inervados, el bulbocavernoso (BC) y el levator ani (LA), son sexualmente dimórficos. Estos músculos, que se encuentran unidos a la base del pene, son necesarios para la eyaculación y para el comportamiento copulatorio del macho (Wainman & Shipounoff, 1941; Cihak *et al.*, 1970; Breedlove, 1984; Nordeen *et al.*, 1985) y se desarrollan bajo la influencia de la testosterona: la castración induce su atrofia y el reemplazo de testosterona produce la recuperación de su tamaño y de su peso (ver Souccar *et al.*, 1982).

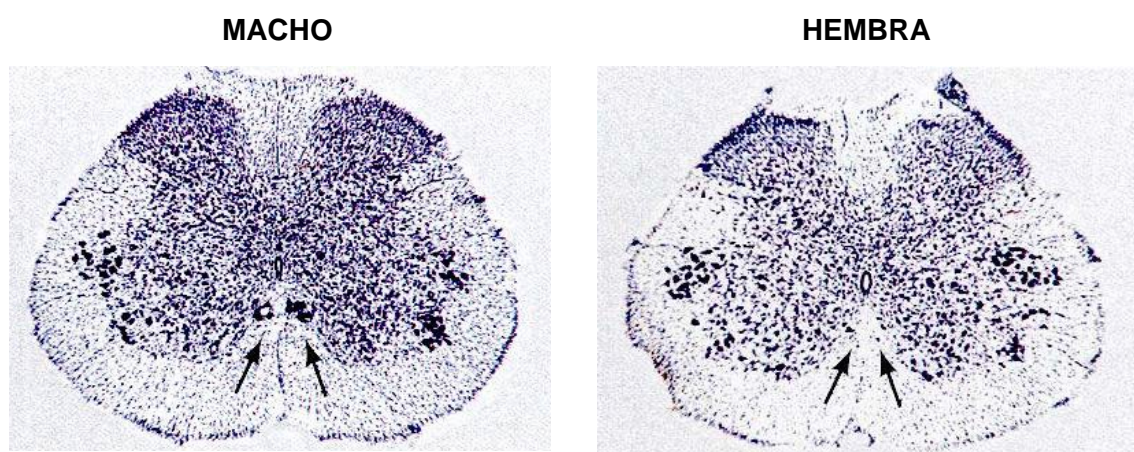
En la literatura existe un importante grado de confusión acerca de la denominación de los músculos del piso pélvico de la rata. En particular, el músculo levator ani, descrito por Greene (1963) tiene una denominación que ha dado lugar, por más de 50 años, a una confusión respecto de su función. Según un estudio anatómico realizado en 1998 por Poortmans y Wyndaele, el ano no se eleva durante la contracción del LA, por lo que su denominación como elevador del ano parece injustificada. Estos autores sugieren que, dado que su principal función sexual está relacionada con su fijación al bulbo y dada su alta sensibilidad a la testosterona, sería más lógico denominar al levator ani como "bulbocavernosus dorsalis".

El músculo levator ani, que está presente sólo en la rata, posee cierta semejanza anatómica con el músculo puborectalis humano, pero tiene una inserción y una función diferente (Poortmans y Wyndaele, 1998). En los humanos, los músculos estriados del piso

pélvico forman un complejo funcional muy importante: los músculos de la base pelviana están integrados por el grupo Levator Ani que incluye a los músculos pubococcygeus, puborectalis e ileococcygeus, los cuales contribuyen sustancialmente a la continencia, la micción, la defecación y al soporte de los órganos pélvicos. Los músculos pubococcygeus e ileococcygeus de la rata comparten similitudes con sus homólogos en el humano (Poortmans y Wyndaele, 1998).

La diferenciación sexual del SNB-BC/LA depende de andrógenos (Breedlove y Arnold, 1983): el sistema está formado prenatalmente en ambos sexos, pero normalmente desaparece en las hembras (tanto en su parte neuronal como en su parte muscular) por la ausencia de testosterona (Cihak *et al.*, 1970; Breedlove, 1984; Nordeen *et al.*, 1985). En los machos, el SNB consiste de aproximadamente 200 motoneuronas.

Tanto el SNB como el BC/LA poseen receptores de andrógenos (ver Matsumoto, 1997). Las motoneuronas del SNB de machos adultos acumulan hormona luego de inyecciones sistémicas de testosterona o dihidrotestosterona radioactivas, pero no de estradiol. Asimismo, estas motoneuronas acumulan más de los andrógenos inyectados que otras motoneuronas de los mismos segmentos espinales. (SCIENCE, 1980).



Corte histológico transversal de la médula espinal a nivel del quinto segmento lumbar. Las flechas indican el núcleo espinal del bulbocavernoso (SNB)

Sólo las ratas macho retienen el músculo LA en el animal adulto. El crecimiento del LA se encuentra retardado respecto de otros músculos esqueléticos dado que su crecimiento depende de los niveles plasmáticos de testosterona, los cuales comienzan a incrementarse luego del día postnatal 40 (22).

Desde 1941, cuando se realizaron los primeros estudios sobre el desarrollo de la musculatura perineal (Wainman P y Shipounoff G, 1941), el músculo LA, que forma parte de este complejo, ha jugado un rol importante como un modelo para testear el efecto miotrófico de las hormonas sexuales. El receptor para andrógenos encontrado en el LA muestra una mayor afinidad por la 5 α -DHT que por la testosterona (Krieg *et al.*, 1974).

Las motoneuronas del SNB están agrupadas como un "cluster", por lo que sus somas están en contacto entre sí. Estudios de microscopía electrónica muestran la existencia de "gap junctions" que permiten el acoplamiento eléctrico y/o metabólico entre estas motoneuronas (Matsumoto *et al.*, 1989). Los andrógenos regulan el número total de los canales que forman las "gap junctions", lo cual indica que el grado de acoplamiento entre estas motoneuronas está regulado por andrógenos que, de este modo, estarían promoviendo la actividad neuronal sincronizada de este núcleo (Matsumoto *et al.*, 1988). Además, se ha reportado que en estas neuronas los andrógenos están involucrados en la expresión génica de proteínas estructurales tales como la β -actina y la β -tubulina, lo cual puede explicar por qué en animales castrados se observan un decrecimiento del tamaño somático y del largo dendrítico. Estos descubrimientos sugieren que los andrógenos inducen cambios morfológicos y moleculares en este núcleo de neuronas. Esto implica que el estudio de los efectos neuronales de la testosterona sobre estas motoneuronas puede proveer evidencias acerca de los mecanismos de plasticidad neuronal hormonalmente inducida en las motoneuronas adultas.

Por otra parte, los esteroides gonadales modifican varias características de la transmisión sináptica, incluyendo la actividad sináptica, la síntesis y la expresión de receptores postsinápticos en el sistema autonómico (Souccar et al., 1982; Schirar et al. 1997; Reilly et al. 1997). Asimismo, cabe resaltar que las conexiones sinápticas y el establecimiento de los circuitos son altamente dependientes de la actividad sináptica, donde las señales sinápticas pueden jugar un rol crítico (ver [Cohen-Cory 2002](#)). Por lo tanto, el influjo de calcio a través de los canales dependientes de voltaje (CCDV) podría ser un punto clave en la cadena de eventos modulada por esteroides gonadales.

La hipótesis general que nos planteamos en este trabajo es que los canales de calcio presinápticos podrían ser un blanco de la modulación neuronal dependiente de esteroides gonadales, ya que estos canales juegan un rol central en la transmisión sináptica. En vista de la gran sensibilidad del sistema SNB-BC/LA a los andrógenos, investigamos si la testosterona podía regular la participación de distintos CCDV modulando así la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA.

Los resultados aquí presentados abren perspectivas muy interesantes respecto de lo que podría suceder en estructuras sexualmente dimórficas del sistema nervioso central: la testosterona podría estar modulando las actividades relativas de determinados tipos de canales y esto a su vez podría estar modulando la eficacia sináptica u otros parámetros sinápticos. Una estructura muy importante y muy estudiada del cerebro de los mamíferos es el hipocampo: la formación hipocampal está involucrada en una gran variedad de funciones de naturaleza muy diversa, como lo son sus bien conocidos roles en los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria (ver [Andrade et al., 2000](#)) y en la regulación de la respuesta hormonal al stress. Por otra parte, se sabe que la liberación de neurotransmisor en el hipocampo está gobernada por canales de tipo P/Q y de tipo N: en la corteza cerebral y en el hipocampo, la transmisión sináptica depende de ambos tipos.

(Takahashi y Momiyama, 1993; Castillo *et al.*, 1994; Scholz y Miller, 1995; Iwasaki *et al.*, 2000). También se sabe que, en algunas zonas del hipocampo también hay una participación del canal de tipo R (Miyazaki *et al.*, 2005). Asimismo, es sabido que las hormonas gonadales influyen en la morfología de esta zona del cerebro, produciendo diferencias entre machos y hembras (ver Juraska, 1991). También se ha observado una reversión del dimorfismo sexual del hipocampo por manipulación de los esteroides gonadales (Foy *et al.*, 1984).

A partir de los resultados obtenidos en el SNB-LA podría plantearse como interesante la posibilidad de estudiar si existen diferencias entre los sexos en los canales de calcio que gobiernan la liberación en distintas áreas del hipocampo ya que esto podría tener alguna relación con, por ejemplo, las diferencias sexuales que se observan en distintos paradigmas de aprendizaje.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Experimentos sobre el levator ani

Los experimentos del presente trabajo se llevaron a cabo utilizando la preparación nervio-músculo del núcleo espinal del bulbocavernoso-levator ani (SNB-LA) de ratas macho Sprague Dawley de 60-80 días de vida posnatal. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales y el sufrimiento de los mismos.

Los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de 12:12 hs. de luz-oscuridad, con libre disponibilidad de agua y alimento balanceado.

Experimentos sobre el diafragma

Para realizar estos experimentos se utilizó la preparación nervio músculo frénico-diafragma de ratones de dos genotipos diferentes: ratones "knock out" para la subunidad α_1 del canal $Ca_v2.1$. (KO, $\alpha_{1A}^{-/-}$) y ratones "wild type" (WT, $\alpha_{1A}^{+/+}$). Los ratones KO se generaron a partir de la cruce de dos cepas heterocigotas $\alpha_{1A}^{+/-}$ como ha sido previamente reportado por Jun *et al.*, 1999. Los animales KO nacen con un fenotipo normal pero exhiben un rápido y progresivo déficit neurológico que se hace evidente a simple vista aproximadamente 10 días después del nacimiento. Luego el ratón se vuelve incapaz de caminar y de alimentarse y muere aproximadamente a los 21 días de vida postnatal (Jun *et al.*, 1999). Por esta razón todos los experimentos fueron hechos con animales de 16-19 días de edad.

El genotipo de los animales fue establecido por PCR utilizando ADN obtenido a partir de biopsias de la porción terminal de la cola del animal y purificado mediante una columna de afinidad de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). El producto de PCR (un fragmento de 240 pb, dos fragmentos

de 240 pb y uno de 390 pb, o un fragmento de 240 pb) correspondientes a los ratones $\alpha_{1A}^{+/+}$, $\alpha_{1A}^{+/-}$ or $\alpha_{1A}^{-/-}$ respectivamente, fueron analizados por una corrida en un gel de 1% de agarosa (proporción 1:2:1) (Jun *et al.*, 1999).

El genotipo de los animales fue establecido por PCR utilizando ADN obtenido a partir de biopsias de la porción terminal de la cola del animal y purificado mediante una columna de afinidad de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). El producto de PCR (un fragmento de 240 pb, dos fragmentos de 240 pb y uno de 390 pb, o un fragmento de 240 pb) correspondientes a los ratones $\alpha_{1A}^{+/+}$, $\alpha_{1A}^{+/-}$ or $\alpha_{1A}^{-/-}$ respectivamente, fueron analizados por una corrida en un gel de 1% de agarosa (proporción 1:2:1) (Jun *et al.*, 1999).

Los animales fueron anestesiados con 2,2,2, tribromoethanol 2%, e inmediatamente desangrados.

Al igual que en el caso de las ratas, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y el sufrimiento de los mismos, que fueron mantenidos bajo un ciclo de 12:12 hs. de luz-oscuridad, con libre disponibilidad de agua y alimento balanceado.



Ratón KO α_{1A} (-/-) intentando girar para pararse durante un episodio de caída.

PREPARACIONES

El músculo correspondiente con su suplemento nervioso fue escindido y disecado sobre una caja de Petri cubierta con un polímero sintético inerte (Sylgard®) conteniendo una solución salina (solución de disección) de la siguiente composición (mM): NaCl 137, KCl 5, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 12, Na₂HPO₄ 1 y glucosa 11; continuamente burbujeado con 95% O₂ - 5% CO₂. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20-23°C).

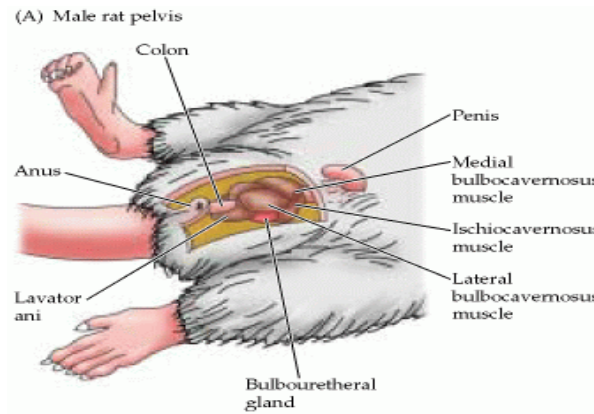
Las preparaciones nervio-músculo fueron luego transferidas a una cámara de registro de 1-1,5 ml., donde se aplicaron las distintas drogas y soluciones de trabajo.

En el caso de estar midiendo el efecto de toxinas peptídicas, tanto las preparaciones control como aquellas tratadas con toxinas fueron ensayadas en presencia de 0,01% de seroalbúmina bovina (BSA) para evitar la unión inespecífica de los péptidos a la cámara de registro y a las tubuladuras.

LEVATOR ANI DE RATA

El levator ani (LA) es un músculo en forma de anillo compuesto por dos unidades musculares. El lado izquierdo y el derecho están unidos por una delgada línea de tejido conectivo (la "línea media") y se ubican rodeando al recto y haciendo uniones bilaterales con la base del pene, por lo que cada lado recibe inervación de la misma zona de la médula espinal (de los axones de las motoneuronas del núcleo espinal del bulbo cavernoso) pero del lado ipsi o contralateral, según corresponda (Greene, 1935; Hayes, 1965; Cihak *et al.*, 1970).

Cuando el músculo se extrajo del animal se separó cuidadosamente del músculo bulbocavernoso que se encuentra muy próximo al LA.



VISTA DE LA REGIÓN PERINEAL DE UNA RATA MACHO

DIAFRAGMA DE RATÓN

El diafragma es un tabique musculotendinoso muy ancho, aplanado y delgado, que separa la cavidad torácica de la cavidad abdominal y que se encuentra inervado por el nervio frénico (derivado de los nervios supraclaviculares).

Una vez que el diafragma fue escindido del animal, se sometió a una limpieza de los huesos de las costillas; luego se lo estiró desde sus extremos y se hizo una limpieza de la capa superficial de tejido conectivo para facilitar el registro electrofisiológico.

Si bien este músculo puede ser dividido en dos hemidiafragmas, siempre se seleccionó el hemidiafragma izquierdo.

REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS INTRACELULARES

Los M.E.P.s ("Miniature End-Plate Potentials", del inglés potenciales de placa miniatura) y los E.P.s ("Evoked End-Plate Potentials", del inglés potenciales de placa evocados) fueron registrados intracelularmente con electrodos de vidrio convencionales obtenidos a partir de capilares de borosilicato de aluminio con microfilamento de 1,5 mm de diámetro externo y 0,86 mm de diámetro interno (Harvard Apparatus LTD), utilizando un estirador de pipetas vertical (Sutter Instrument Co., modelo P-97).

Puller vertical → **Capilar de vidrio**

El capilar es calentado localmente en el centro, estirado y separado, obteniéndose dos electrodos de vidrio



VISTA DE UN ESTIRADOR DE PIPETAS O "PULLER" VERTICAL Y DE LA PUNTA DE UN MICROELECTRODO OBTENIDO A PARTIR DE ÉL

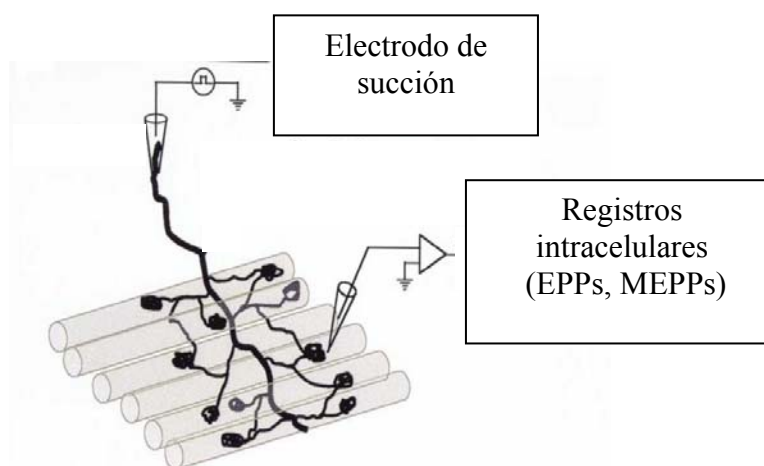
Estos microelectrodos fueron llenados con una solución salina altamente conductora (KCl 3M). Se utilizaron aquellos electrodos que tuvieran una resistencia de 15-30 M Ω , los cuales se conectaron al cabezal de un amplificador, mientras que en la cámara de registro un electrodo de Ag-AgCl servía como referencia. El cabezal, a su vez, estaba sujeto a un micromanipulador. La salida del cabezal fue conectada a un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Inc.). La señal de salida de este amplificador (10 X) se envió a una tarjeta de amplificación y filtrado (CyberAmp 320; Axon Instruments, Inc.) en donde se la amplificó 100 veces más. De allí la señal fue conducida a una interfase analógica-digital de 16 bits (Digidata 1322A; Axon Instruments, Inc.). Esta interfase digitaliza las señales, que fueron así enviadas a una computadora que las adquirió mediante el programa Axoscope 7.0 o mediante el PClamp 8.1 (ambos de Axon Instruments, Inc.). Durante el experimento, la señal de salida del Axoclamp 2B fue visualizada en un osciloscopio Tektronik 5113.

La correcta ubicación del microelectrodo respecto de la placa neuromuscular fue constatada por el tiempo de subida de los E.P.P.s (o de los M.E.P.P.s), debiendo ser éste

no mayor a 1 ms, considerándose como tiempo de subida al transcurso temporal entre el 10 y el 90% de la respuesta.

Como en la micropipeta el electrodo se encuentra en una solución de KCl 3M y el electrodo de referencia se encuentra en el baño extracelular (120 mM NaCl), al colocar los dos electodos en el baño extracelular (antes de impalar la fibra muscular) se genera una diferencia de potencial debida a el potencial de punta de la pipeta y a las diferentes concentraciones de las soluciones que bañan los electodos. Por esta razón, antes de impalar la célula se llevó la diferencia de potencial a cero, utilizando la perilla correspondiente del amplificador Axoclamp 2B.

Luego de haber impalado una fibra muscular, el nervio fue estimulado con un estímulo supramáximo utilizando para ello un electrodo de succión acoplado a un generador de pulsos (asociado a una unidad aisladora de estímulo). La frecuencia de estimulación (para obtener E.P.P.s) fue de 1 Hz.



ESQUEMA DE UNA PREPARACIÓN NEUROMUSCULAR CON LA UBICACIÓN RESPECTIVA DEL MICROELECTRODO DE REGISTRO Y DEL ELECTRODO DE SUCCIÓN MEDIANTE EL CUAL SE ESTIMULÓ AL NERVIO.

La señal de M.E.P.P.s fue registrada por períodos de 1-2 min. y su frecuencia de aparición fue obtenida a partir del conteo directo sobre la pantalla del osciloscopio. La

amplitud de los M.E.P.P.s fue medida utilizando el programa Clampfit 9.0 (perteneciente al pClamp 9.0).

La liberación evocada de neurotransmisor fue evaluada de diferentes maneras, según el caso. Para el caso en que se evaluó por el método de las fallas (explicado más adelante en esta misma sección), se contó el número de E.P.P.s y el número de fallas a lo largo de 100 estímulos (provocados a una frecuencia de 1 Hz) y para ello las preparaciones respectivas se sumergieron en soluciones bajas en Ca^{2+} y altas en Mg^{2+} (0.8-1 mM Ca^{2+} / 5-6 mM Mg^{2+}). Por otra parte, en aquellos casos en que se evaluó la liberación de neurotransmisor por el método de la varianza (explicado más adelante en esta misma sección) las preparaciones se sumergieron en soluciones de concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} fisiológicas a las cuales se les adicionó una determinada cantidad de la droga d-tubocurarina (que bloquea a los receptores postsinápticos de acetilcolina), de concentraciones de entre 0,2 y 0,9 μM . Las concentraciones de d-tubocurarina fueron seleccionadas empíricamente de forma tal de lograr E.P.P.s que no superaran los 10 mV de amplitud. Esto obedece a la necesidad de evitar la "sumación no lineal" de las amplitudes de los E.P.P.s, que ocurre cuando la respuesta postsináptica excede los 10 mV de amplitud. En algunos casos se trabajó sin d-tubocurarina y en vez de ello se aumentó la concentración de Mg^{2+} de forma tal de obtener de esta otra manera E.P.P.s menores a los 10 mV. Si bien tanto la d-tubocurarina como el aumento en la concentración de Mg^{2+} previenen la contracción muscular cuando fue necesario, para prevenirla, se adicionó al baño una concentración 10 μM de μ -conotoxina GIIIB. Esta toxina actúa bloqueando los canales de Na^+ del músculo sin bloquear los del nervio, por lo que se puede utilizar para prevenir los potenciales de acción en la fibra muscular. La contracción muscular debe ser impedida porque expulsa al microelectrodo de la fibra impalada.

ESTIMACION DEL CONTENIDO CUÁNTICO

En este trabajo de tesis se utilizaron (según el correspondiente caso) dos métodos diferentes para estimar el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor: el método de las fallas y el método de la varianza.

Método de fallas

En experimentos hechos en la unión neuromuscular de rana, Fatt y Katz (1951) demostraron que la acetilcolina es liberada a partir de los terminales nerviosos en forma de **paquetes multimoleculares** que ellos denominaron **cuantos**. Un paquete o **cuanto** describe la unidad más pequeña posible en la cual el neurotransmisor es normalmente liberado, y representa el contenido de una vesícula sináptica.

Que la liberación sea cuántica significa que sólo pueden ser liberados contenidos de 0, 1, 2, 3, o más vesículas pero no contenidos de $1^{1/2}$ o $2^{3/5}$. En general, el número de cuantos liberados a partir del terminal nervioso (el **contenido cuántico** de una respuesta sináptica) puede variar considerablemente, pero el número de moléculas de cada cuanto (**tamaño cuantal**) es relativamente constante (con una variación de $\approx 10\%$) (Nicholls *et al.*, 1992).

En el terminal nervioso se almacenan una gran cantidad de cuantos o vesículas. El contenido de cada cuanto (las moléculas de neurotransmisor que guarda en su interior) es liberado en forma aleatoria. El hecho de que frente a cada potencial de acción cada cuanto tenga sólo dos posibilidades (que se libere o no su contenido), es similar a un ensayo de Bernoulli o binomial. Por consiguiente, para una población de cuantos liberables, cada potencial de acción representa una serie de ensayos binomiales independientes.

En una distribución binomial, p representa la probabilidad promedio de éxitos y q ($p-1$) la probabilidad promedio de fallas. Se asume que tanto la probabilidad promedio (p) de que el cuanto sea liberado como el tamaño del pool de vesículas o cuantos liberables (n) permanecen constantes. Si se conocen n y p , las leyes de la probabilidad binomial permiten estimar el número medio de cuantos (m , llamado contenido cuántico) que son liberados luego de una serie de estímulos donde $m = np$. Por consiguiente, si se quiere utilizar la distribución binomial para determinar m , se necesita conocer los valores de n y de p . El inconveniente de esto en la práctica es que n y p no son observables de forma directa. Sin embargo, Castillo y Katz (1954) notaron que:

"Bajo condiciones normales, se asume que p es relativamente grande, lo cual significa que una gran parte de la población sináptica responde frente a un impulso. No obstante, cuando se reduce la concentración de Ca^{2+} o se incrementa la de Mg^{2+} , las chances de respuesta disminuyen y mayormente se observan fallas completas en la respuesta postsináptica, con una respuesta ocasional de una o dos unidades. Bajo estas condiciones, cuando p es muy pequeño, el número de unidades que producen la respuesta postsináptica (E.P.P.) luego de una gran cantidad de observaciones, parece estar distribuido en la forma característica descrita por la ley de Poisson".

Luego, en sus experimentos, estos autores testearon la aplicabilidad de la distribución de Poisson a las fluctuaciones observadas en la amplitud del potencial de placa. En la distribución de Poisson no hay n ni p , sólo m . El número esperado de respuestas conteniendo x cuantos está dado por:

$$n_x = N (m^x/x!) e^{-m}$$

Un método para determinar m es a partir del número de fallas. Cuando $X = 0$ en la ecuación de Poisson, $n_0 = N e^{-m}$ y, en consecuencia,

$$m = \ln (N/n_0)$$

donde N es el número total de ensayos sucesivos (en nuestro caso, 100 a 0.5 Hz) y n_0 es el número de esos ensayos en los cuales la respuesta falló (esto significa que hubo ausencia de E.P.P.). Este método para determinar el contenido cuántico se denomina "método de las fallas".

Para poder utilizar el método de las fallas se trabajó en condiciones de baja probabilidad de liberación, utilizando soluciones de bajo Ca^{2+} - alto Mg^{2+} , las cuales difieren de la solución de disección en las concentraciones de CaCl_2 (0,7-1 mM) y de MgSO_4 (5-7 mM).

Método de varianza

En una gran cantidad de experimentos se utilizó el método de la varianza para estimar el contenido cuántico: en todos aquellos casos en que la relación entre la concentración de Ca^{2+} y la de Mg^{2+} no fuera tan baja como para que se produjeran fallas en la transmisión sináptica y también en aquellos casos en las que se trabajó con las concentraciones fisiológicas de dichos divalentes (en las que nunca se producen fallas). En este último caso lo que se hizo fue aplicar d-Tubocurarina (d-Tc) al comienzo del experimento, en una concentración que varió entre 0,5 y 1,5 μM , con el objetivo de obtener potenciales postsinápticos de entre 0,5 y 4 mV de amplitud y evitar la "sumación no lineal" de los E.P.P.s (Mc. Lachlan y Martin, 1981).

En el método de la varianza el m (contenido cuántico) se estima mediante la siguiente fórmula:

$$m = \frac{(V_{\text{EPP}})^2}{(S_{\text{EPP}})^2 - (S_{\text{ruido}})^2}$$

donde V_{EPP} es la amplitud media de los EPPs (100 potenciales de placa evocados a 1 Hz) y S_{EPP} y S_{ruido} son las desviaciones standard de los EPPs registrados y del ruido respectivamente (ver Hubbard *et al.*, 1969). S_{ruido}^2 no fue considerada cuando su valor era muy pequeño en relación V_{EPP}^2 y a S_{EPP}^2 .

Los potenciales de placa fueron registrados en fibras musculares cuyos valores de potenciales de membrana fueran inferiores a -60 mV y se descartaron aquellas fibras en las que se produjo un cambio mayor de 5 mV a lo largo del registro.

GONADECTOMÍA Y TRATAMIENTO HORMONAL DE LOS ANIMALES

Gonadectomía

El bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) y el Bioterio de la Facultad de Veterinaria (UBA) nos proveyeron de ratas hembras preñadas de la cepa Sprague Dawley. A los pocos días del nacimiento de las crías (entre 8 y 15 por parto) se procedió al sexado de los animales. Las crías hembras fueron sacrificadas y las crías macho fueron dejadas con la madre. La razón de este procedimiento fue que sólo los machos serían luego utilizados y de esta manera dejábamos a estas crías con mayor disponibilidad de alimento materno. Cuando los animales cumplieron 21 días se procedió al destete. A la edad posnatal de 10-12 días, se sometió a todos los animales de una cantidad de camadas a la operación de gonadectomía, mientras otras camadas eran sometidas a una operación control, en donde no se practicó la gonadectomía sino solamente el procedimiento quirúrgico superficial. Estas camadas constituyeron a los animales "controles" (lo que en inglés se denomina "sham operated"). La elección de esta edad para la gonadectomía responde a que es la edad más temprana en que se puede castrar a las ratas sin que éstas pierdan al

grupo de motoneuronas que inervan al LA (el ya mencionado SNB) y al LA mismo por falta de testosterona.

Para realizar la operación de gonadectomía se anestesió a las ratas con 0,15-0,25 ml. de 1,1,1-tribromoetanol. La cantidad de anestesia utilizada resultaba crítica porque un ligero exceso de la misma llevaba a la muerte de los animales y una cantidad levemente menor no conseguía dormirlos. Una vez que el animal se encontraba dormido se procedía a hacer dos pequeñas incisiones abdominales intraperitoneales a la altura de los testículos (que a la edad de la castración aún se encuentran en la zona abdominal e intraperitoneal) y a tomar los testículos con una pinza de disección y sacarlos hacia el exterior. Posteriormente se realizaba un pequeño nudo a la altura del músculo cremáster y luego se procedía al corte del testículo con una pequeña tijera de disección. La realización de este nudo resultaba indispensable para que no se produjera un desangrado del animal al cortar los testículos. Finalmente, se procedía a cerrar la herida con una gota de pegamento adhesivo instantáneo. Dicho procedimiento resultó muy eficaz y nunca produjo la muerte de un animal. La supervivencia de los animales operados fue siempre del 100%. Lo único que produjo la muerte de animales en el procedimiento de la gonadectomía fue el exceso de anestesia.

Tratamiento hormonal

Para diagramar un protocolo de administración, se tuvieron en cuenta datos publicados en el trabajo de Callies *et al.* (2003) en donde se estudia en detalle el curso temporal de la concentración plasmática de testosterona luego de inyecciones de testosterona propionato, En dicho protocolo utilizamos inyecciones subcutáneas, de 10 mg. (lo que se corresponde con la dosis Tprop10 de la fig.1) por cada 400 g. de peso del animal, en intervalos de 10 días (contando como 1 el día de la aplicación). La

testosterona propionato fue disuelta en aceite de girasol en una concentración de 10 mg/ml.

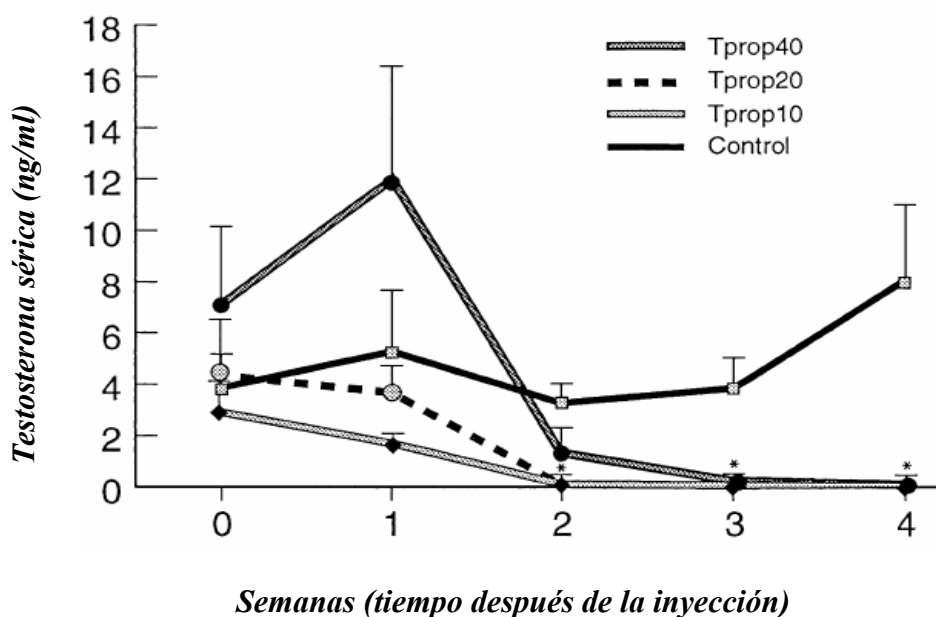


Fig.1 Concentraciones de suero después de una sola inyección de Testosterona propionato dada inmediatamente después de la gonadectomía. Para una descripción más clara sólo se grafica el E.S.M. positivo. * $P < 0,05$ controlado con el grupo control por ANOVA.

(Extraído del artículo: Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats (2003). Callies F, Kollenkirchen U, von zur Muhlen C, Tomaszewski M, Beer S, Allolio B. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 111(4):203-8.)

De este modo pudimos contar con tres lotes diferentes de animales: animales controles (no gonadectomizados ni inyectados), animales gonadectomizados e inyectados con testosterona propionato y animales gonadectomizados e inyectados con el vehículo de disolución de la testosterona (aceite de girasol).

Al momento de sacrificar a los animales colectamos la máxima cantidad de sangre posible, a la cual dejamos coagular para luego centrifugar y obtener el plasma. A dicho plasma se le realizó una extracción de testosterona según la siguiente técnica:

Técnica de extracción de testosterona a partir del suero: 100 μ l de suero se extraen 2 veces con 5 ml de éter en tubos de vidrio cónicos perfectamente limpios. Se agita cada tubo 30 seg y se coloca a -70°C algunos minutos hasta que se congele el suero. Con el

suero congelado el éter se puede volcar directamente a otro tubo cónico. Se juntan los extractos y se evaporan a sequedad a 50-60°C. Finalmente el residuo se resuspende en el buffer en que se realiza el RIA (del inglés "Radio Immuno Assay", Radio Inmuno Ensayo). El RIA se realizó según el protocolo descrito en el trabajo de Ascoli (1981). A partir de este ensayo pudimos determinar las concentraciones séricas de testosterona de los distintos grupos de animales. Los valores obtenidos se muestran en la sección Resultados.

TEJIDOS E INMUNOHISTOQUÍMICA

Los músculos levator ani de cada uno de los distintos grupos de animales (controles, gonadectomizados y tratados con vehículo y gonadectomizados tratados con testosterona) fueron removidos y fijados por 6 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% (preparado con buffer fosfato (PB) 0,1 M a pH 7) a temperatura ambiente. A continuación se los sometió a un lavado con PB durante 1 min., se los permeabilizó con Tritón X-100 al 1% durante 5 min., se los lavó nuevamente con PB por 1 min. y finalmente se los trató con sacarosa 30% disuelta en PB. Se los dejó inmersos en esta solución dentro de un tubo plástico de punta cónica de 50 ml. hasta que el tejido quedó sumergido en el fondo del mismo. Este tratamiento se realizó para proteger al tejido de la ruptura por posteriores congelamientos (se lo "crioprotegió"). A menos que se mencione lo contrario, todos estos pasos se realizaron a 4°C, utilizando buffer PBS 10 mM (el PBS está compuesto por 0,01 M de buffer PB y 145 mM de NaCl y es llevado a pH 7,4 con NaOH 1N). Los bloques de tejido así fijados fueron incluidos en "O.C.T. Tissue-Tek (Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, USA) en un tubo de plástico sellado y congelados a -20°C. Dichos bloques fueron cortados en secciones transversales de 40 micrones de espesor mediante la utilización de un crióstato. Las secciones musculares

así obtenidas fueron montadas sobre portaobjetos cubiertos por una solución de Gelatina (compuesta por gelatina bacteriológica en polvo, sulfato potásico de cromo y timol), secados al aire durante 15 min. y finalmente almacenadas a -20°C hasta la realización de la tinción inmunohistoquímica.

Para la tinción inmunohistoquímica las secciones musculares fueron procesadas simultáneamente para una doble tinción que permitiera identificar, por un lado, los receptores postsinápticos de acetilcolina y, por otro lado, los canales de calcio de tipo N o de tipo R. Para marcar a los canales de calcio se utilizó inmunofluorescencia indirecta y para marcar a los receptores de acetilcolina se utilizó α -bungarotoxina acoplada a tetrametilrodamina (Bgtx-R). El experimento de inmunofluorescencia se realizó según el protocolo descrito en el trabajo de Pagani *et al.* (2004). Como síntesis del protocolo podemos decir que las secciones fueron permeabilizadas, lavadas con PBS, y luego incubadas con el anticuerpo primario anti la subunidad α_1 del canal de calcio correspondiente (N o R) durante 19 hs. a 4°C. A continuación los tejidos fueron lavados sucesivamente con PBS por 90 min. de baja y alta concentración iónica. Luego las secciones fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo secundario (Ig-G conjugada con Alexa 488) y con Bgtx-R, lavadas con PBS, fijadas en PFA 1% y nuevamente lavadas con PBS. Finalmente, las secciones fueron montadas utilizando "Prolong Antifade" (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Para definir los patrones de distribución específicos y el nivel de auto-fluorescencia, se realizaron ensayos controles con IgG pre-inmune de conejo como anticuerpo primario, otros sin anticuerpo primario y otros con el péptido antigénico. No se observó tinción en ninguno de los ensayos controles.

Microscopía y fotografía

Se utilizó un microscopio confocal (BX61-FV300 Olympus, Japón), equipado con un láser de argón y uno de helio-neón que permite un "escaneo" secuencial, para ver y adquirir imágenes de las secciones inmunofluorescentes. La intensidad promedio por pixel fue medida en secciones ópticas de 2 μm a partir de la sinapsis completa y luego de la substracción del fondo o "background", utilizando el programa Image-Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, MD, USA). Todas las fotografías de las señales inmunofluorescentes para un dado anticuerpo fueron tomadas con la misma configuración para el microscopio confocal (intensidad del láser, tiempo de exposición, resolución y magnificación).

Para comparar los resultados de las cuantificaciones se realizó un ANOVA de un factor, luego de comprobar que los resultados cumplieran con los supuestos del método: normalidad de las poblaciones y homogeneidad de varianzas.

Anticuerpos policlonales y α -Bungarotoxina

Los anticuerpos primarios específicos utilizados para identificar a la subunidad α_{1B} (anti-CNB2) de los canales de tipo N, fueron generados como se publica en los trabajos de Vance *et al.* de 1988 y 1989 y generosamente donados por el grupo de trabajo de M. Mcenery (Department of Anaesthesiology, UCLA, USA). Por su parte para identificar a la subunidad α_{1E} de los canales de tipo R, se utilizó una mezcla 1:1 de dos anticuerpos primarios específicos: el anti-CNE1 generado como se publica en los trabajos de Vance *et al.* (1988 y 1989), donado también por el laboratorio de la Dra. Mcenery, y el anti-CNE2 elaborado por los laboratorios Alomone (Jerusalem, Israel) y adquirido comercialmente. Todos los anticuerpos fueron diluidos en una solución de buffer PBS 10 mM conteniendo 3% de BSA (seroalbúmina bovina), L-lisina 0,1 M y

0,075% de Tritón X-100. De todos los anticuerpos primarios (que se encuentran en una concentración de 75 µg/ml) se utilizaron diluciones 1/250.

Se realizaron tinciones dobles para identificar al anticuerpo primario con una IgG de cabra anti-conejo (los primarios fueron generados en conejo) acoplada a Alexa-488 y α -Bungarotoxina acoplada a tetrametilrodamina (Bgtx-R) para identificar a los receptores postsinápticos de acetilcolina (AChR). Ambos compuestos fueron adquiridos a Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

El anticuerpo secundario fue diluido 1/300 y la Bgtx-R se utilizó en una concentración 0,6 µM.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los valores experimentales fueron expresados como la media \pm E.S.M. (error standard de la media) informando al n como nro. de músculos y nro. de fibras ($n = \text{nro.músculos} / \text{nro.de fibras}$). La significancia estadística (valores de p en la leyenda de las figuras) fue evaluada, para el caso de comparar dos grupos de datos, por el t-test de Student para dos colas y valores no pareados. En el caso de no cumplirse los supuestos del ANOVA, se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney U test para comparar dos muestras. En tales casos también se informa la significancia estadística mediante el valor de p.

En el caso de la cuantificación de las tinciones inmunohistoquímicas, se compararon más de dos grupos de datos por lo que se utilizó un ANOVA de un factor (los datos cumplían los supuestos del ANOVA).

Todo el análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Sigma Stat 2000 (dentro del programa Sigma Plot 2000).

Compuestos químicos y toxinas

La sero-albúmina bovina (BSA) y la mayor parte de las sales y reactivos utilizados, fueron de grado analítico y se compraron en Sigma (St. Louis, MO, USA). El resto de las sales y reactivos, también de grado analítico, fueron adquiridas a Merck (Merck Química Argentina S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina). El tribromoetanol se compró en Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

Los polipéptidos sintéticos ω -Conotoxina GVIA, ω -Conotoxina MVIIC y μ -Conotoxina GIIIB fueron comprados a los Laboratorios Alomone (Jerulalem, Israel). Los polipéptidos sintéticos ω -Agatoxina IVA y SNX-482 fueron comprados a la compañía Peptide (Peptide Intitute, Inc., Japan). La adenosina y el antagonista DPCPX fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).

La testosterona propionato fue generosamente donada por el laboratorio Schering (Schering Argentina S.A.I.C.).

Resultados

RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de Tesis. Estos resultados consisten básicamente de una caracterización farmacológica e inmunohistoquímica de los canales de calcio que median la liberación de neurotransmisor en la sinapsis SNB-LA y un estudio de la influencia que la testosterona ejerce sobre ese perfil farmacológico e inmunohistoquímico. Además, se presentan resultados sobre la acción de un neuromodulador (la adenosina) sobre la sinapsis mencionada, intentando buscar una explicación de qué medios podría estar utilizando la testosterona para regular hormonalmente la actividad de ciertos canales de calcio en la liberación de neurotransmisor.

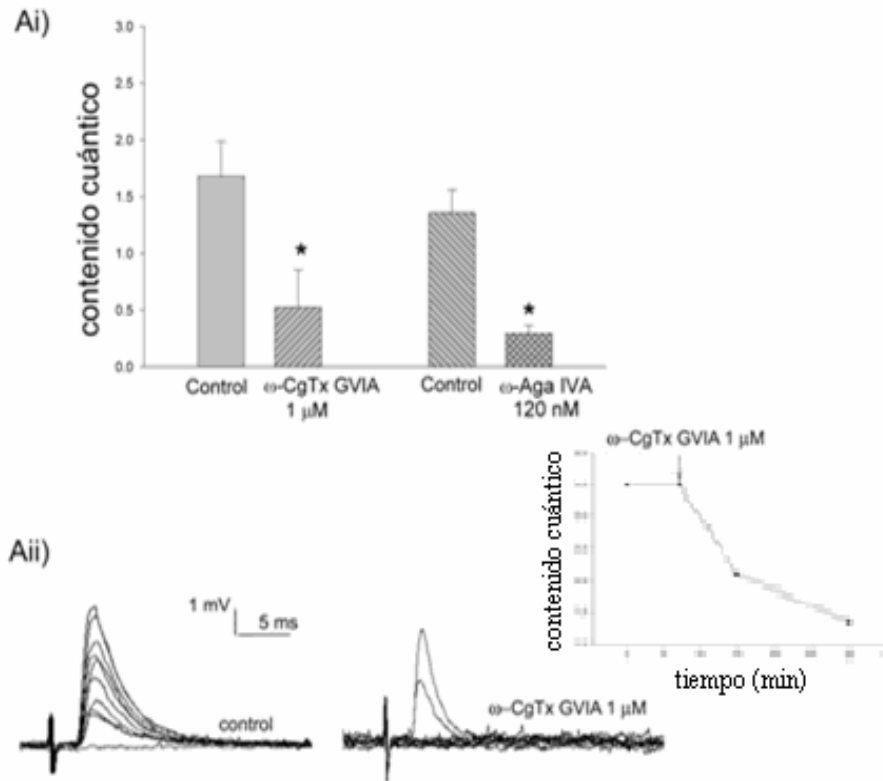
Canales de calcio de tipo N y de tipo P/Q acoplados a la liberación en la sinapsis neuromuscular del levator ani

En el comienzo de este trabajo (y tomando como partida resultados de mediciones de contracciones isométricas realizados por nosotros con anterioridad) hemos establecido la participación de los canales de tipo P/Q ($Ca_v2.1$) y de tipo N ($Ca_v2.2$) en la liberación de neurotransmisor en la unión neuromuscular (UNM) del levator ani (LA) de ratas adultas. Estos resultados se obtuvieron mediante la utilización de bloqueantes farmacológicos específicos para cada uno de los canales: ω -Agatoxina IVA (120 nM) y ω -Conotoxina GVIA (1-2 μ M) respectivamente. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos.

Como se explicó en la sección Materiales y Métodos uno de los métodos indicados para medir el contenido cuántico de la liberación neuralmente evocada (una medida del número de vesículas presinápticas liberadas) es el método de las fallas, que requiere realizar las mediciones en condiciones de bajo Ca^{2+} y alto Mg^{2+} . En la figura 1A se

observan los resultados obtenidos para el LA. Como se muestra en 1Ai) tanto la ω -Aga-IVA como la ω -CgTx-GVIA redujeron fuertemente el contenido cuántico.

A) LEVATOR ANI



B) DIAFRAGMA

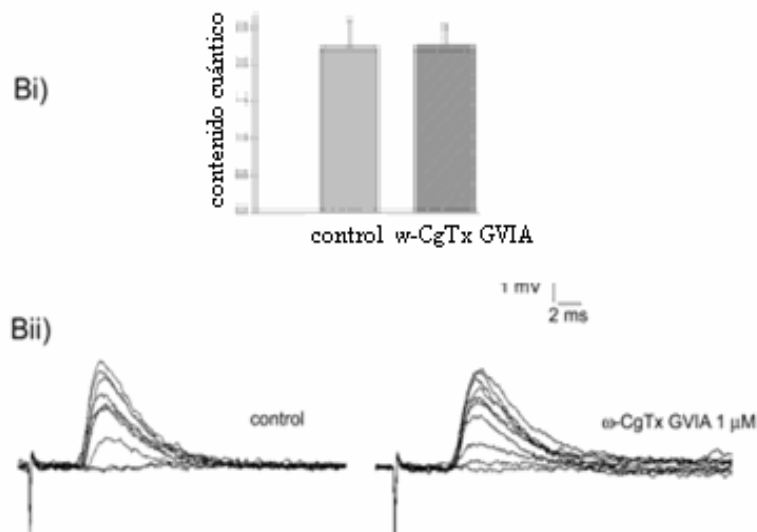


Figura 1: Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre la liberación evocada en UNM del LA y del diafragma de ratas normales. *= $p < 0.05$

En la figura 1Aii) se muestran registros representativos de la acción de la ω -CgTx-GVIA: luego de su aplicación hubo un aumento en el número de fallas de la respuesta evocada (ausencia de EPP frente a un estímulo) y una disminución en la amplitud de las respuestas, indicando que la toxina ejerce su efecto reduciendo el contenido cuántico de la liberación de neurotransmisor. El efecto de la toxina evaluado en una sola UNM muestra un curso rápido de acción de la toxina, el cual se desarrolla completamente luego de 30 minutos de incubación.

La estimación del contenido cuántico antes y después de la aplicación de la ω -CgTx GVIA fue de $1,93 \pm 0,25$ (3 ratones / 27 UNMs) y $0,68 \pm 0,44$ (3 ratones / 28 UNMs), respectivamente. Con respecto a la aplicación de ω -Aga IVA la estimación fue de $1,38 \pm 0,17$ (3 ratones / 29 UNMs) y $0,32 \pm 0,09$ (3 ratones / 30 UNMs) respectivamente. Estos resultados indican que tanto $Ca_v2.1$ (P/Q) como $Ca_v2.2$ (N) están acoplados a la liberación de neurotransmisor en el LA. Mientras el efecto inhibitorio de ω -Aga IVA es consistente con estudios previos, la inhibición ejercida por la ω -CgTx GVIA contrasta con lo encontrado en otras sinapsis neuromusculares adultas de mamíferos (Uchitel *et al.*, 1992; Protti y Uchitel, 1993; Bowersox *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1997).

En función de investigar si la presencia del componente $Ca_v2.2$ está restringida a la UNM del LA o es una característica más general, testeamos el efecto de la ω -CgTx GVIA en la UNM del diafragma del mismo grupo de animales. El resultado que se muestra en la figura 1B) indica claramente que esta toxina no produce ningún efecto sobre el contenido cuántico del diafragma (en la fig 1Bii) se ejemplifica esto con un registro representativo). Esto estaría indicando que la sensibilidad a la ω -CgTx GVIA

sería una particularidad de la UNM del LA y no de las UNMs de mamíferos adultos en general.

Por otra parte, nuestros resultados previos obtenidos mediante el estudio de contracción isométrica indicaron que la ω -CgTx GVIA reduce fuertemente la liberación en la UNM del LA de ratas de 24, 96 y 150 días de edad, sugiriendo un acoplamiento estable de los canales $Ca_v2.2$ a la liberación de neurotransmisor tanto en la pubertad como en la adultez de la rata.

Canales de calcio de tipo R acoplados a la liberación en la sinapsis neuromuscular del levator ani

Una vez establecida la participación de los canales de tipo P/Q y de tipo N en la liberación de transmisor del LA, nos interesó estudiar si también el canal de tipo R ($Ca_v2.3$) estaría involucrado también en este proceso. La razón de esta búsqueda se relaciona con que el canal $Ca_v2.3$ pertenece a la misma familia (la familia de tipo 2) que el $Ca_v2.1$ y el $Ca_v2.2$ y, en el sistema nervioso central, también se lo encuentra funcionalmente acoplado a la liberación de neurotransmisor especialmente en sinapsis de transmisión rápida (ver Dietrich *et al.*, 2003). El primer estudio que realizamos fue uno en el cual bloqueando a los canales de tipo N y de tipo P/Q en forma conjunta con la toxina ω -Conotoxina MVIIC (ω -CgTx MVIIC, 1 μ M) observamos la existencia de un componente residual no bloqueable por esta toxina. En esos mismos experimentos adicionamos, en forma secuencial, la toxina SNX-482 (1 μ M), bloqueante específico de los canales de tipo R, y observamos una reducción significativa del contenido cuántico residual. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 2.

En la figura 2A) el diagrama de barras muestra los resultados poblacionales obtenidos a partir de 3 músculos y 10-15 UNMs en cada uno. Los resultados que muestra el gráfico son de $30,45 \pm 2,07$ para ω -CgTx MVIIC y de $7,93 \pm 4,13$ para SNX-482. Se puede

observar claramente el bloqueo producido por SNX-482 sobre el contenido cuántico de músculos pretratados con ω -CgTx MVIIC (* $p < 0,05$). Es interesante notar que sigue existiendo un componente residual que no se bloquea con esta mezcla de toxinas (creemos que podría tratarse de un componente de canales de tipo "L" pero no obtuvimos datos conclusivos en ese sentido). En la figura 2B) se muestran trazos de registros representativos para cada una de las condiciones. Se puede observar que el bloqueante de los canales R, SNX-482, reduce la amplitud e incrementa la varianza de los EPPs respecto de los registros realizados con ω -CgTx MVIIC solamente. Tanto la disminución en los valores de amplitud de las respuestas como el incremento en su variación relativa indican una disminución del contenido cuántico.

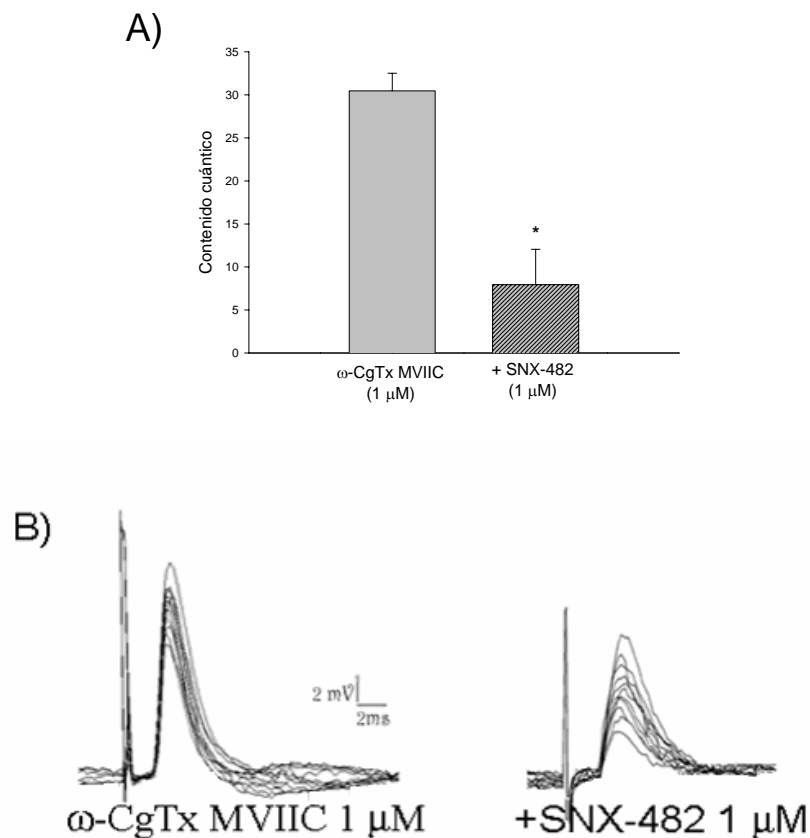


Figura 2: Efecto de la SNX-482 sobre la liberación neuralmente evocada en la UNM del LA de ratas controles. El efecto de la toxina se evalúa en

músculos preincubados con ω -Conotoxina MVIIC, bloqueante conjunto de canales N y P/Q. $\ast = p < 0.05$

Llegados a este punto nos interesó ahondar acerca de la proporción con que cada uno de estos tres canales (P/Q, N y R) participa en la liberación de las vesículas sinápticas en los terminales presinápticos del LA. Los experimentos consistieron en medir el contenido cuántico en condiciones controles (Ringer Normal, 2mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+}) adicionando d-tubocurarina (en concentraciones que fueron variando según las características de cada preparación) de modo tal que las respuestas postsinápticas fueran menores a los 10 mV para poder aplicar el método de la varianza y medir el contenido cuántico de la liberación. Luego se adicionó alguna de las tres toxinas (se aplicaron los bloqueantes de los canales $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ y $\text{Ca}_v2.3$ respectivamente) y se evaluó el valor del contenido cuántico remanente. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 3:

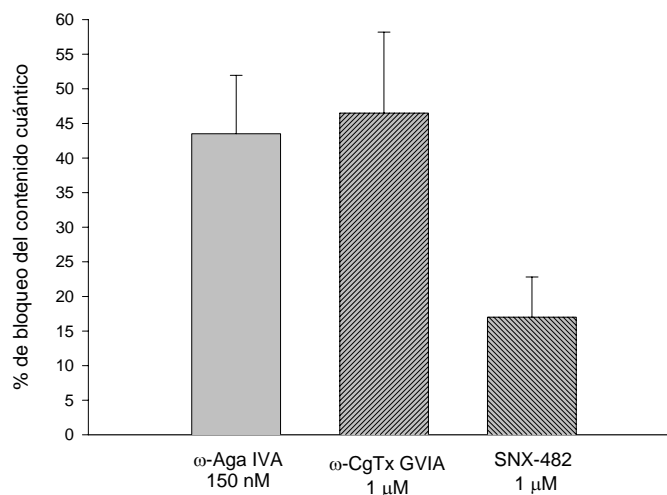


Figura 3: porcentaje de bloqueo del contenido cuántico por las toxinas ω -Agatoxina IVA, ω -Conotoxina GVIA y SNX-482 en UNMs del LA de ratas controles.

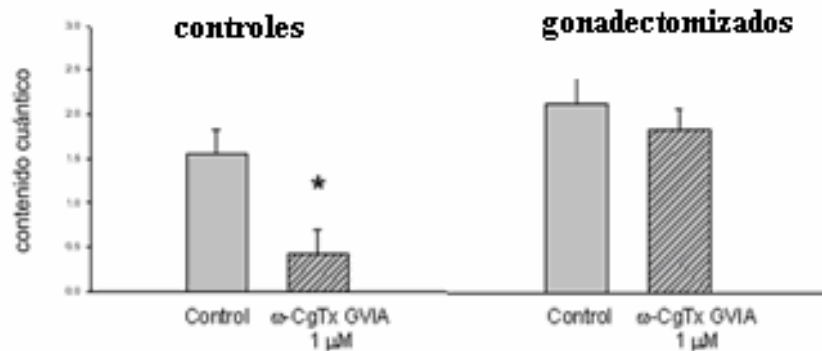
Los porcentajes de bloqueo obtenidos fueron los siguientes: 43,5 ± 8,45 % para la ω -Agatoxina IVA (4 músculos / 74 fibras); 46,5 ± 11,69 % para la ω -Conotoxina

GVIA (3 músculos / 56 fibras) y $17 \pm 5,8$ % para la SNX-482 (4 músculos / 78 fibras). La suma de los porcentajes de bloqueo es de 107 %, sorprendentemente cercana al 100%. Esto estaría indicando que los sitios activos a partir de los cuales se libera cada vesícula estarían constituidos por un solo tipo de canal. De no ser así, la suma de los bloqueos debería ser superior al 100%. Además esto también nos estaría indicando que la proporción de canales P/Q y N respecto del total sería aproximadamente similar (cercana al 45%) mientras que la de canales R sería mucho menor (cercana al 15%). Este tema será ampliado en la sección Discusión. Es bastante notorio que el canal N se esté expresando en una proporción similar al canal P/Q, siendo que en las sinapsis neuromusculares de mamíferos estudiadas hasta el momento el canal P/Q sostiene la totalidad de la liberación de neurotransmisor. Esto probablemente marca la influencia que estarían teniendo las hormonas esteroideas sobre la unión neuromuscular del LA, haciéndola diferente al resto de las uniones neuromusculares en este aspecto.

Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre la neurotransmisión evocada y espontánea del LA de ratas gonadectomizadas

El hecho de que las motoneuronas del SNB y el músculo LA sean altamente sensibles a la testosterona (Breedlove y Arnold, 1980; Krieg *et al.*, 1976) nos llevó a plantearnos la hipótesis de que la expresión de los canales $Ca_v2.2$ en esta UNM podría estar regulada por la testosterona plasmática. Para testear esta hipótesis, estudiamos la liberación de transmisor en la UNM del LA obtenido a partir de ratas macho gonadectomizadas. Como ya se explicó en la sección Materiales y Métodos, los animales fueron gonadectomizados a la edad de 11-13 días y estudiados entre los 60 y los 70 días. Los resultados obtenidos pueden ser observados en la Figura 4.

A)



B) Gonadectomizados

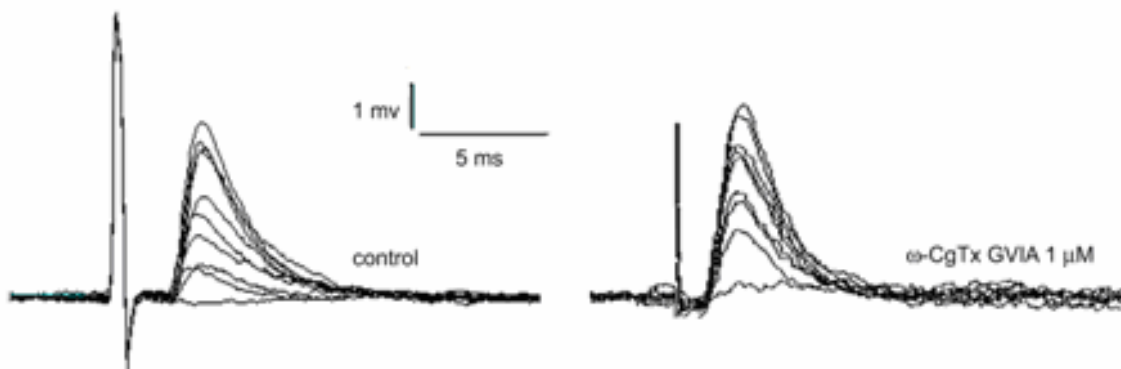


Figura 4: Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre la liberación neuralmente evocada en la UNM del LA de ratas castradas y de ratas controles.

*= $p < 0.05$

Como se observa en la Figura 4B) en la UNM del LA de ratas gonadectomizadas, ni el número de fallas ni la amplitud de los EPPs fueron modificados por la ω -CgTx GVIA. Al mismo tiempo (Figura 4A), en los animales "falsamente operados" (controles) la transmisión sináptica del LA fue sensible a la ω -CgTx GVIA. En dichos animales controles, los valores de contenido cuántico obtenidos antes y después de la aplicación de la toxina fueron de $1,56 \pm 0,3$ (3 músculos / 28

fibras) y de $0,42 \pm 0,3$ (3 músculos / 32 fibras) respectivamente, mientras que en los gonadectomizados fueron de $2,17 \pm 0,5$ (8 músculos / 83 fibras) y de $1,82 \pm 0,22$ (8 músculos / 86 fibras) respectivamente. Los resultados muestran que la gonadectomía conlleva una pérdida de la sensibilidad de la transmisión sináptica al bloqueo por ω -CgTx GVIA. Esto indica que en condiciones de muy bajas concentraciones de testosterona plasmática no habría, en la UNM del LA, una participación del canal $Ca_v2.2$ en la liberación de neurotransmisor.

Con respecto a la liberación espontánea de transmisor, nosotros observamos, al igual que Yamamoto *et al.* (1994) que la frecuencia de MEPPS se incrementó en los animales gonadectomizados. Los resultados obtenidos fueron de $22,1 \pm 7,08$ MEPPs/min (3 animales / 41 UNMs) en animales controles y de $50,1 \pm 0,9$ MEPPs/min (2 animales / 32 UNMs) en animales gonadectomizados, siendo la diferencia obtenida entre estos dos valores estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Por otra parte, evaluamos la *amplitud media* de los MEPPs y, en este caso, no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos de animales: los valores obtenidos fueron de $1,01 \pm 0,06$ mV ($n=2/9$) en los controles y de $1,04 \pm 0,02$ mV ($n=2/7$) en los gonadectomizados. Asimismo, la frecuencia de MEPPs no fue afectada por la ω -CgTx GVIA en ningún caso.

Efectos de la ω -CgTx GVIA sobre la liberación neuralmente evocada en el LA de ratas gonadectomizadas y tratadas crónicamente con testosterona

Para testear si la testosterona está involucrada en la regulación del acoplamiento funcional de los canales $Ca_v2.2$ a la liberación en la UNM del LA, las ratas gonadectomizadas fueron tratadas crónicamente con testosterona propionato (TP) tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. En los animales gonadectomizados, los niveles plasmáticos de testosterona fueron ampliamente

reducidos y restaurados en las ratas tratadas con TP, pero no en las tratadas con vehículo.

Los valores promedio de testosterona en muestras de sangre (medidos por el método de RadioInmunoEnsayo, como se menciona en la sección Materiales y Métodos) fueron los siguientes:

Condición del animal	ng/ml de suero (media \pm E.S.M.)
Normal	3,86 \pm 0,38
Gonadectomizado y tratado con vehículo	0,44 \pm 0,16
Gonadectomizado y tratado con TP	9,21 \pm 1,70

Tabla 1: valores promedio de testosterona en la sangre de ratas con distintos tratamientos hormonales (valores obtenidos con la técnica de RadioInmunoEnsayo).

Estos valores nos mostraron claramente que el tratamiento de restitución hormonal practicado fue correcto en el sentido de que logró sus objetivos principales: los animales gonadectomizados cayeron a niveles bajísimos de testosterona circulante (a un 11% respecto del valor normal), mientras que los tratados con TP mostraron niveles de testosterona que superaron incluso a los normales. El resultado ideal hubiera sido obtener niveles de testosterona similares a los controles en vez de superiores pero es muy difícil establecer un protocolo que logre esto. Nosotros consideramos que con el protocolo utilizado obtendríamos valores parecidos o superiores a los normales y ésta nos pareció la opción más apropiada: asegurarnos valores de testosterona suficientemente altos como para poder apreciar, de estar estos presentes, la existencia de efectos modulados por la hormona. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.

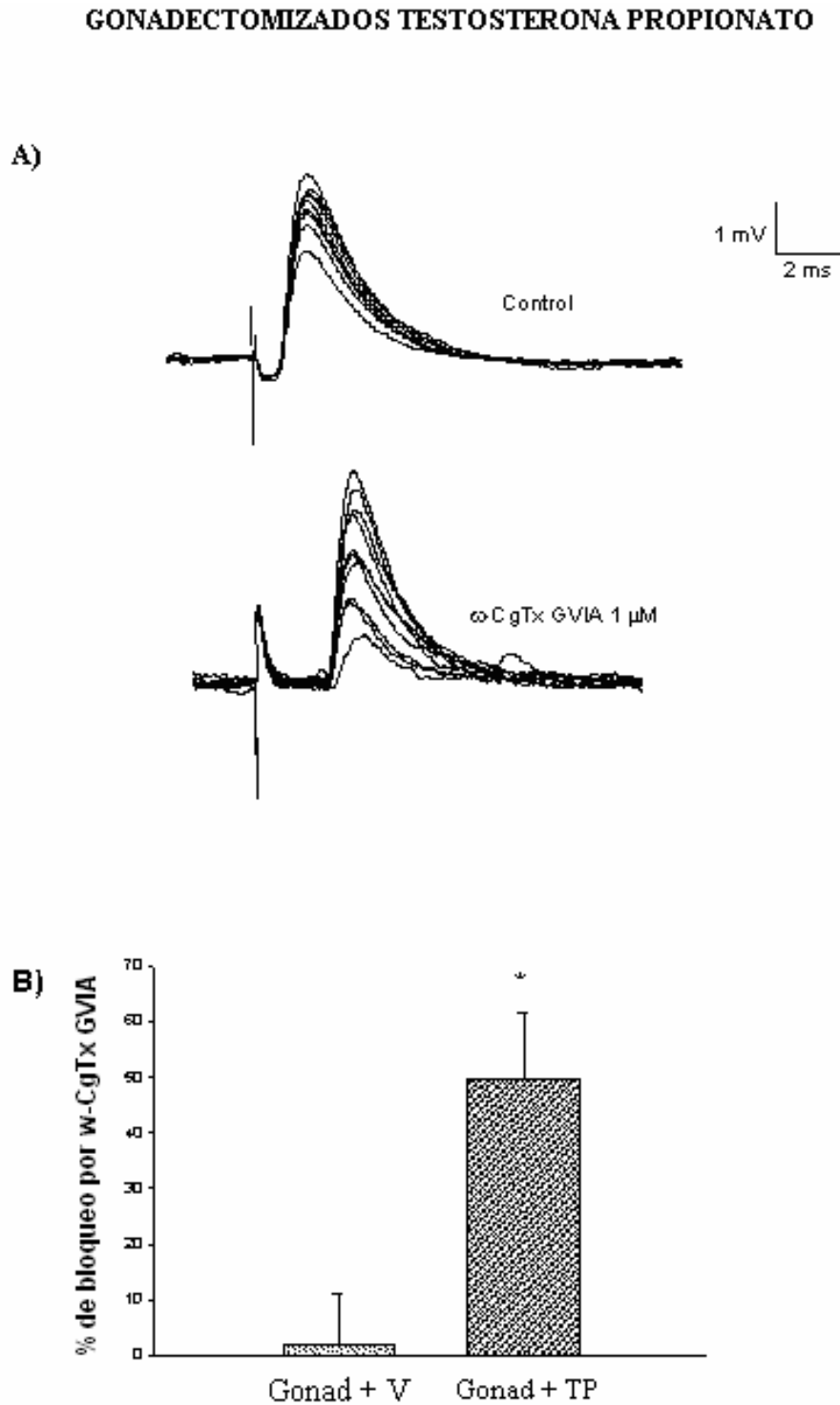


Figura 5: Efecto de la ω -CgTx GVIA sobre la liberación neuralmente evocada en la UNM del LA de ratas castradas y tratadas con testosterona propionato o con vehículo oleoso. *= $p < 0.05$

En la parte A) se muestran registros representativos de 100 estímulos sucesivos obtenidos a partir del LA de ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona propionato, antes y después de la aplicación de la ω -CgTx GVIA. En este caso los músculos se encuentran sumergidos en una solución que contiene 2 mM Ca^{2+} y 5 mM Mg^{2+} , concentraciones en las que la liberación de neurotransmisor está disminuída, no lo suficiente como para observar fallas frente a un estímulo, pero sí lo suficiente para observar una disminución en la amplitud de las respuestas y un aumento en la variabilidad de las respuestas frente a la aplicación de una toxina que produzca una disminución en la liberación de neurotransmisor (ver en sección Materiales y Métodos el método de la varianza para la estimación del contenido cuántico). En este ejemplo se puede notar cómo la toxina inhibe significativamente el contenido cuántico, ya que reduce la amplitud de los EPPs e incrementa significativamente la varianza de las respuestas.

En la figura 5B) el diagrama de barras muestra los resultados poblacionales (de los cuales se extrajo el ejemplo de la figura 5A) obtenidos a partir de 5 músculos y 12-15 UNMs en cada músculo. Se puede observar claramente el fuerte bloqueo producido por la toxina en los músculos de animales gonadectomizados y tratados con testosterona y la ausencia de efecto de la toxina en aquellos tratados con vehículo. (* $p < 0,05$).

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la testosterona es necesaria para un acoplamiento funcional de los canales de calcio de tipo N ($\text{Ca}_v2.2$) a la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA. La pregunta siguiente fue entonces si la testosterona estaría modulando la presencia misma de los canales N en la membrana presináptica (podría estar controlando su expresión a nivel génico o su direccionamiento hacia el terminal presináptico) o si sólo estaría modulando el acoplamiento funcional de estos canales a la liberación de transmisor sin controlar la

presencia del canal en la zona sináptica. Para responder esta pregunta realizamos estudios de inmunohistoquímica en la zona sináptica del levator ani y determinamos en forma semi-cuantitativa la cantidad relativa de canales $Ca_v2.2$ en cada una de las situaciones hormonales del grupo de animales (control, gonadectomizado, gonadectomizado y tratado con testosterona o tratado con vehículo). Los resultados se presentan en la siguiente sección.

Expresión de los canales $Ca_v2.2$ en las sinapsis del levator ani de ratas controles, gonadectomizadas o gonadectomizadas y tratadas con testosterona

La modulación de la sensibilidad a la ω -CgTx GVIA por la testosterona nos llevó a investigar si la expresión de la subunidad α_{1B} (subunidad principal del canal $Ca_v2.2$) se encuentra bajo el control de esta hormona. Para estudiarlo utilizamos anticuerpos policlonales específicos (anti-CNB2) con los que hicimos estudios inmunohistoquímicos sobre las uniones neuromusculares del levator ani de la manera en que se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos y la cuantificación de las marcas correspondientes se muestran en la figura 6. Para realizar estas tinciones se utilizaron secciones transversales de músculos LA en la zona de la placa neuromuscular. En la figura 6A) se realizó una doble tinción para marcar, por un lado (panel superior) a los receptores de acetilcolina (AChR) con Bungarotoxina rodaminada (BgTx-R) en **rojo** (a-d) y, por otro lado (panel intermedio) a la subunidad α_{1B} (de los canales de calcio de tipo N, $Ca_v2.2$) en **verde** (e-h).

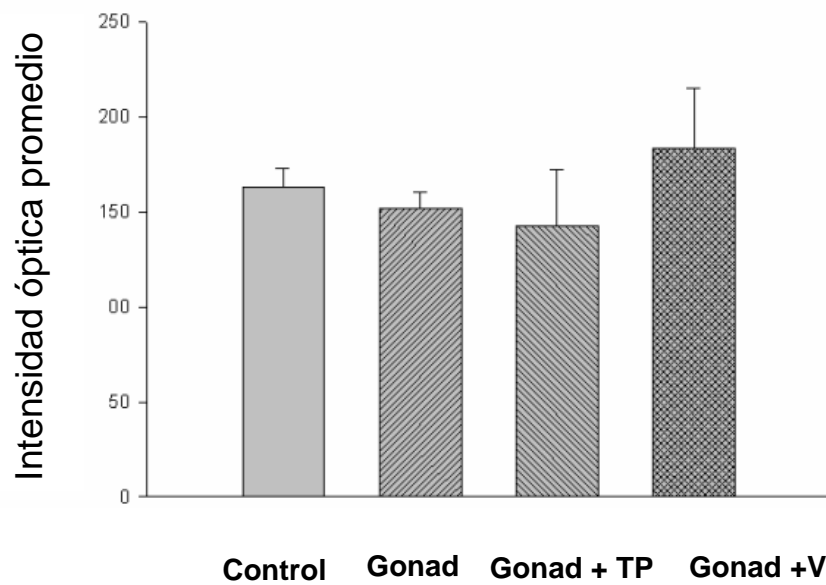
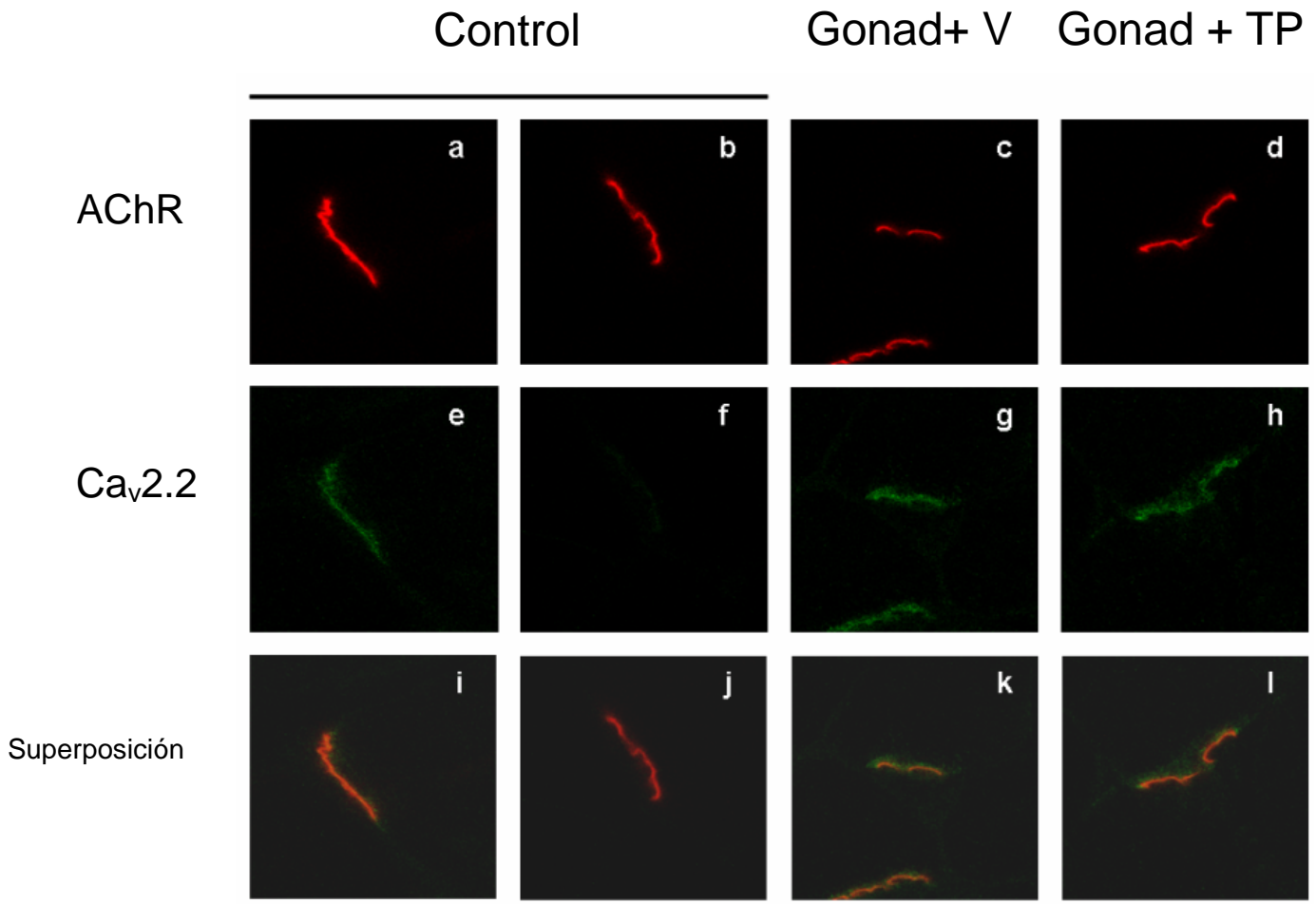


Figura 6: Inmunolocalización de los canales de tipo N ($Ca_v2.2$) en la UNM del LA de ratas en distintas condiciones hormonales y cuantificación de la marca obtenida.

Los músculos fueron obtenidos a partir de ratas controles (e,f); ratas gonadectomizadas y tratadas con vehículo (Gonad. + V) (c,g) y a partir de ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona propionato (Gonad. + TP) (d,h). En el recuadro f el anticuerpo anti-Ca_v2.2 fue preincubado con el "péptido antigénico" y, como se puede observar, el resultado fue una pérdida absoluta de la marca. Esto confirma la especificidad de las tinciones realizadas con el anticuerpo, ya que la exposición previa al epítipo que éste reconoce "secuestra" a las moléculas de anticuerpo dando como resultado la pérdida de marca.

En la parte inferior de la figura se puede observar la cuantificación de la marca obtenida utilizando el anticuerpo anti-Ca_v2.2 en los distintos grupos de animales: cada barra representa la media \pm E.S.M. medida en veinte a veinticinco sinapsis en tres animales diferentes a partir de tres experimentos independientes. En el gráfico se observa con claridad que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos (ANOVA de 1 factor, $p > 0,05$). Esto implica que, independientemente de la condición hormonal, la cantidad de canal N en la zona sináptica es básicamente invariable, y avala fuertemente la idea de que el efecto ejercido por la hormona sería de tipo modulatorio sobre la función del canal y no de tipo genómico: la hormona no estaría afectando su expresión génica. Estos mismos resultados también indicarían que la hormona no está afectando la localización del canal en la zona sináptica. Podemos hablar, entonces, de una modulación de la "expresión funcional" de los canales Ca_v2.2 por la testosterona en la UNM del LA.

Efecto de la SNX-482 sobre la neurotransmisión evocada del LA de ratas gonadectomizadas

Habiendo obtenido el resultado de la participación del canal R en la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA, nos interesó investigar si la actividad de estos

canales también podría estar modulada por la testosterona plasmática. Para estudiarlo utilizamos nuevamente animales de 50-70 días gonadectomizados a los 11-13 días de edad. Los resultados se muestran en el gráfico de la figura 7.

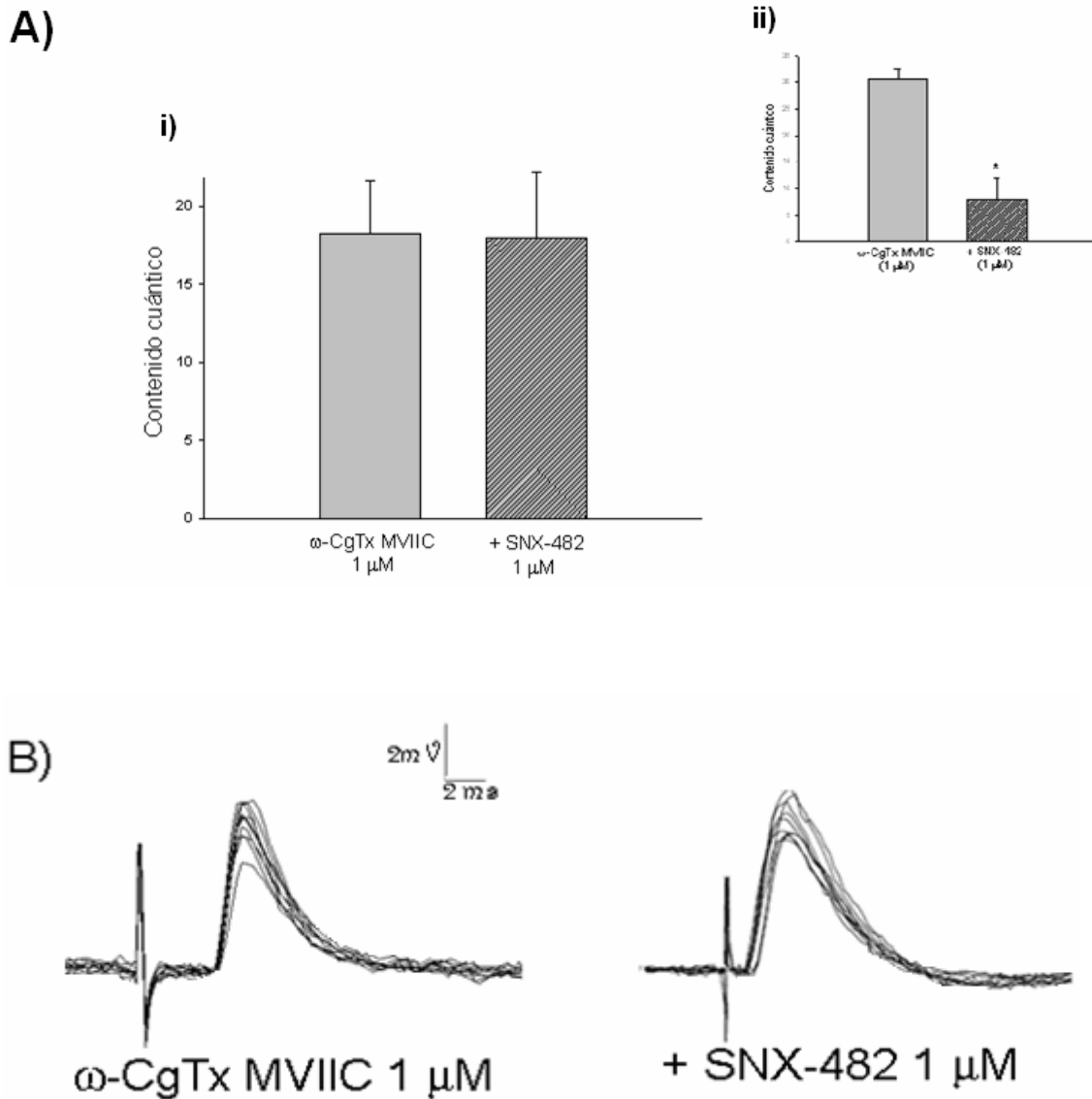


Figura 7: Efecto de la SNX-482 sobre la liberación neuralmente evocada en la UNM del LA de ratas gonadectomizadas. El efecto de la toxina se evalúa en músculos preincubados con ω -Conotoxina MVIIC, bloqueante conjunto de canales N y P/Q.

En la figura 7Ai) el diagrama de barras muestra los resultados poblacionales de contenido cuántico obtenidos a partir de 4 músculos y 25-30 UNMs en cada uno. Los resultados que ilustra el gráfico son de $18,22 \pm 3,36$ para ω -CgTx MVIIC y de $17,97 \pm 4,18$ para SNX-482. El inserto 7Aii) es una reproducción de la figura 2A) donde se mostraba el resultado para el LA control. Con esta figura compuesta queremos remarcar que el efecto que produce el bloqueante SNX-482 en el animal control se pierde por completo en el animal gonadectomizado, mostrando que la actividad del canal de tipo R también está siendo regulada hormonalmente. En la figura 7B) se muestran trazos de registros representativos para cada una de las condiciones. Se puede observar que el bloqueante de los canales R, SNX-482, aplicado en músculos pretratados con ω -CgTx MVIIC, no redujo la amplitud ni incrementó la varianza de los EPPs respecto de los registros realizados con ω -CgTx MVIIC sola. Tanto la estabilidad en los valores de amplitud de las respuestas como la similitud de su variación relativa indican que no hubo un cambio en los valores de contenido cuántico.

Nuevamente, al igual que lo mostrado para el canal $Ca_v2.2$, la testosterona parecería ser necesaria para que el canal $Ca_v2.3$ se halle acoplado a la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA.

Efectos de la SNX-482 sobre la liberación neuralmente evocada en el LA de ratas gonadectomizadas y tratadas crónicamente con testosterona

Para comprobar si es efectivamente la testosterona la que está causando este efecto, tratamos a los animales gonadectomizados con inyecciones de testosterona propionato subcutáneas (con idéntico protocolo al utilizado para el estudio del canal $Ca_v2.2$ descrito en la sección Materiales y Métodos). Medimos nuevamente el efecto de la toxina SNX-482 sobre UNMs del LA. En este caso el pretratamiento con ω -CgTx MVIIC no fue posible porque no contábamos en ese momento con disponibilidad de

dicha toxina en el laboratorio. Para intentar acercarnos a una condición experimental lo más parecida posible a aquella en donde sí utilizamos la toxina, subimos la concentración de Mg^{2+} extracelular: trabajamos en 2 mM Ca^{2+} / 5 mM Mg^{2+} para encontrarnos en una situación de menor probabilidad de liberación y poder apreciar mejor los efectos de la SNX-482 sobre el contenido cuántico si es que los hubiera. Los resultados se muestran en la figura 8.

Como se puede apreciar en la figura, la toxina SNX-482, bloqueante de los canales de tipo R, produce una disminución significativa del contenido cuántico en UNMs del LA de ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona propionato. Este efecto se había perdido con la gonadectomía y se recuperó con la sustitución exógena de la testosterona. Esto nos está indicando que, al igual que lo observado con el canal N, hay una modulación por testosterona de la funcionalidad de los canales R: en presencia de la hormona se encuentran funcionalmente acoplados a la liberación de neurotransmisor y en condiciones de niveles muy bajos de testosterona este acoplamiento se pierde. Los resultados que ilustra el gráfico son de $40,38 \pm 6,38$ para 2 mM Ca^{2+} / 5 mM Mg^{2+} y de $9,88 \pm 6,60$ para SNX-482 (en las mismas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+}).

Nuevamente, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la testosterona es necesaria para un acoplamiento funcional de los canales de calcio de tipo N ($Ca_v2.3$) a la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA. La pregunta siguiente fue, como en el caso del canal $Ca_v2.2$, si la testosterona estaría modulando la presencia misma de los canales R en la membrana presináptica (podría estar controlando su expresión a nivel génico o su direccionamiento hacia el terminal presináptico) o si sólo estaría modulando el acoplamiento funcional de estos canales a la liberación de transmisor sin controlar la presencia del canal en la zona sináptica.

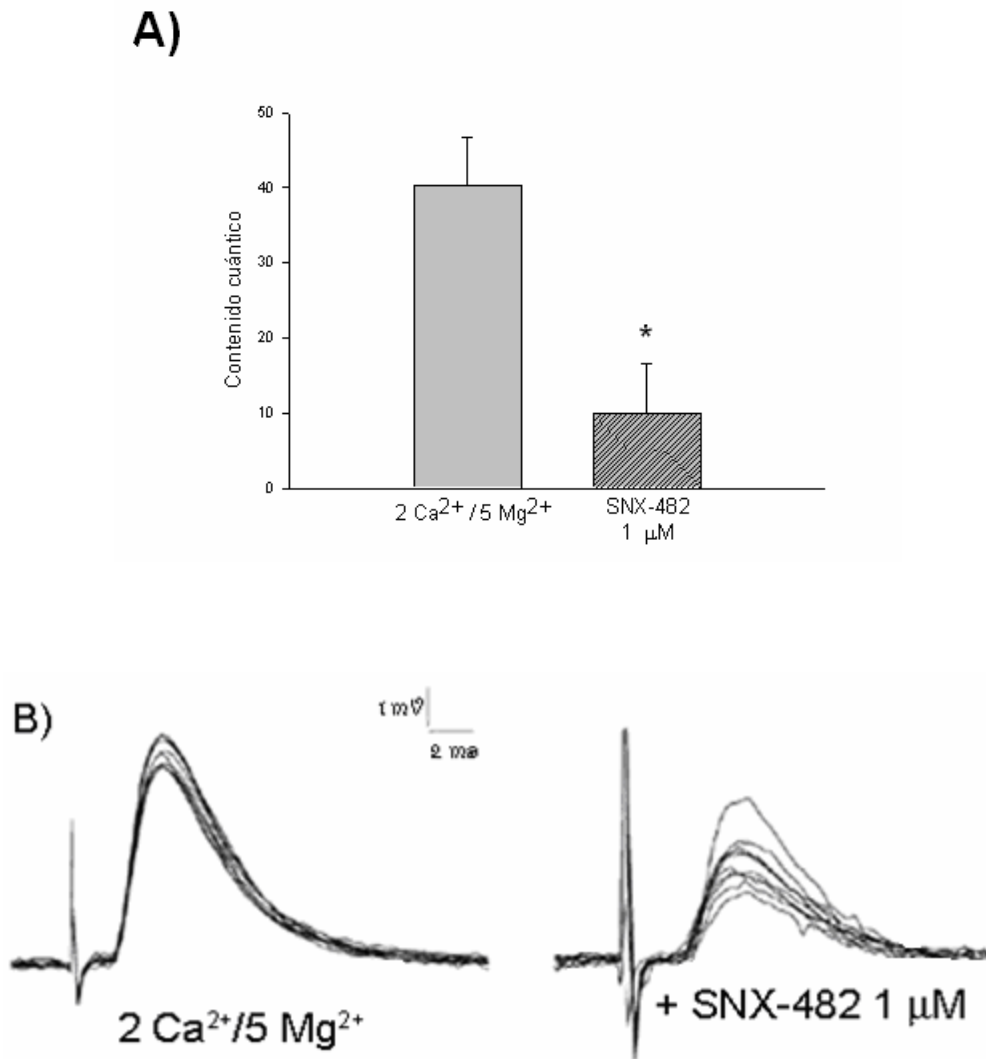


Figura 8: Efecto de la SNX-482 sobre la liberación neuralmente evocada en la UNM del LA de ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona propionato. *= $p < 0.05$

Para responder esta pregunta realizamos una vez más estudios de inmunohistoquímica en la zona sináptica del levator ani y determinamos en forma semi-cuantitativa la cantidad relativa de canales Ca_v2.3 en cada una de las situaciones hormonales del grupo de animales (control, gonadectomizado, gonadectomizado y tratado con testosterona o tratado con vehículo). Los resultados se presentan en la siguiente sección.

Expresión de los canales $Ca_v2.3$ en las sinapsis del levator ani de ratas controles, gonadectomizadas o gonadectomizadas y tratadas con testosterona

La modulación de la sensibilidad a la ω -CgTx GVIA por la testosterona nos llevó a investigar si la expresión de la subunidad α_{1E} (subunidad principal del canal $Ca_v2.3$) se encuentra bajo el control de esta hormona. Para estudiarlo utilizamos anticuerpos policlonales específicos (anti-CNE) con los que hicimos estudios inmunohistoquímicos sobre las uniones neuromusculares del levator ani de la manera en que se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos y la cuantificación de las marcas correspondientes se muestran en la figura 9. Para realizar estas tinciones se utilizaron secciones transversales de músculos LA en la zona de la placa neuromuscular.

En la figura 9A) se realizó una doble tinción para marcar, por un lado (panel superior) a los receptores de acetilcolina (AChR) con Bungarotoxina rodaminada (AChR) en **rojo** (a-d) y, por otro lado (panel intermedio) a la subunidad α_{1B} (de los canales de calcio de tipo N, $Ca_v2.3$) en **verde** (e-h). Los músculos fueron obtenidos a partir de ratas controles (e,f); ratas gonadectomizadas y tratadas con vehículo (GDX + V) (c,g) y a partir de ratas gonadectomizadas y tratadas con testosterona propionato (GDX + TP) (d,h). En el recuadro f el anticuerpo anti- $Ca_v2.3$ fue preincubado con el "péptido antigénico" y, como se puede observar, el resultado fue una pérdida absoluta de la marca. Esto confirma la especificidad de las tinciones realizadas con el anticuerpo, ya que la exposición previa al epítipo que éste reconoce "secuestra" a las moléculas de anticuerpo dando como resultado la pérdida de marca. En la última fila se muestra una superposición ("Merge") de ambos tipos de marcaciones: se puede observar que existe una superposición que da como resultado el color amarillo.

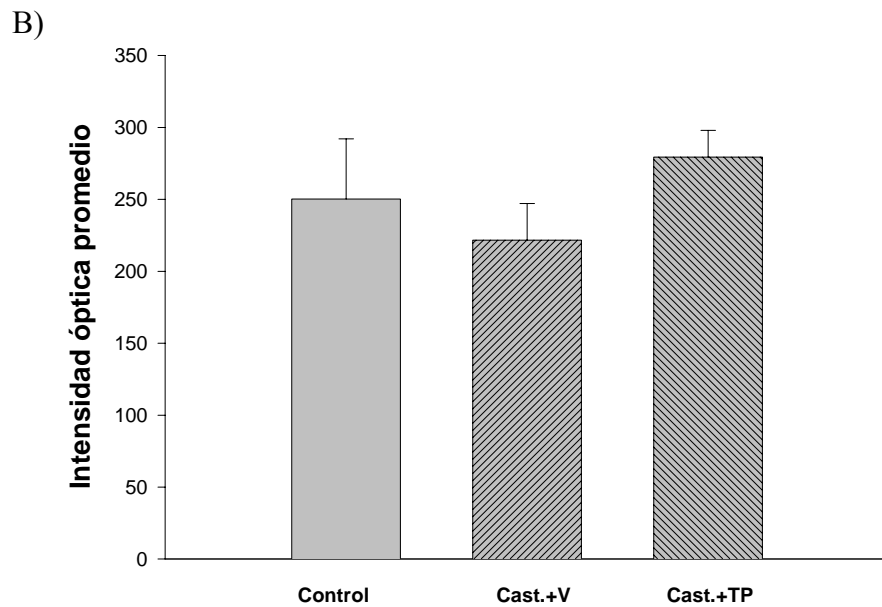
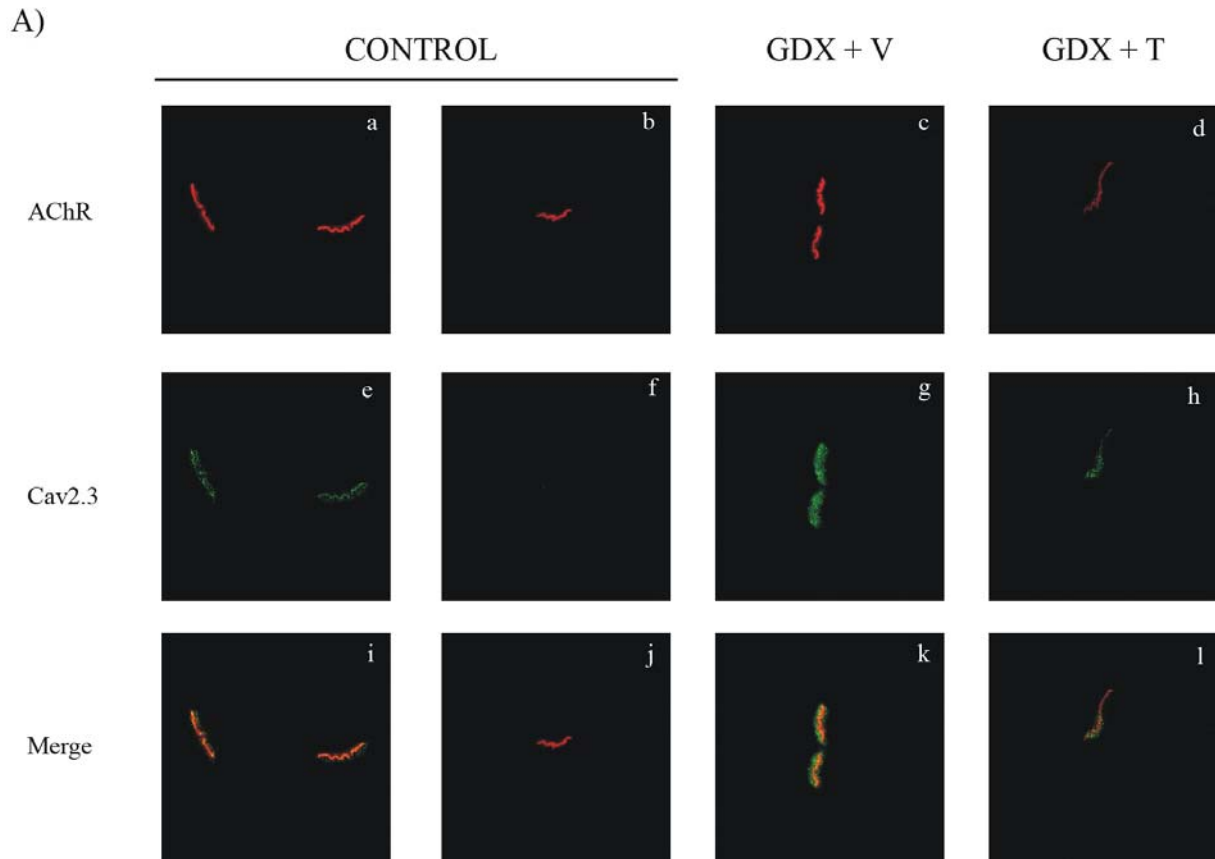


Figura 9: *Inmunolocalización de los canales de tipo R (Cav2.3) en la UNM del LA de ratas en distintas condiciones hormonales y cuantificación de la marca obtenida.*

En la parte inferior de la figura (9B) se puede observar la cuantificación de la marca obtenida utilizando el anticuerpo anti-Ca_v2.3 en los distintos grupos de animales: cada barra representa la media \pm E.S.M. medida en quince a dieciocho sinapsis en dos animales diferentes a partir de dos experimentos independientes. En el gráfico se observa con claridad que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos (ANOVA de 1 factor, $p > 0,05$). Esto implica que, independientemente de la condición hormonal, la cantidad de canal R en la zona sináptica es básicamente invariable, y avala fuertemente la idea de que el efecto ejercido por la hormona sería de tipo modulatorio sobre la función del canal y no de tipo genómico: al igual que lo indicado para el canal N, la hormona no estaría afectando su expresión génica. Estos mismos resultados también indicarían que la hormona no está afectando la localización del canal en la zona sináptica. Podemos hablar, entonces, de una modulación de la "expresión funcional" de los canales Ca_v2.3 por la testosterona en la UNM del LA.

Lo que no podemos descartar de ningún modo es que la testosterona esté ejerciendo su efecto mediante la regulación génica de la expresión de alguna proteína vinculada con la actividad de los canales de tipo N y R en la UNM del LA. Esta hipotética proteína podría estar facilitando, de alguna determinada manera, la actividad sináptica de estos canales.

Inhibición por adenosina de la liberación de neurotransmisor en la UNM

Uno de los mecanismos más conspicuos de control de la liberación de neurotransmisor, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, es su modulación por autoreceptores presinápticos: éstos son receptores específicos de membrana, situados en el terminal presináptico, que responden a la liberación del neurotransmisor con la misma eficacia y afinidad que los receptores postsinápticos. El resultado de este mecanismo es la autorregulación de la liberación del neurotransmisor

con el fin de que la comunicación neuronal sea eficaz, ajustada y esté adecuada a los niveles de excitabilidad que han provocado los potenciales de acción en los terminales presinápticos. Sin embargo, los autorreceptores, a diferencia de los receptores postsinápticos, no controlan canales iónicos, sino receptores acoplados a proteínas G que regulan la liberación de neurotransmisor a través de mecanismos que involucran la participación de segundos mensajeros. Normalmente su control es por retroalimentación y su activación favorece mecanismos de inhibición presináptica, aunque también existen los autorreceptores que producen un aumento en la excitación presináptica.

En la sinapsis neuromuscular las vesículas presinápticas coliberan acetilcolina junto con cantidades similares de ATP. Este ATP se transforma en adenosina en la hendidura sináptica y ésta inhibe la posterior liberación de neurotransmisor vía una proteína G sensible a toxina pertussis (Dolphin, 1995; Dolphin y Prestwich, 1985).

Inhibición por adenosina de la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA

Buscando los posibles mecanismos por los cuales la testosterona podría estar regulando el acoplamiento a la liberación de los canales N y R en la sinapsis neuromuscular del LA se nos ocurrió la posibilidad de que el mecanismo de inhibición por adenosina pudiera estar influenciado de alguna manera por la hormona. Esto surgió a partir de un antecedente bibliográfico del año 2003 de Schwartz *et al* .donde se reporta que en la unión neuromuscular del diafragma de rata existe una corriente de calcio de tipo N que es inhibida en forma basal por la adenosina y que nunca llega a ser efectiva para la liberación de neurotransmisor debido a esta inhibición. La pregunta que nos planteamos fue, entonces, si la unión neuromuscular de roedores no expresaría constitutivamente el canal de tipo N pero que éste se ve funcionalmente inhibido por el potente bloqueo de la

adenosina. La peculiaridad del levator ani podría pasar porque la testosterona, a través de un mecanismo desconocido, estaría liberando de esta inhibición a los canales.

Lo primero que testamos fue si la adenosina tenía algún efecto inhibitorio sobre la transmisión sináptica en la UNM del LA. Los resultados se ilustran en la figura 10.

En la figura 10 el diagrama de barras de la izquierda muestra el resultado obtenido para un músculo (26 UNMs) con valores de contenido cuántico de $77,43 \pm 12,63$ en la situación control y de $41,05 \pm 5,31$ luego del tratamiento con adenosina 0,25 mM. Por problemas experimentales (los potenciales postsinápticos excedieron los 10 mV y esto nos impidió aplicar la fórmula de la varianza para estimar el contenido cuántico) el otro experimento, ilustrado en el diagrama de la derecha de la misma figura, muestra el resultado obtenido de amplitudes postsinápticas relativizadas a -70 mV.

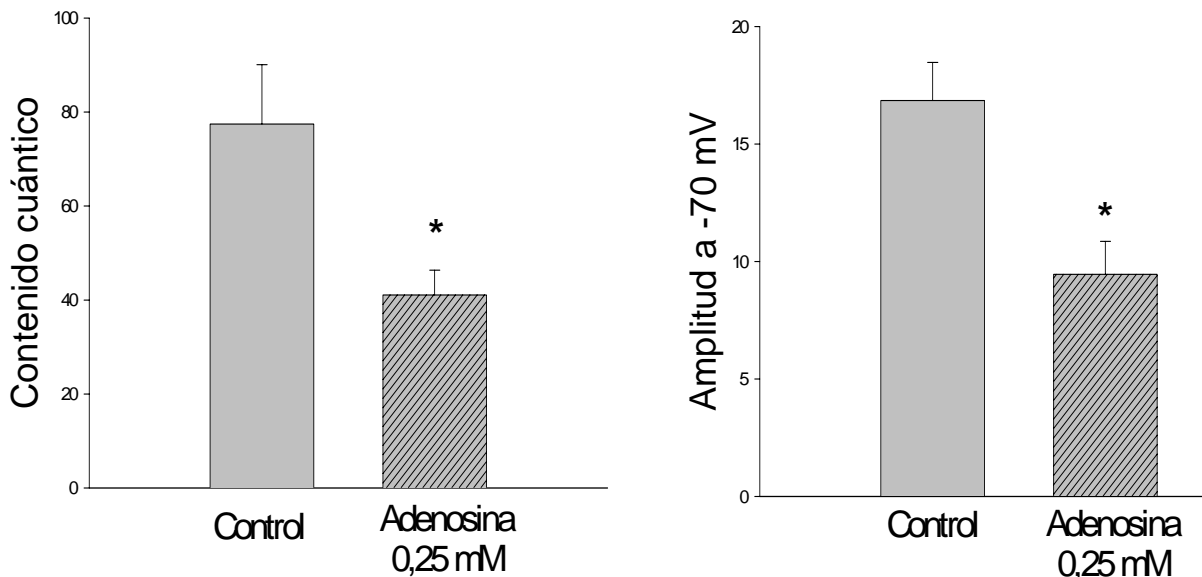


Figura 10: Efecto de la adenosina (0,25 mM) sobre la liberación de neurotransmisor en la UNM del LA de ratas controles. *= $p < 0.05$

Estos fueron de $16,85 \pm 1,62$ para el control y de $9,45 \pm 1,40$ para el tratamiento con adenosina (en este músculo se registraron un total de 24 UNMs). Ambos resultados representan un decrecimiento significativo de la liberación ($p < 0.05$) luego de la aplicación de la adenosina. Esto implica que el efecto inhibitorio de la adenosina se conserva en esta unión neuromuscular, a semejanza de lo que sucede en las uniones neuromusculares de mamíferos estudiadas en la bibliografía.

Lo interesante luego de esta primera aproximación al estudio de los efectos de la adenosina sobre el levator ani, fue discriminar si este efecto inhibitorio se debe a la acción del nucleósido sobre los componentes de la liberación asociados a los componentes N y R o sólo a una acción sobre el canal P/Q. Para ello estudiamos el efecto de la adenosina sobre músculos pre-tratados con ω -Agatoxina IVA 150 nM, que tienen, por ende, la corriente de calcio P/Q inhibida. Los resultados se ilustran en la fig.11.

En la figura 11 el diagrama de barras muestra los resultados poblacionales de contenido cuántico a partir de 2 músculos y 25-30 UNMs en cada uno. Los promedios que ilustra el gráfico son de $22,61 \pm 3,93$ para ω -Agatoxina IVA 150 nM y de $41,95 \pm 5,25$ para ω -Agatoxina IVA 150 nM + Adenosina 0,25 mM.

Los resultados son sorprendentes. En ausencia de actividad del canal P/Q la liberación no se encuentra inhibida por adenosina. Esto implicaría que, en la UNM del LA, ni los canales N ni los canales R resultan inhibidos por adenosina. Se observa, en cambio, un aumento significativo del contenido cuántico que podría explicarse por la activación de los receptores excitatorios de adenosina de tipo A_2 que sí estarían asociados a estos canales. Esto estaría indicando que la liberación sustentada por el canal P/Q conserva la sensibilidad al bloqueo por adenosina observada en otras sinapsis neuromusculares y centrales.

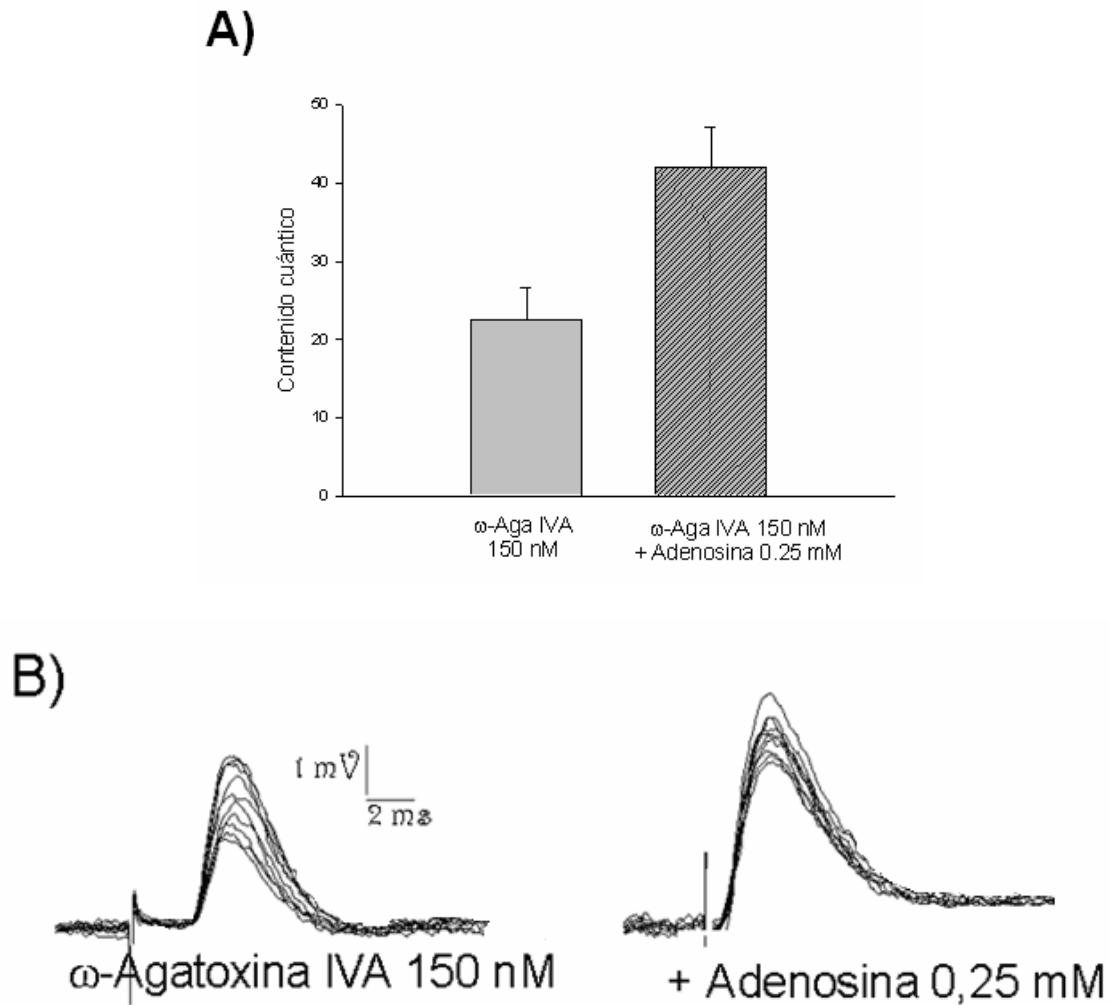


Figura 11: Efecto de la adenosina (0,25 mM) sobre el contenido cuántico en la UNM del LA de ratas controles en preparaciones pre-tratadas con ω -Agatoxina IVA (150 nM).

En un trabajo de Silinsky del año 2004 se demuestra, mediante el registro de corrientes de calcio perineurales, cómo la adenosina bloquea a la corriente de calcio de tipo P/Q de manera directa disminuyendo de esta manera la liberación de neurotransmisor. Esta aclaración viene a cuenta de que el efecto inhibitorio de la adenosina no tiene por qué ser necesariamente sobre la corriente de calcio en sí misma sino que puede producirse

sobre algún elemento de la maquinaria exocitótica. De hecho, en la unión neuromuscular de rana, la liberación de neurotransmisor es sostenida por canales de tipo N exclusivamente y en dicha preparación se ha demostrado que el efecto inhibitorio de la adenosina no se ejerce a través de una inhibición de la corriente de calcio (Silinsky y Solsona, 1992).

En dicho trabajo se propone que la inhibición de la liberación ejercida por la adenosina a partir de los terminales nerviosos motores de rana no es una consecuencia de alteraciones en la entrada de Ca^{2+} , sino que estos efectos inhibitorios se producirían por la acción de la adenosina sobre un sitio blanco ubicado "río abajo" de la corriente de calcio en el proceso exocitótico.

Para comprobar los resultados obtenidos de falta de inhibición de los componentes de liberación asociados a las corrientes de tipo N y de tipo R, hicimos experimentos sobre UNMs controles pre-bloqueadas con el ω -Agatoxina IVA 200 nM sobre los que medimos el efecto del inhibidor del receptor excitatorio de adenosina, el receptor del subtipo A_1 . De existir algún efecto de la adenosina sobre los canales N y/o R, la presencia del inhibidor del receptor inhibitorio de adenosina debería dar por resultado un aumento significativo del contenido cuántico. Los resultados se ilustran en la fig. 12.

En la figura 12 el diagrama de barras muestra los resultados poblacionales a partir de músculos y 75 UNMs en total. Al aplicar el DPCPX se obtiene un contenido cuántico que representa el $0,86 \pm 0,15$ % del control, lo que representa una diferencia no significativa con el $1 \pm 0,13$ % del control sin DPCPX ($p > 0,05$).

El resultado obtenido en la fig. 12 es coherente con el de la fig.11 y reafirma la falta de efecto inhibitorio de la adenosina sobre los componentes N y R en la UNM del LA: cuando se elimina la corriente de calcio P/Q no hay inhibición del contenido

cuántico por adenosina y tampoco hay un aumento del mismo cuando se inhibe al receptor inhibitorio de adenosina.

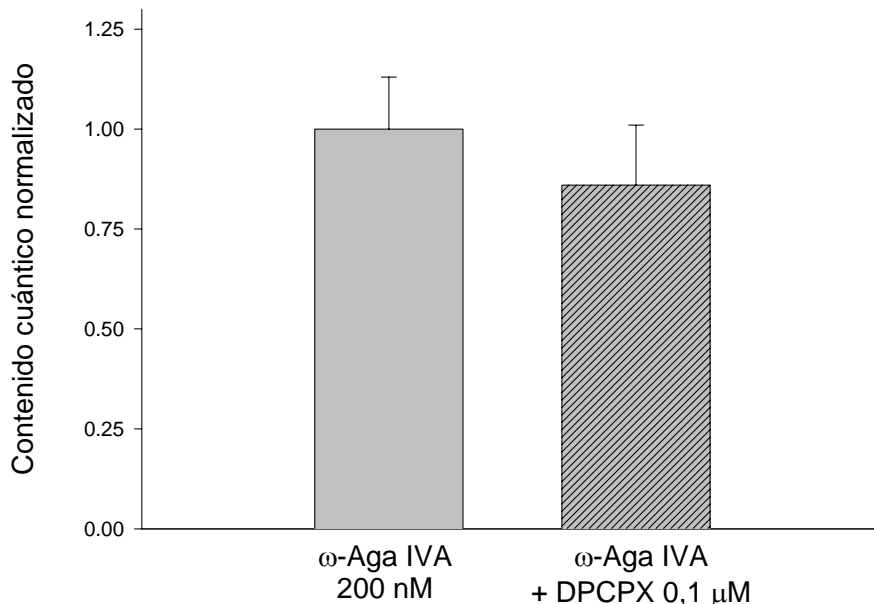


Figura 12: Efecto del antagonista de adenosina, DPCPX (0,1 μM) sobre el contenido cuántico normalizado en la UNM del LA de ratas controles en preparaciones pre-tratadas con ω-Agatoxina IVA (200 nM).

Finalmente, realizamos experimentos sobre la UNM del LA de ratas castradas adicionando el inhibidor del receptor de adenosina DPCPX (0,1 μM) y viendo si esto permite "recuperar" el componente de la liberación ligado al canal N (adicionamos desde el comienzo ω-Agatoxina IVA 200 nM para eliminar el componente P/Q y poder evaluar más claramente al componente N). Los resultados se ilustran en la figura 13. El diagrama de barras de la figura muestra los resultados poblacionales obtenidos a partir de un n=4 músculos y 92 UNMs en total. No se observan diferencias significativas entre las columnas de la izquierda y de la derecha ($p > 0,05$).

El resultado obtenido en la fig.13 muestra que en ausencia de testosterona, la inhibición del receptor inhibitorio de adenosina no resulta suficiente para acoplar al canal N a la liberación de neurotransmisor. En la sección Discusión volveremos sobre

estos resultados para analizar qué significan en relación a nuestra hipótesis de una acción de la testosterona sobre el receptor de adenosina.

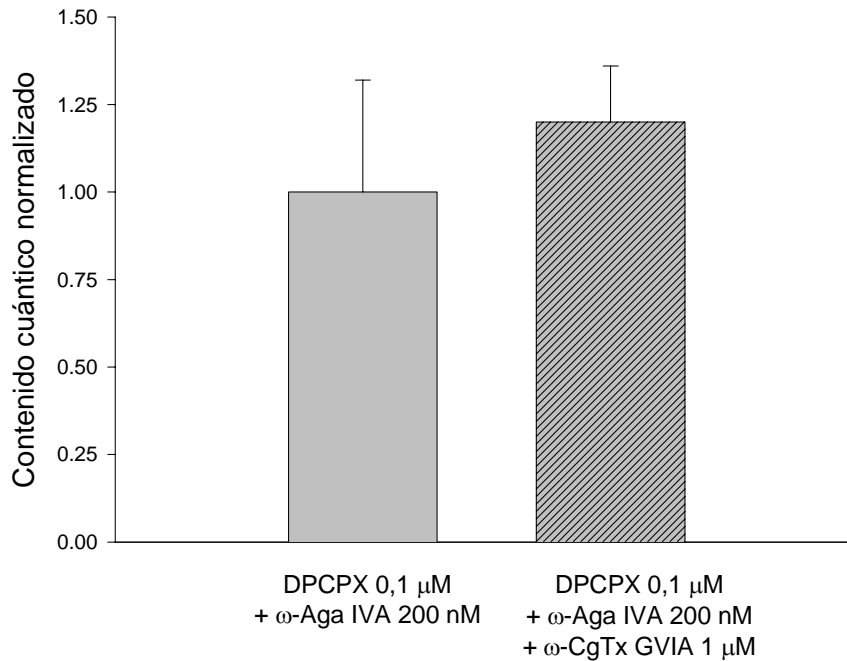


Figura 13: Efecto del bloqueante ω -CgTx GVIA (1 μ M) sobre el contenido cuántico normalizado en la UNM del LA de ratas castradas en preparaciones tratadas con ω -Agatoxina IVA (200 nM) y con DPCPX 0,1 μ M.

Efecto de la adenosina sobre la transmisión neuromuscular en la sinapsis del diafragma de los ratones α_{1A} (-/-) (carentes del canal P/Q)

En vista de los resultados hasta aquí obtenidos nos preguntamos si la falta de inhibición por adenosina de la liberación sustentada por los canales de tipo N y de tipo R se trataría de una particularidad de la UNM del levator ani (y, muy probablemente, de un efecto de la testosterona) o si también se observaría en alguna otra sinapsis neuromuscular de mamíferos en donde estos canales cumplieran funciones en el proceso excitotónico. Como ya se ha mencionado en la Introducción, hay una importante cantidad de sinapsis de roedores, tanto periféricas como centrales, en las cuales se observaron

efectos inhibitorios de la adenosina sobre corrientes de Ca^{2+} de tipo N (por ej., ver Huang *et al.*, 2004; Manita *et al.*, 2004; Rebola *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2001). Con respecto a una inhibición adenosinérgica de corrientes de calcio de tipo R, en la literatura hemos encontrado un solo trabajo (Vacas *et al.*, 2003), realizado sobre células grano del cerebelo.

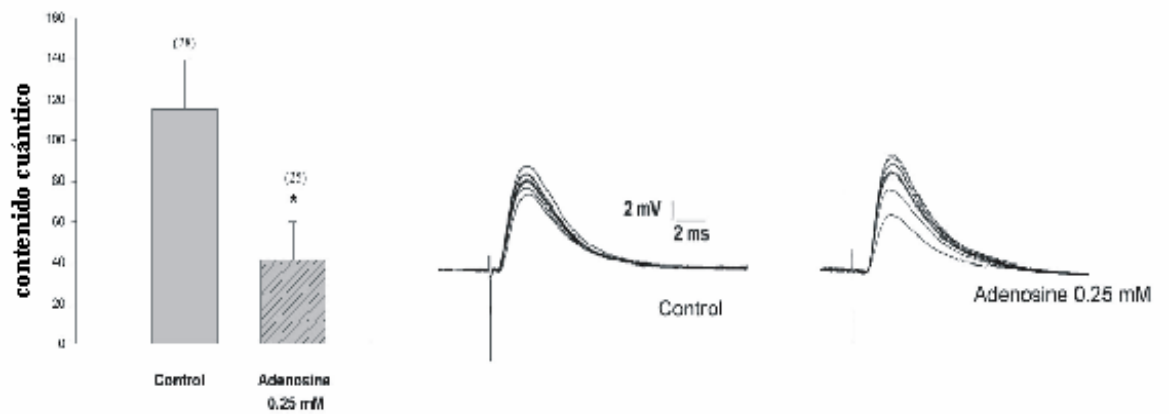
Por todo lo mencionado, en particular respecto de la ampliamente descripta inhibición adenosinérgica del canal N, la falta de inhibición observada en la UNM del LA podría tratarse de una peculiaridad presentada por las sinapsis neuromusculares. En este sentido es sugestivo que en la UNM de rana el canal N tampoco sea inhibido por adenosina a pesar de que el nucleósido conserva su rol como inhibidor de la neurotransmisión. De tratarse de un fenómeno dependiente del tipo de sinapsis, esto descartaría la idea de que la testosterona sea la responsable del fenómeno observado en el LA. Para poder testear esta hipótesis en alguna unión neuromuscular de mamíferos era necesario entonces contar con alguna que liberara el neurotransmisor a partir de corrientes de calcio de tipo N y/o R. Como ya sabíamos por estudios previos de nuestro laboratorio y de otros, las UNMs de mamíferos adultos normales (exceptuando la descripta en esta tesis) sustentan la liberación de neurotransmisor por la entrada de calcio exclusivamente a través del canal de tipo P/Q y esto no nos permitía poner a prueba la hipótesis. Afortunadamente, en nuestro laboratorio disponemos de ratones transgénicos que carecen completamente del canal P/Q, en los que su fisiología ha desarrollado una compensación de la ausencia de este canal reemplazándolo por otros. En la UNM de estos animales, la liberación de neurotransmisor es sustentada por canales de calcio de tipo $\text{Ca}_v2.2$ (N) y de tipo $\text{Ca}_v2.3$ (R), como se describe en el trabajo de Urbano *et al.* (2002).

Así se nos presentó la posibilidad de estudiar la acción de la adenosina sobre el diafragma de estos animales, una UNM que sustenta su liberación en la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio de tipo N y de tipo R. Para que este estudio tuviera validez comparativa con el estudio sobre UNM de animales no alterados genómicamente, tuvimos en cuenta el hecho de que la actividad exo/endocitótica en las UNMs del animal transgénico son funcionales y que su morfología general (si bien sus terminales nerviosos son un poco menores en tamaño) no presenta diferencias importantes con la morfología normal. Estudiamos el efecto inhibitorio de la adenosina sobre el diafragma de los animales "wild type" (controles) y sobre el diafragma de los animales "knock out" (KO). La liberación de neurotransmisor en los animales controles se produce (como ya se ha mencionado en la Introducción) a partir de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de tipo P/Q exclusivamente. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos para ambos genotipos.

En la figura 13A) el diagrama de barras de la izquierda muestra los valores de contenido cuántico obtenidos en solución salina normal antes y después del tratamiento con 0,25 mM de adenosina en UNM de diafragmas WT. Cada columna representa la media \pm error standard de la media de los datos reunidos a partir de 3 preparaciones neuromusculares (los números entre paréntesis son la cantidad de placas neuromusculares estudiadas). La adenosina redujo significativamente ($p < 0,05$) el contenido cuántico al 36% del valor control. A la derecha se muestran registros representativos obtenidos a partir de una unión neuromuscular estimulada 100 veces a una frecuencia de 1 Hz antes (control) y después (adenosine 0.25 mM) del tratamiento con adenosina. La droga redujo la amplitud e incrementó la varianza de los EPPs respecto de los registros controles.

En la figura 13B) se muestran los resultados obtenidos para el KO realizados de la misma manera que para los WT en A). La adenosina redujo significativamente ($p < 0,05$) el contenido cuántico al 23% del valor control. La droga nuevamente redujo la amplitud e incrementó la varianza de los EPPs respecto de los registros controles.

A) WT



B) KO

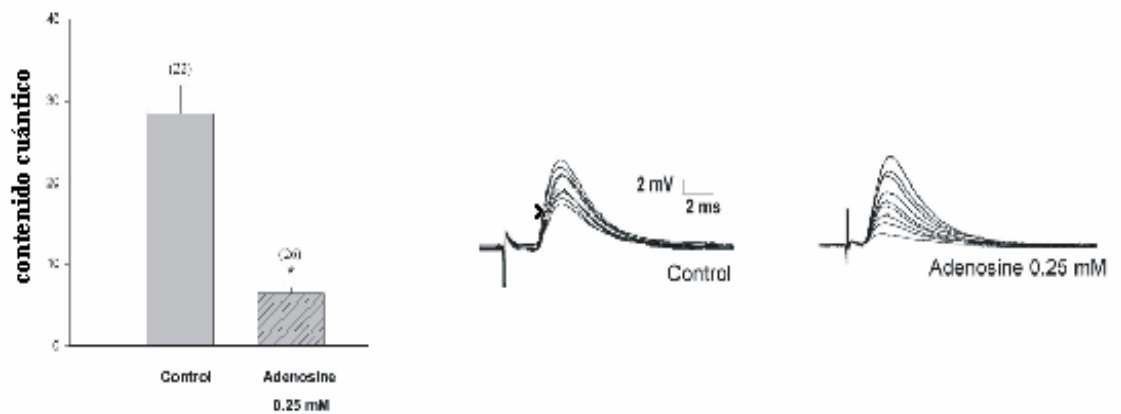


Figura 13: Efecto de la adenosina (0,25 mM) sobre el contenido cuántico en la UNM del diafragma de ratones WT (A) o KO α_{1A} (-/-) (carecientes del canal P/Q) (B).

Habiendo obtenido los resultados de la figura 13 nos aseguramos que en la UNM de los ratones WT de la cepa particular con que trabajamos el sistema de inhibición por adenosina funcionara con normalidad. Por otra parte, en el KO, pudimos observar que al menos uno de los dos canales de calcio (o ambos) que sustentan la liberación es bloqueable por adenosina. Lo interesante en este punto fue, entonces, realizar una "disección" del efecto de la adenosina: ¿estaría actuando sobre la liberación evocada por los canales N, por los canales R o sobre ambas? Para responder esta pregunta realizamos los siguientes experimentos: bloqueamos a la corriente N con ω -CgTx GVIA (1 μ M) antes de adicionar la adenosina (0,25 mM) y observar su efecto. Inversamente, bloqueamos a la corriente R con SNX-482 (1 μ M) y volvimos a estudiar el efecto de la adenosina.

En la figura 14A) el diagrama de barras de la izquierda muestra los valores de contenido cuántico obtenidos luego del tratamiento con ω -CgTx GVIA 1 μ M y el de la derecha suma la adición de 0,25 mM de adenosina. Cada columna representa la media \pm error standard de la media de los datos reunidos a partir de 3 preparaciones neuromusculares de diafragmas KO (los números entre paréntesis son la cantidad de placas neuromusculares estudiadas). Los valores obtenidos son de $10,24 \pm 2,85$ para ω -CgTx GVIA y de $9,02 \pm 3,23$ para ω -CgTx GVIA + adenosina.

En la figura 14B) el diagrama de barras de la izquierda muestra los valores de contenido cuántico obtenidos luego del tratamiento con SNX-482 1 μ M y el de la derecha suma la adición de 0,25 mM de adenosina. Los valores obtenidos son de $26,1 \pm 6,58$ para ω -CgTx GVIA y de $8,74 \pm 4,75$ para ω -CgTx GVIA + adenosina. $*=p<0,05$.

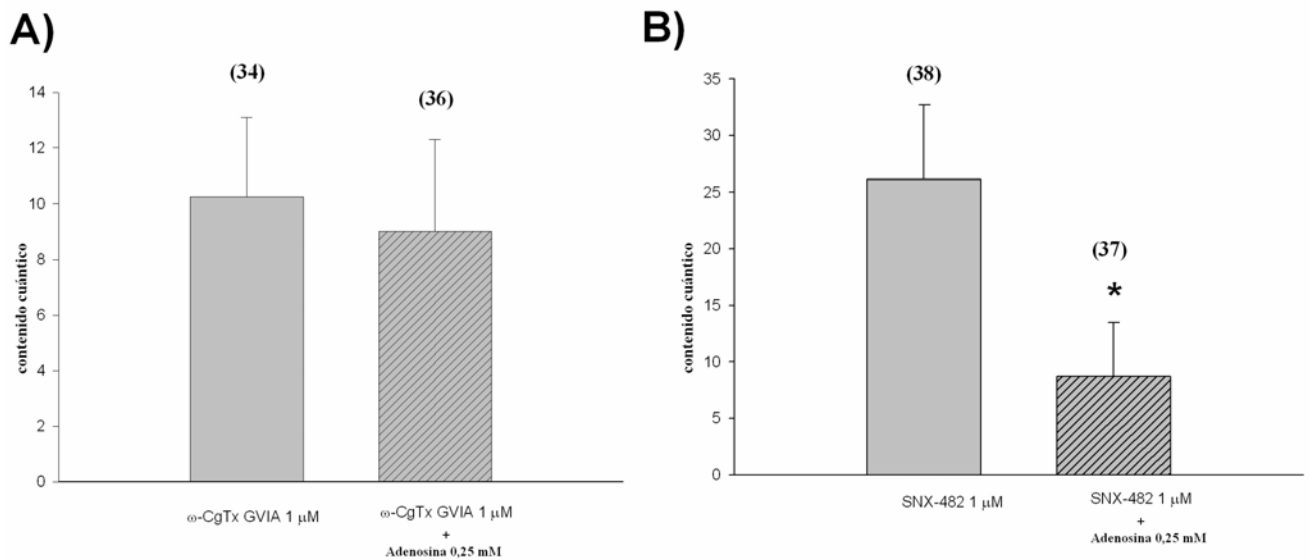


Figura 14: Efecto de la adenosina (0,25 mM) sobre el contenido cuántico en la UNM del diafragma de ratones KO bloqueada con ω -CgTx GVIA (A) o con SNX-482 (B).

Como se puede ver en la Figura 14, estando bloqueada la corriente de tipo N la adenosina no tiene ningún efecto. Por el contrario, bloqueando a la corriente R observamos un efecto de la adenosina: un bloqueo del contenido cuántico estadísticamente significativo de aprox. el 65%. Esto estaría indicando que sólo el canal de tipo N es sensible al bloqueo por adenosina en esta preparación, mientras que el canal R no lo es.

Estos resultados nos estarían indicando que no hay ningún impedimento "intrínseco" en las sinapsis neuromusculares para que el canal N (por ejemplo) sea inhibido por la adenosina. Ampliaremos este punto en la sección Discusión.

Discusión

DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra una modulación positiva de la testosterona sobre la participación de los canales de calcio de tipo N ($Ca_v2.2$) y de tipo R ($Ca_v2.3$) en la liberación de neurotransmisor en la sinapsis neuromuscular del levator ani (LA): en ausencia de la hormona esta participación se pierde: la unión neuromuscular (UNM) del LA de ratas gonadectomizadas no posee una sensibilidad a los bloqueantes de los CCDV de tipo N o de tipo R. Sin embargo, tratando a las ratas gonadectomizadas con inyecciones periódicas de testosterona, hemos podido observar la recuperación de la participación de estos canales en la neurotransmisión del LA.

La forma históricamente más conocida y más ampliamente estudiada de acción de la testosterona sobre una proteína es su acción como reguladora de la transcripción de los genes que codifican para dicha proteína. Aquí introducimos brevemente los conocimientos que se poseen hasta el presente sobre la regulación de la expresión génica de canales de calcio por andrógenos.

Regulación de la expresión de canales de calcio por andrógenos

Los andrógenos modulan la expresión génica por medio del clásico receptor nuclear de andrógenos: éste es una proteína de aproximadamente 110 kDa que contiene varios dominios para: la unión del ligando (andrógenos), la transactivación, la unión al ADN, la localización nuclear y la dimerización (revisiones: ver Leppa *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1995 y Quigley *et al.*, 1995).

Se conocen acciones de activación transcripcional de la subunidad principal de canales de calcio a través de los receptores intracelulares clásicos de andrógenos: por ejemplo, la testosterona endógena incrementa la expresión de los canales de calcio de tipo L **en músculo liso de corazón porcino**: la evidencia indica que el género y la condición hormonal sexual influyen la fisiología y la patofisiología cardiovascular.

En un trabajo de Bowles *et al.* de 2004 se demuestra que la corriente de calcio que fluye a través de los canales de calcio de tipo L está incrementada en el músculo liso de las arterias coronarias de los machos respecto de la de las hembras. La región promotora del gen de los canales de calcio de tipo L (Ca_v1.2) contiene un elemento de respuesta a hormona que es activado por testosterona: la secuenciación de la región 5' no traducida de la subunidad α_1 de los canales de calcio tipo L muestra la existencia de un elemento de respuesta a hormona activado por testosterona (Liu *et al.*, 2000).

En un trabajo de Golden *et al.* de 2003 se muestra que la gonadectomía de ratas macho adultas reduce la contractilidad de miocitos cardíacos aislados. Estos resultados proveen la evidencia de que los andrógenos regulan la expresión de los canales de calcio de tipo L y del intercambiador Na/Ca en miocitos ventriculares aislados de rata y por lo tanto podrían jugar un rol en modular el rendimiento cardíaco en machos y contribuir a las diferencias de género observadas en la función cardíaca.

Sin embargo, este tipo de regulación no parece ser la que está actuando en nuestro caso: intentando encontrar el mecanismo por el cual la testosterona produce su acción, hemos cuantificado (mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas y de microscopía confocal) la densidad relativa de cada uno de estos tipos de canales en animales controles, gonadectomizados y gonadectomizados y tratados con testosterona exógena. Los resultados nos indican que no hay variaciones significativas en la densidad relativa de canales en cada una de estas condiciones fisiológicas: esto nos estaría diciendo que la hormona no está regulando la expresión génica de, cuando menos, la subunidad principal de estos dos tipos de canales: la inmunotinción se realizó con un anticuerpo sintetizado contra las subunidades α_1 de cada tipo de canal. No obstante, la hormona podría estar ejerciendo una acción sobre la expresión génica de alguna de las subunidades auxiliares que modulan la actividad de estos canales, en

especial de las subunidades β . Sin embargo, esto parece poco probable porque las subunidades β son muy "promiscuas": los diferentes subtipos de β se unen con gran facilidad a cualquier α_1 . Por otra parte, y como ampliaremos en esta sección, cada vez se conocen más mecanismos de acciones no genómicas de los esteroides: una posibilidad es que la hormona esté afectando en forma directa la actividad de los canales de calcio. En la siguiente sección presentamos evidencia bibliográfica de acciones directas de la testosterona sobre la actividad de canales de calcio.

Regulación de la actividad de canales de calcio por andrógenos

En un trabajo de Scragg *et al.* de 2004 que se titula: "La testosterona es un potente inhibidor de los canales de Ca^{2+} de tipo L" plantean que la testosterona es beneficiosa en aliviar la isquemia miocárdica en los hombres con la enfermedad coronaria significativa de las arterias (CAD), una condición que está asociada con la hipotestosteronaemia. La infusión de concentraciones fisiológicas de testosterona resulta en una rápida vasodilatación en los pacientes con CAD. A través de sus resultados se puede ver que la testosterona actúa inhibiendo directamente a los canales de tipo L humanos tanto nativos como recombinantes en una manera voltaje independiente y con un IC_{50} de 38 nM, un valor dentro del rango fisiológico. A concentraciones mayores (suprafisiológicas) los canales de calcio de tipo T (tanto nativos como recombinantes) también son inhibidos por testosterona.

La inhibición del canal que se muestra es rápida aún cuando las corrientes se registraron a temperatura ambiente y durante la diálisis intracelular producida por las pipetas de patch-clamp, haciendo poco probable que el mecanismo inhibitorio sea genómico. Mucho más probable es un bloqueo directo sobre el canal lo cual, si es cierto, indica que la testosterona bloquea la subunidad principal α_1 del canal de calcio

de tipo L, dado que las subunidades auxiliares no están expresadas en las células HEK 293 sobre las cuales se realizan las mediciones.

En un trabajo de Gupte *et al.*, de 2002 se describe el bloqueo de las corrientes de calcio de tipo L por epiandrosterona (EPI), un metabolito del precursor de testosterona dehidroepiandrosterona: se sugiere que la EPI actúa como un antagonista de los CCDV de tipo L muy parecido a las dihidropiridinas.

Sin embargo, es poco probable que en nuestro trabajo se trate de una acción de este tipo: para que así fuera debería haber testosterona en el baño durante la realización del experimento y esto no es posible porque la testosterona que se encuentra en el sistema circulatorio del animal se lava completamente (al igual que todos los componentes sanguíneos) al sumergir al preparado en las soluciones fisiológicas exógenas. Ya que nosotros no adicionamos testosterona al medio durante los experimentos es poco probable que la acción facilitadora de la hormona en los animales controles sea una acción directa sobre el canal.

Tal vez la hormona podría estar actuando de manera no genómica mediante segundos mensajeros originados en la membrana plasmática cuya acción sea más duradera en el tiempo.

Relacionado con esto podemos comentar que además del clásico receptor de andrógenos, se han descrito receptores de superficie celular no-genómicos para testosterona, en células que son típicos blancos para esta hormona como, por ej., los osteoblastos de rata (Lieberherr y Grosse, 1994). En la siguiente sección introducimos el tópico de las acciones de la testosterona a través de receptores de membrana.

Efectos no genómicos de la testosterona a nivel de la membrana plasmática

Una de las primeras descripciones de efectos no genómicos de la testosterona, junto con una descripción del mecanismo posible, fue hecha en **osteoblastos de rata**: en 1994 se describió la existencia de receptores para testosterona pertenecientes a la clase de receptores de membrana acoplados a fosfolipasa C a través de una proteína G sensible a la toxina pertussis. La unión de la testosterona a estos receptores de superficie de membrana produce el influjo de Ca^{2+} y un incremento en la formación de 1,4,5-inositol trifosfato y diacilglicerol. La testosterona dispara un incremento transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, seguido por una fase de incremento sostenida y modula la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de dos mecanismos: el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular y la movilización de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico. Por un lado, la nifedipina (bloqueante de CCDV de tipo L) disminuye el incremento en la respuesta en un 30% y anula totalmente la fase de incremento sostenido. Por otro lado, la tapsigarguina (la cual modifica el secuestro de calcio por el retículo endoplásmico) y los inhibidores de la fosfolipasa C bloquean parcial o totalmente el incremento inicial sin tener efecto sobre la fase de incremento sostenido. La testosterona inmovilizada sobre sero-albúmina bovina (testosterona (O-carboximetil) sero albúmina oximebovina) y su derivado, (O-carboximetil)oxima, incrementaron rápidamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol, actuando como agonistas completos, si bien fueron menos potentes que el esteroide libre (Lieberherrl y Grosse, 1994).

Los andrógenos inducen la relajación de la actividad contráctil en el **miometro humano** preñado a término: la respuesta de relajación a los andrógenos tiene cursos temporales muy rápidos y no fue afectado ni por flutamida, un antiandrógeno específico, ni por inhibidores de la síntesis proteica (cicloheximida) ni por factores que afectan la transcripción (actinomicina D), implicando que los andrógenos actúan a través de un mecanismo no genómico. El **bloqueo de canales de calcio de tipo L**

parece estar involucrado en las acciones relajantes no genómicas de los andrógenos (Perusquía *et al.*, 2005).

Por otra parte, la testosterona induce el influjo de Ca^{2+} a través de receptores de superficie a partir de mecanismos no-genómicos en **linfocitos T activados** (Benten *et al.*, 1997). La interacción de la testosterona con células T era controvertida. Predominaba el punto de vista de que la testosterona no era capaz de interactuar directamente sobre células T. La información disponible indicaba que las células T no contenían receptores de andrógenos clásicos. En este trabajo de Benten *et al.* se muestran evidencias de que la testosterona es capaz de actuar a través de mecanismos no-genómicos utilizando receptores de la membrana plasmática para disparar la entrada de Ca^{2+} en células T activadas. En este caso, la testosterona en concentraciones fisiológicas (1-10 nM) induce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en segundos, y este aumento es debido al influjo de calcio porque está mediado por canales bloqueables por Ni^{2+} y no es inhibido por ciproterona, un bloqueante del receptor de andrógenos clásico. Además, este incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede ser inducido también por testosterona conjugada con BSA, la cual es impermeable a la membrana plasmática.

No obstante, los mecanismos por los cuales la testosterona induce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células T no parece ser el mismo identificado en osteoblastos de rata mencionados con anterioridad en esta sección. En el trabajo sobre células T el aumento del Ca^{2+} intracelular en células T murinas no está necesariamente acoplado con una liberación de Ca^{2+} mediada por inositol 1,4,5-trifosfato a partir de reservorios intracelulares (Chakrabarti *et al.*, 1995; Sjaastad *et al.*, 1996). Lo que se sugiere es que la acción de la testosterona produce un aumento del influjo de calcio a partir del medio extracelular, el cual estaría mediado por canales de Ca^{2+} bloqueables por Ni^{2+} . No obstante, en el trabajo se brindan evidencias de que no se trataría de un efecto directo de

la testosterona sobre los canales sino de un efecto indirecto mediado, muy probablemente por receptores de la superficie celular.

Nuevamente se nos plantea la pregunta: ¿podrían estos efectos no genómicos observarse en ausencia de la hormona durante el experimento? Esto depende de cuánto tiempo puedan durar estos efectos.

Desarrollo de la placa neuromuscular del LA y su probable interacción con la presencia de diversos canales de calcio presinápticos

Durante el desarrollo de la placa neuromuscular se produce una modificación de los canales de calcio que median la liberación de neurotransmisor. En un trabajo de Rosato Siri y Uchitel, de 1999 se reporta que la ω -Conotoxina GVIA, bloqueante de los canales de tipo N, inhibe significativa e irreversiblemente la liberación evocada por estimulación nerviosa en placas neuromusculares recién formadas en los estadios tempranos del desarrollo (embriones y ratas de 0 a 4 días de edad). Sin embargo, esta toxina deja de ser efectiva en ratas de 5 a 11 días en adelante. Durante todos estos estadios del desarrollo la liberación evocada de neurotransmisor es fuertemente bloqueada por ω -Agatoxina IVA, de acuerdo con el efecto que este bloqueante tiene sobre la liberación de neurotransmisor en músculos maduros. Resumiendo, la participación de los canales N en la liberación es transitoria y durante los primeros estadios del desarrollo y la de los canales P/Q es permanente. Por otra parte, en un

trabajo de Pagani *et al.* de 2004 se reporta la presencia (detectada por inmunohistoquímica) de los canales N en la sinapsis neuromuscular de ratones adultos, si bien estos canales ya no cumplen un rol en la liberación de neurotransmisor.

En este sentido, pareciera que la UNM del LA conserva las características de una placa neuromuscular inmadura: tanto el canal P/Q como el N sostienen la liberación de neurotransmisor. Es dable pensar que en las UNMs no dependientes de testosterona el canal N sufre tempranamente un desacople de la liberación que en el LA no sufre. La UNM del LA es una sinapsis que tiene varios aspectos de su desarrollo retardados en el tiempo respecto de otras UNMs. Por ejemplo, un proceso conocido como "eliminación sináptica" mediante el cual las fibras musculares pasan de estar múltiple a simplemente inervadas, tiene lugar más tardíamente en el LA respecto de las demás UNMs de mamíferos (Jordan *et al.*, 1988), y este retardo parece obedecer a una acción de la testosterona: la castración temprana de los animales adelanta el proceso. Sin embargo, si castramos a los animales tempranamente (como lo hemos hecho en este trabajo) la poliinervación desaparece pero los canales permanecen en la terminal sináptica (como pudimos comprobar mediante la inmunohistoquímica), por lo que no podemos especular con una posible relación entre estos dos procesos.

Canales de calcio presinápticos en la UNM del LA y adenosina

Ahora bien, la pregunta es: ¿mediante qué mecanismo la testosterona permite la expresión funcional de los canales de calcio de tipo N y de tipo R en el LA? Para intentar responderla nos interesa comentar un trabajo de Schwartz *et al.* de 2003 titulado "la adenosina inhibe a los canales de calcio de tipo N en la unión neuromuscular de la rata". En este estudio, utilizando al antagonista del receptor de adenosina de tipo A₁, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxantina (DPCPX), observan que la ω -Conotoxina GVIA

deprime significativamente la liberación evocada de transmisor en el diafragma de ratas adultas. Esto implica que el canal N está presente en la UNM adulta y en condiciones de acoplarse a la liberación de neurotransmisor, pero que la inhibición que ejerce sobre él la adenosina le impide cumplir este rol.

Esto hace muy llamativa nuestra observación de que en el LA el componente N es insensible a la inhibición por adenosina. Sin embargo, (a partir de los resultados de la figura 13) cuando realizamos experimentos sobre la UNM del LA de ratas castradas adicionando el inhibidor del receptor de adenosina DPCPX (0,1 μ M) para ver si esto permitía "recuperar" el componente de la liberación ligado al canal N (adicionamos desde el comienzo ω -Agatoxina IVA 200 nM para eliminar el componente P/Q y poder evaluar más claramente al componente N), no observamos diferencias significativas entre la condición control y la condición tratada. El resultado obtenido en la fig.13 muestra que en ausencia de testosterona, la inhibición del receptor inhibitorio de adenosina no resultaría suficiente para acoplar al canal N a la liberación de neurotransmisor. De todas maneras, harían falta estudios más completos sobre este punto para poder sacar alguna conclusión acerca de cuál es el motivo por el cual, en las ratas castradas, el canal N se desacopla de la liberación de transmisor: no podemos descartar que se trate de una inhibición por adenosina que en condiciones controles es impedida por la testosterona.

Sin embargo, la adenosina inhibe a los canales de calcio de tipo P/Q en el diafragma de ratones adultos pero esto no impide que los canales medien la liberación de neurotransmisor en esta sinapsis: la disminución que produce la adenosina en concentraciones fisiológicas sobre esta corriente de calcio no es absoluta sino parcial y permite que una cantidad importante de calcio siga fluyendo a través de estos canales. En un trabajo de Silinsky del año 2004 se demuestra, mediante el estudio de las

corrientes de Ca^{2+} perineurales, que la inhibición de la liberación evocada de neurotransmisor por adenosina en la unión neuromuscular murina está asociada con una reducción en la entrada de calcio a través de los canales de tipo P/Q. Esto implicaría que la falta de inhibición por adenosina no sería motivo suficiente para explicar por qué la testosterona está facilitando la participación de los canales N y R en la liberación de neurotransmisor en el LA: aunque la inhibición existiera no tendría por qué impedir en forma absoluta la actividad de estos canales.

Sin embargo, no deja de ser intrigante la falta de inhibición por adenosina de estas corrientes de calcio en el LA y sigue siendo muy probable que la testosterona esté ligada con este hecho, aunque no sea éste el mecanismo por el cual la hormona permita la participación de estas corrientes en la liberación: podría tratarse de un efecto "extra" de la testosterona.

Siguiendo en la investigación acerca de cómo la adenosina bloquea a los canales de tipo P/Q, Silinsky (2005) continuó su trabajo para determinar si la acción de la adenosina está mediada a través de un efecto directo sobre los canales de calcio o a través de la maquinaria secretoria, examinó los efectos de "clivar" proteínas del aparato de secreción (denominadas "SNARE"). El clivaje de la proteína syntaxina con toxina botulínica de tipo C previene el efecto inhibitorio de la adenosina sobre las corrientes de calcio del terminal nervioso, el clivaje de otras proteínas del SNAREs no tiene acción sobre este efecto. Estos resultados proveen evidencia de un acoplamiento íntimo de los canales de calcio del terminal presináptico con la syntaxina, un componente de membrana del complejo SNARE, de forma tal que la modulación de las corrientes de calcio a través de un receptor acoplado a una proteína G (como lo es el receptor de adenosina) no puede ocurrir cuando la syntaxina es clivada.

Ubicación diferencial de los canales de calcio

El hecho de que sólo los canales N y R sean regulados por la testosterona, mientras el P/Q no lo es resulta intrigante. Tal vez, la existencia de estos canales adicionales participando de la neurotransmisión le puede conferir a la UNM del LA, comparándola con otras sinapsis neuromusculares, ciertas cualidades diferentes. La presencia de diferentes tipos de canales de Ca^{2+} presinápticos con, por ejemplo, diferentes sitios regulatorios, podría permitir una gran flexibilidad en la neurotransmisión de una sinapsis.

La coexistencia de varios tipos de canales de Ca^{2+} en la zona activa podría ser muy importante para la función sináptica. Varios neurotransmisores y neuromoduladores inhiben la liberación de neurotransmisor por modulación de los canales de Ca^{2+} presinápticos (Wu y Saggau, 1997). Un caso que hemos estudiado en esta Tesis es el de la adenosina: el hecho de que los canales N y R no se vean inhibidos por este neuromodulador puede ser de gran importancia en la señalización a alta frecuencia: en dicho caso se liberan grandes cantidades de adenosina y el funcionamiento de los canales P/Q podría quedar severamente disminuido, transformando a los otros dos canales en fundamentales para el mantenimiento de la neurotransmisión. Para poder saber si esto es lo que realmente sucede en el LA sería necesario realizar estudios de estimulación neural a altas frecuencias (desde aproximadamente 20 Hz en adelante).

Otra posibilidad es que la ubicación de los distintos canales respecto del sitio de liberación sea diferente: si, por ejemplo, estos canales están ubicados de forma diferencial en cuanto a la distancia del sitio de liberación, la modulación de los canales distantes sólo afectará la liberación durante la señalización a alta frecuencia: en este caso la cantidad de calcio que se acumula hace crecer el tamaño del "microdominio"

que se forma alrededor de la entrada de cada canal y se expande lo suficiente como para alcanzar a la maquinaria de liberación de neurotransmisor.

Para estudiar cuáles canales están más cercanos o más lejanos de los sensores de Ca^{2+} habría que estudiar el efecto de distintas concentraciones de dos tipos de "quelantes" de Ca^{2+} permeables a la membrana plasmática: uno de tipo rápido, como el BAPTA-AM, que atrapa rápidamente a los iones Ca^{2+} y uno de tipo lento, como el EGTA-AM, que atrapa más lentamente a los iones Ca^{2+} : si la liberación a partir de un canal es afectada sólo por el quelante rápido y la liberación a partir de otro canal es afectada por ambos, significa que el segundo se encuentra más alejado de los sensores de Ca^{2+} y es, por lo tanto, menos "eficiente" para liberar al neurotransmisor. Por ejemplo, en el trabajo de Urbano *et al.*, de 2002, en donde se estudia la transmisión en la placa neuromuscular de los ratones "knock out" (KO) para el canal P/Q, utilizando esta metodología han podido establecer que los canales de tipo N están más distantes del sitio de liberación que los canales de tipo R. Sin embargo, como una aparente forma de "compensación" de esta ubicación desventajosa, los canales N son más abundantes que los de tipo R en dicha preparación.

En un trabajo de Pietrobon de 2005 se comenta que estudios hechos en rodajas de cerebro de ratón revelaron que los canales P/Q, N y R cooperan en el control de la liberación en la mayoría de las sinapsis excitatorias, pero los canales P/Q tienen un rol dominante, parcialmente por un acoplamiento más eficiente a la maquinaria exocitótica (Matsushita *et al.*, 2002; Mintz *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999). Los canales P/Q parecen estar localizados preferencialmente en los sitios de liberación en un número limitado de "slots" (lugares específicos de interacción entre los canales de Ca^{2+} y la maquinaria exocitótica) contribuyendo con los cambios locales en la concentración de Ca^{2+} que dispara la liberación evocada rápida y sincrónica. En la UNM del KO del canal P/Q los

datos sugieren que los canales de tipo R están localizados más cerca de los sensores de Ca^{2+} presinápticos que los más abundantes canales de tipo N y, a diferencia de estos últimos, son capaces de ocupar los "slots" normalmente ocupados por los canales P/Q (Urbano *et al.*, 2003).

También podría suceder que los diferentes canales median la liberación de transmisor con diferentes índices de cooperatividad: la relación no lineal entre la concentración de Ca^{2+} extracelular y la liberación fue caracterizada por primera vez en la unión neuromuscular de rana por Dodge y Rahamimoff (1967). En esta preparación la amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos varía con el cuarto poder de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ a bajas concentraciones. Si bien los canales de calcio que median la liberación en la UNM de rana son sensibles al bloqueo por la ω -conotoxina GVIA (también son canales de tipo N), son una variante diferente del canal presente en mamíferos. Los distintos canales de calcio de la UNM del LA podrían median la liberación de neurotransmisor con diferentes cooperatividades (Mintz *et al.*, 1995). Por ejemplo, en un estudio realizado en cerebelo sugiere que la liberación es más fuertemente dependiente de la concentración intraterminal de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{it}$) para los canales de tipo P/Q que para los de tipo N (Mintz *et al.*, 1995). La cooperatividad fue estimada en 4 para los canales P/Q y en 2,5 para los canales de tipo N. Este estudio se realizó utilizando colorantes sensibles al Ca^{2+} para medir la $[\text{Ca}^{2+}]_{it}$ antes y después del bloqueo selectivo de cada subtipo de canal. La cooperatividad fue estimada a partir de dos puntos de datos, uno registrado antes y uno después de agregar el bloqueante selectivo, y estos puntos unidos a diferentes rangos de $[\text{Ca}^{2+}]_{it}$ para cada subtipo de canal. Un estudio utilizando una técnica similar en el hipocampo, y explorando las $[\text{Ca}^{2+}]_{it}$ más a fondo, no encontró diferencias significativas en la cooperatividad asociada con distintos subtipos de canales de calcio (Wu y Saggau, 1994).

Podrían realizarse estudios con una técnica similar a la utilizada por Dodge y Rahamimoff en la UNM del LA y estudiar, con la utilización de bloqueantes selectivos, cuál es la cooperatividad para el canal P/Q, el N y el R en esta preparación.

Modulación de canales de calcio

Hay varias vías por las cuales los canales de calcio dependientes de voltaje pueden ser regulados positiva o negativamente por segundos mensajeros, por ejemplo por fosforilación (Nunoki *et al.*, 1989; Dolphin, 1999; Catterall, 2000). Estas incluyen regulación por quinasas, por ejemplo la regulación de los canales cardíacos de tipo L por PKA (Reuter, 1987) y la regulación por PKC (Stea *et al.*, 1995).

Uno de los principales mecanismos de inhibición tanto de los canales de tipo N como de los P/Q es el que ocurre por la activación de proteínas G heterotriméricas acopladas a distintos tipos de receptores. Esta modulación ha sido observada en la mayoría de los tipos neuronales, incluyendo a las neuronas del ganglio cervical superior (Ikeda y Schofield, 1989) y neuronas de la submucosa (Surprenant *et al.*, 1990). Entre estos receptores acoplados a proteínas G se encuentran, por ejemplo, los receptores de GABA-B, los receptores presinápticos muscarínicos de acetilcolina, los receptores de opioides μ y δ y, como ya mencionamos, los receptores de adenosina de tipo A₁ (Dunlap y Fischbach, 1978; Dolphin *et al.*, 1986; Scott y Dolphin, 1986). Las características de esta inhibición son un enlentecimiento de las cinéticas de activación y una inhibición dependiente del voltaje (Bean, 1989). La remoción de la inhibición puede ser inducida por un prepulso despolarizante aplicado inmediatamente antes del pulso test (Ikeda, 1991). La inhibición será reducida durante un tren de estimulación de alta frecuencia, como un resultante de la dependencia de voltaje de la modulación inhibitoria.

Una de las formas de regulación de la liberación de neurotransmisión en la unión neuromuscular es la existencia de "autorreceptores" de acetilcolina: receptores de acetilcolina situados en la membrana presináptica, denominados receptores muscarínicos. Las vías de señalización por receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) incluyen a varias enzimas y canales iónicos. Estudios de hace unos pocos años han revelado la importancia de varias isoformas tanto de la subunidad α como de las subunidades β de las proteínas G en la iniciación de la señalización, así como el rol de la pequeña proteína G monomérica, ρ , en la activación de la fosfolipasa D.

La modulación de canales iónicos por agonistas de los mAChR es sumamente variada y compleja. Los canales de calcio de tipo R son facilitados por el subtipo 1 de estos receptores e inhibidos por el subtipo 2 (Lanzafame *et al.*, 2003).

La testosterona podría estar interactuando de alguna manera con los receptores muscarínicos de forma tal que los canales de tipo N y de tipo R del LA vean facilitada su actividad.

Se sabe que existe una modulación de la actividad del canal de tipo N por fosforilación por PKC: la activación de la PKC por ésteres de forbol (los cuales mimetizan el efecto del diacilglicerol (DAG), segundo mensajero endógeno) lleva a un incremento de la amplitud de las corrientes de calcio de tipo N en neuronas de los ganglios simpáticos, así como a una atenuación de la inhibición mediada por proteínas G (Swartz, 1993; Swartz *et al.*, 1993). Además, la activación de la PKC revierte la inhibición tónica mediada por proteína G en neuronas del ganglio cervical superior de la rata. Se ha propuesto que la zona de convergencia de estas dos vías de señalizaciones opuestas sería la zona de unión citoplasmática entre los dominios I y II de la subunidad α_{1B} (Zamponi *et al.*, 1997; Hamid *et al.*, 1999). El modelo propuesto en la actualidad es uno de mutua exclusividad entre el DAG y las subunidades de la proteína G: el rol de la

fosforilación por PKC sería prevenir el bloqueo por proteínas G (Barrett y Rittenhouse, 2000).

Una hipótesis posible es que la testosterona incremente en las terminales nerviosas de la UNM del LA los niveles de DAG y de esta manera aumente la actividad de la PKC con la consecuente activación del canal de tipo N. Para dilucidar esto habría que estudiar en animales castrados qué pasa con la neurotransmisión del LA si se adicionan al preparado ésteres de forbol (análogos sintéticos del DAG que pueden permear la membrana plasmática): tal vez se encuentre que en estas condiciones es posible acoplar al canal N a la liberación de transmisor.

Resultados diferenciales sobre inhibición por adenosina obtenidos en el KO de P/Q

El resultado encontrado en los ratones $\alpha_{1A}(-/-)$ con respecto a la falta de inhibición de la liberación asociada al canal de tipo R puede estar indicando que la falta de efecto en el levator ani sea una generalidad de todas las UNM y no un efecto particular de la testosterona. Sin embargo, el resultado positivo obtenido con respecto al canal de tipo N indicaría que sí se puede tratar de un efecto de la testosterona. Hay una cantidad importante de bibliografía en donde se informa de bloqueos de la corriente de tipo N por adenosina actuando a través de su receptor de tipo A_1 . Esto hace llamativa la observación del LA, en donde el componente N es insensible a la inhibición por adenosina y hace pensar en un efecto de la testosterona sobre los receptores A_1 .

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

.Adams ME, Herold EE, Venema VJ (1989). Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. *J Comp Physiol* 164(3):333-42.

.Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM (1993). Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 32(47):12566-70

.Akaike N, Kanaide H, Kuga T, Nakamura M, Sadoshima J, Tomoike H (1989). Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol* 416:141-60.

.Akaike N, Lee KS, Brown AM (1978). The calcium current of Helix neuron. *J Gen Physiol* 71(5):509-31.

.Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM (2000). Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. *Brain Res.* 875(1-2):125-37.

.Arnold AP, Gorski RA (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7:413-42.

.Artalejo CR, Adams ME, Fox AP (1994). Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367(6458):72-6.

.Ascoli M (1981). Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108(1):88-95.

.Barrett CF, Rittenhouse AR (2000). Modulation of N-type calcium channel activity by G-proteins and protein kinase C. *J Gen Physiol.* 115(3):277-86.

.Bean BP (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51: 367-384.

.Bean BP (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol.* 51:367-384.

.Beato M, Chavez S, Truss M (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61(4):240-51.

.Benten WP, Lieberherr M, Sekeris CE, Wunderlich F. (1997). Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett* 407(2):211-4.

.Berrow NS, Brice NL, Tedder I, Page KM, Dolphin AC (1997). Properties of cloned rat alpha1A calcium channels transiently expressed in the COS-7 cell line. *Eur J Neurosci.* 9(4):739-48.

.Boland LM, Morrill JA, Bean BP (1994). omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14(8):5011-27.

.Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999). Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2(5):407-15.

.Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, Zamponi GW (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophys J* 81(1):79-88.

.Bowersox SS, Miljanich GP, Sugiura Y, Li C, Nadasdi L, Hoffman BB, Ramachandran J, Ko CP (1995). Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel omega-conopeptides and omega-agatoxin-IVA. *J Pharmacol Exp Ther* 273(1):248-56.

.Bowles DK, Maddali KK, Ganjam VK, Rubin LJ, Tharp DL, Turk JR, Heaps CL.(2004).Endogenous testosterone increases L-type Ca²⁺ channel expression in porcine coronary smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 287(5):H2091-8.

.Bowling N, Bloomquist WE, Cohen ML, Bryant HU, Cole HW, Magee DE, Rowley ER, Vlahos CJ. Effects of prolonged ethinyl estradiol treatment on calcium channel binding and in vivo calcium-mediated hemodynamic responses in ovariectomized rats (1997). *J Pharmacol Exp Ther* 281(1):218-25.

.Breedlove SM (1984). Steroid influences on the development and function of a neuromuscular system. *Prog Brain Res* 61:147-70.

.Breedlove SM, Arnold AP (1983). Sex differences in the pattern of steroid accumulation by motoneurons of the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 215(2):211-6.

.Byerly L, Chase PB, Stimers JR (1985). Permeation and interaction of divalent cations in calcium channels of snail neurons. *J Gen Physiol* 85(4):491-518.

.Callies F, Kollenkirchen U, von zur Muhlen C, Tomaszewski M, Beer S, Allolio B (2003). Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 111(4):203-208.

.Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.

.Catterall WA (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium.* 24(5-6):307-23.

.Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 521-55.

.Catterall WA, Striessnig J (1992). Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 13(6):256-62.

.Chakrabarti R, Chang JY, Erickson KL.(1995). T cell receptor-mediated Ca^{2+} signaling: release and influx are independent events linked to different Ca^{2+} entry pathways in the plasma membrane. *J Cell Biochem.* 58(3):344-59

.Chang C, Saltzman A, Yeh S, Young W, Keller E, Lee HJ, Wang C, Mizokami A (1995). Androgen receptor: an overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 5(2):97-125.

.Cihak R, Gutmann E, Hanzlikova V (1970). Involution and hormone-induced persistence of the M. sphincter (levator) ani in female rats. *J Anat* 106(Pt 1):93-110.

.Clapham DE, Neer EJ (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365(6445):403-6.

.Cloues RK, Cibulsky SM, Sather WA (2000). Ion interactions in the high-affinity binding locus of a voltage-gated Ca^{2+} channel. *J Gen Physiol* 116(4):569-86.

.Cohen-Cory S (2002).The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science.* 298(5594):770-6.

.Correia-de-Sa P, Timoteo MA, Ribeiro JA (1996). Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 76(6):3910-9.

.Couteaux R (1973). Motor endplate structure. In Structure and Function of Muscle. Vol. 2, ed GH Bourne, pp. 483-530. New York: Academic.

.Dale HH, Felburg W, Vogt M (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol.* 86:353-380.

.Daly JW (1985). Adenosine receptors. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 19:29-46.

.Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci* 17(16):6226-35.

.Dietrich D, Kirschstein T, Kukley M, Pereverzev A, von der Brélie C, Schneider T, Beck H (2003). Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca^{2+} channels. *Neuron* 39(3):483-96.

.Diverse-Pierluissi M, Dunlap K (1993). Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron* 10(4):753-60.

.Dodge FA Jr, Rahamimoff R (1967). Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193(2):419-32.

.Dolphin AC (1995). The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp Physiol* 80(1):1-36.

.Dolphin AC (1999). L-type calcium channel modulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33:153-77.

.Dolphin AC (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr.* 35(6):599-620.

.Dolphin AC (2003). G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2003 55(4):607-27.

.Dolphin AC, Forda SR, Scott RH (1986). Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J Physiol* 373:47-61.

.Dolphin AC, Prestwich SA (1985). Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature* 316(6024):148-50.

.Dooley DJ, Lickert M, Lupp A, Osswald H (1988). Distribution of [125I]omega-conotoxin GVIA and [3H]isradipine binding sites in the central nervous system of rats of different ages. *Neurosci Lett* 93(2-3):318-23.

.Droogmans G, Callewaert G (1986). Ca²⁺-channel current and its modification by the dihydropyridine agonist BAY k 8644 in isolated smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 406(3):259-65.

.Dunlap K, Fischbach GD (1978). Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature* 276(5690):837-9.

.Dunlap K, Fischbach GD (1981). Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317:519-35.

.Ellinor PT, Zhang JF, Horne WA, Tsien RW (1994). Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 372(6503):272-5.

.Engel AG (1994). The neuromuscular junction. In *Myology: Basic and Clinical*. Vol. 1., ed. AG. Engel & C. Franzini-Armstrong, New York: McGraw-Hill.

.Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori , Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25(3):533-5.

.Fatt P, Katz B (1952). Spontaneous subthreshold potentials at motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 117:109-128.

.Feng ZP, Hamid J, Doering C, Bosey GM, Snutch TP, Zamponi GW (2001). Residue Gly1326 of the N-type calcium channel alpha 1B subunit controls reversibility of omega-conotoxin GVIA and MVIIA block. *J Biol Chem* 276(19):15728-35.

.Fishman RB, Breedlove SM (1988). Neonatal androgen maintains sexually dimorphic muscles in the absence of innervation. *Muscle Nerve* 11(6):553-60.

.Fletcher CF, Tottene A, Lennon VA, Wilson SM, Dubel SJ, Paylor R, Hosford DA, Tessarollo L, McEnery MW, Pietrobon D, Copeland NG, Jenkins NA (2001). Dystonia and cerebellar atrophy in Cacna1a null mice lacking P/Q calcium channel activity. *FASEB J* 15(7):1288-90.

.Fomina AF, Levitan ES, Takimoto K (1996). Dexamethasone rapidly increases calcium channel subunit messenger RNA expression and high voltage-activated calcium current in clonal pituitary cells. *Neuroscience* 72(3):857-62.

.Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987). Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol* 394:173-200.

.Foy MR, Chiaia NL, Teyler TJ (1984). Reversal of hippocampal sexual dimorphism by gonadal steroid manipulation. *Brain Res.* 321(2):311-4.

.Fredholm BB, Dunwiddie TV (1988). How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9(4):130-4.

.Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I (1996). Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354(3):262-7.

.Fu WM, Huang FL (1994). Potentiation by endogenously released ATP of spontaneous transmitter secretion at developing neuromuscular synapses in *Xenopus* cell cultures. *Br J Pharmacol.* 111(3):880-6.

.Gilman AG (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell.* 36(3):577-9.

.Ginsborg BL, Hirst GD (1972). The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol* 224(3):629-45.

.Glossmann H, Striessnig J (1990). Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 114:1-105.

.Golard A, Role L, Siegelbaum SA (1994). Substance P potentiates calcium channel modulation by somatostatin in chick sympathetic ganglia. *J Neurophysiol* 72(6):2683-90.

.Golden KL, Marsh JD, Jiang Y, Brown T, Moulden J (2003). Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285(3):E449-53.

.Gordon EL, Pearson JD, Dickinson ES, Moreau D, Slakey LL (1989). The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. *J Biol Chem* 264(32):18986-95.

.Gray DB, Bruses JL, Pilar GR (1992). Developmental switch in the pharmacology of Ca²⁺ channels coupled to acetylcholine release. *Neuron* 8(4):715-24.

.Greene EC (1963). *Anatomy of the rat.* New York: Hafner.

.Gupte SA, Tateyama M, Okada T, Oka M, Ochi R (2002). Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J Mol Cell Cardiol.* 34(6):679-88.

.Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, Zamponi GW (1999). Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem.* 274(10):6195-202.

.Hamilton BR, Smith DO (1991). Autoreceptor-mediated purinergic and cholinergic inhibition of motor nerve terminal calcium currents in the rat. *J Physiol* 432:327-41.

.Hanson JE, Smith Y (2002). Subcellular distribution of high-voltage-activated calcium channel subtypes in rat globus pallidus neurons. *J Comp Neurol* 442(2):89-98.

.Harlow ML, Ress D, Stoschek A, Marshall RM, McMahan UJ (2001). The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature.* 409(6819):479-84.

.Hawthorn MH, Gengo P, Wei XY, Rutledge A, Moran JF, Gallant S, Triggle DJ (1988). Effect of thyroid status on beta-adrenoceptors and calcium channels in rat cardiac and vascular tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337(5):539-44.

.Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G.(1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371(6497):513-5.

.Helguera G, Olcese R, Song M, Toro L, Stefani E (2002). Tissue-specific regulation of Ca(2+) channel protein expression by sex hormones. *Biochim Biophys Acta* 1569(1-3):59-66.

- .Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (1993). Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* 123(4):949-62.
- .Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380(6571):258-62.
- .Hess P (1990). Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci.* 13:337-56.
- .Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81(2):275-300
- .Heuser JE, Reese TS, Landis DM (1974). Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. *J Neurocytol* 3(1):109-31.
- .Hille B (1984). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer, 426 pp.
- .Hille B (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes. Ed. Sinauer Associates Inc. Printed in USA.
- .Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, et al (1992). A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron* 9(1):69-77.
- .Hodgkin AL, Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117:500-44.
- .Holz GG 4th, Rane SG, Dunlap K (1986). GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319(6055):670-2.
- .Huang CC, Chan SH, Hsu KS (2004). 3-Morpholinylsydnonimine inhibits glutamatergic transmission in rat rostral ventrolateral medulla via peroxynitrite formation and adenosine release. *Mol Pharmacol.* 66(3):492-501.
- .Ikeda SR (1991). Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol*;439:181-214.
- .Ikeda SR, Schofield GG (1989). Somatostatin blocks a calcium current in rat sympathetic ganglion neurones. *J Physiol.* 409:221-40.
- .Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20(1):59-65.
- .Iwasaki S, Takahashi T (1998). Developmental changes in calcium channel types

mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* 509 (Pt 2):419-23.

.Jan LY, Jan YN (1976). Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol*. 262(1):189-214.

.Jarvis SE, Magga JM, Beedle AM, Braun JE, Zamponi GW (2000). G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma. *J Biol Chem* 275(9):6388-94.

.Jen J (2000). Familial Episodic Ataxias and Related Ion Channel Disorders. *Curr Treat Options Neurol*. 2(5):429-431.

.Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB (2001). Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16):9407-12.

.Jordan CL, Letinsky MS, Arnold AP (1988). Synapse elimination occurs late in the hormone-sensitive levator ani muscle of the rat. *J Neurobiol*. 19(4):335-56.

.Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS (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(26):15245-50.

.Juraska JM (1991). Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 16(1-3):105-9.

.Karst H, Nair S, Velzing E, Rumpff-van Essen L, Slagter E, Shinnick-Gallagher P, Joels M (2000). Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *Eur J Neurosci* 16(6):1083-9.

.Katz B (1969). The release of neural transmitter substances. Liverpool University Press.

.Katz E, Ferro PA, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R, Uchitel OD (1995). Effects of Ca²⁺ channel blockers on transmitter release and presynaptic currents at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 486 (Pt 3):695-706.

.Katz E, Ferro PA, Weisz G, Uchitel OD (1996). Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol*. 497 (Pt 3):687-97.

.Katz E, Protti DA, Ferro PA, Rosato Siri MD, Uchitel OD (1997). Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 121(8):1531-40.

.Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T (1991). Structure and function of

signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60:349-400.

.Krieg M, Szalay R, Voigt KD (1974). Binding and metabolism of testosterone and of 5-dihydrotestosterone in bulbocavernous/levator ani (BCLA) of male rats: in vivo and in vitro studies. *J Steroid Biochem* 5(5):453-9.

.Kurachi Y, Ito H, Sugimoto T, Katada T, Ui M (1989). Activation of atrial muscarinic K⁺ channels by low concentrations of beta gamma subunits of rat brain G protein. *Pflugers Arch* 413(3):325-7.

.Lampe RA, Lo MM, Keith RA, Horn MB, McLane MW, Herman JL, Spreen RC (1993). Effects of site-specific acetylation on omega-conotoxin GVIA binding and function. *Biochemistry* 32(13):3255-60.

.Lansman JB, Hess P, Tsien RW (1986). Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol* 88(3):321-47.

.Lanzafame AA, Christopoulos A, Mitchelson F (2003). Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels*. 9(4):241-60.

.Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19(6):1912-21.

.Lemos JR, Nowycky MC (1989). Two types of calcium channels coexist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals. *Neuron* 2(5):1419-26.

.Leppa S, Harkonen P, Jalkanen M (1991). Steroid-induced epithelial-fibroblastic conversion associated with syndecan suppression in S115 mouse mammary tumor cells. *Cell Regul*. 2(1):1-11.

.Lieberburg I, Maclusky NJ, McEwen BS (1977). 5alpha-Dihydrotestosterone (DHT) receptors in rat brain and pituitary cell nuclei. *Endocrinology* 100(2):598-607.

.Lieberburg I, McEwen BS (1977). Brain cell nuclear retention of testosterone metabolites, 5alpha-dihydrotestosterone and estradiol-17beta, in adult rats. *Endocrinology* 100(2):588-97.

.Lieberherr M, Grosse B (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem*. 269(10):7217-23.

.Liu L, Fan QI, El-Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD (2000). Regulation of DHP receptor expression by elements in the 5'-flanking sequence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278(4):H1153-62.

.Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B (1992). Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15(9):351-5.

.Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325(6102):321-6.

.Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ (1993). Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11(5):895-902.

.Manita S, Kawamura Y, Sato K, Inoue M, Kudo Y, Miyakawa H (2004). Adenosine A(1)-receptor-mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal CA3-CA1 synapses is primarily due to inhibition of N-type Ca(2+) channels. *Eur J Pharmacol.* 499(3):265-74.

.Matsumoto A (1997). Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. *Brain Res Bull* 44(4):539-47.

.Matsumoto A, Arnold AP, Micevych PE (1989). Gap junctions between lateral spinal motoneurons in the rat. *Brain Res* 495(2):362-6.

.Matsumoto A, Arnold AP, Zampighi GA, Micevych PE (1988). Androgenic regulation of gap junctions between motoneurons in the rat spinal cord. *J Neurosci* 8(11):4177-83.

.Matsushita K, Wakamori M, Rhyu IJ, Arii T, Oda S, Mori Y, Imoto K (2002). Bidirectional alterations in cerebellar synaptic transmission of tottering and rolling Ca₂⁺ channel mutant mice. *J Neurosci.* 22(11):4388-98.

.Mc Lachlan EM, Martin AR (1981). Non linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J. Physiol.* 340:230-233.

.McCleskey EW (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 4(3):304-12.

.McDonough SI, Lampe RA, Keith RA, Bean BP (1997). Voltage-dependent inhibition of N- and P-type calcium channels by the peptide toxin omega-gammatoxin-SIA. *Mol Pharmacol* 52(6):1095-104.

.McEneaney MW, Snowman AM, Snyder SH (1991). Evidence for subtypes of the omega-conotoxin GVIA receptor. Identification of the properties intrinsic to the high-affinity receptor. *Ann N Y Acad Sci* 635:435-7.

.Meir A, Bell DC, Stephens GJ, Page KM, Dolphin AC (2000). Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. *Biophys J.* 79(2):731-46

.Meir A, Dolphin AC. (1998). Known calcium channel alpha1 subunits can form low threshold small conductance channels with similarities to native T-type channels. *Neuron.* 20(2):341-51.

.Meriney SD, Grinnell AD (1991). Endogenous adenosine modulates stimulation-induced depression at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 443:441-55.

.Mintz IM (1994). Block of Ca²⁺ channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *J Neurosci* 14(5 Pt 1):2844-53.

.Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15(3):675-88.

.Mintz IM, Venema VJ, Adams ME, Bean BP (1991). Inhibition of N- and L-type Ca²⁺ channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (15):6628-31.

.Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVa. *Nature.* 355(6363):827-9.

.Mlinar B, Enyeart JJ (1993). Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J Physiol* 469:639-52.

.Nagano O, Foldes FF, Nakatsuka H, Reich D, Ohta Y, Sperlagh B, Vizi ES.(1992). Presynaptic A1-purinoceptor-mediated inhibitory effects of adenosine and its stable analogues on the mouse hemidiaphragm preparation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346(2):197-202.

.Nakanishi S, Fujii A, Kimura T, Sakakibara S, Mikoshiba K (1995). Spatial distribution of omega-agatoxin IVA binding sites in mouse brain slices. *J Neurosci Res* 41(4):532-9.

.Nordeen EJ, Nordeen KW, Sengelaub DR, Arnold AP (1985). Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229(4714):671-3.

.Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316(6027):440-3.

.Nunoki K, Florio V, Catterall WA (1989). Activation of purified calcium channels by stoichiometric protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(17):6816-20.

.Ogata T (1988). Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch Histol Cytol* 51(5):385-424.

.Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V, Cruz LJ (1985). Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230(4732):1338-43.

.Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-67.

.Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. (1996). Familial hemiplegic

migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87(3):543-52.

.Pagani R, Song M, McEnery M, Qin N, Tsien RW, Toro L, Stefani E, Uchitel OD (2004). Differential expression of alpha 1 and beta subunits of voltage dependent Ca²⁺ channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse *Neuroscience* 123(1):75-85.

.Palmer TM, Stiles GL (1995). Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 34(7):683-94.

.Park KS, Jeong SW, Cha SK, Lee BS, Kong ID, Ikeda SR, Lee JW (2001). Modulation of N-type Ca²⁺ currents by A1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 299(2):501-8.

.Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei XY, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, Birnbaumer L (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 340(6230):233-6.

.Perusquia M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montano LM (2005). Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol Reprod.* 73(2):214-21.

.Pietrobon D (2005). Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol.* 15(3):257-65.

.Poortmans A, Wyndaele JJ (1998). M. levator ani in the rat: does it really lift the anus? *Anat Rec* 251(1):20-7.

.Protti DA, Reisin R, Mackinley TA, Uchitel OD (1996). Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology* 46(5):1391-6.

.Protti DA, Sanchez VA, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R, Uchitel OD (1993). Mammalian neuromuscular transmission blocked by funnel web toxin *Ann N Y Acad Sci* 681:405-7.

.Protti DA, Szczupak L, Scornik FS, Uchitel OD (1991). Effect of omega-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res.* 23;557(1-2):336-9.

.Protti DA, Uchitel OD (1993). Transmitter release and presynaptic Ca²⁺ currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport* 5(3):333-6.

.Publicover SJ, Thomas GP, el Haj AJ (1994). Induction of a low voltage-activated, fast-inactivating Ca²⁺ channel in cultured bone marrow stromal cells by dexamethasone. *CalcifTissueInt*54(2):125-32.

.Qian F, Huang P, Ma L, Kuznetsov A, Tamarina N, Philipson LH (2002). TRP genes:

candidates for nonselective cation channels and store-operated channels in insulin-secreting cells. *Diabetes*. 51 Suppl 1:S183-9.

.Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*. 16(3):271-321.

.Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413-92.

.Randall A, Tsien RW (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci*. 15(4):2995-3012.

.Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA (2003). Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res* 987(1):49-58.

.Reilly CM, Stopper VS, Mills TM (1997). Androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum. *J Androl* 18(1):26-31.

.Reuter H (1987). Calcium channel modulation by beta-adrenergic neurotransmitters in the heart. *Experientia* 43(11-12):1173-5.

.Reuter H (1996). Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 6(3):331-7.

.Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990). Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5(6):773-9.

.Rosato Siri MD, Uchitel OD (1999). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol* 514 (Pt 2):533-40.

.Rossier MF, Lesouhaitier O, Perrier E, Bockhorn L, Chiappe A, Lalevee N (2003). Aldosterone regulation of T-type calcium channels. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5):383-8.

.Rothman JE (1994). Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1994. 29:81-96.

.Sanes JR, Lichtman JW (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.

.Sano K, Enomoto K, Maeno T (1987). Effects of synthetic ω -conotoxin, a new type Ca²⁺ antagonist, on frog and mouse neuromuscular transmission. *Eur J Pharmacol* 141:235-241.

.Santafe MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD (2000). Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience* 95(1):227-34.

- .Santafe MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD (2000). Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience*. 95(1):227-34.
- .Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* 11(2):291-303.
- .Scanziani M, Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9(5):919-27.
- .Schirar A, Chang C, Rousseau JP (1997). Localization of androgen receptor in nitric oxide synthase- and vasoactive intestinal peptide-containing neurons of the major pelvic ganglion innervating the rat penis. *J Neuroendocrinol*. 9(2):141-50.
- .Schwartz AD, Whitacre CL, Lin Y, Wilson DF (2003). Adenosine inhibits N-type calcium channels at the rat neuromuscular junction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 30(3):174-7.
- .Schwartz AD, Whitacre CL, Lin Y, Wilson DF (2003). Adenosine inhibits N-type calcium channels at the rat neuromuscular junction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(3):174-7.
- .Scott RH, Dolphin AC (1986). Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-baclofen-mediated inhibition. *Neurosci Lett* 69(1):59-64.
- .Scott RH, Dolphin AC (1987). Activation of a G protein promotes agonist responses to calcium channel ligands. *Nature* 330(6150):760-2.
- .Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C (2004). Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca(2+) channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 318(2):503-6.
- .Shapiro MS, Hille B (1993). Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron* 10(1):11-20.
- .Sidach SS, Mintz IM (2000). Low-affinity blockade of neuronal N-type Ca channels by the spider toxin omega-agatoxin-IVA. *J Neurosci* 20(19):7174-82.
- .Silinsky EM (1980). Evidence for specific adenosine receptors at cholinergic nerve endings. *Br J Pharmacol* 71(1):191-4.
- .Silinsky EM (1981). On the calcium receptor that mediates depolarization-secretion coupling at cholinergic motor nerve terminals. *Br J Pharmacol* 73(2):413-29.
- .Silinsky EM (2004). Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 2004 558(Pt 2):389-401.

.Silinsky EM (1984). On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve endings. *J Physiol* 346:243-56.

.Silinsky EM (2005). Modulation of calcium currents is eliminated after cleavage of a strategic component of the mammalian secretory apparatus. *J Physiol*. 566(Pt 3):681-8.

.Silinsky EM, Solsona CS (1992). Calcium currents at motor nerve endings: absence of effects of adenosine receptor agonists in the frog. *J Physiol*. 457:315-28.

.Sjaastad MD, Lewis RS, Nelson WJ (1996). Mechanisms of integrin-mediated calcium signaling in MDCK cells: regulation of adhesion by IP₃- and store-independent calcium influx. *Mol Biol Cell*. 7(7):1025-41.

.Slutsky I, Wess J, Gomeza J, Dudel J, Parnas I, Parnas H (2003). Use of knockout mice reveals involvement of M₂-muscarinic receptors in control of the kinetics of acetylcholine release. *J Neurophysiol* 89(4):1954-67.

.Smith SJ, Augustine GJ, Charlton MP (1985). Transmission at voltage-clamped giant synapse of the squid: evidence for cooperativity of presynaptic calcium action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(2):622-5.

.Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE.(1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 362(6418):318-24.

.Souccar C, Lapa AJ, Ribeiro do Valle J (1982). Influence of castration on the electrical excitability and contraction properties of the rat levator ani muscle. *Exp Neurol* 75(3):576-88.

.Stea A, Soong TW, Snutch TP (1995). Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron*. 15(4):929-40.

.Stephens GJ, Page KM, Burley JR, Berrow NS, Dolphin AC (1997). Functional expression of rat brain cloned alpha_{1E} calcium channels in COS-7 cells. *Pflugers Arch*. 433(4):523-32.

.Stewart BA, Mohtashami M, Trimble WS, Boulianne GL (2000). SNARE proteins contribute to calcium cooperativity of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(25):13955-60

.Striessnig J (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cell Physiol Biochem* 9(4-5):242-69.

.Striessnig J, Murphy BJ, Catterall WA (1991). Dihydropyridine receptor of L-type Ca²⁺ channels: identification of binding domains for [3H](+)-PN200-110 and [3H]azidopine within the alpha 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(23):10769-73.

.Sugiura Y, Woppmann A, Miljanich GP, Ko CP (1995). A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol* 24(1):15-27.

- .Surprenant A, Shen KZ, North RA, Tatsumi H (1990). Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol*. 431:585-608.
- .Swartz KJ (1993). Modulation of Ca²⁺ channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron*. 11(2):305-20.
- .Swartz KJ, Merritt A, Bean BP, Lovinger DM (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca²⁺ channels and synaptic transmission. *Nature* 361(6408):165-8.
- .Takahashi K, Ueno S, Akaike N (1991). Kinetic properties of T-type Ca²⁺ currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 65(1):148-55.
- .Takahashi T, Momiyama A (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366(6451):156-8.
- .Tottene A, Moretti A, Pietrobon D (1996). Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci* (20):6353-63.
- .Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 12(9):349-54.
- .Turner TJ, Adams ME, Dunlap K (1993). Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20):9518-22.
- .Uchitel OD (1997). Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon* 35(8):1161-91.
- .Uchitel OD, Protti DA (1994). P-type calcium channels and transmitter release from nerve terminals. *News Physiol Sci* 9:101-105.
- .Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8):3330-3.
- .Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD (2001). Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch*. 441(6):824-31.
- .Urbano FJ, Piedras-Renteria ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003). Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(6):3491-6.
- .Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Uchitel OD (2002). Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions *Mol Membr Biol* 19(4):293-300.

- .Vacas J, Fernandez M, Ros M, Blanco P (2003). Adenosine modulation of $[Ca^{2+}]_i$ in cerebellar granular cells: multiple adenosine receptors involved. *Brain Res.* 992(2):272-80.
- .Wainman P, Shipounoff G (1941). The effects of castration and testosterone propionate on the striated perineal musculature of the rat. *Endocrinology* 29:955-978.
- .Wakamori M, Mikala G, Mori Y (1999). Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca^{2+} channel current in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 15;517 (Pt 3):659-72.
- .Wang G, Dayanithi G, Custer EE, Lemos JR (2002). Adenosine inhibition via A(1) receptor of N-type Ca^{2+} current and peptide release from isolated neurohypophysial terminals of the rat. *J Physiol* 540(Pt 3):791-802.
- .Wessler I, Dooley DJ, Werhand J, Schlemmer F (1990). Differential effects of calcium channel antagonists (omega-conotoxin GVIA, nifedipine, verapamil) on the electrically-evoked release of $[^3H]$ acetylcholine from the myenteric plexus, phrenic nerve and neocortex of rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341(4):288-94.
- .Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9(6):1099-115.
- .Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA (1995). Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of braincalciumchannels. *J Neurosci* 15(10):6403-18.
- .Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994). Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264(5155):107-11.
- .Williams M (1987). Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 27:315-45.
- .Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Philipson LH, Miller RJ, Johnson EC, Harpold MM, Ellis SB (1994). Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J Biol Chem* 269(35):22347-57.
- .Woppmann A, Ramachandran J, Miljanich GP (1994). Calcium channel subtypes in rat brain: biochemical characterization of the high-affinity receptors for omega-conopeptides SNX-230 (synthetic MVIIC), SNX-183 (SVIB), and SNX-111 (MVIIA). *Mol Cell Neurosci* 5(4):350-7.
- .Wu LG, Saggau P (1994). Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12(5):1139-48.
- .Wu LG, Saggau P (1994). Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci* 14(9):5613-22.

.Wu LG, Saggau P (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 20(5):204-12.

.Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19(2):726-36.

.Wang G, Dayanithi G, Custer EE, Lemos JR (2002). Adenosine inhibition via A(1) receptor of N-type Ca(2+) current and peptide release from isolated neurohypophysial terminals of the rat. *J Physiol* 540(Pt 3):791-802.

.Yamamoto LA, Lapa AJ, Souccar C (1994). Prejunctional regulatory actions of androgens on a hormone sensitive muscle. *Muscle Nerve* 17(8):906-12.

.Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 385(6615):442-6.

.Zamponi GW, Bourinet E, Snutch TP (1996). Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol* 151(1):77-90.

.Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32(11):1075-88.

.Zhang ZD, Kwan CY, Daniel EE (1993). Identification of Ca(2+)-release channels in smooth muscle and isolated membranes. *Biol Signals* 2(5):284-92.