



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE UNA TOXINA
PURIFICADA DEL VENENO DE *Tityus discrepans* EN LA
SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR DE GLIAS DE
GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Alejandra E. Guevara Zambrano como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(a): Cecilia J. Castillo.

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL-2016

ACTA DE VEREDICTO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, con la finalidad de examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Alejandra E. Guevara Z, CI: 19.559.991 para optar por el título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por el reglamento respectivo, lo consideramos aprobado con la calificación de veinte (20) puntos. Con la finalidad de dar fe de ello, se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los veintinueve días del mes de Abril de 2016.



Dra. Cecilia Castillo

CI: 12.416.985

Tutora Académica



Dr. Fernando González

CI: 3.663.730

Jurado Principal



Dra. Gina D' Suze

CI: 4.416. 519

Jurado Principal

RESÚMEN

Los escorpiones se encuentran distribuidos por todo el mundo, desde Australia, África, Asia, Europa hasta en América. Están representados por más de 1.500 especies hasta ahora incluidas en 18 familias distintas, siendo *Buthidae* la más grande con 800 especies diferentes y a la que se le han atribuido la mayor cantidad de accidentes escorpiónicos letales.

El veneno de escorpión está compuesto principalmente por péptidos, enzimas, lípidos, nucleótidos y aminas biogénicas. En el caso de la especie *Tityus discrepans* (*T. discrepans*), contiene componentes en su mayoría neurotóxicos, algunos de estos con potencial antibacteriano, antimicótico, procoagulante, anticancerígeno, entre otras propiedades. Uno de sus componentes es el objeto de estudio de este trabajo.

Por otra parte, las células gliales son de gran importancia para el funcionamiento adecuado del Sistema Nervioso (SN). Cumplen funciones de mantenimiento u homeostasis, controlando el medio químico extracelular apropiado para la señalización neuronal, forman la envoltura de mielina responsable de la conducción saltatoria rápida de potenciales de acción (PA) y elaboran respuestas que protegen ante cualquier daño o patología.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la fracción 19 (F-19) componente del veneno de *T. discrepans* sobre la señalización de Ca^{2+} intracelular de glías de ganglios de la raíz dorsal (GRD), se purificaron y aislaron los componentes del veneno completo por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Las respuestas de Ca^{2+} en las glías producidas por la aplicación de la F-19 se registraron en tiempo real mediante la técnica de Imagenología de Ca^{2+} , usando como indicador de Ca^{2+} citosólico Fura-2 AM. Todo lo anterior con la finalidad de determinar el blanco de acción de este componente del veneno.

La aplicación de condiciones y el uso de inhibidores específicos permitió determinar características importantes del mecanismo involucrado en el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de F-19. Probablemente se trate de un receptor metabotrópico cuya activación desencadena la liberación de iones Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. Finalmente, mediante el estudio del efecto de la fracción sobre la respuesta producida por el ATP en estas células, se determinó que el blanco fisiológico de la F-19 en células gliales de GRD probablemente es el receptor metabotrópico de Angiotensina II tipo 1 (AT_1R). Este receptor podría estar implicado en la recuperación de la respuesta al ATP observada después de la aplicación de F-19.

Palabras clave: *Tityus discrepans*, toxina, calcio, ganglio, raíz dorsal, Imagenología de Ca^{2+} , Fura-2AM, Angiotensina II tipo 1 (Ang II), Adenosina 5' trifosfato (ATP), receptor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia por sus conocimientos, su ayuda, su paciencia aportadas durante este largo proceso.

A la Dra. Lisbeth y a Marianela por instruirme con sus conocimientos y su ayuda al momento de cultivar las células.

Al Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y su Unidad de Neurociencias por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en sus instalaciones.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), su unidad de Neurofarmacología Celular y a la Dra. Gina por brindarme la oportunidad de aprender una técnica de purificación de proteínas mientras obtenía la fracción de veneno estudiada.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, mi amada casa de estudio, y a mis excelentes profesores que participaron en mi formación como profesional y como persona, poniendo todo su esfuerzo aunque las condiciones no fueran las mejores.

A mi amadísima gran familia, a Giovanni y a mis amigos que siempre estuvieron pendientes de mí, queriéndome, apoyándome y ayudándome en lo que podían, durante estos meses de trabajo y ansiedad.

De corazón, muchas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESÚMEN	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
CAPÍTULO 1	
MARCO TEÓRICO.....	8
1.1 Sistema Nervioso Periférico.....	8
1.2 Células Neurogliales.....	10
1.3 Señalización de Ca ²⁺ en Glías.....	16
1.4 Óxido Nítrico.....	36
1.5 Biología del escorpión.....	38
1.6 Características bioquímicas del veneno de <i>T.discrepans</i>	41
1.7 Imagenología de Ca ²⁺ como técnica para medir variación en la [Ca ²⁺] _i	45
1.8 ANTECEDENTES.....	48
1.9 OBJETIVOS.....	50
CAPÍTULO 2	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
2.1.1 Recolección del veneno de <i>T.discrepans</i>	52
2.1.2 Cuantificación proteica del veneno de <i>T.discrepans</i>	52
2.1.3 Purificación de los componentes del veneno de <i>T. discrepans</i>	53
2.2.1 Extracción de Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD).....	55

2.2.2 Procedimiento para cargar las células con el indicador Fura-2AM	57
2.3 Registro de las señales de Ca^{2+} en células gliales de cultivo primario GRD.....	57
2.4 Especificaciones en protocolos.....	59
2.5 Pruebas estadísticas.....	61
CAPÍTULO 3	
RESULTADOS.....	62
3.1 Purificación del veneno completo de <i>T. discrepans</i> con CLAR-FR y cuantificación proteica.....	62
3.2 Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de F-19 en orden decreciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	64
3.3.1 Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de F-19 en orden creciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	67
3.3.2 Cálculo CE_{50} para F-19.....	70
3.4 Perfusión con F-19.....	71
3.5 Efecto de la condición $0Ca^{2+}$ en medio extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ producida por la aplicación de F-19.....	73
3.6 Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por F-19.....	76
3.7 Efecto de la aplicación de concentraciones distintas de ATP en orden decreciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	78
3.8 Efecto de la aplicación de concentraciones distintas de ATP en orden creciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	80
3.9 Perfusión con ATP.....	82

3.10 Efecto de la condición $0Ca^{2+}$ extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP.....	83
3.11 Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP.....	85
3.12 Efecto de la Perfusión de F-19 sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP.....	87

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES.....	108
REFERENCIAS	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nervios espinales.....	9
Figura 2. Micrografía electrónica y diagrama de la unidad neurona-CGS en GRD.....	13
Figura 3. Micrografía de una fibra mielinada del nervio Safenus de ratón.....	15
Figura 4. Micrografía de fibras Remak asociadas con células de Schwann no mielinizantes en Nervio Safenus de ratón adulto.....	16
Figura 5. Mecanismo general de endocitosis y tráfico de Receptores Acoplados a proteína G dependiente de β -arrestina y Dinamina.....	34
Figura 6. Mecanismo de liberación de Ca^{2+} desde RE en glias.....	36
Figura 7. Ejemplar de la especie de escorpión <i>Tityus discrepans</i>	41
Figura 8. Estructura de las toxinas Bactridina 1, TdNa3, Discrepina.....	44
Figura 9. Indicador químico de Ca^{2+} Fura-2AM.....	45

Figura 10. Cultivo dissociado de GRD cargados con Fura-2AM.....	46
Figura 11. Diagrama de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	55
Figura 12. Diagrama del procedimiento extracción de Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD) de ratas adultas Sprague-Dawley.....	56
Figura 13. Diagrama del equipo utilizado para la detección de señales de Ca^{2+} de la Unidad de Neurociencias del IDEA.....	59
Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido de la separación de los componentes polares veneno completo de <i>Tityus discrepans</i> por CLAR-FR.....	63
Figura 15. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de F-19 en orden decreciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	66
Figura 16. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de F-19 en orden creciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	69
Figura 17. Gráfico de la respuesta promedio a la F-19 en función del logaritmo de la concentración para el cálculo de CE_{50}	70
Figura 18A. Registros representativos de las respuestas a la perfusión con F-19 10 $\mu\text{g/mL}$	72
Figura 18B. Registros representativos de las respuestas a la perfusión F-19 1 $\mu\text{g/mL}$	73
Figura 19. Efecto de la condición $0Ca^{2+}$ en medio extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ por la aplicación de F-19.....	75
Figura 20. Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por F-19.....	77

Figura 21. Efecto de la aplicación de concentraciones distintas de ATP en orden decreciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	79
Figura 22. Efecto de la aplicación de concentraciones distintas de ATP en orden creciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$	81
Figura 23. Registro promedio del efecto de la perfusión de ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$	82
Figura 24. Efecto de la condición $0Ca^{2+}$ extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP.....	84
Figura 25. Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP.....	86
Figura 26. Efecto de la perfusión de F-19 sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP.....	92
Figura 27. Estructura molecular de la Suramina.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la Solución Salina Tamponada de Hank (HBSS).....	61
--	----

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Sistema Nervioso Periférico (SNP)

El Sistema Nervioso Periférico (SNP) está compuesto por nervios y ganglios. Los nervios se definen como agrupaciones de axones de neuronas sensoriales y motoras que se forman desde el Sistema Nervioso Central (SNC), transmitiendo información sensorial desde el ambiente interno y externo hacia el SNC para su procesamiento y desde éste información motora a los órganos efectores musculares y glandulares. Se clasifican en nervios craneales que presentan conexión directa con el encéfalo y nervios espinales o raquídeos, los cuales se conectan directamente con la médula espinal y la zona visceral motora (Curtis y col., 2008).

Cada nervio espinal presenta una división sensorial o sensitiva llamada raíz dorsal y una división motora llamada raíz ventral. La raíz dorsal se adentra en la parte dorsal de la médula espinal y transporta información sensorial referente al tacto, dolor y temperatura desde la piel, los músculos y los órganos internos hacia la médula espinal. Por otra parte, la raíz ventral sale de la parte ventral de la médula espinal e inerva los músculos esqueléticos y la región motora visceral (Kandel y col, 2000).

El SNP también está compuesto por estructuras llamadas ganglios que pueden ser sensoriales o autonómicos. Estos están compuestos por agrupaciones de cuerpos celulares neuronales organizados alrededor de una masa de extensiones nerviosas (axones y dendritas) llamada neuropilo (Randall y col., 2002).

Los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales están agrupados en los Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD), los cuales se encuentran por fuera de la médula

espinal y cerca de la entrada de la raíz dorsal a esta estructura (Figura 1). Las neuronas que componen estos ganglios no presentan dendritas, por lo tanto no reciben sinapsis, además presentan un solo axón que se bifurca en forma de T, donde las ramificaciones largas se extienden hacia la periferia y forman los terminales sensoriales; mientras que las ramificaciones cortas se adentran en el asta dorsal de la médula espinal, estableciendo sinapsis con interneuronas o ascendiendo hasta el encéfalo a través de cordones de materia blanca.

La mayoría de la información referente a estímulos sensoriales (mecánica, térmica, dolorosa y propioceptiva) son transportados hacia el SNC por GRD (Hanani, 2005).

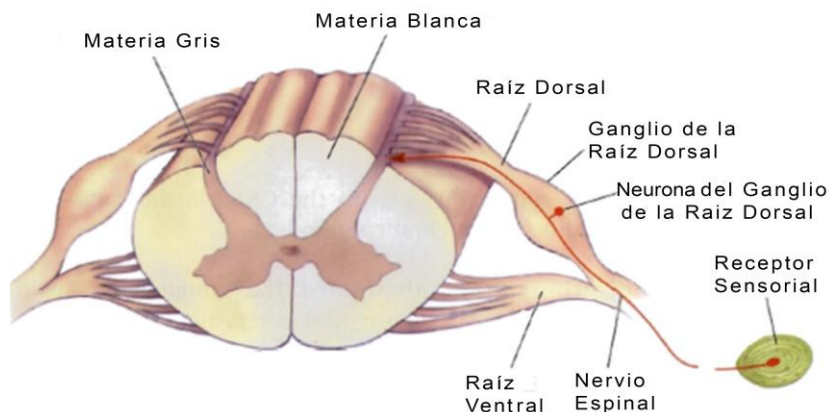


Figura 1. Nervios espinales. Adaptado de Bear y colaboradores (2007).

Otros tipos importantes de ganglios sensoriales son los ganglios trigeminales, los cuales proveen de información sensorial a la mayor parte de las regiones de la cabeza como el rostro y los dientes. También se encuentran los ganglios nodosos, los cuales

reciben entradas sensoriales desde órganos internos como el corazón, el estómago y el tracto respiratorio (Hanani, 2005).

1.2 Células Neurogliales

Las células sobre las cuales se estudió el efecto de la fracción del veneno de *T. discrepans* fueron las células gliales o Neuroglia. Estas células conforman el Sistema Nervioso (SN) junto con las neuronas y se definen como células eléctricamente no excitables, lo que significa que su membrana plasmática no es capaz de responder a cambios en la diferencia de potencial en reposo (V_m) generando potenciales de acción (PA).

Las células gliales presentan como función principal la homeostasis (estabilidad relativa, mantenimiento) del SN (Verkhatsky y Butt, 2013), aunque también se le han atribuido funciones importantes relacionadas con estados patológicos de este sistema (Nedergaard y col., 2010). Existen entre 50 y 100 veces más células gliales que neuronas en el SN de vertebrados (Kandel y col, 2000), de hecho, estas células componen el 60% de todas las células de este sistema en roedores y el 90% en humanos (Verkhatsky y Toescu, 2006). La importancia que estas células representan para un SN funcional está evidenciada en el incremento de su densidad relativa a lo largo del proceso evolutivo (Kettenmann y Ransom, 2013).

Estas células conforman una población altamente heterogénea debido a que presentan diferentes orígenes, estructuras y funciones. En el SN de mamíferos se clasifican en células gliales del SNP y células gliales del SNC. Las últimas a su vez, se clasifican en macroglia de origen ectodérmico y microglia de origen mesodérmico (Verkhatsky y Butt, 2013).

De forma más específica, dentro de las células gliales en el SNC se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos, glia-NG2 o ploidendrocitos (precursores oligodendrogliales) y la microglia (Verkhratsky y Butt, 2013). Los astrocitos participan de varias formas en el mantenimiento del medio extracelular químico apropiado para la señalización neuronal. En el SNP, las células gliales principales son las células de Schwann (mielinizantes, no mielinizantes y perisinápticas), las células envoltorias olfativas y las células gliales satélites. Los oligodendrocitos (SNC) y las células de Schwann mielinizantes (SNP) producen la envoltura de mielina. Subtipos de astrocitos (radiales) definen caminos migratorios para neuronas y el crecimiento de los axones durante el desarrollo cerebral. Por último, la microglia se comporta como fagocitos que participan en procesos de eliminación de patógenos y detritos durante el proceso de recuperación que ocurre después de una herida o infección.

La diferencia principal entre neuronas y células gliales consiste en que las últimas no son eléctricamente excitables. La carencia de excitabilidad que caracteriza a las glías se debe principalmente a:

- Expresión a baja densidad de canales de iones Na^+ dependientes de voltaje (100-10.000 menos en comparación con las neuronas). Estos canales permiten la corriente de entrada neta de iones Na^+ responsable de la fase ascendente del PA, representada por una despolarización (el potencial de membrana se hace más positivo).
- Presentan una gran densidad relativa de canales de iones K^+ dependientes de voltaje en reposo, lo que resulta en una alta conductancia a estos iones en reposo. La cantidad de canales de K^+ es incluso mayor a la cantidad de canales de iones Na^+ , lo que tiene como consecuencia un potencial de membrana en

reposo (V_m) relativamente negativo (-50 a -70mV en cultivos celulares de glías de vertebrados) (Hild y Tasaki, 1962).

- La mayoría de las células gliales están acopladas entre ellas por medio de uniones brecha, lo cual proporciona una baja resistencia que se deriva hacia glías adyacentes. Por esta razón, estas células tienden a estar a una diferencia de potencial común (Sontheimer y col., 1996).

Todas estas características tienden a evitar que el V_m glial alcance un nivel de despolarización suficiente (potencial umbral) para desencadenar un PA.

Células gliales en ganglios de la raíz dorsal (GRD)

Los principales tipos de glías en GRD son mayoritariamente células gliales satélite (CGSs), pero también se encuentran células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes (CSs) (Hanani, 2005).

Las CGSs consisten en células laminares sin verdaderos procesos que se encuentran rodeando a las neuronas de los ganglios sensoriales y autonómicos (Figura 2). Con respecto a los GRD, en la mayoría de los casos el cuerpo celular de cada neurona sensorial primaria tiene su propia envoltura delgada y completa de CGS compuesta por un grupo de varias de estas células muy cercanas a la membrana de la neurona (distancia entre membranas glial y neuronal: 20 nm). De esta manera en conjunto, constituyen una unidad morfológica y funcional distinta no encontrada en el SNC (Hanani, 2005; Pannese, 2010).

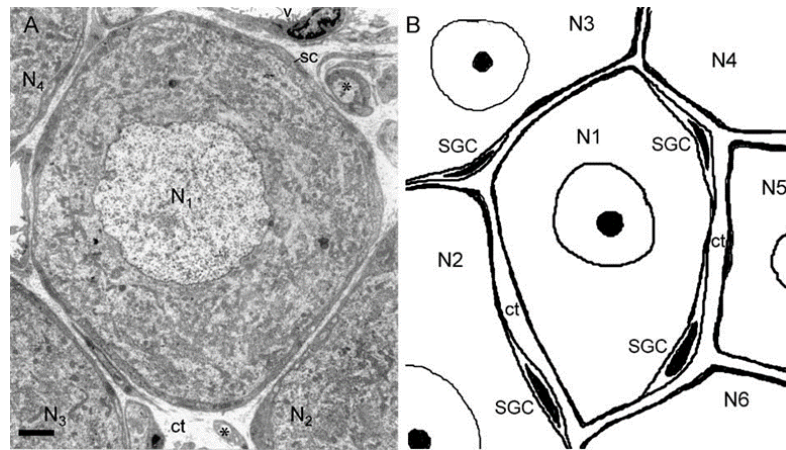


Figura 2. (A) Micrografía electrónica de la unidad neurona-CGS en GRD de ratón. (B) Diagrama esquemático de las relaciones anatómicas entre neurona (N₁-N₆)-CGSc en ganglios sensoriales. Tomado de Hanani. Brain Research Reviews 48 (2005) 457-476.

La cantidad de CGSs aumenta con el incremento del volumen de la neurona que rodean y también con el seccionamiento de las ramificaciones de las neuronas de GRD (Hanani, 2005).

Existe evidencia que indica que las CGSs controlan y modifican el microambiente de los ganglios sensoriales. Estas células expresan receptores y transportadores para numerosos neurotransmisores y sintetizan agentes neuroactivos (Glutamina Sintetasa, Citoquinas, ATP, Bradikinina, Glutamato, Ácido γ -aminobutírico, entre otros), por lo tanto, pueden modificar y ser modificadas por neuronas así como por otras células adyacentes, mediante la recepción y envío de señales. A través de la influencia de la activación de las CGSs sobre las neuronas sensoriales, estas células podrían participar en la transmisión y procesamiento de información sensorial aferente en estos ganglios sensoriales. Adicionalmente, en apoyo a la propuesta referente al papel de estas células en el procesamiento de la información sensorial, se ha observado que la estimulación de los nervios no solo lleva al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de las neuronas sensoriales, sino también en las CGSs cercanas y la estimulación mecánica de las CGSs resulta en

ondas en la $[Ca^{2+}]_i$ que se expanden no solo a CGSs vecinas, sino también a neuronas vecinas (Zhang y col, 2007; Gu y col, 2010; Suadecani y col., 2010).

Los transportadores de Glutamato capturan este neurotransmisor asociado al transporte de iones Na^+ y Cl^- , lo cual les permite reducir la excitotoxicidad por sobreactivación de receptores de este neurotransmisor en neuronas, adicionalmente, se han encontrado transportadores de Ácido γ -aminobutírico (GABA). El acoplamiento en cierto grado por uniones brecha podría permitirles la toma de iones K^+ del medio extracelular donde se acumula cuando las neuronas son excitadas y transportarlo lejos del sitio de acumulación, realizando una forma de “buffering espacial” de K^+ parecido al que realizan los astrocitos (Hanani, 2005).

Las células de Schwann también forman parte de las glías encontradas en los GRD. Estas se clasifican funcionalmente en dos fenotipos distintos: las células de Schwann mielinizantes (CSMs) (Figura 3) y las células de Schwann no mielinizantes o células Remak (CSNMs) (Figura 4) (Kettenmann y col., 2013).

Las CSMs están asociadas a axones de un calibre $>1\mu m$. Entre las funciones más conocidas de las CSMs se encuentra que producen la envoltura de mielina que consiste en una sustancia lipoproteica formada por la modificación estructural y bioquímica de la membrana, la cual permite la conducción saltatoria rápida del potencial de acción (PA) (Randall y col., 2002; Quarles y col., 2006). Las capas de mielina que rodean secciones de los axones de forma extensa y compacta, constituyen un camino de alta resistencia para la fuga de corriente desde el axón, esto permite que el flujo de corriente dentro de este se propague a mayor distancia. Sólo una célula de Schwann puede formar un segmento de mielina.

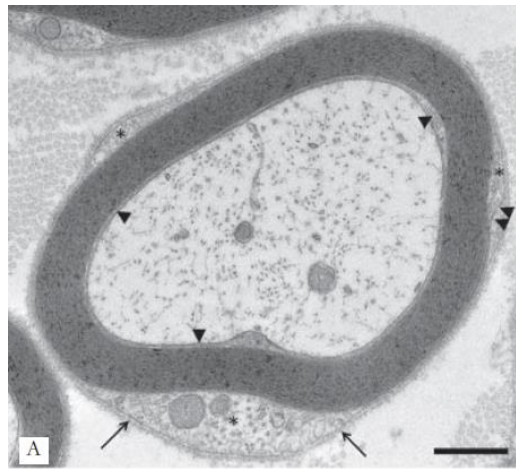


Figura 3. Micrografía de una fibra mielinada del nervio Safenus de ratón adulto. Tomado de Kettenmann y Ransom (2013).

Por otro lado, las CSNMs se encuentran asociadas a grupos de axones no mielinados de un calibre $<1\mu\text{m}$. Incluyen a las células de Schwann de fibras Remak, las células de Schwann terminales especializadas en la unión neuromuscular y de algunos traductores sensoriales, algunas fibras parasimpáticas y simpáticas pregangliónicas y fibras simpáticas postgangliónicas (Griffin y Thompson, 2008). El conjunto de estas células se encuentra asociado al sistema de alarma contra daños representado por las fibras nociceptivas, las cuales son un tipo especial de receptores sensoriales capaces de diferenciar entre estímulos nocivos e inocuos (Dubin y Patapoutian, 2010).

Existen diferencias entre estos dos fenotipos de CS. Una diferencia significativa es la relación 1:1 estricta entre axones y células de Schwann en fibras mielinadas, en contraste con el hecho que una sola o múltiples células de Schwann no mielinizantes se han observado no asociadas a axones, o en su defecto a uno, dos o más axones sin envoltura de mielina (Bilbao y Schmidt, 2015).

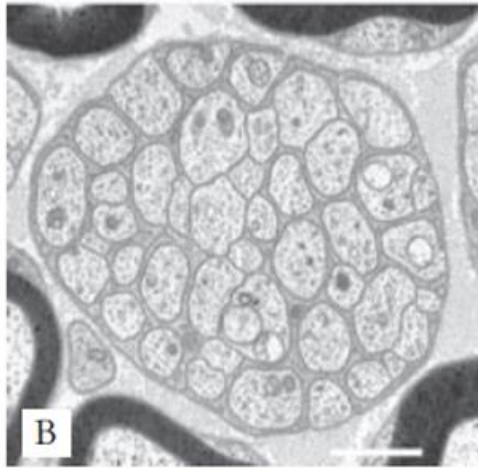


Figura 4. Micrografía de fibras Remak asociadas con células de Schwann no mielinizantes en Nervio Safenus de ratón adulto. Tomado de Kettenman y Ransom (2013).

1.3 Señalización Ca^{2+} en Glías

Las células gliales responden a los cambios que ocurren en el microambiente que comprende su entorno de una manera distinta a la forma en la que responden las neuronas. La señalización célula-célula, en lugar de estar asociada primordialmente a corrientes generadas por el flujo de iones a través de la membrana plasmática y a la difusión de moléculas en el espacio extracelular (neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas), está asociada al flujo intercelular directo de iones y segundos mensajeros por medio de uniones brecha (Kettenmann y Ransom, 2013)

Por otro lado, el sistema de señalización intracelular, en lugar de estar asociado a la generación de PA, está representado por movimientos de Ca^{2+} altamente controlados que representan la forma universal con la cual las glías responden a varios tipos de estimulación, tanto física como química (Deitmer y Verkhratsky, 1998). En este caso, la fuerza impulsora es generada por gradientes electroquímicos de Ca^{2+} entre citosol y espacio extracelular y entre el citosol y reservorios de Ca^{2+} intracelulares siempre dirigidos hacia el citosol, creados por el transporte activo de iones Ca^{2+} dependiente de energía.

Considerando que en las neuronas la señalización de Ca^{2+} constituye también un papel fundamental, es necesario establecer ciertas diferencias entre neuronas y glías. En las neuronas, los microdominios de elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son de corta duración, causados por la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y dependientes de ligando en la membrana plasmática que determinan la liberación rápida y focal de neurotransmisores en la hendidura sináptica. Por otro lado, en glías las señales de Ca^{2+} son usualmente iniciadas por la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, la cual produce elevaciones de Ca^{2+} más amplias y duraderas, determinando así una liberación de gliotransmisores más sostenida y lenta, como hasta ahora se ha descrito en astrocitos en SNC (Kettenmann y Ransom, 2013).

La concentración de iones Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el citosol de todas las células, tanto de procariontas como de eucariotas, se mantiene en un nivel excesivamente bajo comprendido entre 50-100 nM, el cual es ~15.000-40.000 veces menor en comparación con el espacio extracelular (1,5-2 mM) (Egelman y Montague, 1999; Kettenmann y Ransom, 2013).

Existe una diferencia de concentración similar entre el citosol y algunos organelos intracelulares, por ejemplo, el retículo endoplasmático (RE), el complejo de Golgi, algunos organelos ácidos (ej. vesículas secretorias) y la mitocondria. Estos organelos pueden contener hasta un 1mM de iones Ca^{2+} (Kettenmann y Ransom, 2013).

Los movimientos de iones Ca^{2+} producen fluctuaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Estos cambios están organizados espacio-temporalmente en diferentes partes de la célula y en los compartimientos intracelulares y son generalmente llamados señales de Ca^{2+} (Kettenmann y Ransom, 2013).

El RE es la principal fuente de iones Ca^{2+} en glias (Verkhratsky y Toescu, 2006; Nedergaard y col., 2009). Consiste en un sistema extenso de endomembranas (cisternas, túbulos y vesículas) que divide el citoplasma en compartimientos y canales (Curtis y col., 2008), el cual cumple múltiples funciones como la síntesis de proteínas y su modificación postraslacional y el transporte intracelular de varias sustancias (ARN y productos secretorios). Además, es capaz de acumular, almacenar y liberar Ca^{2+} al medio intracelular. El lumen de este organelo presenta una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ comprendida en un rango entre 0,2-1 mM (Verkhratsky y Toescu, 2006).

La membrana del RE contiene canales intracelulares de Ca^{2+} y la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endo(sarco)plasmático (SERCA). SERCA actúa como bomba de Ca^{2+} transportando iones Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico desde el citosol al lumen del RE. Los canales de Ca^{2+} presentes en esta membrana están representados por varias familias: (1) receptores de rianodina (RyRs), controlados directamente por Ca^{2+} citosólico (Hamilton, 2005); (2) receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃Rs) sensibles a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ y al segundo mensajero InsP₃ (Bezprozvanny, 2005); y (3) posiblemente receptores de ácido nicotínico adenina dinucleotido fosfato (NAADP), el mensajero movilizador de Ca^{2+} más potente (Ruas y col., 2010). Cabe destacar que los iones Ca^{2+} en el lumen del RE son los principales reguladores de los canales que liberan Ca^{2+} y de SERCA (Burdakov y col., 2005).

El gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el citosol y RE siempre dirigido hacia el citosol, constituye la fuerza impulsora de la señalización de Ca^{2+} intracelular en glias subyacente a la difusión de este ión.

El mecanismo de señalización intracelular en células gliales se define como un incremento transitorio, expandido y de larga duración (desde milisegundos a minutos)

en la $[Ca^{2+}]_i$. Este incremento aparece en forma de nanodominios e incluso microdominios de alta $[Ca^{2+}]_i$ (exceso de 10-100 μM) (Kettenmann y Ransom, 2013). Conceptualmente, las señales de Ca^{2+} pueden ser consideradas en función a cuatro procesos: (1) la entrada de iones Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de la membrana plasmática; y (2) la liberación de iones Ca^{2+} desde reservorios de Ca^{2+} intracelulares. Ambos procesos pueden contribuir a la fase ascendente de la señal de Ca^{2+} intracelular que representa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Por otro lado, (3) la salida de iones Ca^{2+} a través de la membrana plasmática fuera de la célula y (4) la incorporación de iones Ca^{2+} dentro de compartimientos intracelulares que representa la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, la cual puede resultar en la recuperación de la $[Ca^{2+}]_i$ a su nivel basal. Los primeros dos representan flujos de Ca^{2+} pasivos, ya que se llevan a cabo a favor del gradiente electroquímico de Ca^{2+} , mientras que los últimos dos procesos son considerados como transporte activo, en el cual se bombea Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico y por lo tanto requiere de energía (Deitmer y Verkhratsky, 1998).

La forma de las señales de Ca^{2+} está definida por su amplitud y curso temporal, donde el incremento en estos parámetros se observa con la disminución del volumen en el cual ocurren: las señales de Ca^{2+} son a menudo más grandes y rápidas en células pequeñas y en procesos celulares finos, en comparación a aquellas que ocurren en cuerpos celulares grandes (Deitmer y Verkhratsky, 1998).

Las proteínas de unión a Ca^{2+} (PUCs, buffers de Ca^{2+} , ej. como parvalbumina, calbindina-D28k, calretinina) presentan una afinidad alta a Ca^{2+} (K_d en un rango nanomolar muy bajo) (Ikura y col., 2002), lo cual limita la difusión de Ca^{2+} citosólico y facilita la localización de señales de Ca^{2+} citosólicas como adaptación fisiológica.

Varias señales ambientales físicas o químicas, inician la difusión de iones Ca^{2+} a través de varios grupos de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática y en las membranas intracelulares (endomembrana), la cual impulsa el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A estas señales se les da forma en el espacio y el tiempo mediante las proteínas de unión Ca^{2+} citoplasmáticas (PUCs) y por medio del transporte de Ca^{2+} activo mediante bombas e intercambiadores intracelulares y plasmalemales (Kettenmann y Ransom, 2013).

El número de moléculas señalizadoras/homeostáticas es relativamente limitado. Los más diversos son los canales iónicos permeables a Ca^{2+} plasmalemales representados por canales voltaje-dependientes (CCVD), ligando-dependientes (CCLD), mecanosensitivos (CCMS), “store-operated calcium channels” (SOCC) y una familia extensa de canales TRP “cationic transient receptor potencial channels”. El transporte de Ca^{2+} transmembrana es logrado por ATPasa- Ca^{2+} en la membrana plasmática (PMCA), ATPasa- Ca^{2+} del retículo endoplasmático (SERCA), ATPasa- Ca^{2+} del camino secretorio del complejo de Golgi (SPCA) y de otros compartimientos ácidos, (Brini y Carafoli, 2009; Pizzo y col, 2011) así como también por intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Guerini y Carafoli, 2005). Adicionalmente, las señales de Ca^{2+} involucran la acumulación y liberación de iones Ca^{2+} desde la mitocondria a través del canal uniportador, la permeabilidad del poro de transición y NCX mitocondrial (Bernardi y col., 2006; De Stefani y col., 2011).

A continuación, se describen brevemente las principales vías de señalización de Ca^{2+} , especificando en algunas su existencia en ciertos tipos gliales.

Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (CCVD): son canales iónicos selectivos para iones Ca^{2+} con características de activación e inactivación dependientes de voltaje

(Grienberger y Konnerth, 2012). Basándose en su umbral de activación, se clasifican en canales activados por voltaje alto (HVA) con un umbral de activación de -40mV y aquellos activados por voltaje bajo (LVA), también llamados tipo T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$), con un umbral de activación hacia -70mV (Tyson y Snutch, 2013). Son inhibidos por derivados de 3,4-dihidroquinazolina.

A su vez, los canales HVA se subdividen según características moleculares, biofísicas y farmacológicas en canales de Ca^{2+} tipo L, P/Q, N y R (Grienberger y Konnerth, 2012). Los canales de Ca^{2+} tipo L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$) soportan corrientes de larga duración, presentan inactivación dependiente de voltaje lenta y son bloqueados por dihidropiridinas (DHP), benzodiazepinas y fenilalkilaminas, clásicos antagonistas de canales de Ca^{2+} ; los canales de Ca^{2+} tipo N ($Ca_v2.2$) presentan una dependencia de voltaje y tasa de inactivación intermedia (más negativa y rápida que las tipo L, pero más positiva y lenta que las tipo T) y son selectivamente inhibidos por ω -conotoxina GVIA del caracol *Conus geographus*. Los corrientes tipo P fueron registrados por primera vez en neuronas de Purkinje y las corrientes tipo Q fueron registradas por primera vez en neuronas granulares cerebelares ($Ca_v2.1$). Estas corrientes difieren en su cinética, pero ambas son inhibidas con distinta afinidad por la toxina ω -agatoxina IVA de la araña embudo americana *Agelenopsis aperta*. Por último, los canales de Ca^{2+} tipo R ($Ca_v2.3$) son sensibles de forma selectiva a la toxina peptídica SNX-482 de la tarántula *Hysteroocrates gigas* (Catterall, 2011; Stotz y col., 2004).

Numerosos experimentos electrofisiológicos y microfluorométricos han revelado la presencia de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en astrocitos (Barres y col., 1990),

oligodendrocitos (von Blankenfeld y col., 1992) y células de Schwann (Amedee y col., 1991).

Canales de Ca^{2+} ligando dependientes (CCLD): conocidos también como receptores ionotrópicos, están representados principalmente por dos clases topológicamente distintas, receptores purinérgicos P2X y receptores de glutamato ionotrópicos. Generalmente presentan una selectividad relativa con respecto a la división catión/anión y relativamente débil entre diferentes cationes. Algunos receptores ionotrópicos son más selectivos a cationes divalentes, en particular a Ca^{2+} . De forma importante, existen tipos específicos de CCLD que responden a los dos principales neurotransmisores excitadores: Glutamato (receptores NMDA y algunos receptores AMPA/KA) y Adenosina 5' Trifosfato (ATP) (purinoreceptores P2X).

La importancia fisiológica de estos canales está definida por su habilidad de mediar corrientes de Ca^{2+} seguidas de su activación por neurotransmisores. Se ha reportado que todos los principales tipos de células gliales expresan varios tipos de receptores ionotrópicos, algunos de los cuales pueden ser permeables a iones Ca^{2+} .

Hay tres subtipos principales de receptores de glutamato ionotrópicos: AMPA, kainato y NMDA, llamados de esta forma debido a los agonistas sintéticos que los activan (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-ácido propiónico, kainato y N-metil-D-asparto), respectivamente.

Receptores ionotrópicos de glutamato activados por N-metil-D-aspartato (NMDA): ionotrópicos de glutamato con una variedad de subtipos que presentan un ciclo de activación e inactivación relativamente lento. Son canales catiónicos de alta conductancia permeables a iones Na^+ , K^+ pero con mayor permeabilidad a Ca^{2+} (Burnashev y col., 1995; Garaschuk y col., 1998). Su apertura depende de la presencia

de glicina extracelular como cofactor. Las propiedades específicas de estos receptores dependen de las subunidades que los componen, del estado de fosforilación y de forma importante del V_m . La permeabilidad aumenta con un incremento en la fosforilación y viceversa, por otro lado, la eficacia del bloqueo del receptor por iones Mg^{2+} extracelulares está determinado por el V_m : donde a mayor despolarización del V_m , mayor incremento en las corrientes dependientes de este receptor. El Mg^{2+} extracelular se une a un sitio del poro del canal abierto y actúa como bloqueador del flujo de corriente. Al V_m en reposo, el Mg^{2+} se une fuertemente al canal, pero cuando la membrana se despolariza, el Mg^{2+} es expulsado del canal por repulsión electrostática (Nowak y col., 1984). Es bloqueado selectivamente por el fármaco ácido 2-amino-5-fosfonoaléico (APV); por el fármaco alucinógeno fenciclidina y por el compuesto MK801 (Kandel y col., 2000).

Recientemente, se encontró que se expresan en oligodendrocitos (Micu y col., 2006) y astrocitos corticales, pero con propiedades biofísicas distintas a los receptores NMDA expresados en neuronas, por ejemplo, en astrocitos las corrientes no presentan bloqueo dependiente de voltaje por iones Mg^{2+} (Lalo y col., 2006). También están presentes en células gliales satélite de GRD (Castillo y col., 2013).

Receptores ionotrópicos de glutamato activados α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico (AMPA): receptores ionotrópicos de glutamato representados por una variedad de subtipos. Se caracterizan por la carencia de la subunidad receptora GluR2. Los receptores AMPA carentes de esta subunidad son permeables a iones Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y Zn^{2+} . Estos exhiben una rápida cinética de apertura (Geiger y col., 1995) y su relación I-V de rectificación interior surge del bloqueo voltaje dependiente por poliaminas intramoleculares. La corriente a través del canal está en función del número

de moléculas de agonistas unidas al receptor (Rosenmund y col., 1998). Son bloqueados por 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) (Kandel y col., 2000).

Receptores ionotrópico activado por Kainato (KA): son receptores ionotrópicos de glutamato con variedad de subtipos (Swanson y col., 1996). Son bloqueados por 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), al igual que los receptores AMPA (Kandel y col., 2000).

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR): son receptores de glutamato acoplados a proteína G. Se clasifican de acuerdo a su mecanismo de transducción y perfil farmacológico en tres grupos, el grupo I comprende mGluR1 y mGluR5, cuya activación desencadena la liberación de Ca^{2+} dependiente del segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato, mientras que el grupo II (mGluR2-3) y el grupo III (mGluR4-mGluR6-8) están acoplados a adenilato ciclasa. Los subtipos mGluR3 y mGluR5 son expresados por astrocitos y han sido reportados tanto en cultivo como in situ, incluyendo en hipocampo humano (revisado Winder y Conn, 1996; Condorelli y col., 1999).

Purinoreceptores ionotrópicos P2X: son canales iónicos permeables a cationes activados por Adenosina 5' Trifosfato (ATP); que presentan permeabilidad a iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Se encuentran ensamblados en forma homo o heteromérica con siete subunidades distintas (P2X1-7), las cuales por múltiples combinaciones pueden conformar siete (7) subtipos de receptores P2X descritos, los cuales difieren en su cinética, sensibilidad farmacológica y permeabilidad al Ca^{2+} (Burnstock, 1990; Browne y col., 2010; Coddou y col., 2011). Su activación produce una corriente de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de astrocitos y oligodendrocitos solo a concentraciones altas de ATP. Adicionalmente a estos receptores ionotrópicos de ATP,

se encuentran los receptores metabotrópicos de ATP P2Y, los cuales actúan mediante su acoplamiento a proteína G y la posterior liberación de Ca^{2+} dependiente del segundo mensajero InsP_3 . Ambos son bloqueados por el compuesto Suramina.

Los purinoreceptores ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y están presentes en astrocitos, oligodendrocitos (Walz y col., 1994; Matute y col., 2007) células de Schwann (Colomar y Amédée, 2001), así como también en glías satélite (Villa y col., 2010).

Canales de Ca^{2+} mecanosensitivos (MSCC): son canales de Ca^{2+} plasmalemales activados por tensión mecánica en la membrana. Son altamente permeables a cationes divalentes como el Ca^{2+} y su activación resulta en la entrada de Ca^{2+} extracelular y de regiones intracelulares. Son inhibidos por el compuesto gadolinio (Krasznai y col., 2003). Mediante experimentos de patch-clamp se ha demostrado la existencia de canales mecanosensitivos en neuroglia (Oh, 1997).

“Store-operated Ca^{2+} channels” (SOCCs): se definen como canales de Ca^{2+} ubicados en la membrana plasmática que se abren en respuesta al agotamiento del contenido de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (RE), generando un mecanismo que impulsa la entrada de iones Ca^{2+} desde el medio extracelular que garantiza la reposición del contenido de Ca^{2+} de este reservorio intracelular. Este mecanismo está relacionado con un sistema de señalización complejo y específico que conecta el RE con la entrada de Ca^{2+} , llamado “Store-Operated Calcium Entry” (SOCE). Involucra canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, sensores de Ca^{2+} en RE y posiblemente bombas de Ca^{2+} en RE (tipo SERCA).

Uno de los más estudiados es el canal de Ca^{2+} activado por la liberación de Ca^{2+} (canal CRAC), el cual presenta alta selectividad a iones Ca^{2+} sobre cationes

monovalentes dependiente de las cantidades micromolares de Ca^{2+} intracelular. Esta formado por una familia de proteínas homólogas llamadas Orai.

El sensor de Ca^{2+} que monitorea la $[\text{Ca}^{2+}]$ intraluminal en RE ha sido asociado con la molécula de interacción estromal (STIM). Las propiedades sensoras de Ca^{2+} de STIM están relacionadas con dos motivos de unión a Ca^{2+} “EF-hand” localizados en el N-terminal que está en contacto con el lumen del RE. A la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}} \sim 400 \mu\text{mol/L}$ los motivos EF se ensamblan con el dominio α -motivo estéril (SAM), la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ resulta en la disociación de Ca^{2+} del motivo “EF-hand” y el desdoblamiento del complejo EF-SAM, lo cual impulsa la oligomerización de los monómeros de STIM e inicia su migración hacia la membrana plasmática donde interactúa y activa los canales de Ca^{2+} Orai. La reposición del contenido de Ca^{2+} del RE impulsa el proceso opuesto que resulta en la disociación del complejo STIM y la inactivación de I_{CRAC} (Verkratsky y Pappas, 2014).

La activación I_{CRAC} no es dependiente de voltaje, presenta una relación corriente-voltaje rectificadora y es bloqueada por Ni^{2+} y Cd^{2+} (Armstrong y col., 1999). Estos canales están ampliamente expresados en astrocitos en cerebelo (Lo y col., 2002). Los “store-operated calcium channels” presentes en células no excitables son bloqueados por 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) (Bootman y col., 2002).

“Cationic transient receptor potential channels” (TRPCs): consisten en una familia de 30 canales catiónicos agrupados en seis subfamilias homotetraméricas y heterotetraméricas identificadas en mamíferos. Son permeables a cationes pero no presentan selectividad estricta para iones Ca^{2+} . Se activan por estímulos diversos tales como pH, osmolaridad, Ca^{2+} , fuerza mecánica, temperatura y varias cascadas de señalización intracelular; despolarizando el V_m de la célula. Se encuentran comúnmente

en células epiteliales, pero pueden ser encontrados en otros tipos celulares. Relativamente pocos ligandos endógenos son conocidos para su activación. Muchos de estos son potenciados por la activación de fosfolipasa C (PLC), receptores acoplados a proteína G y receptores de tirosina quinasa (Wu y col., 2010), pero no se conoce claramente el mecanismo de potenciación (Trebak y col., 2007).

Los TRPC pueden contribuir con el mecanismo SOCE. STIM puede interactuar con varias isoformas TRPC y activar a los canales TRPC1 y TRPC3. Las corrientes mediadas por estos canales son distintas de I_{CRAC} en su apertura, conductancia y permeabilidad (Ambudkar y col., 2007; Verkratsky y Parpura, 2014).

Son bloqueados por inhibidores no específicos como rutenio rojo y flufenamato, pero existen otros inhibidores relativamente más específicos para TRPA1 como HC-030031 (Caterina y col., 1997) y La^{3+} , el cual es útil para reconocer TRPC4 o TRPC5, ya que potencian estos canales y bloquean la mayoría de otros canales TRP y canales permeables a Ca^{2+} (Strübing y col., 2001). Se ha encontrado la expresión de estos canales en astrocitos (Malarkey y col., 2008).

ATPasa de Ca^{2+} en la membrana plasmática (PMCA): consiste en una enzima con un peso molecular de 138.000 Da altamente ubicua en organismos eucariotes (Carafoli y col., 1985). Existen al menos 20 isoformas generadas a partir del “splicing” alternativo de 4 genes distintos. Es una bomba iónica tipo P, definidas de esta forma por la formación de un intermediario fosforilado de alta energía (aspartil-fosfato) durante su ciclo catalítico. Esta bomba transporta un ión Ca^{2+} al medio extracelular por cada molécula de ATP que hidroliza. Cuando el Ca^{2+} intracelular se eleva producto de la activación de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente o ligando dependiente, el Ca^{2+} se une la proteína Calmodulina (CaM), la cual presenta cuatro sitios de unión a Ca^{2+} . El

estado conformacional de esta proteína depende de cuántos iones Ca^{2+} estén unidos, lo cual la convierte en un sensor de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Carafoli, 1987; Guerini y col., 2005).

El complejo Ca^{2+} -CaM estimula a la PMCA incrementando su afinidad por Ca^{2+} y por ATP además de incrementar su $V_{\text{máx}}$, lo cual lleva a la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a su nivel de reposo (Benaim y Meis, 1990; Benaim, 1993; Carafoli y col., 1996). Son inhibidas por el inhibidor competitivo de ATPasas tipo P Ortovanadato (Dux y Martonosi, 1983). Algunas isoformas de estas bombas de Ca^{2+} han sido encontradas en astrocitos (Fresu y col., 1999).

ATPasa de Ca^{2+} de retículo endo(sarco) plasmático (SERCA): consiste en una ATPasa tipo P unida a membrana intracelular que secuestra iones Ca^{2+} (dos Ca^{2+} por molécula de ATP hidrolizada) hacia el lumen del retículo endo(sarco)plasmático (Grover, 1985; Misquitta y col., 1999). Presenta un peso molecular entre 109.000 y 115.000 Da (Carafoli, 1987). SERCA es bloqueada por el inhibidor específico Tapsigargina y por el compuesto Vanadato (Michelangeli y East, 2011). Ambas ATPasa de Ca^{2+} cumplen un papel fundamental en la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular.

El uso de sus inhibidores específicos ha demostrado su existencia en astrocitos, microglia y oligodendrocitos.

ATPasa- Ca^{2+} de camino secretorio del complejo de Golgi (SPCA): se trata de una ATPasa de Ca^{2+} tipo P que se encuentra principalmente en la membrana media del aparato de Golgi y otros compartimientos más distales del camino secretorio (Wuytack y col., 2003). Esta involucrada en la entrega de Ca^{2+} y Mg^{2+} dentro del camino secretorio (Lapinskas y col., 1995). No se han encontrado inhibidores específicos para SPCA, pero son inhibidas por vanadato (Michelangeli y East, 2011). Mediante un análisis por

Western blot, se demostró la existencia de SPCA1 en astrocitos y oligodendrocitos (Murín y col., 2006).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX): La familia de NCX en mamíferos está representada por tres genes NCX1, NCX2 y NC3 que se expresan en astrocitos. De acuerdo a la estequiometría, 3 Na^+ por un Ca^{2+} , pueden operar en modo delantero (la extrusión de Ca^{2+} y el influjo de Na^+) y en modo reverso (la entrada de Ca^{2+} y la extrusión de Na^+). El cambio entre estos modos operacionales es controlado por los gradientes iónicos transmembrana de Na^+ y Ca^{2+} y el valor del potencial de membrana. Este intercambiador es bloqueado por el compuesto Benzamil (Weiss y col., 2004). Se han encontrado en procesos astrogliales perisinápticos (Guerini y col, 2005; Minelli y col., 2007).

Canal uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (CUM): localizado en la membrana interna de este organelo, se encarga de consumir el Ca^{2+} acumulado en la matriz mitocondrial pasando Ca^{2+} a favor del gradiente electroquímico, sin acoplamiento directo de la hidrólisis de ATP o el transporte de otros iones. Se une a Ca^{2+} con extrema facilidad ($K_D \leq 2$ nM), permitiendo alta selectividad a Ca^{2+} . Es un canal rectificador, haciéndolo especialmente efectivo para el consumo de este ión en la mitocondria energizada (Kirichok y col, 2004). Es bloqueado por el compuesto Rutenio rojo (Baughman y col, 2011). Se ha encontrado en astrocitos (De Stephani y col, 2011).

Receptores acoplados a proteína G (RAPG) o receptores de siete dominios transmembrana (7-TM): conforman la familia más grande de proteínas de membrana codificada por más de 800 genes en el genoma humano (Fredriksson y col., 2003). Estos receptores median la mayoría de las respuestas celulares a hormonas y neurotransmisores, también son responsables de los sentidos de la visión, el olfato y el

gusto; detectando un amplio espectro de señales extracelulares que incluyen fotones, iones, pequeñas moléculas orgánicas y proteínas completas. Los RAPG representan uno de los principales puntos de comunicación entre el ambiente externo e interno de una célula.

De acuerdo a la guía de la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica, los RAPG no sensoriales (excluyendo los receptores de luz, olor y sabor) pueden ser clasificados de acuerdo a su secuencia, similaridad estructural y propiedades farmacológicas en cinco familias: rodopsina (familia A), secretina (familia B), glutamato (familia C), adhesión y receptores “frizzled/Taste2”.

La estructura de estos receptores puede ser dividida en tres partes: (1) la región extracelular que consiste en el N terminal y tres bucles extracelulares (ECL1-ECL3); (2) la región transmembrana que consiste en siete α -hélices (TM1-TM7) y (3) la región intracelular compuesta por tres bucles intracelulares (ICL1-ICL3), una hélice anfipática intracelular (H8) y el C terminal. De forma general, la región extracelular modula el acceso del ligando, la región transmembrana forma el núcleo estructural, une ligandos y traduce esta información a la región intracelular a través de cambios conformacionales; por último, la región intracelular interactúa con proteínas de señalización intracelulares, lo que resulta en una respuesta celular (Venkatakrishnan y col., 2013). La mayoría de los receptores 7-TM son generalmente reconocidos como RAPG debido a que la mayoría de las señales activan complejos proteínicos de unión a nucleótidos de guanina heterotriméricos, llamadas proteínas G. Estas proteínas actúan como interruptores moleculares dentro de la célula, debido a que están involucrados en la transmisión de señales desde una variedad de estímulos extracelulares.

Las proteínas G que se activan están compuestas por tres subunidades α , β y γ . Estas proteínas se clasifican generalmente en cuatro grupos de acuerdo a la homología de secuencia de sus subunidades α : el complejo heterotrimérico G_s contiene $G_{\alpha s}$ y las $G_{\alpha olf}$ olfatorias; en G_q se encuentran $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$ y $G_{\alpha 14}$; G_i contienen $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha z}$, transducina y gustducina; y las G_{12} contienen $G_{\alpha 12}$ y $G_{\alpha 13}$. Las proteínas G_s se acoplan a la estimulación de la enzima enlazada a membrana adenilato ciclasa que cataliza la transformación de ATP a cAMP, el cual activa a la proteína quinasa A (PKA). G_i se acoplan a la inhibición de adenilato ciclasa. G_q se acopla a la activación fosfolipasas específicas para fosfatidilinositol, por ejemplo fosfolipasa $C\beta$, generando los segundos mensajeros inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol, los cuales incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelular y subsecuentemente causan la activación de la proteína quinasa C (PKC). Por último, G_{12} se acoplan a la activación de GTPasas de bajo peso molecular Rho (factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (Dakaa, 2012).

Las subunidades $G\beta\gamma$ han demostrado traducir señales independientemente de $G\alpha$ que regulan la actividad de varias moléculas efectoras clásicas, como adenilato ciclasa y la PKC (Dakaa, 2012).

La exposición a corto plazo (segundos a minutos) de un RAPG a un agonista, a menudo resulta en la atenuación de la sensibilidad del receptor. Este proceso llamado desensibilización a menudo se relaciona con la internalización del receptor y es consecuencia de la combinación de diferentes mecanismos:

- Las subunidades $G\beta\gamma$ de la proteína G libres median el reclutamiento de quinasas de receptores acoplados a proteína G intracelulares (GRK) que promueven la modificación covalente del receptor activado por agonista. Estas quinasas fosforilan al receptor en residuos de serina y treonina localizados dentro

del tercer bucle intracelular y el dominio carboxilo terminal. Además de las subunidades $G\beta\gamma$, GRK también se une a la $G\alpha$ -GTP anclada a la membrana e inhibe la señalización por secuestro.

- La fosforilación de receptores RAGG ocupados por agonista promueve la unión del dominio N de la proteína β -arrestina a secuencias citosólicas del receptor mediante un cambio conformacional de la β -arrestina que le confiere alta afinidad. Este cambio es promovido por la unión del núcleo polar cargado positivamente de la β -arrestina con fosfatasas asociadas al receptor. La β -arrestina impide estéricamente el acoplaje del receptor a la proteína G, llevando a la inhibición de la señalización. Adicionalmente, la β -arrestina unida al receptor interactúa a través de la exposición del dominio C terminal con componentes de la maquinaria de endocitosis mediada por vesículas cubiertas por clatrina (VCC) como las cadenas pesadas de Clatrina que forman parte de los triskeliones y la subunidad β 2-adaptina del complejo adaptador de proteína 2 (AP2).

Los triskeliones de Clatrina se ensamblan como enrejados poligonales que impulsan la invaginación de la membrana y la formación de la vesícula. El complejo adaptador de proteína (AP2) dirige el ensamblaje de la Clatrina mediante funciones que desempeñan sus componentes: la subunidad α 2-adaptina especifica el sitio de ensamblaje de la Clatrina eligiendo como blanco regiones ricas en fosfolinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en la membrana plasmática, la subunidad β 2-adaptina interactúa con la cadena pesada de Clatrina e impulsa el ensamblaje de esta y la subunidad μ 2 recluta al receptor interactuando con motivos basados en tirosina dentro de este receptor.

- Estas vesículas formadas son disociadas de la membrana plasmática con ayuda de la GTPasa dinamina, la cual podría actuar como una enzima mecanoquímica. La unión de GTP promueve el ensamblaje de esta proteína en “forma de collar” alrededor del cuello de la invaginación causando la tubulación y la hidrólisis de GTP estimulada por el ensamblaje impulsa un cambio de conformacional que media la fisión de la vesícula (Mettlen y col., 2009).

Una vez internalizados los RAPG exhiben dos patrones distintos de interacción con β -arrestina. La clase de receptores A se disocia rápidamente de la β -arrestina después de la internalización. Estos receptores son movilizados a compartimientos ácidos dentro de los endosomas donde el ligando es disociado del receptor y este es desfosforilado por una proteína fosfatasa específica para RAPG. Posteriormente, este receptor se recicla cuando es enviado de vuelta a la membrana plasmática en un estado en el cual es competente para señalizar de nuevo (Ferguson, 2001) (Figura 5).

Los receptores de la clase B, entre los cuales se encuentra el receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT_1R), forman complejos estables receptor- β -arrestina. Estos receptores se acumulan en las vesículas endocíticas donde pueden ser marcados para degradación o ser reciclados lentamente hacia la membrana plasmática.

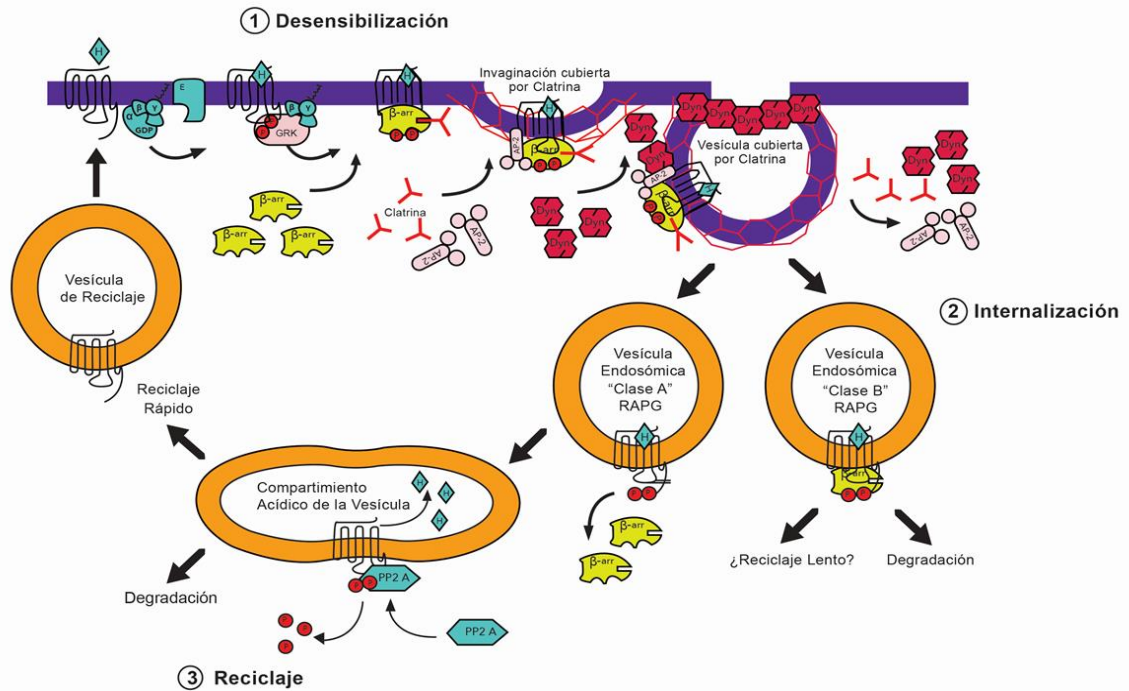


Figura 5. Mecanismo general de endocitosis y tráfico de Receptores Acoplados a proteína G dependiente de β -arrestina y Dinamina. Modificado de Luttrell y Lefkowitz. *Journal of Cell Science*. 115 (2002) 455-465.

Como en otras células no excitables, la señalización de Ca^{2+} intracelular en glias está asociada a la activación del flujo de iones Ca^{2+} a través de la membrana plasmática o a través de membranas intracelulares, la cual es desempeñada principalmente por el RE (Verkhratsky, 2006).

Generalmente, se inicia con la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G en la membrana plasmática de la célula glial (Verkhratsky, 2006). Cuando este receptor se encuentra enlazado al ligando que reconoce (neurotransmisor, hormona) y la proteína G se encuentra con el tipo correcto de receptor, se desencadenan una serie de eventos en la molécula de proteína G asociada: el intercambio de una molécula de GDP por una de GTP en la subunidad α y posteriormente, la división de la proteína G unida a GTP activada en dos componentes, la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$.

La subunidad α de la proteína G se une a la enzima fosfolipasa $C\beta$ (PLC β), una enzima enlazada a la membrana, activándola. La PLC β actúa sobre el fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$), dividiéndolo en dos segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e 1,4,5- inositol trifosfato (InsP $_3$). El InsP $_3$ difunde en el citosol y se une a receptores de InsP $_3$ (InsP $_3$ Rs) que son canales permeables a Ca^{2+} activados por InsP $_3$ en la membrana del retículo endoplasmático liso (ER), causando que este organelo libere su contenido de Ca^{2+} a favor del gradiente electroquímico (Bear y col., 2007) (Figura 6).

Los dominios de elevada $[Ca^{2+}]_i$ son sensados por la mitocondria, la cual es capaz de acumular iones Ca^{2+} mediante el canal uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. La entrada de iones Ca^{2+} actúa como el principal enlace entre la actividad celular y la producción de energía mediante la regulación del transporte electrónico mitocondrial y la síntesis de ATP (Kettenmann y Ranson, 2013).

El agotamiento del contenido de Ca^{2+} del RE, activa “store-operated calcium channels” (SOCCs) abundantes en todos los tipos de glías. Estos canales activan el mecanismo llamado “Store-Operated Calcium Entry”, el cual repone los reservorios de Ca^{2+} intracelular después del agotamiento mediante la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

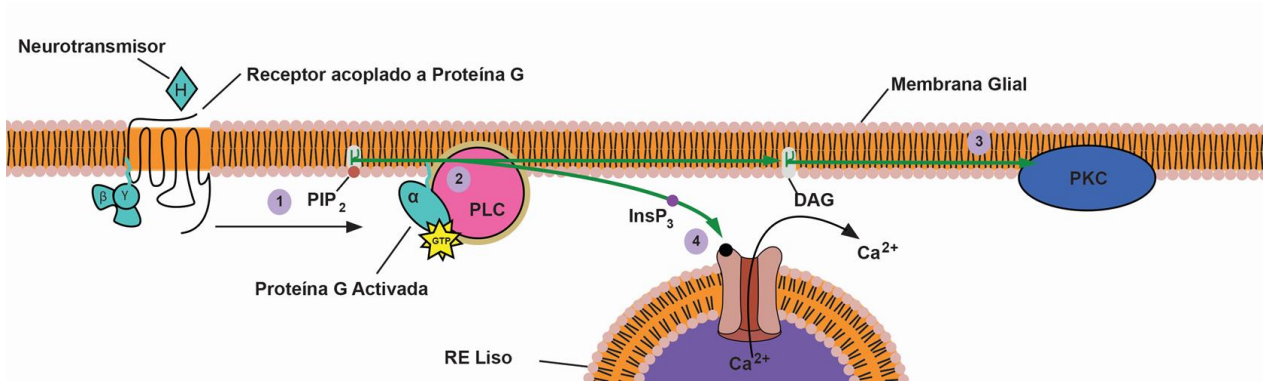


Figura 6. Mecanismo de liberación de Ca²⁺ desde RE en glia. Adaptado de Bear y colaboradores (2007).

1.4 Óxido Nítrico (ON)

Se tiene evidencia que el Óxido Nítrico (ON) regula la internalización de receptores acoplados a proteína G (RAPG), modulando la funcionalidad de algunos componentes de la maquinaria de tráfico (Wang y col., 2006; Kang-Decker y col., 2007; Ozawa y col., 2008).

Se trata de una molécula diatómica gaseosa, pequeña y sin carga, por ende altamente lipofílica y difusible. Esta molécula funciona dentro de la célula que lo produce como segundo mensajero y de forma paracrina, cuando se dispersa desde el sitio donde se produce a través de múltiples membranas celulares sin requerimiento de energía (10-20 células) hasta su blanco final (Murad, 2011).

Se trata de una de las moléculas biológicas estructuralmente más simples. Consiste en un único átomo de oxígeno enlazado a un átomo de nitrógeno a través de un enlace químico que exhibe un doble enlace parcial y un carácter de triple enlace parcial como resultado de un electrón desapareado que ocupa el orbital molecular antienlazante $2p\pi^*$. Este carácter de radical libre le confiere propiedades de alta reactividad química específica y determina su interacción con numerosos blancos *in vivo* (Dudzinski y col., 2006).

Se ha demostrado que funciona como una molécula de señalización ubicua que desarrolla diversos roles en estados fisiológicos y fisiopatológicos. A diferencia de otras moléculas de señalización que funcionan uniéndose de forma no covalente a un receptor, el ON ejerce sus funciones biológicas por modificaciones químicas de blancos, preferencialmente interactuando con radicales libres, metales de transición y grupos tiol.

El mecanismo de señalización celular por ON puede ser clasificado en: (1) señalización dependiente de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y proteínas quinasas dependientes de cGMP, canales y fosfodiésterasas (clásica), (2) unión de ON a la enzima citocromo C oxidasa en la mitocondria (menos clásica) y (3) señalización por ON independiente de cGMP, mayoritariamente relacionada a modificaciones postraslacionales, donde las más conocidas son la S-nitrosilación, S-glutationilación y nitración de tirosina (no clásica) (Martínez-Ruiz y col., 2011).

La producción de ON es catalizada en mamíferos por una familia de enzimas homodiméricas llamadas óxido nítrico sintasa (ONS) mediante un conjunto de reacciones óxido-reducción. Se forma a partir del aminoácido L-arginina utilizado como sustrato a través de dos pasos. En el primero, una molécula de nicotinamida-adeninad nucleotido fosfato reducida (NADPH) en el dominio C-terminal de la enzima cede electrones al oxígeno molecular, el cual reacciona con la molécula de L-arginina enlazada al sitio activo de la enzima, liberando una molécula de agua y formando L-omega-N-hidroxiarginina (LHA). LHA es el sustrato para el próximo paso de la catálisis de ON, donde un electrón es requerido para formar oxígeno molecular reducido, el cual se une al carbón guanidino de LHA para formar un intermediario tetraédrico. Este intermediario colapsa para formar el grupo carbonil de la L-citrulina con la formación concomitante de ON. La estequiometría completa de la catálisis de ON consume un mol

de L-arginina, 1,5 moles de NADPH, 2 moles de oxígeno molecular para generar un mol de ON, un mol de L-citrulina y dos moles de agua.

Actualmente, tres isoformas distintas han sido clonadas y caracterizadas: nONS (ON neuronal o ONS1) encontrada en algunas estructuras del SNC y SNP como la médula espinal y ganglios simpáticos y adrenales, iONS (inducible o ONS2), inicialmente identificada en macrófagos, pero que su expresión puede ser estimulada en cualquier célula o tejido provisto de los agentes inductores apropiados y la eONS (endotelial o ONS3) principalmente expresada en células endoteliales (Förstermann y Sessa, 2012).

1.5 Biología del escorpión

Los escorpiones son uno de los grupos más antiguos de animales en la Tierra, con más de 400 millones de años de antigüedad. Están representados actualmente por al menos 1.500 especies distintas que se encuentran distribuidas por todo el mundo (Possani y col., 1999).

Los segmentos funcionales del escorpión (tagmas) están constituidos por un cefalotórax corto, que lleva los quelíceros, pedipalpos, patas y ojos; un preabdomen (o mesosoma) formado por siete segmentos y un postabdomen (o metasoma) que representa la cola, constituido por cinco segmentos que terminan en un aparato punzante que cumple la función de inyectar veneno.

Generalmente, los escorpiones son de hábito nocturno y se alimentan de artrópodos vivos como insectos y arañas. Son animales ovovivíparos con alrededor de 30 crías por camada (Hickman y col., 2006).

Los escorpiones suramericanos potencialmente peligrosos para los humanos pertenecen al género *Tityus*, siendo todas sus especies potencialmente letales. La distribución de este género es exclusivamente neotropical, representado por 150 especies distribuidas desde Panamá hasta el norte de Argentina (Gonzalez-Sponga, 2011) causando morbilidad y mortalidad en habitantes de Brazil, Colombia y Venezuela (Mazzei De Dávila y col., 2010).

Distribución

Generalmente, los escorpiones se encuentran en regiones tropicales y subtropicales. En América del Sur, Venezuela es considerado el país que presenta mayor diversidad en especies, clasificándose hasta ahora 184 especies, agrupadas en 5 familias (Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae y Scorpionidae) y 17 géneros. La familia Buthidae en Venezuela está conformada por los géneros: *Ananteris* (30 especies), *Centruroides* (2 especies), *Isometrus* (1 especie), *Mesotityus* (1 especie), *Microtityus* (8 especies), *Rophalurus* (1 especie) y *Tityus* (56 especies), representando el 28,3% de la escorpio-fauna descrita en el país (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007; González-Sponga, 2011). Estas especies habitan en ambientes húmedos desde 0 hasta los 2000 m.s.n.m en zonas montañosas o pie de monte con vegetación húmeda. Específicamente, la especie *T.discrepans* se encuentra en gran parte del país, principalmente en la región centro norte-costera, abarcando el Distrito Capital y los estados Aragua, Miranda y norte de Guárico, de forma específica en el parque nacional Henry Pittier (Edo. Aragua), la población de Birongo (Edo. Miranda), Caracas y sus alrededores, Altos Mirandinos, parque Guatopo al norte de Altigracia de Orituco, Edo. Guárico y Tiara, Dtto. Ricaute (González-Sponga, 2011).

Después del emponzoñamiento

El emponzoñamiento escorpiónico consiste en un cuadro clínico que se produce a partir de la entrada del veneno al torrente sanguíneo por medio de una aguijoneadura. Dependiendo de la especie involucrada, cantidad de veneno inoculado y masa corporal del individuo afectado, este cuadro clínico puede llegar a tener consecuencias graves e incluso la muerte. En Venezuela, la época del escorpionismo ocurre generalmente durante la estación de lluvia (mayo-julio y octubre-noviembre), específicamente en cinco regiones macro-endémicas: (1) la región Centro-Norte (2) región Norte-Este, (3) región Centro-Oeste (4) región de los Andes y (5) la región Sur (Mazzei de Dávila y col., 2010). El promedio anual de incidencia es de 40 emponzoñamientos escorpiónicos por cada 100.000 habitantes y la mortalidad es de 0,04 por cada 10.000 habitantes (Chippaux y Goyffon, 2008). Lamentablemente, en Venezuela los casos de escorpionismo están altamente sub-registrados, tomando en cuenta que el escorpionismo y sus consecuencias representan una importante causa de emergencia clínica, en particular pediátrica en muchos países (Chippaux y Goyffon, 2008).

El veneno de escorpión produce una sintomatología diversa y compleja a nivel sistémico en humanos denominado “síndrome de emponzoñamiento por escorpión” (D’Suze y col., 2014), el cual se caracteriza por una serie de síntomas de tipo colinérgico como vómitos, dolor abdominal, sialorrea, náuseas, hipotensión arterial, broncoespasmos, diarrea, miosis y calambres y síntomas de tipo adrenérgico como palidez cutánea, piloerreción, frialdad en las extremidades, hipertensión arterial, taquipnea y midriasis. En casos donde el tratamiento no es aplicado a tiempo, se pueden desarrollar complicaciones adicionales como pancreatitis aguda, miocarditis, edema agudo pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria por escorpionismo,

trastornos de la coagulación y/o activación de procesos inflamatorios generalizados con liberación de citoquinas (Mazzei De Dávila y col., 2010).

1.6 Características bioquímicas del veneno de *T.discrepans*

La fracción de veneno estudiada proviene de la especie de escorpión *Tityus discrepans* (*T.discrepans*) (Figura 7). Esta especie pertenece al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida, Orden Scorpionida, Familia Buthidae y al género *Tityus*; del cual se han descrito al menos 56 especies en Venezuela (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007; González-Sponga, 2011).



Figura 7. Fotografía de un ejemplar de la especie de escorpión *Tityus discrepans*. Tomado de <http://diversidadbiologica.minamb.gob.ve/especies/ficha/10/12524/>

El veneno del género *Tityus* es considerado neurotóxico presentando componentes que modulan, abren y bloquean canales de iones Na^+ y K^+ voltaje dependientes de forma directa (Catterall y col., 2007) y canales de iones Ca^{2+} de forma indirecta (Grolleau y col., 2006). El veneno de este género está compuesto por una mezcla compleja de aminoácidos, péptidos, proteínas de alta y baja masa molecular,

sales, lípidos y mucopolisacáridos; donde la composición química del veneno en un momento determinado es influenciada por factores como variaciones genéticas, condiciones ambientales y el género del animal. Entre la diversidad de especies del género *Tityus*, el veneno de la especie *T.discrepans* ha sido el más estudiado en Venezuela.

El estudio proteómico del veneno mediante el empleo de las técnicas Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDITOF) y Nanometric Electrospray Ionization Ion Traps Mass Spectrometry (Nano-ESI-ITMS), determinó la existencia de 205 componentes con masas moleculares distintas comprendidas entre 272 y 57.908 Da (Batista y col., 2006).

De estos componentes, hasta la fecha solo se ha determinado la secuencia de 43 péptidos (Batista y col., 2006), de los cuales al menos 12 se han caracterizado fisiológicamente mostrando tener actividad curarizante, sobre canales iónicos, inflamatoria, anti-neoplásica, antibacteriana, antimicótica (D'Suze y col., 1995; 1997; 1999; 2004; 2010; Díaz y col., 2009, Joya y col., 2011). A los restantes solo se le han determinado los genes que las codifican y se les ha asignado una función putativa basada en la homología de su estructura primaria con otras toxinas, cuyo mecanismo ha sido determinado de forma experimental (Borges y col., 2006; Diego-García, 2007).

Entre estos componentes, destacan alta proporción de péptidos de baja M.M (<5 kDa), donde la mayoría estudiada bloquean canales de iones K^+ y péptidos de 6-8 kDa que modifican mecanismos cinéticos de apertura y cierre de canales de iones Na^+ dependientes de voltaje (Batista y col., 2006; Borges y col., 2006; Díaz y col., 2009; Diego-García y col., 2007; D'Suze y col., 1996; 1997; 1999; 2004a; 2004b; 2009; Peigneur y col., 2012; D'Suze y col., 2015). Las toxinas activas en canales de Na^+ están

compuestas por 60 a 70 aminoácidos y son estabilizados por cuatro puentes disulfuro, aquellas activas en canales de K^+ de cadena corta están compuestas por 34 a 38 aminoácidos estabilizadas por tres puentes disulfuro y las de cadena larga por 47 a 59 aminoácidos estabilizados por cuatro puentes disulfuro (Batista y col., 2006; Díaz y col., 2009; D' Suze y col., 1996; 1997; 1999, 2004a; 2004b; 2009; Prochnicka, 2006).

La separación de los componentes del veneno en base a su hidrofobicidad y pesos moleculares mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (CLAR-FR), permite distinguir distintas fracciones que se identifican por números de acuerdo al orden de elución: aquellas que eluyen en los primeros 10 minutos presentan masas moleculares entre 200 y 2.000 Da, fracciones que eluyen entre 10 y 20 minutos presentan masas moleculares entre 2 y 4 kDa, aquellas eluídas entre 20 y 30 minutos se encuentran entre 3 y 5 kDa, las eluídas entre 30 y 40 minutos que presentan masas moleculares entre 5 y 8 kDa y por último los péptidos que eluyen después de 40 minutos, los cuales son los más hidrofóbicos y presentan mayor peso molecular (>8 kDa) (Batista y col., 2006).

Solo la estructura tridimensional de una sola toxina, la Discrepina, ha sido determinada por resonancia magnética nuclear (RMN), mientras que otras, la Bactridina y TdNa3, han sido modeladas *in silico* (Figura 8) (Díaz y col., 2009; D'Suze y col., 2009). Se trata de proteínas globulares que adoptan un patrón de plegamiento similar: un motivo α/β con una α -hélice y 2 ó 3 láminas paralelas o antiparalelas β estabilizadas por 3 ó 4 puentes disulfuro. Cabe destacar que muestran un alto porcentaje de aminoácidos cargados distribuidos sobre la superficie de la proteína que permiten la interacción con el blanco fisiológico (Gurevitz y col., 2007) y su configuración espacial

ha sido conservada a pesar de la diversidad de secuencia aminoacídica (Froy y Gurevitz, 2003; Zhu y col., 2004; Bosmans y Tytgat, 2007; Forsyth y col., 2012).

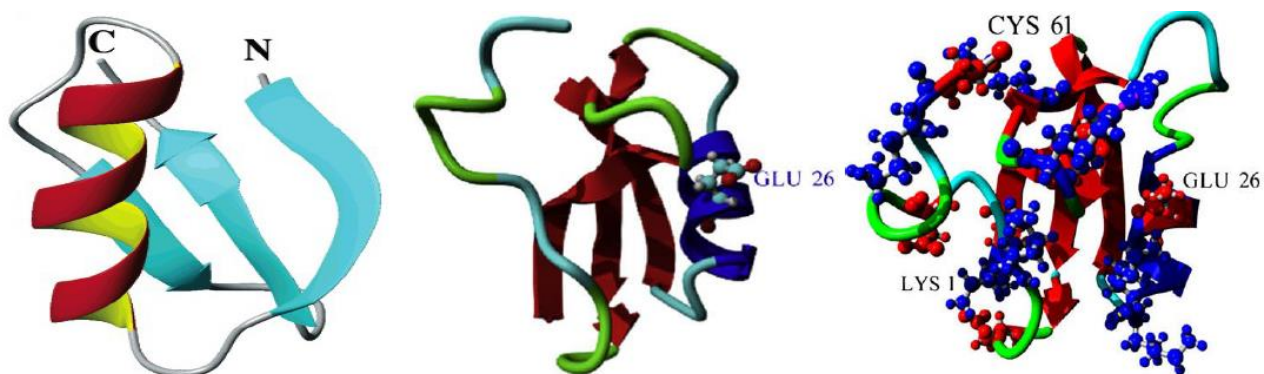


Figura 8. Izq. Bactridina 1 (Díaz y col, 2009) Cen: TdNa3 (D Suze y col, 2009) Der: Discrepina (Prochnicka-Chalufour y col, 2006).

Por otro lado, la F-19 estudiada representa el 1,59% del total del veneno de *Td*. Su repurificación por CLAR-FR resultó en ocho (8) picos, donde p7 es su componente mayoritario. Mediante el uso de electroforesis y espectrometría de masas se determinó que esta fracción de veneno está compuesta por al menos diez (10) componentes con masas moleculares comprendidas entre 3845,6 y 8157,7 Da (Cisneros, 2015).

Existe evidencia que indica que la F-19 induce incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en macrófagos peritoneales de ratón (Ramírez-Bello y col., 2014) y que adicionalmente presenta actividad apoptogénica sobre la línea celular cancerígena de neuroblastoma Neuro-2A (Cisneros, 2015)

1.7 Imagenología de Ca²⁺ como técnica para medir variación en [Ca²⁺]_i

En este estudio el registro de las señales de Ca²⁺ se realizó mediante el uso de la técnica Imagenología de Ca²⁺, la cual se caracteriza como una técnica versátil y ampliamente utilizada que permite medir en tiempo real y de forma individual $\Delta[Ca^{2+}]_i$ en un conjunto de células vivas. Esto se realizó mediante el uso de un indicador de Ca²⁺ libre citosólico fluorescente en el cual la variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por el indicador cuando se une a iones Ca²⁺ representa un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. Adicionalmente, la variación en la intensidad de fluorescencia se detecta y registra mediante un conjunto de equipos que funcionan en conjunto.

El indicador de Ca²⁺ citosólico fluorescente utilizado fue el Fura-2AM. Se trata de un indicador de Ca²⁺ químico que forma parte de una familia de indicadores de Ca²⁺ citosólicos muy sensibles y versátiles compuestos por la unión de un agente quelante altamente selectivo a Ca²⁺ (EGTA o BAPTA) y un fluoróforo (Figura 9). Se empleó su forma éster acetoximetil (Fura-2AM) debido a que su forma de carga no es invasiva para la célula.

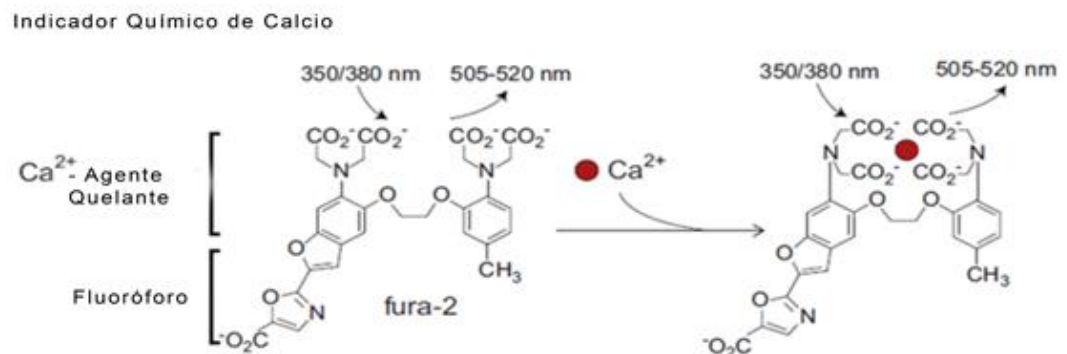


Figura 9. Indicador químico de Ca²⁺ Fura-2. Adaptado de Grienberger y Konnerth (2012) Neuron 73 862-885.

El Fura-2 es un indicador de Ca^{2+} radiométrico de excitación dual debido a que la unión a Ca^{2+} modifica la longitud de onda (λ) de excitación óptima del indicador. La forma del indicador unida a Ca^{2+} tiene una λ de excitación óptima a ~ 340 nm ($\lambda_e=340$ nm) y la forma libre de Ca^{2+} del indicador tiene una longitud de onda de excitación óptima a ~ 380 nm ($\lambda_e=380$ nm) (Figura 10).

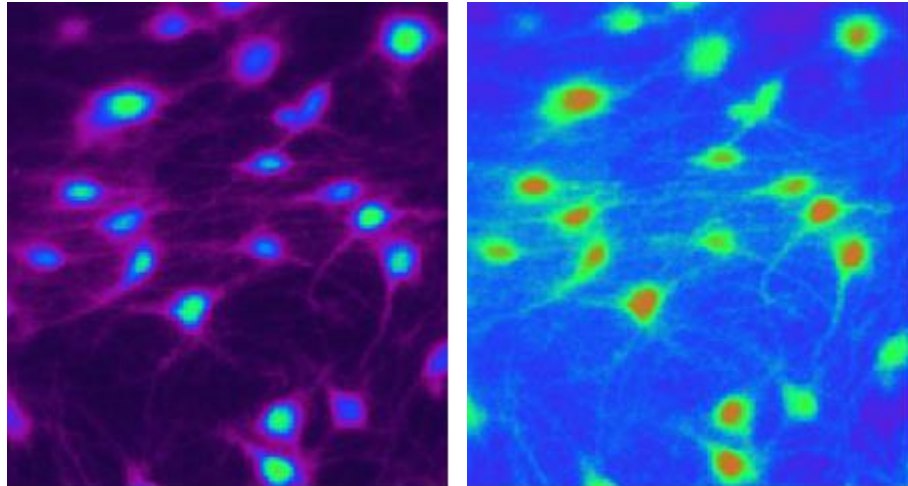


Figura 10. Cultivo disociado de GRD cargados con Fura-2AM ($5 \mu\text{M}$). Izq. $\lambda_e=340$ nm. Der. $\lambda_e=380$ nm. Objetivo Super fluor 40X en aceite.

El parámetro que indica un cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el ratio constituido por el cambio en la intensidad de la fluorescencia emitida por la forma unida a Ca^{2+} del indicador a $\lambda_e=340$ nm y el cambio en la intensidad de fluorescencia emitida por la forma del indicador libre de Ca^{2+} a $\lambda_e=380$ nm (F_{340}/F_{380}), con respecto a un ratio de fluorescencia emitida a 340nm y 380 nm basal (F_{340}/F_{380} basal).

Una elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementa la intensidad de la fluorescencia emitida por el indicador cuando es excitado a 340 nm y consecuentemente disminuye la intensidad de la fluorescencia emitida cuando el indicador es excitado a 380 nm. De

forma inversa, cuando ocurre una disminución de $[Ca^{2+}]_i$ aumenta la intensidad de la fluorescencia emitida cuando el Fura-2 es excitado a 380 nm y consecuentemente disminuye la intensidad de fluorescencia emitida por el indicador cuando es excitado a 340 nm (Bootman y col., 2013). Lo anterior ocurre debido a que teóricamente, siempre existe la misma cantidad de Fura-2 citosólico, por lo tanto, cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, estos iones se unen al indicador incrementando la concentración de Fura-2 unido a Ca^{2+} y consecuentemente disminuyendo la concentración de la forma del indicador libre de Ca^{2+} . El incremento en la concentración de la forma unida a Ca^{2+} y la disminución de la concentración de la forma libre de Ca^{2+} resultan en el incremento y disminución de sus respectivas emisiones de fluorescencia.

Entre las características generales de este indicador se encuentra que es excitable por luz ultravioleta (UV) 350 y/o 380 nm, su pico de emisión de fluorescencia se encuentra entre 505-520 nm, su constante de disociación (K_d) de Ca^{2+} es cercana a los niveles de Ca^{2+} típicos en células de mamíferos (~100 nM), presenta alta selectividad de unión a iones Ca^{2+} relativa a iones Mg^{2+} y por último alta resistencia al fotoblanqueo (Haugland y col, 1996).

El hardware de un sistema básico para Imagenología de Ca^{2+} consiste generalmente de un microscopio de investigación (típicamente invertido), una fuente de luz de amplio espectro, una cámara CCD o un tubo fotomultiplicador y un sistema que dirige la luz hacia filtros que la colectan en un rango específico de la radiación electromagnética.

1.8 ANTECEDENTES

Batista y colaboradores realizaron el primer análisis proteómico del veneno completo de *T. discrepans*. A partir de la purificación de veneno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), se obtuvieron 58 fracciones diferentes a partir de las cuales se obtuvieron 205 componentes identificados por espectrometría de masa (MS), presentando masas moleculares comprendidas entre 272 y 57.908 Da. Adicionalmente, se obtuvo la secuencia de aminoácidos total o parcial de 43 péptidos por degradación de Edman automatizada (Batista y col., 2006).

El trabajo de investigación más relacionado con este estudio se titula **“Macrophage alteration induced by inflammatory toxins isolated from *Tityus discrepans* scorpion venom. The role of exchangers $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ” (2014)**, realizado por Vanesa Ramírez y colaboradores en la unidad de Neurofarmacología Celular en el IVIC.

El envenenamiento por *T. discrepans* además de causar desordenes neurológicos, produce un síndrome de inflamación generalizada que se expande a todos los órganos, especialmente el páncreas, intestino, hígado y pulmones; el cual se caracteriza por el abundante secuestro e infiltración de macrófagos y neutrófilos (D’Suze y col., 2004). Macrófagos y linfocitos liberan de forma descontrolada citoquinas pro-inflamatorias que juegan un papel importante en el establecimiento de la inflamación generalizada que lleva a la falla multiorgánica. Se conoce que la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de macrófagos está regulada por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cual actúa como segundo mensajero activando diversas vías metabólicas celulares.

Los macrófagos fueron incubados con buffer HEPES (pH=7,4, 319 mOsmol/L) en presencia de 10 μM de los indicadores de Ca^{2+} fluorescentes fluo-4AM, Hoechst 33342

y merocianina 540 por treinta (30) minutos a 4°C en oscuridad. Las células cargadas fueron expuestas al veneno completo de *T. discrepans* y a cada una de las 40 fracciones aisladas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) (10 µg/mL de cada una) por sesenta (60) minutos. Se identificaron siete fracciones activas (InfTx1-7).

En un cromatograma resultado de la purificación del veneno completo de *T. discrepans* puede identificarse la fracción F-19 estudiada como la InfTx4 de acuerdo al tiempo de retención en la columna (28 minutos aprox.).

Las células fotografiadas por epifluorescencia de deconvolución 3D usando un microscopio automatizado vertical, fueron expuestas tanto a todo el veneno como a las fracciones (InfTx1-7) mostrando alteraciones claras después de una hora de tratamiento, entre estas pseudopodia, membrana internalizada, vacuolización y depósitos significativos de Ca²⁺ en forma de complejos Ca²⁺-fluo-4 en verde brillante. Los cambios en la intensidad de fluorescencia normalizada del complejo Ca²⁺-fluo-4 fueron llamados intensidad de fluorescencia verde (IF verde), representada por unidades arbitrarias en la intensidad de fluorescencia. Específicamente, las fracciones InfTx4-5-6 y 7 inducen un incremento significativo en la IF verde en los macrófagos representando un incremento en [Ca²⁺]_i, donde InfTx4 incrementó la IF verde x 2,71 con respecto al control.

1.9 OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el blanco fisiológico de la fracción F-19 aislada del veneno de la especie de escorpión *T.discrepans* en cultivos primarios de glias de Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD) de rata adulta.

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar el veneno del escorpión *T.discrepans* mediante el uso de un equipo Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).
2. Realizar el cultivo primario glias de Ganglios de la Raíz Dorsal de ratas adultas.
3. Determinar la concentración adecuada de F-19 ($\mu\text{g/mL}$) para observar la respuesta media del efecto de la fracción en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular (CE_{50}) mediante el estudio en un rango de concentraciones.
4. Determinar el blanco de acción de la F-19. Se estudiará si el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por la fracción, depende de Ca^{2+} extracelular o de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares.
 - Para determinar si depende de la entrada de Ca^{2+} extracelular, se eliminará el contenido de Ca^{2+} extracelular mediante la aplicación de la condición $0\text{Ca}^{2+}_{\text{ext}}$ +0,5 mM EGTA. Si es así, se estudiará la participación de canales y

receptores ionotrópicos descritos en la membrana plasmática de glias mediante el uso de sus inhibidores específicos.

- Para determinar si depende de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, se estudiará la participación de receptores de Ca^{2+} descritos en membranas intracelulares de glias mediante el uso de sus inhibidores específicos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Recolección del veneno de *Tityus discrepans*

Escorpiones adultos fueron recolectados en el Área Metropolitana de Caracas, Venezuela y posteriormente se mantuvieron vivos almacenándolos en envases de plástico con agua y comida. Para la obtención del veneno, el escorpión se mantuvo a 0°C con la finalidad de disminuir su actividad biológica para luego estimular eléctricamente de forma repetida el telsón del animal. Se recolectó el veneno en microtubos de 1,5 mL (Eppendorf^{MR}, Alemania), este se disolvió en agua destilada y se centrifugó durante un tiempo de 30 minutos a 15.000 g en una centrífuga refrigerada (Eppendorf^{MR}, Microcentifuge, 5417R; Alemania) a 4°C para descartar los componentes no polares carentes de toxicidad contenidos en el precipitado, entre estos mucoproteínas y partes del tejido glandular secretados al momento de la estimulación eléctrica del telsón realizada para la extracción del veneno.

2.1.2 Cuantificación proteica del veneno de *Tityus discrepans*

El contenido de proteínas se estimó por espectrofotometría (Eppendorf^{MR} BioPhometer plus) empleando la Ley de Lambert y Beer (Lambert, 1760), en la cual se asume que a $\lambda=280$ nm una (1) unidad de absorbancia/mL equivale a 1mg/mL de proteína y que la muestra proteica presenta un coeficiente de extinción molar (ϵ)= 1. El sobrenadante se liofilizó utilizando una centrífuga al vacío a -56°C (Refrigerated CentriVap Centrifugal Concentrator, LABCONCO; EE.UU) y se almacenó en una nevera (Revco Manufacturing Ltd, Suiza) a -80°C hasta el momento de su uso.

2.1.3 Purificación de los componentes del veneno de *Tityus discrepans*

El sobrenadante liofilizado con los componentes polares del veneno se resuspendía en agua bidestilada y se centrifugaba durante 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Tres (3) mg de veneno por corrida se separaban en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) (Waters 1525, Binary HPLC pumps) usando una columna de fase reversa C₁₈ analítica (C_{18a}) (250 x 10 mm, Vydac Hesperia, CA. USA). El sorbente de esta columna está compuesto por micropartículas porosas de sílica que se modifican químicamente para hacerlo no polar con un derivado silano que contiene un n-alkyl ligando hidrofóbico, en este caso n-octadecyl (C₁₈). La mezcla compleja a separar se aplicaba inicialmente al sorbente en presencia de “buffers” acuosos, posteriormente los componentes eluían por la adición de un solvente orgánico (Aguilar y Hearn, 1996).

Los componentes se separaron en función de las diferencias en polaridad que presentaban con respecto a la columna cromatográfica (fase estacionaria) y los solventes utilizados (fase móvil) usando un gradiente lineal de solventes desde una solución A (agua con 0,12% TFA) al 60% de la solución B (ACN con 0,1% de TFA) por 60 minutos (D'Suze y col., 1999), a un flujo constante de 1mL/min donde los componentes eluyen en orden del incremento de su hidrofobicidad (Aguilar y Hearn, 1996; Soto y Guadarrama, 2004).

La retención de los componentes menos polares de la muestra en la fase estacionaria (columna cromatográfica) se disminuye añadiendo a la fase móvil acuosa polar un solvente orgánico. De esta manera, la distribución de los componentes menos polares cambia hacia la fase móvil. En este caso se utilizó acetonitrilo (ACN) debido a su bajo grado de absorción de UV y bajo grado de viscosidad.

La fase móvil acuosa se acidificó agregando ácido trifluoroacético (TFA), el cual permite mantener las cargas de los grupos aminos y carboxilos de las proteínas del veneno. Al acidificar la fase móvil durante la separación se agregan protones, los cuales facilitan unión de las proteínas con la mezcla de solventes polar: no polar, separándose de la fase estacionaria.

La detección de los componentes se monitoreó midiendo absorbancia a $\lambda = 230$ nm (rango de absorción del enlace peptídico entre 180-230 nm) debido a que el veneno presenta componentes pequeños y pocos componentes aromáticos. Adicionalmente, la detección se llevó a cabo con 0.5 U de sensibilidad.

Las fracciones se colectaron manualmente especificando el orden de elución con números arábigos y el tiempo de retención en la columna, con la finalidad de identificar la fracción del veneno. Posteriormente, se liofilizaron. Se recolectó el mayor contenido proteico posible mediante siete (7) lavados de 200 μ L y un lavado de 1000 μ L con una solución 30% ACN y 70% H₂O y finalmente se alicuotaron determinando los μ g totales por eppendorf, se liofilizaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

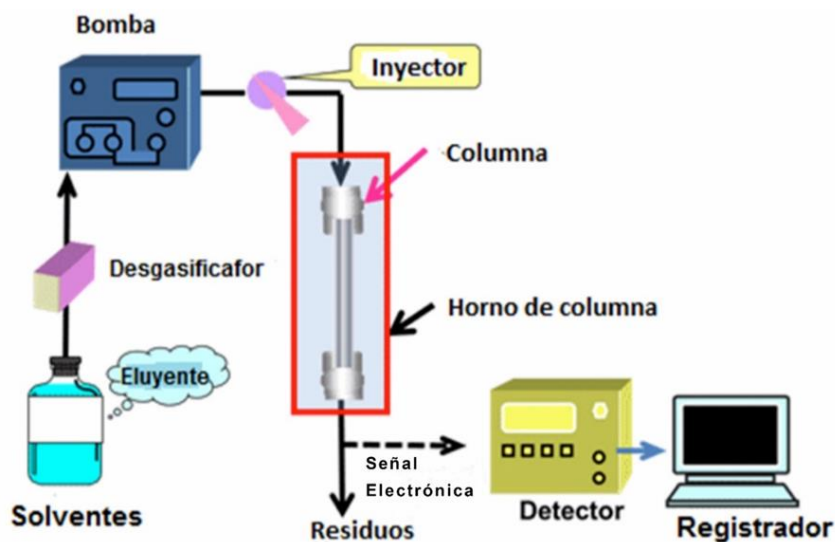


Figura 11. Diagrama de las partes de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Adaptado de shodex.net/index.php?seitenid=1&applic=1472.

2.2.1 Extracción de Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD)

Se utilizaron ratas adultas Sprague-Dawley (250-320g) obtenidas del Bioterio Central del IDEA, las cuales se mantuvieron en jaulas metálicas a temperatura ambiente con agua, luz y comida controlada. A partir de estas se extraían los Ganglios de la Raíz Dorsal. Estos ganglios se disociaban en un medio con colagenasa tipo I (200 U/mL) y tripsina 2,5 mg/mL (enzimas proteolíticas) durante noventa (90) minutos a 37 °C con agitación. Luego, se disociaban de forma mecánica usando pipetas pasteur con orificios de diámetro decreciente. La detención de la reacción enzimática de disociación se realizaba diluyendo la mezcla de enzimas con Solución Salina Tamponada de Hank (HBSS)+Ca²⁺+Mg²⁺ (Tabla 1) durante el proceso de disociación mecánica. Se centrifugaban a 450 g por 5 min. El sobrenadante se descartaba y el precipitado se resuspendía en 3 mL de HBSS. Los ganglios disociados se colocaban sobre un gradiente de densidad de Optiprep (Axis-Shield, Noruega) (4,8%, 6%, 7,4%, 9% y 12%) y se centrifugaban (822 g, 15 min, 4 °C). Las fracciones 7,4%, 9% y 12 % se

colectaban, se diluían en HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺ y se centrifugaban (450 g, 8 min, 4 °C). El precipitado que contenía las células se resuspendía en 500 µL de Neurobasal Adulto (NBA) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 2% suplemento B27 (Gibco-Invitrogen), 0,5 mM Glutamax (Gibco-Invitrogen), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Se sembraban sobre cubre objetos de 15 mm de diámetro cubiertos con Poly-D-lysina (PDL), a una concentración final de 50 µg/mL y se cultivaban en medio NBA, debido a que este favorece el mantenimiento a corto y a largo plazo de neuronas en estado postnatal y adulto. Por último, se mantenían en una incubadora a 37°C y a 5% de CO₂ hasta su uso aproximadamente dos (2) días después de realizar el cultivo primario, permitiendo la generación de una cantidad considerable de células gliales y la recuperación de las células después del tratamiento mecánico y enzimático utilizado para su aislamiento (Castillo y col., 2011). Este procedimiento se realizó cada dos semanas durante el desarrollo del estudio (Figura 12).



Figura 12. Diagrama de la extracción de Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD) de ratas adultas Sprague-Dawley.

2.2.2 Procedimiento para cargar las células con el indicador Fura-2AM

Las células se cargaban con Fura-2AM 5 μ M en medio de cultivo durante un periodo entre treinta (30) y cuarenta y cinco (45) minutos aproximadamente. Posteriormente, se lavaban tres veces con solución buffer salino y se dejaban veinte (20) minutos en la incubadora para la esterificación del indicador. La carga se realizaba en una placa de Petri que se coloca dentro de la incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

2.3 Registro de las señales de Ca²⁺ en células gliales de cultivo primario de GRD

A continuación se describe el sistema y procedimiento utilizado en la obtención de registros (Figura 13):

El cubreobjeto con el cultivo primario de glías y neuronas cargadas con Fura-2AM se asocia a la platina del microscopio invertido (1). Cuando se está llevando a cabo un experimento, se aplican los tratamientos que corresponden a los antagonistas y/o agonistas de las vías de Ca²⁺ que se estudiarán. Esto se realiza mediante el sistema de aplicación de tratamientos focal multiválvula que presenta su propio sistema de control, asociado a su vez a una bomba de presión y a una computadora con el programa "OctaFlow™" (2). Este programa permite controlar de forma precisa el suministro de los tratamientos por las válvulas con respecto al tiempo de aplicación y la presión con la cual se aplican.

La lámpara (Arc Lamp Power Supply) representa la fuente de luz de amplio espectro que proporciona energía de una región amplia de la radiación electromagnética (3). Esta se encuentra asociada a un sistema de espejos (IonOptix Hyperswitch) que producen un cambio en la dirección de propagación de la luz hacia

dos filtros que colectan luz solo de las longitudes de onda 340 nm y 380 nm, las cuales representan las λ de excitación óptimas de la forma unida a Ca^{2+} y de la forma libre del Fura-2, respectivamente. La aplicación de luz de estas dos longitudes de onda sobre las células se alterna cada dos (2) segundos.

Cuando ocurre una señal de Ca^{2+} (incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el citosol de alguna de las células estudiadas, la cámara CCD detecta el cambio en la intensidad de la fluorescencia emitida por el indicador unido a Ca^{2+} y el cambio en la intensidad de fluorescencia del indicador libre como imágenes fotográficas, capturando una imagen cuando es excitado a 340nm y otra a 380 nm por separado. Esta cámara tiene asociado un filtro que colecta la emisión de luz visible por parte del indicador a $\lambda=510$ nm (4).

El sistema de Interfase (“InOptix Fluorescence System” modelo FSI-700) convierte la información analógica en información electrónica o digital (5), la cual se envía a la computadora de registro con el programa “IonOptix Acquire” (6), el cual permite el registro de la variación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) en función del radio F340/F380 nm y el tiempo (s).

Además del sistema de detección/registro de las señales de Ca^{2+} citosólicas, también se encuentra un sistema de perfusión/succión para los tratamientos. La bomba de perfusión bombea solución buffer salina Hepes con un flujo de 15mL/h y la bomba de succión succiona esta solución y los tratamientos aplicados al mismo flujo. La función del sistema perfusión/succión es asegurar el lavado de los tratamientos y que tiempo de aplicación sea el establecido por el operador (Figura 13).

Los experimentos fueron llevados a cabo en oscuridad a pH= 7,35; el cual corresponde al pH de la solución buffer salina Hepes con la cual se bañaba el cultivo de células constantemente. La temperatura se mantuvo a 30°C midiendo la temperatura mediante un termómetro y un regulador asociados a conectores que se ajustan a la placa con el cultivo de células.

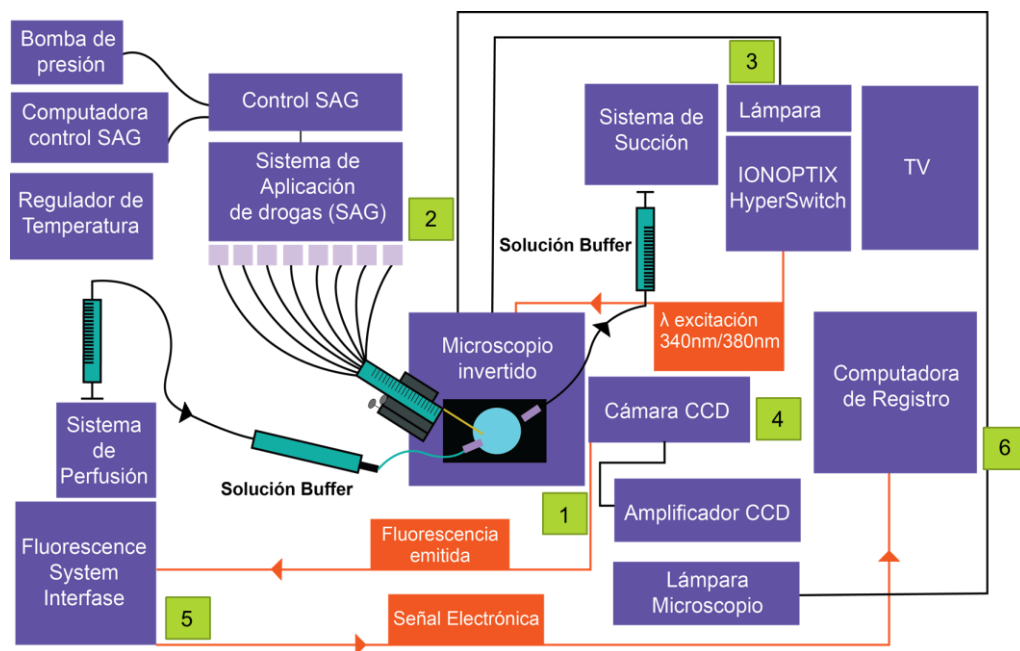


Figura 13. Diagrama del equipo utilizado para la detección de señales de Ca^{2+} en la Unidad de Neurociencias del IDEA.

2.4 Especificaciones en los protocolos aplicados para la obtención de registros

El cultivo primario disociado de GRD, se trata de un cultivo mixto compuesto por neuronas sensoriales y glías (CGS y CS). Estas células se identificaban morfológicamente debido a que las neuronas presentan una forma redonda y las glías presentan una forma irregular en el campo de visión del microscopio invertido. Adicionalmente, al inicio de cada registro se aplicaban pulsos de una solución de

Cloruro de Potasio (KCl) 50 mM para identificar a neuronas y pulsos de ATP 100 μ M para identificar glias.

Las concentraciones de los compuestos aplicados en los registros por pulso y por perfusión fueron las siguientes, a no ser que se indique una concentración en específico:

Solución Buffer Salino Hepes (en mM) 140 NaCl, 5 KCl, 5 NaHCO₃, 10 HEPES, 2 CaCl₂ 1 mM MgCl₂ y 10 glucosa, pH 7.35 a 30°C para perfusión.

Pulsos F19= Solución Buffer Salino Hepes con [F19]= 1 μ g/mL durante dos (2) o tres (3) segundos.

Pulsos ATP= Solución Buffer Salino Hepes con [ATP]=100 μ M durante dos (2) segundos.

Perfusión F19= Solución Buffer Salino Hepes con F-19 1 μ g/mL

Perfusión ATP= Solución Buffer Salino Hepes con ATP 100 μ M

Perfusión 0Ca²⁺= Solución Buffer Salino Hepes 0Ca²⁺+EGTA 0,5 mM

Soluciones con inhibidores

Suramina= Solución Buffer Salino Hepes + Suramina 100 μ M

Telmisartán= Solución Buffer Salino Hepes + Telmisartán 20 μ M

Soluciones para la extracción de GRD

Tabla 1. Composición de la Solución Salina Tamponada de Hank (HBSS) +Ca²⁺ +Mg²⁺. Tomado de http://www.bioind.com/page_143

Componentes	Peso Molecular	Conc. (gm/L)	Molaridad (mM)
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	0,11	0,14	1,26
Cloruro de Potasio (KCl)	75	0,40	5,33
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	136	0,06	0,44
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ -6H ₂ O)	203	0,10	0,50
Sulfato de Magnesio MgSO ₄ -7H ₂ O	246	0,10	0,41
Cloruro de Sodio (NaCl)	58	8	138
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	84	0,35	4
Fosfato de Sodio Dibásico (Na ₂ HPO ₄)	142	0,048	0,30
Glucosa	180	1	5,60
Fenol Rojo	398	0,01	0,03

2.5 Pruebas estadísticas

Debido a que generalmente los datos referentes a pico y área del incremento en la [Ca²⁺]_i no seguían una distribución normal según la prueba de normalidad D'Agostino, se aplicó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis sobre el promedio de las normalizaciones de los picos y áreas de las respuestas en cada uno de los tratamientos (pico y área promedio). Seguidamente, se emplearon comparaciones múltiples de Dunns al 95% de confianza entre pares de columnas de picos y áreas promedio con la finalidad de determinar el efecto de las condiciones aplicadas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Purificación de los componentes del veneno completo de *T. discrepans* por CLAR-FR y su cuantificación proteica

En la figura 14 se observa el perfil cromatográfico típico de la separación de los componentes de carácter polar del veneno de *Td* realizada en un equipo de CLAR-FR. En cada una de las corridas (30), los componentes polares del veneno completo de *T. discrepans* se separaron bajo las condiciones y el protocolo especificado en la metodología, obteniéndose cuarenta (40) fracciones (F-1 a F-40) (que incluyen los valles entre picos del cromatograma), los cuales eluyeron en tiempos comprendidos entre 3,8 y 52 minutos. Posteriormente, se colectaron manualmente los tubos que contenían la F-19 obteniendo por espectrofotometría una cantidad total de **μg_T F-19= 3002,79**. Cabe destacar que en los perfiles cromatográficos de las separaciones realizadas no se encontraron diferencias cualitativas significativas.

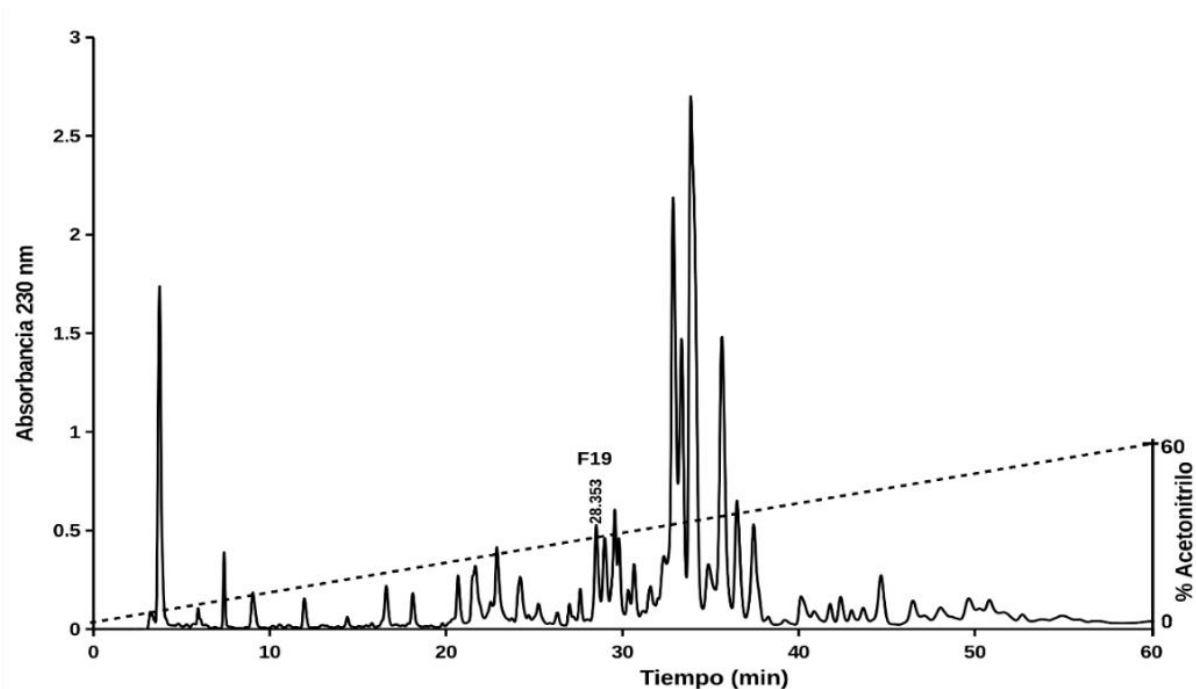


Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido de la separación de los componentes polares veneno completo de *Tityus discrepans* por CLAR-FR en una columna C18a. El eje de las ordenadas representa absorbancia de los componentes a $\lambda=230$ nm y el eje de las abscisas el tiempo de elución de los componentes. La elución de las fracciones fue realizada en gradiente lineal desde solución A (H_2O con 0,12% TFA) a 60% Solución B (ACN con 0,1% TFA) a un flujo constante de 1 mL/ min durante 60 min. La F-19 se colectó manualmente a los 28,353 minutos.

Registros y análisis del efecto de la F-19 sobre $[Ca^{2+}]_i$

A continuación se muestra una selección de registros con sus respectivos análisis en cuanto a pico y área promedio, donde el área fue seleccionada desde el punto de inicio y el último punto donde se observaba respuesta. Se evidencia el efecto de la aplicación de F-19 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en glías de GRD bajo distintas condiciones, lo que permitirá esclarecer parte del mecanismo involucrado en esta respuesta.

3.2 Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de F-19 en orden decreciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 15A se muestra el efecto de la aplicación de la F-19 por pulso sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de una célula glial. Se aplicaron una serie de pulsos consecutivos de la fracción con una duración de dos (2) segundos a diferentes concentraciones en orden decreciente: 10 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

El nivel de fluorescencia antes de la aplicación de la fracción corresponde a la $[Ca^{2+}]_i$ basal de la célula; luego de aplicar cada compuesto se espera a que la célula llegue a un valor similar de fluorescencia, es decir a un valor similar en la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Se observa que al aplicar cada pulso de F-19, se produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que consiste en una fase ascendente representada por un incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$, seguido por una fase descendente que representa una disminución más lenta hasta llegar al nivel basal en la $[Ca^{2+}]_i$. Veintidos (22) (84,6%) células del total estudiado (n=26) respondieron a todos los pulsos de F-19 aplicados.

En las gráficas del análisis de las respuestas del conjunto de células (Figura 15B y C) el pico y área de la respuesta se normalizaron con respecto al pulso de F-19

correspondiente 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En ambos casos la disminución observada en estos parámetros luego de la aplicación de la concentración más alta resultó ser estadísticamente significativa al aplicar todas las concentraciones de F-19 menores que F-19 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p \leq 0.001$).

Tomando en cuenta que a concentraciones más altas podría haber mayor probabilidad que mayor cantidad de receptores se activen, es razonable pensar que el pico y el área de las respuestas en conjunto sea mayor. Sin embargo, luego podría ser que el número de receptores disponibles a activarse sea menor luego del primer pulso debido a un proceso de desensibilización.

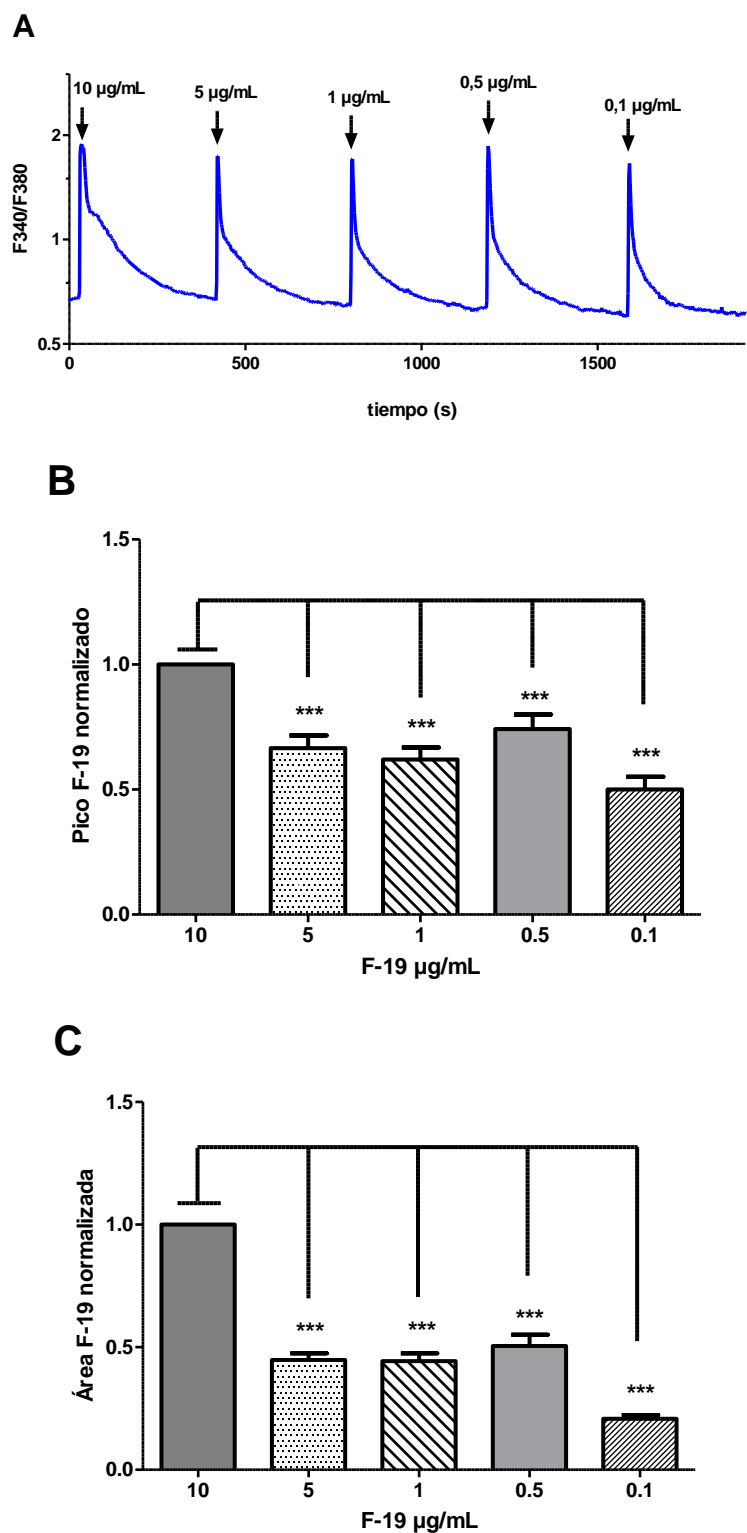


Figura 15. (A) Registro representativo del efecto de la F-19 sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando es aplicada por pulso a distintas concentraciones en orden decreciente. (B) Análisis de la respuesta con respecto al pico y (C) el área normalizados y comparados con respecto a la columna correspondiente a F-19 10 $\mu\text{g/mL}$. Las barras corresponden a concentraciones diferentes de F-19. *** = $p < 0.001$.

3.3.1 Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de F-19 en orden creciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la aplicación de la F-19 a concentraciones crecientes, se aplicaron un par de pulsos consecutivos de la fracción a la misma concentración en lapsos de dos (2) segundos cada uno en orden creciente: 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$. Solo una (1) célula (3,3%) respondió a los primeros dos pulsos de F-19 0,1 $\mu\text{g/mL}$ del total de células analizado (n=30), trece (13) células (43,3%) respondieron al menos a un pulso de F-19 0,5 $\mu\text{g/mL}$, diecisiete (17) células (56,6%) respondieron al menos a un pulso de F-19 1 $\mu\text{g/mL}$, nueve (9) células (30%) respondieron al menos a uno de los pulsos de F-19 5 $\mu\text{g/mL}$ y solo dos (2) células (6,6%) respondieron a uno de los pulsos de F-19 10 $\mu\text{g/mL}$.

Se observa una activación gradual de la población de células hasta la aplicación del primer pulso de F-19 1 $\mu\text{g/mL}$ donde responden la mayor cantidad. Luego, la cantidad de células que responden disminuye gradualmente con la aplicación de las mayores concentraciones.

En las gráficas 16A y B, se muestra el análisis de la respuesta promedio donde se observa que el comportamiento de activación de los receptores presenta forma de campana. Al aplicar las concentraciones menores de F-19 (0,1 $\mu\text{g/mL}$ y F-19 0,5 $\mu\text{g/mL}$), tanto el pico como el área de la respuesta aumentan gradualmente aproximadamente tres veces en el pico y dos veces en el área. Con el primer pulso de F-19 1 $\mu\text{g/mL}$ se observa la respuesta mayor, lo cual podría representar la activación de la mayor cantidad de receptores involucrados. Posteriormente, se observa una disminución gradual en el pico y en el área cuando se aplican concentraciones

mayores, aproximadamente una vez con respecto al pico y 0,7 veces con respecto al área entre las concentraciones 5 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$.

En el caso del pico, la comparación realizada con respecto a la normalización de las respuestas al primer pulso de F-19 0,1 $\mu\text{g/mL}$, resultó ser estadísticamente significativa con respecto a ambos pulsos de 1 $\mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0.001$) y con respecto al primer pulso de F-19 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0.05$). Con respecto al área, la comparación realizada resultó ser estadísticamente significativa en el caso de F-19 1 $\mu\text{g/mL}$ para ambos pulsos ($p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$ respectivamente). La ausencia de una respuesta clara a la [F-19] en el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se refleja en el cambio de los parámetros de la respuesta a la exposición múltiple de las mismas concentraciones y la dependencia de esta respuesta a la exposición de bajas concentraciones, previa a la estimulación con altas concentraciones de [F-19].

La aplicación de la F-19 a concentraciones crecientes permitió observar la activación gradual de la población de receptores. Luego, la disminución observada en el pico y área promedio de la respuesta podría deberse a la desensibilización de la población de receptores involucrados debida al tiempo de exposición.

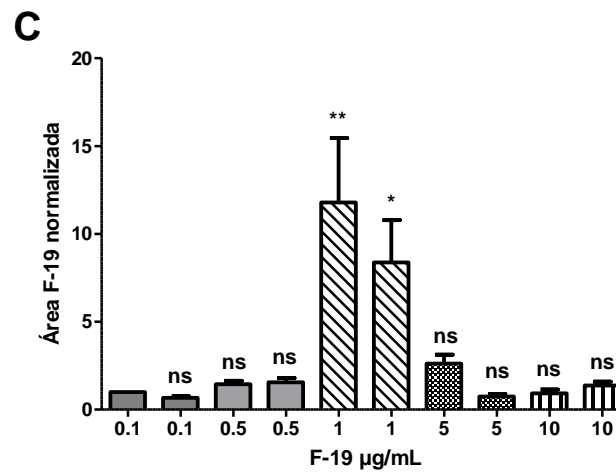
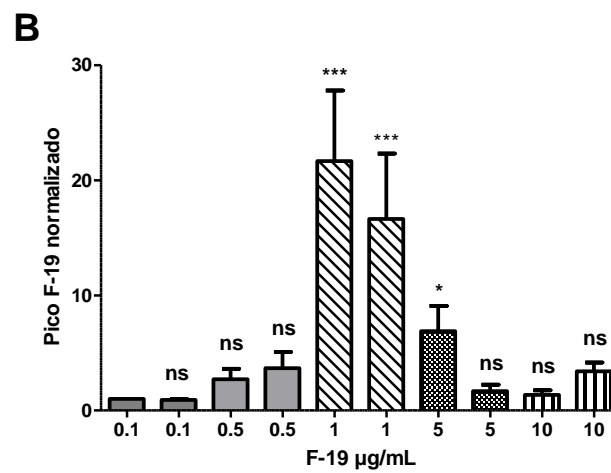
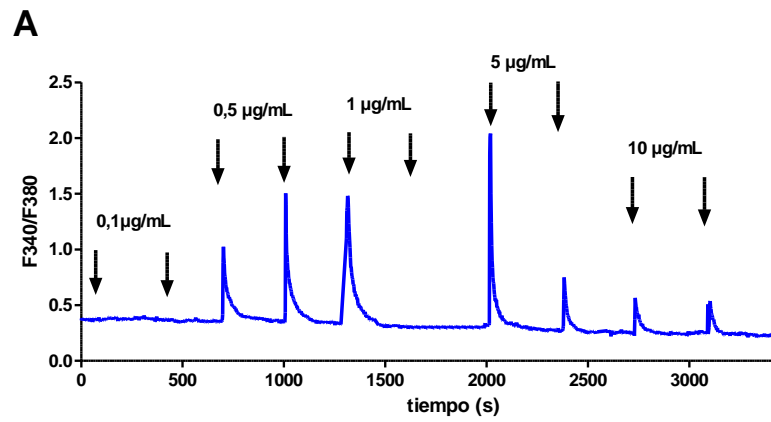


Figura 16. (A) Registro representativo del efecto de la F-19 aplicada a distintas concentraciones en orden creciente sobre $[Ca^{2+}]_i$. Análisis de la respuesta con respecto a pico (B) y área (C) normalizados y comparados con respecto a la primera columna correspondiente al primer pulso F-19 0,1 µg/mL. Las barras representan distintas concentraciones de F-19 aplicadas por duplicado.

3.3.2 Cálculo CE₅₀ para F-19.

En la figura 17 se muestra el pico promedio de la respuesta a la F-19 en función del logaritmo de la concentración de F-19 aplicada de forma creciente, dos pulsos por cada concentración. El resultado del ajuste del promedio de los puntos a una función resulta en una curva tipo campana en la cual no se observa respuesta a la aplicación de las concentraciones menores (0,1 y 0,5 µg/mL). La respuesta máxima se obtuvo al aplicar 1 µg/mL y luego de la aplicación de esta concentración, la respuesta disminuyó de forma progresiva.

La forma de campana requiere el ajuste de los datos a dos sigmoides. En cada una de estas es posible que falten concentraciones intermedias debido a que los parámetros obtenidos resultan ser ambiguos, por esta razón no se pudo obtener el CE₅₀ para la F-19.

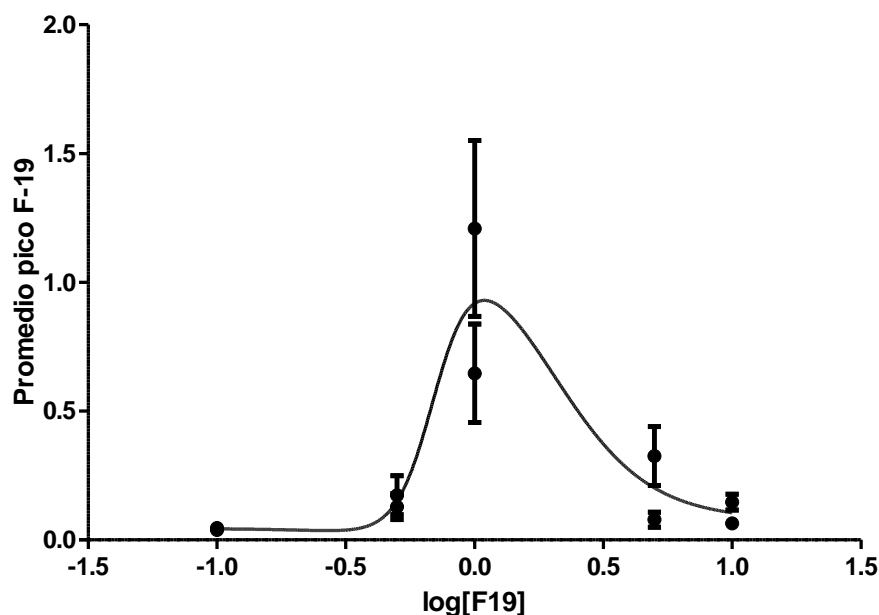


Figura 17. Gráfico de la respuesta promedio a la aplicación de F-19 en función del logaritmo de la concentración. Las barras representan el error estándar de cada réplica. La amplitud de la respuesta varía a medida que se aumenta la concentración de F-19 presentando un comportamiento tipo campana. La respuesta máxima promedio se obtuvo al aplicar F-19 1 µg/mL.

3.4 Perfusión continua con F-19.

La cantidad de células que respondían a la F-19 disminuyó en un momento de la investigación debido posiblemente a que el lote utilizado del suplemento B27 (uno de los componentes utilizados para el del cultivo) se terminó. Se procedió a probar con dos lotes diferentes, pero seguía siendo poca la cantidad de células que respondían. Por otro lado, se preparó B27 en el laboratorio esperando a que favoreciera la respuesta a la F-19, sin mucho éxito. Por último, también se agregó suero fetal bovino (SFB) compuesto por otros factores de crecimiento y nutrientes. A pesar del empleo de estas medidas, seguía siendo menos frecuente observar la respuesta directa de las células a esta fracción del veneno. Por esta razón, se decidió aplicar la F-19 por perfusión durante unos minutos, aumentando el tiempo de aplicación y de esta manera incrementar la probabilidad de observar una respuesta.

Al aplicar F-19 con perfusión continua a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 18A), se observaron dos tipos de respuesta, la primera está representada en el trazo rojo donde se observa un incremento rápido y de gran amplitud en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de haber transcurrido pocos minutos de iniciar la perfusión. Sin embargo, a pesar que se continuó perfundiendo con F-19 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máximo no se mantiene, por el contrario disminuye gradualmente sin alcanzar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal. Este comportamiento podría representar una activación y desensibilización rápida de una población de los receptores. Por otro lado, la otra forma de respuesta representada en el trazo azul, se caracteriza por un incremento más lento y de menor amplitud en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el cual también se alcanza pocos minutos después de iniciar la perfusión. En este caso, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantuvo sin disminuir considerablemente durante el tiempo que duró la perfusión e incluso después de haber pasado varios

minutos luego de haberla eliminado, indicando una activación y desensibilización más lenta de los receptores. En la mayoría de las células que respondieron a la perfusión por F-19 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=65$ de 75 células) se observó que el 76,9 % (50 células) respondieron en forma de meseta como en el trazo azul y 23% (15 células) respondieron en forma de pico.

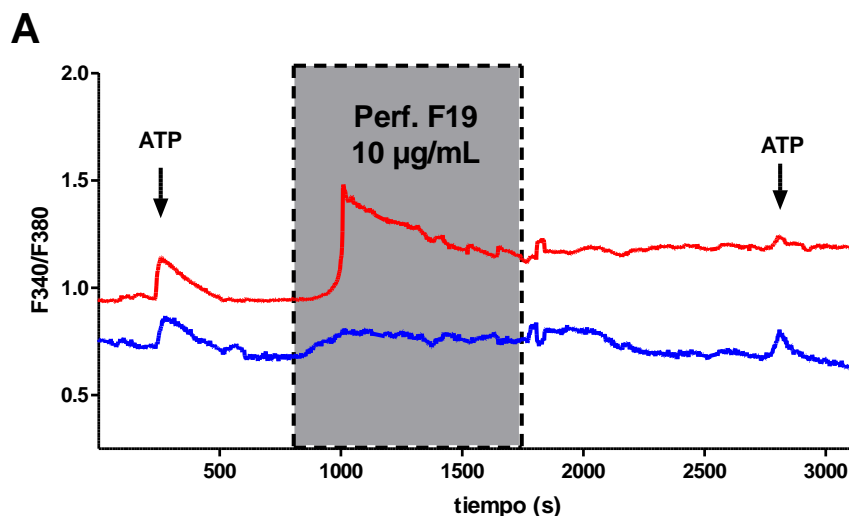


Figura 18A. Registros representativos de las dos formas de señales de Ca^{2+} obtenidas por la aplicación de F-19 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por perfusión continua.

Por otro lado, también se perfundieron las células con F-19 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ debido a que a esta concentración responden mayor cantidad de células cuando se aplican concentraciones en orden creciente (Figura 18B).

En la figura 18B se muestra el registro de la señal de incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de una célula que respondió a la exposición continua de F-19 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante diez (10) minutos. En el conjunto de células que respondieron a la aplicación de la fracción de veneno (14,5%=29 células, $n=200$), se observa que la respuesta a esta concentración es considerablemente pequeña con respecto a la obtenida con la perfusión de F-19 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la mayoría de los casos presenta forma de meseta (62%=18 células,

n=29) pudiendo indicar una activación y luego una desensibilización lenta de los receptores. El 37,9% respondió en forma de pico caracterizándose por un incremento rápido e igualmente de poca magnitud en la $[Ca^{2+}]_i$, pudiendo indicar una activación y una desensibilización más rápidas.

B

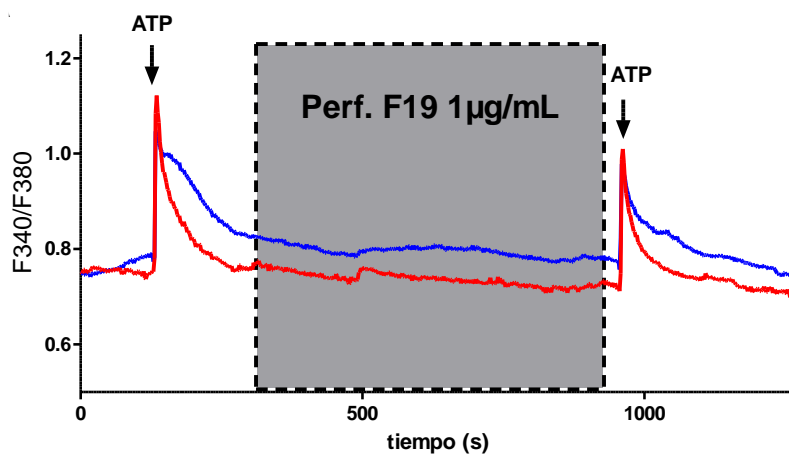


Figura 18B. Registros representativos de ambas formas de señales de Ca^{2+} obtenidas por la aplicación de perfusión continua con F-19 1 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Efecto de la condición $0Ca^{2+}$ en medio extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ producida por la aplicación de F-19.

En la figura 19A se muestra un registro representativo correspondiente al efecto de la ausencia de iones Ca^{2+} en el medio extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la F-19. Puede observarse que una vez iniciada la perfusión de medio extracelular sin Ca^{2+} la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye, ya que esta es un balance entre el influjo, la salida y el intercambio de Ca^{2+} con reservorios intracelulares (Grienberger y Konnerth, 2012) y en esta condición se eliminó la fuente de entrada de Ca^{2+} desde el medio

extracelular. Adicionalmente, se observa que dentro de la perfusión $0Ca^{2+}$ ambos pulsos de F-19 producen un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que indica que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la F-19 podría depender de la liberación de iones Ca^{2+} desde reservorios intracelulares.

Se estudiaron un total de setenta y cuatro células (74) (tres experimentos independientes), de las cuales treinta y cinco (35) (47,2%) respondieron al menos a un pulso de F-19 dentro de la perfusión $0Ca^{2+}$, luego de haber respondido al menos a un pulso de F-19 en medio extracelular con Ca^{2+} .

Los datos correspondientes al pico y al área del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ obtenidos por la aplicación de los pulsos de F-19 en $0Ca^{2+}$, fueron normalizados con respecto a la respuesta obtenida por la aplicación del pulso de F-19 aplicado antes de iniciar la perfusión $0Ca^{2+}$. El promedio de la normalización está representado en los gráficos de barras mostrados en las gráficas 19B y C, donde se muestran los datos correspondientes al pulso de F-19 aplicado antes de la perfusión $0Ca^{2+}$, dos pulsos de F-19 aplicados dentro de la perfusión y a un pulso de F-19 aplicado después de la perfusión.

La comparación múltiple de Dunn se realizó entre el promedio de la normalización del pico y el área obtenidos por los dos pulsos de F-19 aplicados dentro de la perfusión $0Ca^{2+}$, con respecto al promedio de la normalización de estos parámetros obtenidos por el pulso de F-19 aplicado antes de esta. En el caso del pico y el área, en la respuesta observada con el primer pulso de F-19 en $0Ca^{2+}$ extracelular no hubo diferencias significativas con respecto al primer pulso de F-19 en presencia de Ca^{2+} externo ($p > 0.05$), mientras que la disminución en la respuesta observada con el

segundo pulso de F-19 en $0Ca^{2+}$ extracelular resultó ser estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$).

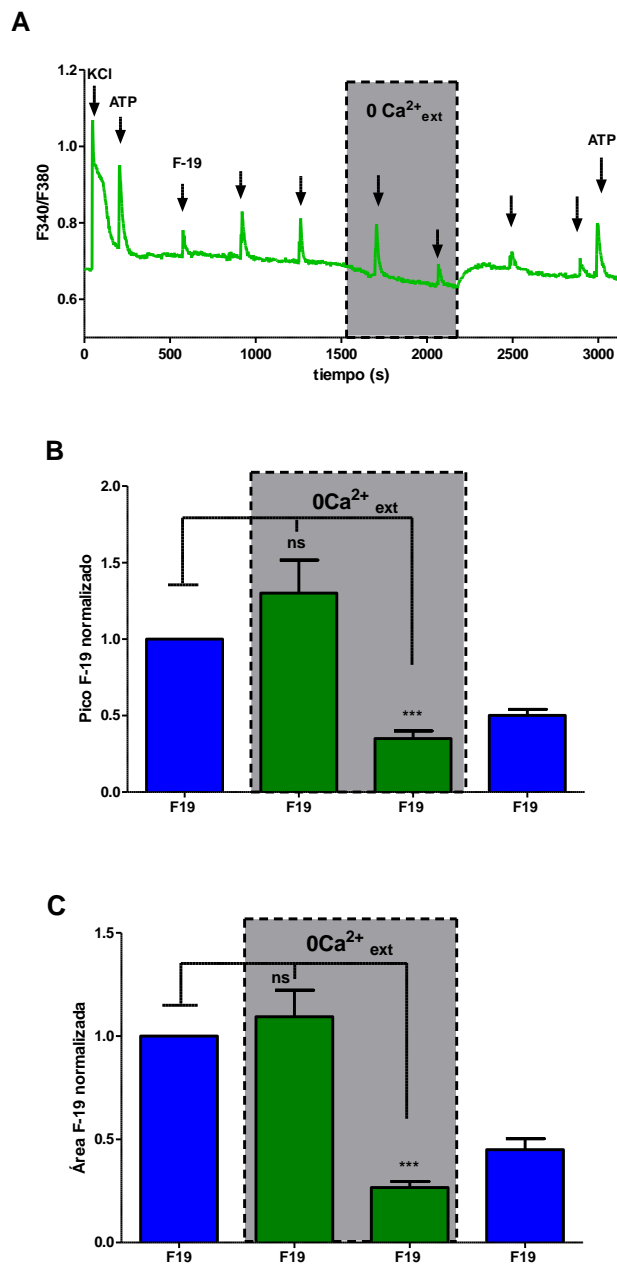


Figura 19. (A) Registro representativo del efecto de la condición $0Ca^{2+}$ en medio extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ producido por la F-19. En ausencia de Ca^{2+} extracelular con 0,5 mM EGTA, la F-19 induce incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. (B) Gráfico de barras correspondiente al pico promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de F-19 en presencia y ausencia de calcio extracelular. (C) Gráfico de barras correspondiente al área promedio. Las columnas fueron normalizadas y comparadas con el pulso aplicado antes de la perfusión $0Ca^{2+}$. El análisis Kruskal-Wallis arrojó $p < 0.0001$ en ambos casos indicando al menos un promedio de pico y área distinto. *** ($p \leq 0.001$) denota diferencia estadísticamente significativa y ns ($p > 0.05$) indica lo contrario.

3.6 Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por F-19.

La participación de un receptor metabotrópico acoplado a proteína G en el mecanismo involucrado en el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la F-19, se estudió mediante la utilización del compuesto Suramina.

Se estudiaron un total de treinta y tres (33) células donde 24% respondieron la aplicación de F-19 por pulso al menos una oportunidad. La comparación múltiple de Dunn utilizada para estudiar el efecto de la Suramina, se realizó entre el promedio de la normalización de los picos y áreas del pulso de F-19 aplicado antes de la perfusión con Suramina y el promedio de la normalización de los mismos parámetros correspondientes a los pulsos de F-19 con Suramina dentro y fuera de la perfusión con el inhibidor, respectivamente. La diferencia que existe entre agregar y no agregar perfusión con Suramina es la probabilidad de entrada del inhibidor a la célula: mientras más tiempo esté en contacto el inhibidor con la célula, existe mayor mayor probabilidad de entrada.

Con respecto al pico, resultó que no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) en el caso del pulso de F-19 con Suramina dentro de la perfusión, mientras que la disminución observada con la aplicación del pulso de F-19 con Suramina sin perfusión, sí resultó ser estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$)

En cuanto al área, la disminución resultó ser estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al pulso F-19 con Suramina dentro de la perfusión con el inhibidor y de igual forma la comparación con el pulso de F-19 con Suramina sin perfusión ($p \leq 0.001$) (Figura 20A y B).

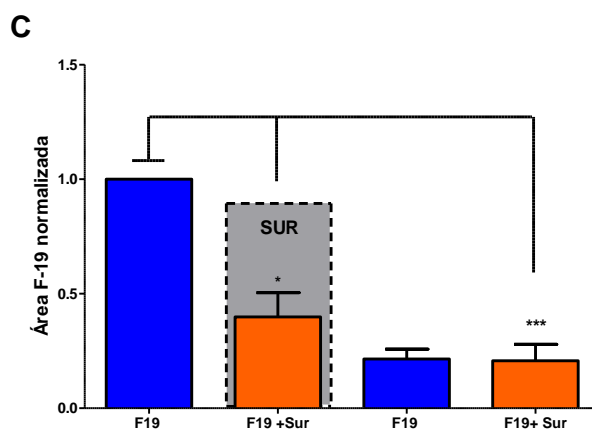
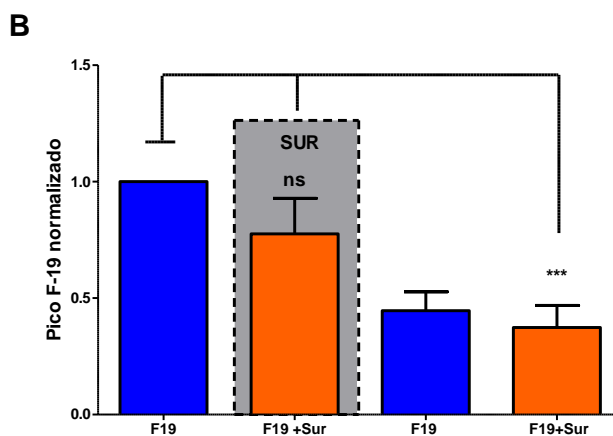
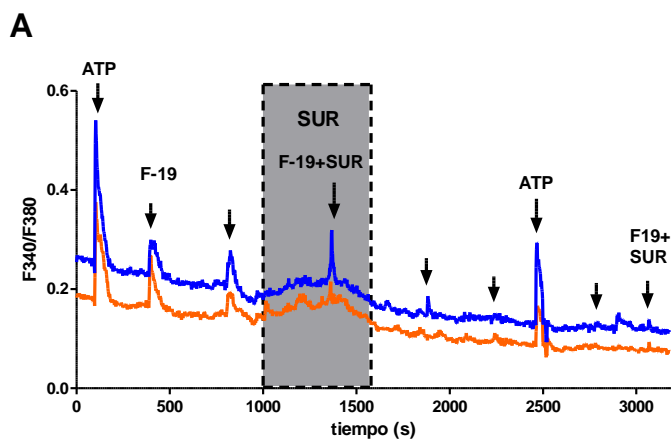


Figura 20. (A) Registros representativos del efecto de la aplicación de Suramina 100 μ M sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por F-19. (B) Gráfico de barras del pico promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la F-19 en presencia y en ausencia de Suramina. (C) Gráfico correspondiente al área promedio. Las columnas fueron normalizadas y comparadas contra el pulso de F-19 aplicado antes de la perfusión con Suramina. El análisis por Kruskal-Wallis indicó un $p=0.0029$ para el pico y $p=0.0002$ para el área indicando al menos un promedio de picos y áreas distinto. ** ($p \leq 0.01$) denota diferencia estadísticamente significativa entre las columnas comparadas y ns ($p > 0.05$) indica lo contrario.

Caracterización del mecanismo subyacente al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP.

Se estudió el comportamiento del grupo de receptores purinérgicos en respuesta a la aplicación de Adenosina 5' trifosfato (ATP), con el objetivo de comparar con los resultados obtenidos por la aplicación de la F-19.

3.7 Efecto de la aplicación de concentraciones distintas de ATP en orden decreciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 21A se presenta el registro promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de pulsos de ATP de dos (2) segundos a concentraciones decrecientes. Se observa que a las concentraciones mayores (200 y 100 μ M) las magnitudes de las respuestas son mayores y similares, mientras que después de la aplicación de estas, se observa una disminución gradual. La comparación múltiple de Dunn realizada con respecto al pulso de ATP 10 μ M resultó en que la disminución del pico promedio de la respuesta con cada pulso fue estadísticamente significativa después de aplicar ATP 200 μ M: $p \leq 0.001$ para los pulsos de ATP 100 y 200 μ M y $p \leq 0.05$ para el pulso de ATP 50 μ M. La disminución del área resultó ser estadísticamente significativa al comparar el área promedio obtenida por los pulsos de ATP 200 y 100 μ M ($p \leq 0.001$) y no significativa en el caso de pulso ATP 50 μ M ($p > 0.05$) ($n=89$, dos experimentos independientes) (Figuras 21B y C).

La disminución estadísticamente significativa de los parámetros podría explicarse por un proceso de desensibilización paulatina de los receptores purinérgicos de ATP involucrados en la respuesta, la cual es más pronunciada luego del pulso de ATP 100 μ M.

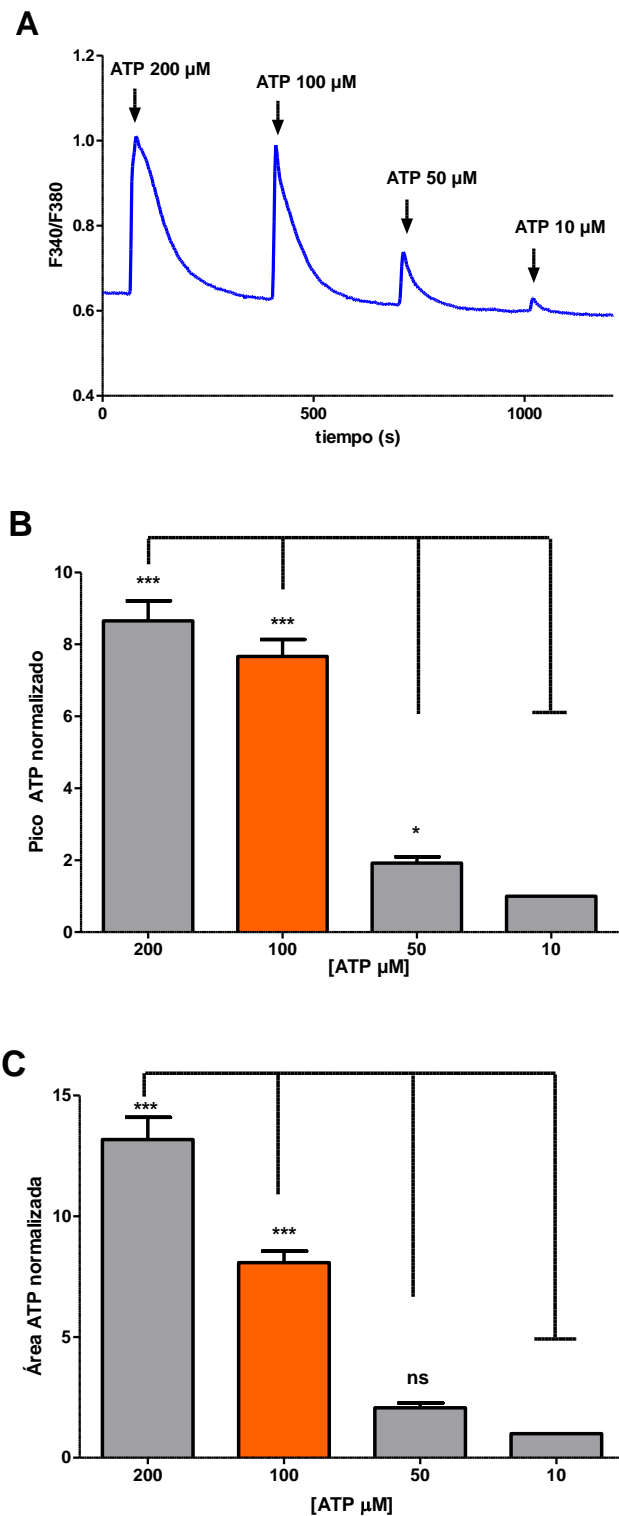


Figura 21. Registro promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ por la aplicación de concentraciones decrecientes de ATP 200, 100, 50 y 10 μM . (B) Gráfico de barras del pico promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de [ATP] en orden decreciente. (C) Gráfico correspondiente al área promedio. Las columnas fueron normalizadas y comparadas con respecto a la concentración menor de ATP aplicada (10 μM). El análisis por Kruskal-Wallis arrojó un $p < 0.0001$ con respecto al pico y al área promedio indicando al menos un pico promedio y área distinto. * ($p \leq 0.05$), *** ($p \leq 0.001$) denotan diferencia estadísticamente significativa, ns indica diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0.05$).

3.8 Efecto de la aplicación de concentraciones distintas de ATP en orden creciente sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 22A se muestra un registro representativo del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP a concentraciones crecientes. Se observa el incremento gradual en la respuesta con cada pulso de dos (2) segundos hasta ATP 100 μ M, pudiendo ser reflejo de la activación progresiva de la población de receptores a medida que se aumenta la concentración. Probablemente, a mayor concentración de ATP, existe mayor probabilidad de que se activen mayor cantidad de receptores purinérgicos.

Se observa un comportamiento en forma de campana en el proceso de activación de los receptores a medida que se aumenta la concentración de ATP. En el promedio de los picos y áreas (Figura 22B y C) se observa la activación gradual en la población de receptores cuando se aplica ATP de 10 a 100 μ M luego, a pesar de que se aumenta la concentración a 200 μ M ATP la respuesta disminuye, posiblemente debido al proceso de desensibilización de los receptores purinérgicos. Adicionalmente, se observa que a la concentración de ATP correspondiente a 100 μ M, el pico y área promedio de la respuesta son mayores.

La comparación múltiple de Dunn realizada contra ATP 10 μ M en el caso del pico promedio, resultó ser estadísticamente significativa en el caso de 100 y 200 μ M ($p \leq 0.001$) y no significativa ($p > 0.05$) para ATP 50 μ M, mientras que con respecto al área promedio resultó ser estadísticamente significativa para 100 μ M ($p \leq 0.001$) (n=98, tres experimentos).

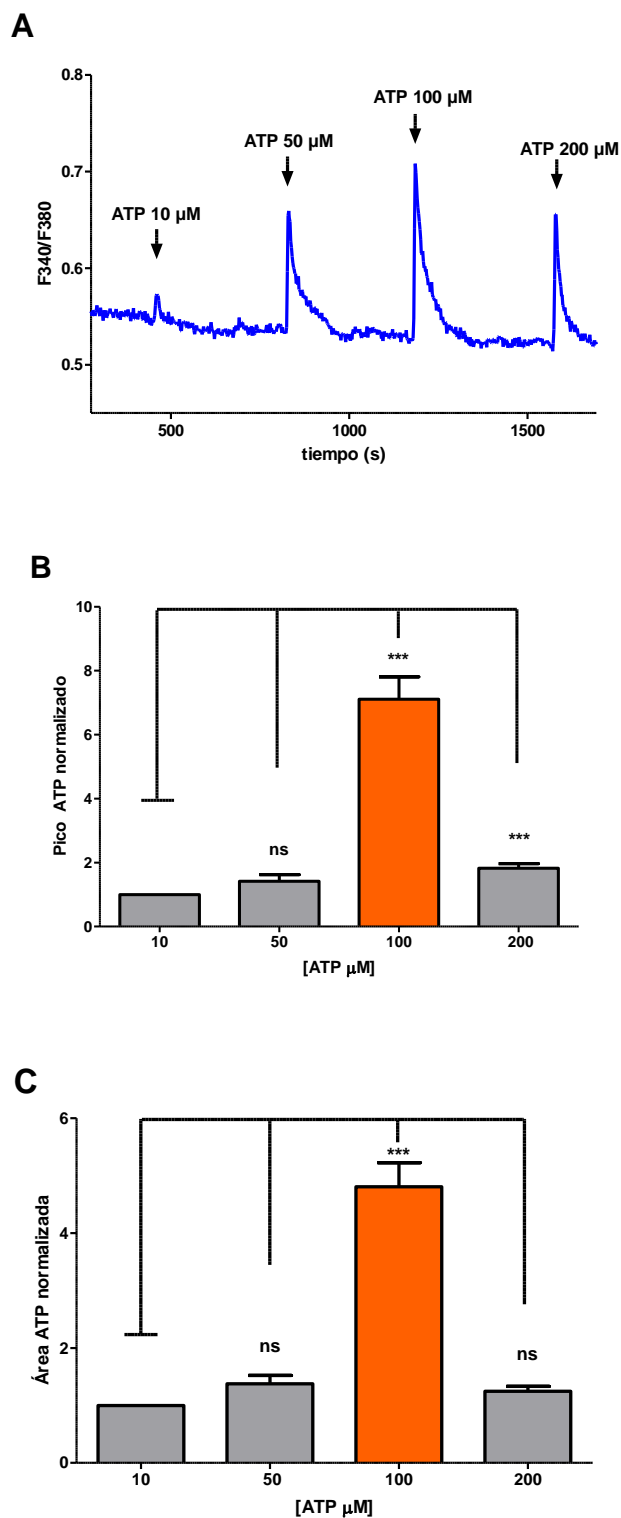


Figura 22. Registro promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de concentraciones crecientes de ATP 10, 50, 100 y 200 μ M. (B) Gráfico de barras del pico promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de [ATP] en orden creciente. (C) Gráfico correspondiente al área promedio. Las columnas fueron normalizadas y comparadas con respecto a la menor concentración de ATP aplicada (10 μ M). *** ($p \leq 0.001$) denotan diferencia estadísticamente significativa, mientras que ns indica lo contrario ($p > 0.05$).

3.9 Perfusión con ATP.

En la figura 23 se muestra el registro promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de una población de células sobre las cuales se perfundió ATP 100 μ M durante ocho (8) minutos, concentración con la cual se obtuvo la respuesta de mayor amplitud y área al aplicar ATP en concentraciones crecientes (Figura 21). Se evidencia un incremento rápido y luego una disminución más lenta en la $[Ca^{2+}]_i$ debida posiblemente a una activación rápida y desensibilización más lenta y gradual de los receptores (n= 91 células).

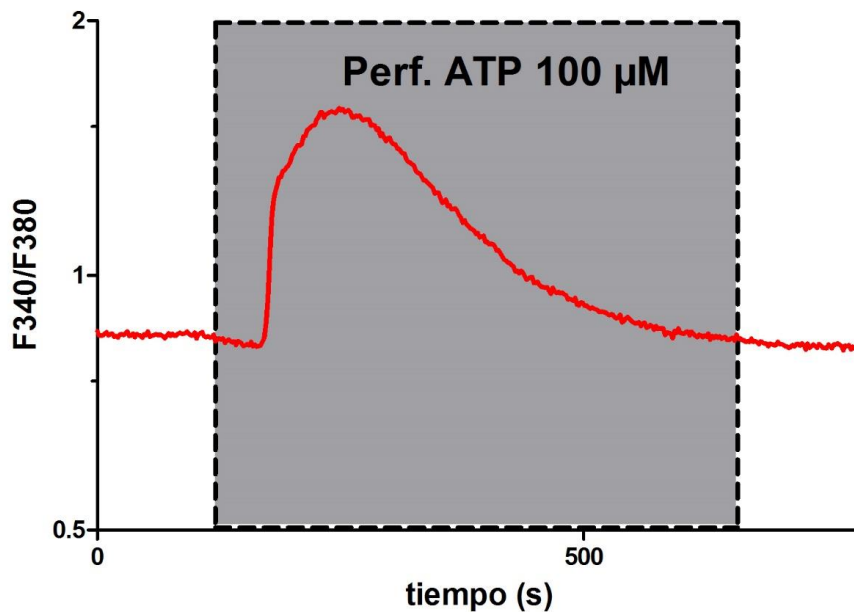


Figura 23. Registro promedio del efecto de la perfusión de ATP 100 μ M sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

3.10 Efecto de la condición 0Ca^{2+} extracelular sobre el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP.

En la figura 24A se muestra un registro representativo del efecto de la ausencia de iones Ca^{2+} en el medio extracelular sobre el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP. Se observa incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al aplicar ambos pulsos de ATP en esta condición, lo que podría indicar que parte de la respuesta depende de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. Adicionalmente, con la aplicación del segundo pulso se observa la disminución considerable de la respuesta, lo cual propone el agotamiento de estos reservorios de iones Ca^{2+} .

La comparación de Dunn realizada entre el pico promedio de la respuesta al ATP antes de la perfusión 0Ca^{2+} y el pico promedio en respuesta al primer pulso de ATP dentro de la perfusión 0Ca^{2+} , indica que la disminución observada con este pulso es estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$). Con respecto al segundo pulso de ATP en perfusión 0Ca^{2+} , la disminución resultó de igual manera estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$). Por otra parte, la misma comparación realizada con respecto al área promedio, resultó en una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) para ambos pulsos dentro de la perfusión ($n=97$, tres experimentos) (Figura 24B y C).

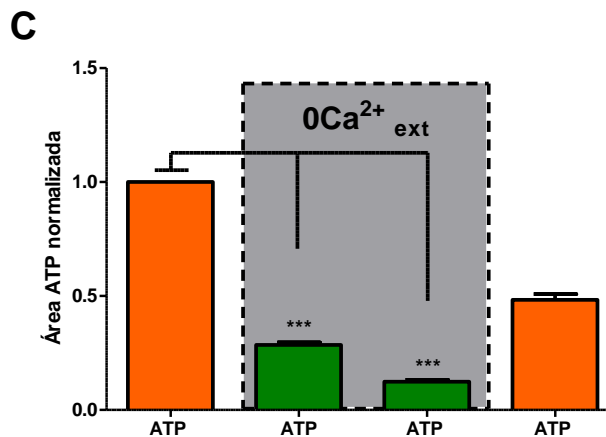
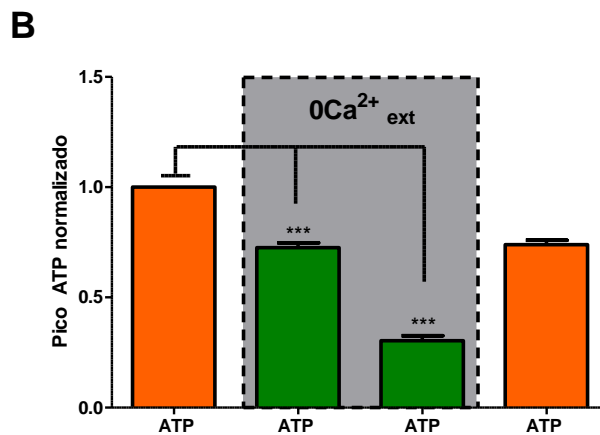
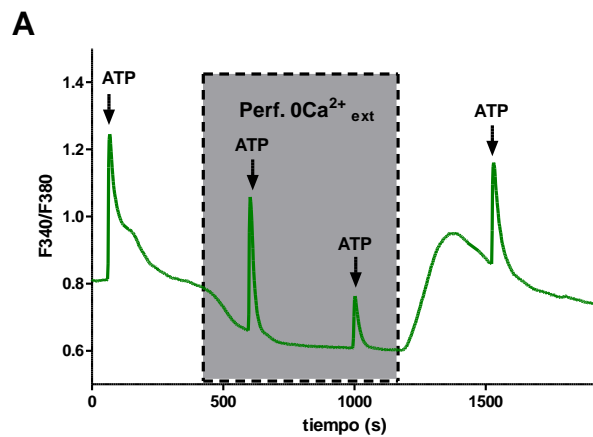


Figura 24. (A) Registro promedio del efecto de la condición $0Ca^{2+}$ extracelular +0,5 mM EGTA sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ causada por el ATP. En ausencia de Ca^{2+} extracelular, el ATP induce incremento de $[Ca^{2+}]_i$. (B) Gráfico de barras correspondiente al pico promedio del incremento $[Ca^{2+}]_i$ por la aplicación de ATP en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular (C) Gráfico de barras correspondiente al área promedio. Las columnas fueron normalizadas y comparadas con el primer pulso ATP aplicado antes de la perfusión $0Ca^{2+}$. El análisis Kruskal-Wallis indicó $p < 0.0001$ tanto para el pico como para el área indicando al menos un promedio de pico y áreas distinto. *** ($p \leq 0.001$) denota diferencia estadísticamente significativa.

3.10 Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP.

En la figura 25A se observa un registro representativo del efecto de la aplicación de Suramina a $100\mu M$ sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP. Se observa que la respuesta al ATP es inhibida completamente cuando este se aplica por pulso junto con Suramina y en perfusión con el inhibidor y cuando se aplica el ATP por pulso junto con el inhibidor sin perfusión.

Con respecto al pico, la comparación de Dunn realizada entre el pico promedio de la respuesta obtenida por el primer pulso de ATP antes de la perfusión con Suramina y el pico promedio correspondiente al pulso de ATP con Suramina dentro de la perfusión con el inhibidor, resultó en una disminución estadísticamente significativa de la respuesta ($p \leq 0.001$). De igual forma, la disminución del pico promedio de la respuesta al pulso de ATP con Suramina sin la perfusión con respecto al primer pulso de ATP antes de la perfusión resultó estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$).

La disminución en el área promedio de la respuesta por el pulso ATP con Suramina dentro de la perfusión resultó ser estadísticamente significativa con respecto al área de la respuesta al pulso de ATP antes de la perfusión ($p \leq 0.001$). De la misma manera, la disminución del área del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ cuando se aplica el pulso de ATP con Suramina sin perfusión resultó ser estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) con respecto al pulso de ATP aplicado antes de la perfusión ($n=54$, dos experimentos).

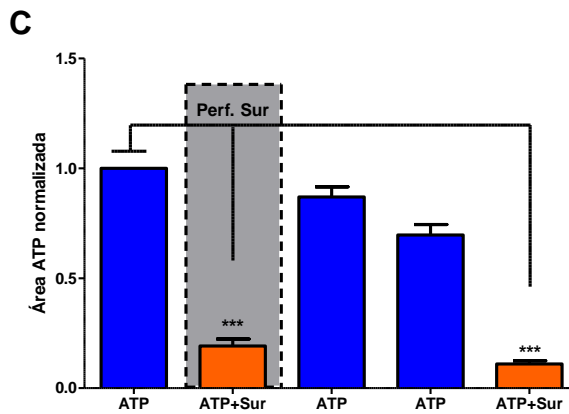
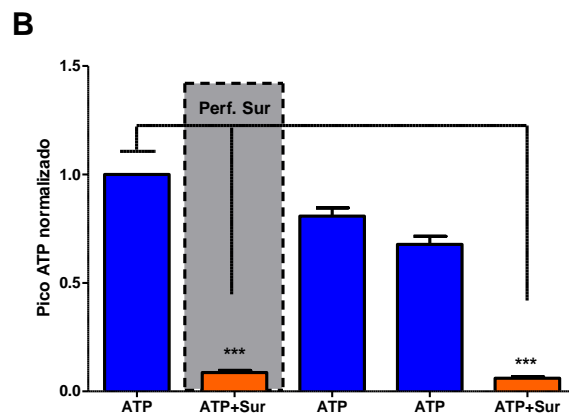
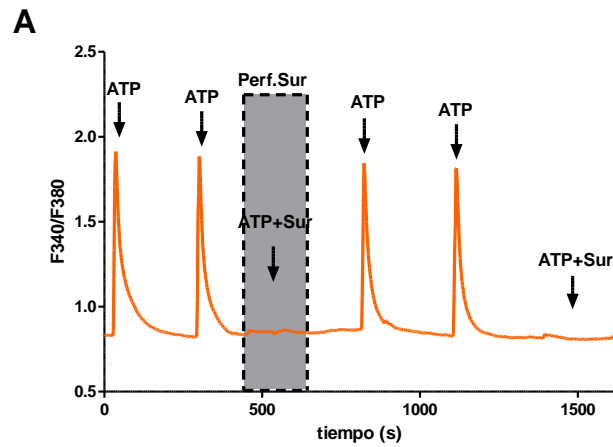


Figura 25. (A) Registro representativo del efecto de la presencia de Suramina 100 μM en el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por el ATP. (B) Gráfico de barras del pico promedio del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causada por la aplicación del ATP en presencia y en ausencia de Suramina. (C) Gráfico correspondiente al área promedio. Las columnas fueron normalizadas y comparadas contra el primer pulso de ATP aplicado antes de la perfusión con Suramina. Kruskal-Wallis arrojó un $p < 0.0001$ para el pico y área promedio indicando al menos un promedio de pico y área distinto. *** ($p \leq 0.001$) denota diferencia estadísticamente significativa.

3.12 Efecto de la perfusión de F-19 sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP.

Un conjunto de observaciones realizadas por diferentes laboratorios y una realizada en el curso de este trabajo, las cuales se describen a continuación, nos llevaron a realizar el estudio del efecto de la F-19 sobre las respuestas obtenidas por la aplicación de pulsos de ATP.

En experimentos donde se perfundió F-19 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego se aplicaron pulsos de ATP $100\mu\text{M}$ consecutivos, se observó que el pico y el área de algunas respuestas posteriores al primer pulso de ATP incrementaban después de la perfusión, en comparación con experimentos donde solo se aplicaban pulsos de ATP y se observaba la disminución paulatina de la respuesta con cada pulso, el cual representa el comportamiento habitual de esta respuesta.

Por otro lado, la aplicación de F-19 en macrófagos induce la producción de óxido nítrico (ON) en estas células (Ramírez-Bello y col., 2014). Además, el precursor y el donador de ON, L-arginina y espermima-NONOato aplicados por separado en cultivos de células mesangiales de rata, produjeron la recuperación de la respuesta al ATP observada como un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, hecho que fue atribuido a los efectos del ON en el reciclaje y consecuente resensibilización de los receptores P2Y responsables del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, a través de una vía de señalización por ON independiente de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Liu y col., 2012). En CGSs de GRD de rata se ha detectado por hibridación histoquímica *in situ* la expresión de mRNA de receptores purinérgicos P2Y, específicamente P2Y₁₂ y P2Y₁₄ (Kobayashi y col., 2006) y estudios por inmunofluorescencia mostraron marcaje para receptores P2Y₁ (Chen y col.,

2008). Por último, se ha detectado la expresión del receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁R) en GRD de rata (Pavel y col., 2008) y existe evidencia que indica que este receptor puede activar el sistema de producción de ON en tipos celulares de riñón (Patzak y col., 2004; Liu y Persson, 2004).

Este conjunto de observaciones condujeron a llevar a cabo experimentos con la finalidad de estudiar si la F-19 es capaz de inducir el reciclaje y resensibilización de receptores P2Y por medio de la producción de ON en estas células. Por otra parte, también se estudió la posible participación de los AT₁Rs en la recuperación de la respuesta al ATP causada por la F-19, en base a la relación de estos receptores con la producción de ON. Lo anterior se realizó mediante el uso del Telmisartán, un antagonista con selectividad alta para AT₁Rs (Shin-ichiro Miura y col., 2011).

Con la finalidad de probar estas hipótesis, se realizaron tres tipos de experimentos: (1) control (2) efecto de la perfusión con F-19 sobre la resensibilización de receptores de ATP P2Y, (3) efecto de la perfusión con F-19+Telmisartán sobre la resensibilización de receptores ATP P2Y.

Para realizar el control, se aplicó un primer pulso de ATP seguido de un periodo de diez (10) minutos sin aplicación de tratamiento alguno y por último tres pulsos de ATP consecutivos a intervalos de cinco (5) minutos (cuatro experimentos independientes, n=127 células). Para los experimentos donde se perfundió con F-19, se aplicó un pulso de ATP inicial, perfusión con F-19 durante diez (10) minutos y por último tres pulsos de ATP consecutivos (cinco experimentos, n=200 células). Finalmente, los experimentos donde se perfundió F-19 con Telmisartán fueron llevados a cabo aplicando un pulso de ATP inicial, perfundiendo F-19 simultáneamente con Telmisartán

durante diez (10) minutos, y seguidamente aplicando tres pulsos de ATP consecutivos (tres experimentos, n=109 células) (Figura 26A).

Cabe destacar que se aplicó perfusión con Telmisartán antes de aplicar pulsos consecutivos de ATP, con la finalidad de evaluar si la aplicación de este inhibidor específico del AT₁R podría afectar el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de pulsos de ATP (n=40). Las comparaciones de Dunn realizadas entre el pico y área promedio de las respuestas al ATP en el control y después de la perfusión con Telmisartán indicaron que no hay diferencia estadística ($p > 0.05$) para el pico y área, por esta razón las respuestas al ATP después de la perfusión con Telmisartán fueron incluidas en el control (datos no mostrados).

El pico y el área del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ producido en cada célula por los pulsos de ATP después de las perfusiones con F-19, F-19 con Telmisartán y en el control, fueron normalizados con respecto a estos parámetros obtenidos por la aplicación del primer pulso de ATP. El promedio de la normalización del pico y el área están representados por separado en los gráficos de barras correspondientes a Pico de ATP normalizado y Área de ATP normalizada (Figura 26B y C).

Puede observarse claramente en las tres condiciones que el pico y el área promedio de la respuesta disminuyen gradualmente con cada pulso de ATP consecutivo (Figura 26A). Sin embargo, cuando se comparan estadísticamente por orden de aplicación el pico promedio del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por cada pulso de ATP después de la perfusión con F-19 con respecto a los picos correspondientes a los pulsos de ATP en el control, se observa que el pico promedio de las respuestas de cada pulso de ATP es estadísticamente mayor cuando se perfunde primero con F-19: $p \leq 0.01$

primer pulso de ATP, $p \leq 0.001$ para el segundo y el tercer pulso. Con respecto al área promedio, se muestra que la comparación de los pulsos de ATP aplicados después de la perfusión con F-19 con respecto a los pulsos de ATP aplicados en el control, arrojó un incremento estadísticamente significativo en los tres pulsos de ATP: $p \leq 0.05$ para el primer pulso, $p \leq 0.001$ para el segundo y $p \leq 0.01$ para el tercero.

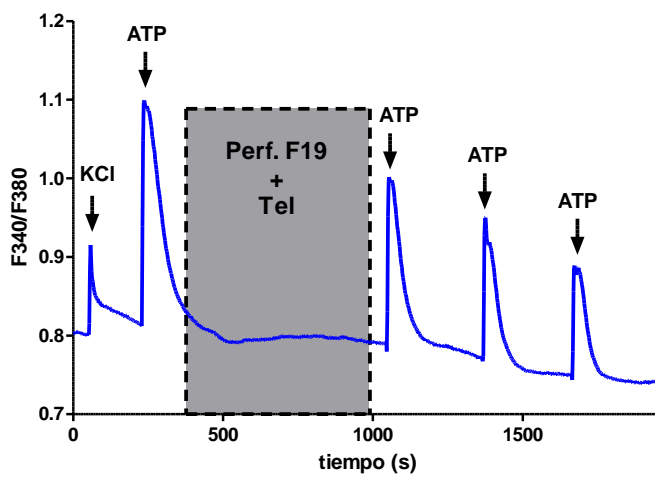
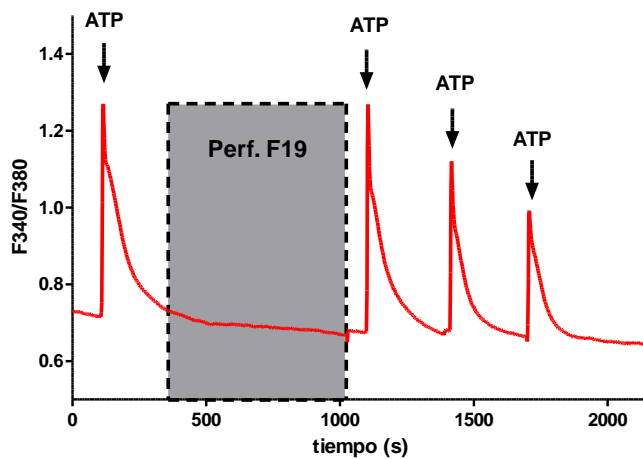
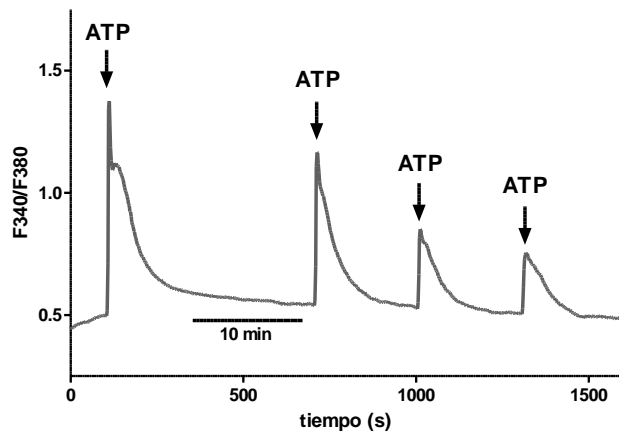
Realizando de la misma forma una comparación del pico promedio de la respuesta a los pulsos de ATP aplicados luego de la perfusión con F-19 con respecto al pico promedio de los pulsos de ATP aplicados luego de la perfusión de F-19 con Telmisartán, se obtuvo que la disminución de la respuesta con cada pulso de ATP después de la perfusión de F-19 con Telmisartán es estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$).

Con respecto al área promedio, la comparación realizada entre las respuestas a los pulsos de ATP aplicados luego de la perfusión con F-19 y las respuestas a los pulsos de ATP aplicados luego de la perfusión de F-19 con Telmisartán, indicó una disminución estadísticamente significativa únicamente con respecto al segundo pulso ($p \leq 0.01$).

Adicionalmente, también se realizó la comparación de Dunn entre el pico y el área promedio de los pulsos de ATP en el control y luego de la perfusión con F-19 más Telmisartán, con la finalidad de estudiar la capacidad inhibitoria de este compuesto sobre el efecto de la F-19 con respecto al control. Con respecto al pico, no hubo diferencia estadística en el caso del primer y el segundo pulso ($p > 0.05$) y una diferencia estadísticamente significativa para el tercero ($p \leq 0.01$), mientras que en el caso del área todas las comparaciones fueron estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

Una observación adicional es que el efecto de la inhibición de los receptores AT1 sobre la recuperación de la respuesta ATP causada por la perfusión con F-19, es más evidente en el pico que en el área promedio de la respuesta, donde la disminución resultó ser significativa solo en el segundo pulso de ATP.

A



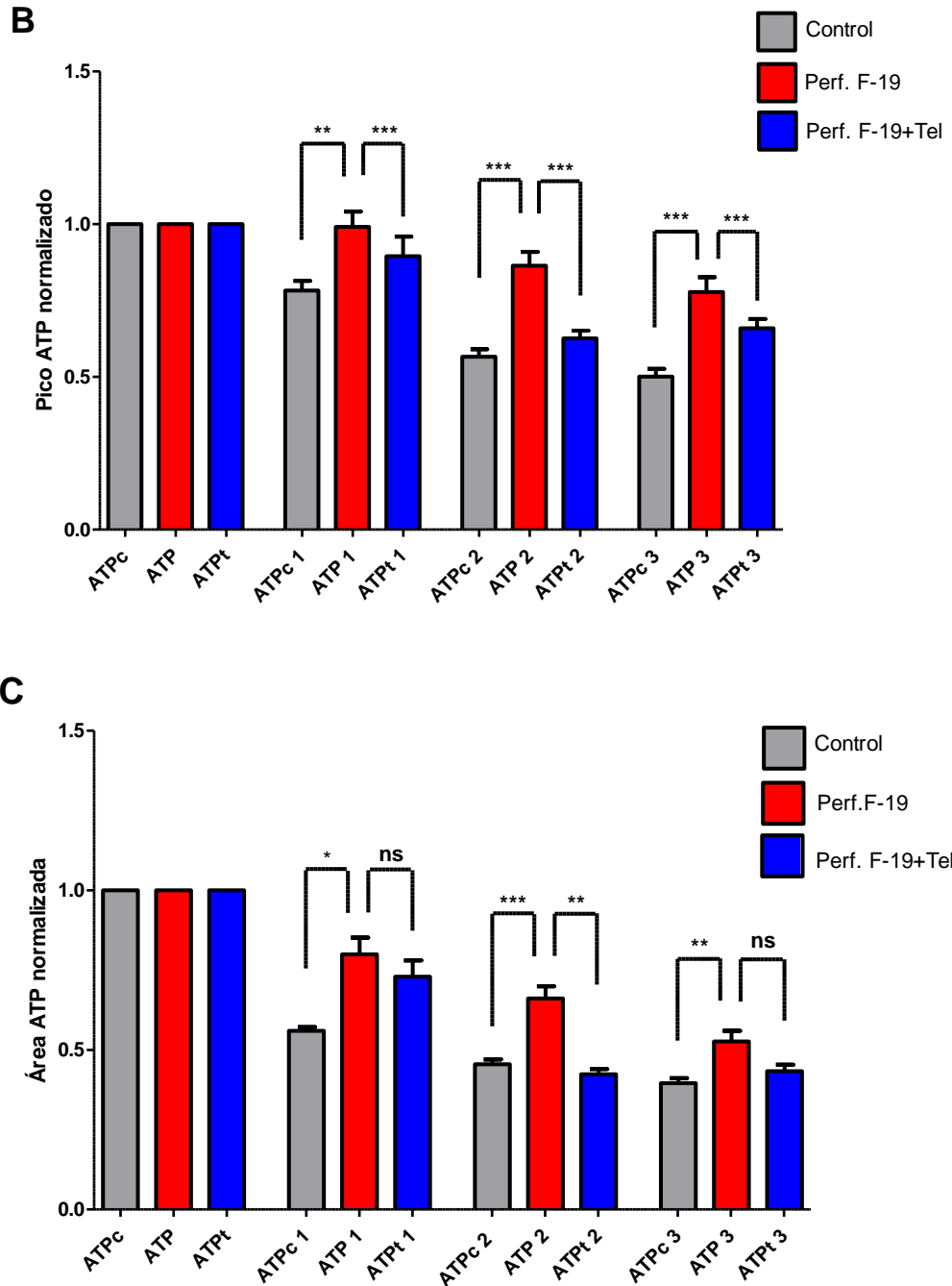


Figura 26. (A) Registros promedio del control, efecto de la perfusión F-19 1µg/mL y F-19 1µg/mL +Telmisartán 20µM sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de tres pulsos consecutivos de ATP 100µM. (B) Gráfico de barras del pico promedio del incremento en $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a tres pulsos de ATP aplicados después de la perfusión de F-19, en comparación con los picos promedio obtenidos por los pulsos de ATP después de la perfusión F-19+Telmisartán y con el control. (C) Gráfico correspondiente al área promedio. Las respuestas a los pulsos de ATP fueron normalizadas contra el primer pulso de ATP en su condición correspondiente. El análisis Kruskal-Wallis arroja $p < 0.0001$ para el pico y para el área promedio indicando al menos un promedio de pico y área distinto. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$) denotan diferencia estadísticamente significativa entre las columnas comparadas y ns ($p > 0.05$) indica que no hay diferencia estadística.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La F-19 forma parte del veneno de la especie de escorpión *Td*, representando el 1,59% del total. Se ha demostrado mediante microscopia de fluorescencia que induce incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en macrófagos peritoneales de ratón (Ramirez-Bello y col., 2014), donde se conoce que oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ regulan la activación de estas células e inducen la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Akira y col., 1990; Baumann y Gauldie, 1994). Adicionalmente, presenta actividad apoptogénica sobre la línea celular cancerígena de neuroblastoma Neuro-2A, representada por la disminución de la viabilidad celular de estas células (Cisneros, 2015).

El mecanismo subyacente al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ observado por la aplicación de F-19 en células gliales de GRD se estudió mediante la aplicación de condiciones, las cuales permitieron determinar algunas características relevantes.

Efecto de la Condición $0Ca^{2+}$ en medio extracelular sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de F-19 y ATP.

La ausencia de iones Ca^{2+} en medio extracelular permitió determinar que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de F-19 depende de los iones Ca^{2+} liberados desde reservorios intracelulares. La aplicación de pulsos de F-19 en esta condición produjo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

La diferencia no significativa obtenida en la comparación entre los picos y áreas promedio de la respuesta al pulso de F-19 en medio con Ca^{2+} y el primer pulso de F-19 aplicado en perfusión $0Ca^{2+}$, indica la dependencia de la liberación de iones Ca^{2+} desde

reservorios intracelulares, probablemente desde el retículo endoplasmático (RE), considerado principal reservorio intracelular dinámico de Ca^{2+} en glias (Verkhatsky y Kettenmann, 1996). La liberación de Ca^{2+} posiblemente se produce por la activación de receptores metabotrópicos. Generalmente, estos receptores activan una enzima que produce un segundo mensajero difusible, que a su vez inicia una cascada bioquímica al activar quinasas específicas que fosforilan diversas proteínas celulares en residuos de serina o treonina o por otro lado activan la movilización de iones Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, como lo sería en este caso (Kandel, 2000).

Por otro lado, la disminución significativa del pico y área promedio del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenida con el segundo pulso de F-19 en esta condición, corrobora esta hipótesis, ya que podría indicar el agotamiento de estos reservorios finitos de Ca^{2+} .

En el caso del ATP, el efecto de la ausencia de Ca^{2+} en medio extracelular resultó en una disminución significativa del pico y el área promedio de la respuesta para ambos pulsos de ATP aplicados dentro de la perfusión 0Ca^{2+} . La disminución significativa obtenida con el primer pulso de ATP en 0Ca^{2+} , indicaría que parte de la respuesta depende de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y que otra parte depende de la liberación intracelular. La parte que depende de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares podría deberse a la activación de receptores metabotrópicos de ATP P2Y, cuya expresión ha sido demostrada en CGSs de GRD, específicamente los receptores tipo P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₄ (Chen y col., 2008; Kobayashi y col., 2006). La otra parte que depende del Ca^{2+} extracelular estaría activando receptores ionotrópicos, también llamados canales iónicos dependientes de ligando, los cuales modulan la apertura de canales iónicos de forma directa debido a que el receptor y el canal forman parte de la misma proteína de membrana. En este caso el ATP

activaría receptores P2X, cuya existencia ya se ha demostrado en CGSs de GRD, por ejemplo la expresión del receptor P2X7 (Chen y col., 2008).

La disminución significativa de la respuesta al segundo pulso de ATP en ausencia de 0Ca^{2+} extracelular, corrobora la hipótesis que indica que una parte de la respuesta se debe a la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares finitos, ya que propone el agotamiento de estos reservorios, posiblemente sensibles a InsP_3 (Pavenstadt y col., 1993; Gutiérrez y col., 1999).

Por lo tanto, podría concluirse que la respuesta a la F-19 se debería a la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, mientras que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por el ATP, podría tratarse de una respuesta combinada entre la entrada de Ca^{2+} y su liberación desde reservorios intracelulares.

Efecto de la aplicación de Suramina sobre el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado la aplicación de F-19 y ATP.

La Suramina es una droga tripanocida compuesta por un derivado naftilaminabenzamida polisulfonado, la cual presenta en su estructura varios anillos aromáticos y está cargada negativamente (Figura 27) (Chahdi y col., 1997). Este compuesto y sus análogos ejercen la mayoría de sus efectos inhibitorios sobre blancos en células de mamíferos, entre los cuales se encuentra la subunidad α de la proteína G (Freissmuth y col., 1995).

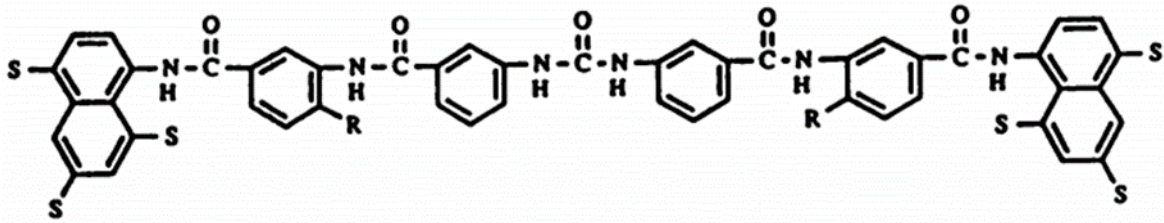


Figura 27. Estructura de la Suramina. Tomado de Freissmuth y colaboradores (1996).

Freissmuth y colaboradores determinaron que la Suramina y sus análogos actúan como antagonistas directos de la proteína G heterotrimérica debido a que bloquean el paso limitante de su activación (la disociación de la molécula de GDP preenzimada a la subunidad α). La Suramina inhibió la unión de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ a subunidades α de proteína G purificada de membranas de plaquetas. Este efecto fue más pronunciado para la proteína $G_{\alpha s}$ que para las proteínas $G_{\alpha o}$ y $G_{\alpha i}$. Se descartó que la inhibición fuera debida a la competencia por el sitio de unión para el nucleótido de guanosina, determinando la tasa de disociación de la molécula de GDP preenzimada después del premarcaje de la proteína $G_{\alpha s}$ con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GDP}$ en presencia y ausencia de Suramina. Los parámetros cinéticos mostraron que la habilidad de la Suramina de bloquear la unión de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ es considerada completa con la supresión de la liberación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GDP}$.

La afinidad alta de unión a agonistas de los receptores acoplados a proteína G depende de la formación del complejo ternario agonista/receptor/proteína G. Se espera que los compuestos que interfieren con el acoplamiento entre el receptor y la proteína G supriman la unión del agonista (Beindl y col., 1996). Beindl y colaboradores estudiaron la capacidad de la Suramina de inhibir la formación del complejo ternario de alta afinidad agonista/receptor/proteína G y el efecto de esta inhibición en la unión del

agonista en receptores de Adenosina A₁ y Dopamina D₂ (caracterizados como receptores acoplados a proteína G tipo G_i/G_o) expresados en membrana de corteza cerebral humano y tejido estriatal de rata, respectivamente. Estos investigadores concluyeron que la Suramina inhibió la unión de los agonistas radioligando respectivos para cada receptor ¹²⁵I-HPIA y apomorfina, probablemente debido a que este compuesto impide el contacto entre el receptor y la proteína G. Esta inhibición resultó ser cuasicompetitiva con respecto a la unión del agonista debido a que puede ser superada incrementando la ocupación del receptor, pero posiblemente no resulte de la interacción de los compuestos con el bolsillo de unión a ligando de los receptores, ya que la unión de antagonistas o de agonistas no es afectada en ausencia de interacciones receptor/proteína G funcionales (Beindl y col., 1996).

Los resultados obtenidos por la comparación del pico y área promedio de la respuesta a la aplicación de F-19 fueron estudiados en presencia y ausencia de Suramina. La diferencia no significativa obtenida por la comparación entre el pico promedio de la respuesta a un pulso de F-19 con Suramina dentro de la perfusión con el inhibidor y un pulso de F-19 en ausencia de Suramina, podría indicar que en el incremento en la [Ca²⁺]_i observado con la aplicación de F-19, no participan receptores acoplados a proteína G tipo G_i/G_o o G_s. Sin embargo, con respecto al área, esta comparación resultó ser estadísticamente significativa, pudiendo indicar una posible inhibición.

Por el contrario, la comparación realizada entre el pico y el área promedio de la respuesta obtenida por la aplicación del pulso de F-19 con Suramina sin perfusión y el pulso de F-19 sin Suramina, resultó estadísticamente significativa tanto para el pico como para el área, apoyando la hipótesis de la inhibición de un receptor acoplado a

proteína G con los tipos de proteína G mencionados. Sin embargo, pudiese ser que la para el momento de la aplicación del pulso de F-19 con Suramina sin perfusión, no haya habido respuesta a la F-19 debido a la desensibilización rápida de los receptores por causa de la aplicación de pulsos consecutivos ya descrita. Adicionalmente, debido a la naturaleza altamente polar de la estructura de la Suramina, es probable que el tiempo empleado en este pulso no haya sido suficiente para la entrada del inhibidor.

Los resultados obtenidos con la presencia de Suramina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP, indican la inhibición casi completa de la respuesta, lo cual se correlaciona con la capacidad descrita de este compuesto de inhibir de forma no específica receptores purinérgicos P2X y P2Y (Dunn y Blakeley, 1988; Hoiting y col., 1990; Inoue y col., 1991).

Cabe destacar que debe tomarse en cuenta que en la respuesta a la F-19 podría estar involucrado un receptor metabotrópico, mientras que se está considerando que la respuesta al ATP está mediada por receptores ionotrópicos y metabotrópicos, de acuerdo con lo obtenido con la condición $0Ca^{2+}$ extracelular.

Sin embargo, a pesar de la ambigüedad observada entre la posible no inhibición observada en la perfusión con Suramina y la posible inhibición de los receptores involucrados en la respuesta a F-19 observada sin la perfusión con Suramina, si se realiza la comparación de los resultados obtenidos con la F-19 con los resultados obtenidos con el ATP en presencia y ausencia de Suramina, podría concluirse que la respuesta a la F-19 no es completamente inhibida por la Suramina a la concentración utilizada.

Efecto de la perfusión con F-19 sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP.

El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de pulsos consecutivos de ATP en el control y después de la perfusión con F-19 fueron comparados con la finalidad de estudiar la capacidad de esta fracción de veneno de inducir la recuperación de la respuesta al ATP. El aumento significativo observado en el pico y el área promedio de la respuesta al ATP luego de la perfusión con F-19 evidenció la recuperación de la respuesta, probablemente causada por un mecanismo relacionado con la presencia de F-19.

La F-19 se ha relacionado con la producción de ON debido a induce un pico en su producción en macrófagos ($[ON]=46 \mu M$) durante un tiempo de exposición de cinco (5) minutos a $[F-19]=50 \mu g/mL$, siendo uno de los componentes del veneno de *Td* más potentes relacionados con la liberación de ON en estas células (Ramírez-Bello y col., 2014). Por esta razón, es posible que la presencia de F-19 induzca la producción de ON en células gliales de GRD.

Análisis inmunohistoquímicos demostraron que la ONS neuronal (nONS) se expresa constitutivamente en algunas neuronas primarias (<5%) (Ruscheweyh y col., 2006) excitatorias peptidérgicas de GRD lumbares (Zhang y col., 1993), pudiendo ser específicamente esta enzima la responsable de la producción de ON en GRD.

Liu y colaboradores (2002), relacionaron la presencia de ON con la recuperación de la respuesta al ATP. Estos investigadores aplicaron pulsos de ATP sobre cultivos de células mesangiales de rata y observaron un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediante el uso de Imagenología de Ca^{2+} y el indicador de Ca^{2+} Fura-2. Este incremento es

caracterizado por una fase ascendente en la $[Ca^{2+}]_i$ causada por la activación de receptores de ATP metabotrópicos P2Y y consecuente liberación de estos iones dependiente de $InsP_3$ y por otra parte una fase más lenta relacionada con la entrada de Ca^{2+} (Pavenstadt y col., 1993; Gutiérrez y col.,1999). De forma importante, observaron que al aplicar pulsos consecutivos de ATP la respuesta disminuía de forma gradual con cada pulso.

La aplicación del precursor de ON L-arginina produjo el incremento en la [ON] representado por el aumento en la intensidad de la fluorescencia del indicador de ON 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) en esas células, al igual que lo hizo el donador de ON exógeno espermina-NONOato. La presencia de estos compuestos produjo la recuperación de la amplitud de la respuesta al ATP en el cuarto pulso aplicado.

La inhibición de la ON sintasa inducible (iONS) por la aplicación de NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) apoyó la idea de la influencia del ON en la recuperación de la respuesta al ATP. Cuando el inhibidor fue añadido continuamente durante la aplicación de los tres primeros pulsos de ATP, incrementó significativamente el grado de desensibilización gradual de los receptores de ATP P2Y, evidenciando que la producción celular de ON es suficiente para la recuperación parcial de la respuesta. Al eliminar el inhibidor durante el cuarto pulso de ATP y luego añadir espermina-NONOato y L-arginina por separado, se observó la recuperación sustancial del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de ATP.

Por otro lado, el mecanismo relacionado con resensibilización mostró evidencia de ser independiente de cGMP (mecanismo de señalización clásico por ON), cuando la

presencia continua del inhibidor de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) [1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalina-1-uno] (ODQ), no produjo diferencia significativa con respecto al control en la amplitud del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en el cuarto pulso de ATP, ni en presencia de L-arginina ni de espermina-NONOato.

Estos investigadores concluyeron que la recuperación de la respuesta al ATP en células mesangiales de rata, se debe un mecanismo de señalización por ON independiente de cGMP. Este mecanismo podría influir mejorando el proceso de reciclaje y resensibilización de los receptores de ATP P2Y involucrados en la respuesta (Liu y col., 2012).

Los mecanismos de señalización por ON independientes de cGMP, son aquellos basados en modificaciones postraslacionales. Entre estos se encuentra la S-nitrosilación, la cual se define como una forma no clásica que consiste en la unión covalente y reversible de una unidad de ON a grupos tiol (-SH) en determinados residuos de cisteína, generando grupos S-nitrosotioles (RSNOs) en sitios activos o alostéricos, los cuales pueden modificar la funcionalidad de un rango amplio de proteínas (Hess y col., 2005; Martínez-Ruiz y col., 2011). Entre las proteínas modificadas se incluyen canales iónicos como canales de liberación de Ca^{2+} sensibles a rianodina, receptores (receptor NMDA), transportadores, factores de transcripción, proteínas de señalización (caspasa-3) y enzimas metabólicas, atribuyendo un rol fisiológico en cada caso.

Se tiene evidencia que el ON mediante la S-nitrosilación regula la internalización de receptores acoplados a proteína G (RAPG), modulando la funcionalidad de algunos componentes importantes de la maquinaria de tráfico de estos receptores, entre estos

las proteínas β -arrestina y dinamina (Wang y col., 2006; Kang-Decker y col., 2007; Ozawa y col., 2008).

Se ha demostrado que la β -arrestina 2 es S-nitrosilada en el residuo Cis-410 y que esta modificación resulta en la asociación de esta proteína con la proteínas Clatrina y el complejo adaptador de proteína AP2, facilitando un incremento la tasa de tráfico del receptor adrenérgico β_2 (β_2 AR) desde la membrana plasmática (Ozawa y col., 2008).

Por otro lado, la internalización mediada por agonista del mismo receptor puede ser regulada por S-nitrosilación de la dinamina 1 y 2. Se ha demostrado que dinamina 1 y la dinamina 2 pueden ser S-nitrosiladas en los residuos Cis-607 (Wang y col., 2006) y Cis-86 respectivamente (Kang-Decker y col., 2007). Esta modificación parece ser requerida para la función óptima de esta proteína debido a que promueve el ensamblaje de la dinamina e incrementa su actividad GTPasa, acelerando de esta manera el proceso de fisión de la vesícula de endocitosis desde la membrana plasmática (Dakaa, 2012).

El mecanismo de internalización de RAPG por endocitosis da lugar al proceso de resensibilización en la mayoría de estos. Los compartimientos membranosos intracelulares están enriquecidos con fosfatasas específicas para RAPG y una vez que estos receptores son desfosforilados en los endosomas, son enviados de nuevo a la superficie celular en un estado expuesto pre-ligando, en el cual son de nuevo competentes para señalizar (Ferguson, 2001).

El proceso de S-nitrosilación probablemente ocurre en los componentes mencionados de la maquinaria de endocitosis de receptores de ATP P2Y expresados en células gliales de GRD, debido a que se ha demostrado que la F-19 puede inducir la

producción de ON (Ramirez-Bello y col., 2014). La modificación de estas proteínas podría entonces incrementar tasa de internalización de los receptores de ATP P2Y, de la misma forma como ocurre en el caso de los β_2 AR y de esta manera favorecer el reciclaje de estos receptores en la membrana plasmática, explicando la recuperación de la respuesta de ATP observada después de la perfusión con F-19.

En los resultados obtenidos entre la comparación del pico promedio de la respuesta al ATP después de perfundir con F-19 y después de la perfusión de F-19 con Telmisartán, antagonista específico de AT₁Rs, se observa que este compuesto disminuye significativamente la capacidad de recuperación de la respuesta al ATP observada luego de perfundir solo con F-19. En el caso del área promedio, esta disminución resultó ser significativa solo para el segundo pulso de ATP.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la inhibición de los receptores AT₁ presentes, afecta el proceso involucrado en la recuperación de la respuesta al ATP y por esta razón es probable que estos receptores estén relacionados con el reciclaje y resensibilización de los receptores de ATP P2Y en la membrana plasmática.

Por otra parte, también propone de forma indirecta al AT₁R como posible blanco fisiológico de la F-19 en GRD, debido a que la presencia de Telmisartán disminuye de forma significativa el efecto de la F-19 en la recuperación de la respuesta al ATP. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ observado por la aplicación de F-19, probablemente se deba a la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) a través de la proteína G_q asociada al AT₁R y el consecuente aumento de la concentración de InsP₃ (Kaschina y Unger, 2003).

La expresión del receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT₁R) se ha demostrado mediante el uso de autoradiografía e hibridación *in situ* en GRD situados en la región lumbar de ratas Sprague-Dawley, predominantemente del tipo AT_{1A} (Pavel y col., 2008).

Por otro lado, las comparaciones de los pulsos de ATP en el control y los aplicados después de la perfusión de F-19 con Telmisartán resultaron en su mayoría no significativas. Esto indica que no hay diferencia entre las respuestas en las dos condiciones, corroborando la hipótesis del AT₁R como posible blanco fisiológico de la F-19.

Está documentado que la Ang II a través del receptor AT₁ puede activar el sistema de producción de ON. En arteriolas aferentes de riñón de ratón, la producción de ON por la aplicación de Ang II fue detectada como un incremento en la intensidad de fluorescencia verde del indicador DAF-2 DA en ~10%. La aplicación del antagonista específico de receptores AT₁ ZD7155 limitó el incremento en la intensidad de fluorescencia en un ~4%, mientras que el inhibidor específico de receptores AT₂ PD123.319 no cambió de forma significativa la fluorescencia del indicador. Estos investigadores atribuyeron la producción local de ON y su efecto vasodilatador la función de contrarrestar el efecto vasoconstrictor de la Ang II en este sistema en condiciones fisiológicas (Patzak y col., 2004). Por otro lado, mediante el uso de microscopía confocal y el mismo indicador de ON, se determinó de igual manera que la Ang II incrementó la producción de ON en células de mácula densa. El antagonista del receptor AT₁ CV-11974 bloqueó esta producción, mientras que el antagonista del receptor AT₂ PD-123319 no tuvo efecto significativo (Liu y Persson., 2004).

La Angiotensina II (Ang II) es una hormona octapeptídica que representa el componente activo del sistema renina-angiotensina (RAS) (Kaschina y Unger, 2003). Incrementa la presión sanguínea principalmente por constricción de vasos sanguíneos; presenta efectos neurológicos como causar la sensación de sed, la necesidad por sal y estimula la liberación de la hormona antidiurética desde la glándula pituitaria y noradrenalina desde los nervios simpáticos; presenta efectos sobre las glándulas adrenales como la estimulación de la producción de aldosterona resultando en la retención de Na⁺ y pérdida de K⁺ en los riñones y presenta efectos en los riñones como el incremento en la retención de Na⁺ y alteración de la forma en que los riñones filtran la sangre, lo que resulta en el incremento de la reabsorción de agua y por lo tanto en el volumen de sangre y presión sanguínea (Hein y col., 1997; Kaschina y Unger, 2003; Vukelic y Griendling, 2014). Adicionalmente, está relacionada con la inducción de crecimiento mediante la expresión de factores de transcripción relacionados con este proceso (*c-fos*, *c-myc* y *c-jun*) (Chung y col., 1998), migración celular y mitosis de células vasculares de músculo liso.

Sus acciones están mediadas por los receptores de Angiotensina II tipo 1 y 2 (AT₁R y AT₂R), identificados por medio de clonación molecular y estudios farmacológicos, los cuales presentan una estructura típica de receptor acoplado a proteína G con siete dominios transmembrana. En ratas, los receptores AT₁ han sido adicionalmente identificados y subdivididos en receptores AT_{1A} y AT_{1B} con ~96% de similitud en secuencia (Iwai e Inagami, 1992; Chung y col., 1998).

La mayoría de los efectos fisiológicos clásicos de la Ang II están mediados por AT₁R, mientras que el rol de AT₂R es todavía controversial, aunque posiblemente esté

relacionado con efectos inhibitorios de crecimiento en células endoteliales y neuronas (Chung y col., 1998).

En GRD, existe evidencia que indica que la Angiotensina II (Ang II) a través de la activación de AT₁R es un factor importante en la percepción del dolor neuropático, ya que este es potenciado cuando la Ang II es impulsada a través de lesiones por constricción del nervio ciático de rata. La liberación continua de Ang II induce hiperalgesia táctil, al calor y al frío alrededor de siete días después del daño al nervio. El bloqueo del receptor con Losartán, un inhibidor altamente selectivo para receptores AT₁, evita la hiperalgesia táctil y atenúa la hiperalgesia al frío, pero no afecta la respuesta a un estímulo nocivo de calor (Pavel y col., 2013).

Como se mencionó anteriormente, el ON a través del proceso de S-nitrosilación participa de forma directa potenciando la funcionalidad de componentes importantes de la maquinaria de endocitosis de receptores acoplados a proteína G, como se ha demostrado al menos en el caso de la β -arrestina (Ozawa y col., 2008) y dinamina (Wang y col., 2006; Kang-Decker y col., 2007).

Se puede concluir que el AT₁R expresado en GRD podría inducir la producción de ON posterior a la interacción de la F-19 con el receptor y su activación. El ON podría llevar a cabo el proceso de S-nitrosilación en los componentes de la maquinaria de endocitosis mencionados, favoreciendo la internalización de los receptores de ATP P2Y y por consiguiente su reciclaje y resensibilización.

CONCLUSIONES

- CLAR-FR resultó un método práctico para la obtención de la F-19 a partir del veneno de *Td*.
- El receptor involucrado en el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ por la aplicación de F-19 podría ser de desensibilización rápida.
- El proceso de activación del receptor por la aplicación de concentraciones crecientes de F-19 presentó forma de campana.
- La activación de los receptores purinérgicos por la aplicación de concentraciones crecientes de ATP presentó forma de campana.
- La respuesta a la F-19 depende de la liberación de Ca^{2+} intracelular.
- La respuesta al ATP es una respuesta combinada entre la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares.
- La Suramina inhibió casi completamente el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por el ATP, más los resultados obtenidos con el inhibidor a la concentración empleada no son concluyentes con respecto a su efecto sobre la respuesta a la F-19.
- La F-19 podría actuar como agonista sobre receptores AT1 metabotrópicos en GRD produciendo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células gliales de estos ganglios. Este incremento podría ser causado por la liberación de iones de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. A su vez, estos receptores podrían inducir la producción de ON en este sistema, el cual llevaría a cabo la modificación por S-nitrosilación de componentes de la maquinaria de endocitosis de receptores P2Y

expresados, favoreciendo el proceso de reciclaje y resensibilización de estos receptores de ATP.

REFERENCIAS

- Aguilar, M. I., Hearn, M. T. 1996. High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods in enzymology*. **270**: 3.
- Akira S., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *The FASEB Journal*. **4(11)**: 2860-2867.
- Ambudkar, I. S., Ong, H. L., Liu, X., Bandyopadhyay, B., Cheng, K. T. 2007. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell calcium*. **42(2)**: 213-223.
- Amedee, T., Ellie, E., Dupouy, B., Vincent, J. D. 1991. Voltage-dependent calcium and potassium channels in Schwann cells cultured from dorsal root ganglia of the mouse. *The Journal of physiology*. **441(1)**: 35-56.
- Armstrong D., Rossie S. 1999. Advances in second Messenger and Phosphoprotein research. Academic Press. Primera Edición. California, USA.
- Barres, B. A., Koroshetz, W. J., Chun, L. L., Corey, D. P. 1990. Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron*. **5(4)**: 527-544.
- Batista, C. V., D'Suze, G., Gómez-Lagunas, F., Zamudio, F. Z., Encarnación, S., Sevcik, C., Possani, L. D. 2006. Proteomic analysis of Tityus discrepans scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics*. **6(12)**: 3718-3727.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Mootha, V. K. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. **476(7360)**: 341-345.
- Baumann H., Gauldie J. 1994. The acute phase response. *Immunology Today*. **15(2)**: 74-80.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (Eds.). 2007. Neuroscience (Vol. 2). Lippincott Williams & Wilkins.
- Beindl W., Mitterauer T., Hohenegger M., Ijzerman A.P, Nanoff C., Freissmuth M. 1996. Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol Pharmacol*. **50(2)**: 415-23.
- Benaim, G. 1993. Homeostásis intracelular del calcio. La calmodulina y la Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática de tripanosomatideos. *Acta. Cient. Venezol*. 57-66.
- Benaim, G., de Meis, L. 1990. Similarities between the effects of dimethyl sulfoxide and calmodulin on the red blood cell Ca²⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. **1026(1)**: 87-92.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blalchy-Dyson, E., Di Lisa, F., Forte, M. A. 2006. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS Journal*. **273(10)**: 2077-2099.
- Bezprozvanny, I. 2005. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Cell calcium*. **38(3)**: 261-272.
- Bilbao, J. M., Schmidt, R. E. 2015. Schwann Cells and Myelin in the Peripheral Nervous System. *Biopsy Diagnosis of Peripheral Neuropathy*. Springer International Publishing.

- Blankenfeld, G. V., Verkhatsky, A. N., Kettenmann, H. 1992. Ca²⁺ channel expression in the oligodendrocyte lineage. *European Journal of Neuroscience*. **4(11)**:1035-1048.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., MacKenzie, L., Roderick, H. L., Berridge, M. J., Peppiatt, C. M. 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *The FASEB Journal*. **16(10)**: 1145-1150.
- Bootman, M. D., Rietdorf, K., Collins, T., Walker, S., Sanderson, M. 2013. Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2013(2)**: 83-99.
- Borges, A., García, C. C., Lugo, E., Alfonzo, M. J., Jowers, M. J., den Camp, H. J. O. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zuliaanus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **142(3)**: 240-252.
- Bosmans F, Tytgat J. 2007. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels. *Toxicon*. **49(4)**: 550-560.
- Brini, M., Carafoli, E. 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiological reviews*. **89(4)**:1341-1378.
- Browne, L. E., Jiang, L. H., North, R. A. 2010. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends in pharmacological sciences*. **31(5)**: 229-237.
- Burdakov, D., Petersen, O. H., Verkhatsky, A. 2005. Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell calcium*. **38(3)**: 303-310.
- Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., Sakmann, B. 1995. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of Physiology*. **485(2)**:403-418.
- Burnstock, G. 1990. Overview: purinergic mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **603(1)**: 1-17.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annual review of biochemistry*. **56(1)**: 395-433.
- Carafoli, E., Garcia-Martin, E.,Guerini, D. 1996. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia*. **52(12)**: 1091-1100.
- Carafoli, E., Zurini, M., Benaim, G. 1985. The Purified Calcium-Pumping ATPase of Plasma Membrane. *In Calcium in Biological Systems* (pp. 265-273). Springer US.
- Castillo, C., Norcini, M., Baquero-Buitrago, J., Levacic, D., Medina, R., Montoya-Gacharna, J. V., Recio-Pinto, E. 2011. The N-methyl-D-aspartate-evoked cytoplasmic calcium increase in adult rat dorsal root ganglion neuronal somata was potentiated by substance P pretreatment in a protein kinase C-dependent manner. *Neuroscience*. **177**: 308-320.
- Castillo, C., Norcini, M., Hernandez, L. M., Correa, G., Blanck, T. J. J.,Recio-Pinto, E.2013. Satellite glia cells in dorsal root ganglia express functional NMDA receptors. *Neuroscience*. **240**: 135-146.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. **389 (6653)**: 816-824.

- Catterall, W. A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **3(8)**: a003947.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Frank, H. Y., Konoki, K., Scheuer, T. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. **49(2)**: 124-141.
- Chahdi, A., Daeffler, L., Gies, J. P., Landry, Y. 1998. Drugs interacting with G protein α subunits: selectivity and perspectives. *Fundamental & clinical pharmacology*, **12(2)**:121-132.
- Chen, Y., Zhang, X., Wang, C., Li, G., Gu, Y., Huang, L. Y. M. 2008. Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105(43)**:16773-16778.
- Chippaux, J. P., Goyffon, M. 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica*. **107(2)**:71-79.
- Chung, O., Kühl, H., Stoll, M., Unger, T. 1998. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney International*. **54**: S95-S99.
- Cisneros, M. 2015. Caracterización de la actividad anticancerígena de una toxina purificada del veneno de *Tityus discrepans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., Stojilkovic, S. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*. **63(3)**: 641-683.
- Colomar, A., & Amédée, T. 2001. ATP stimulation of P2X7 receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *European Journal of Neuroscience*. **14(6)**: 927-936.
- Condorelli, D. F., Conti, F., Gallo, V., Kirchhoff, F., Seifert, G., Steinhäuser, C., Yuan, X. 1999. Expression and functional analysis of glutamate receptors in glial cells. *The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease*. Springer US.
- Curtis E., Barnes N.S. 2008. Biología. Editorial Médica Panamericana. Séptima Edición en español. Madrid, España.
- D' Suze G., Batista C.V.F., Frau A., Murgia A.R., Zamudio F.Z., Sevcik C., Possani L.D., Prestipino G. 2004b. Discrepin, A new peptide of the sub-family α -Ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K^+ -channels (IA currents) of cerebellum granular cells. *Arc. Bioquim. Biophys*. **430**: 256-263.
- D'Suze G., Castillo C., Sevcik C., Brazón J., Malavé C., Hernández D., Zerpa N. 2014. Scorpionism and Dangerous Scorpion Species in Venezuela. En: *Handbook of Toxinology: Scorpion Venoms*. DOI 10. 1007/978-94-007-6647-1_24-1. Editorial. Springer.
- D'Suze, G., Corona, F., Possani, L. D., Sevcik, C. 1996. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. **34(5)**: 591-598.
- D'Suze G., Moncada S, González C, Sevcik C, Aguila, V, Alagón A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon*. **41**: 367-375.
- D'Suze G., Rosales A., Salazar V., Sevcik C. 2010. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*. **56**: 1497-1505.

- D'Suze, G., Sevcik, C., Corona, M., Zamudio, F. Z., Batista, C., Coronas, F. I., Possani, L. D. 2004a. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. **43**: 263–272.
- D'Suze, G., Sevcik, C., Perez, J. F., Fox, J. W. 1997. Isolation and characterization of apotent curarizing polypeptide from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. **35(12)**: 1683-1689.
- D'Suze, G., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., Possani, L. D. 1999. A novel K⁺ channel blocking toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *FEBS Lett*. **456**: 146–148.
- Daaka, Y. 2012. S-nitrosylation-regulated GPCR signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **1820(6)**: 743-751.
- De Stefani D., Raffaello A., Teardo E., Szabo I., Rizzuto R. 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. **476**: 336-340.
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J., Lohr, C. 1998. Calcium signalling in glial cells. *Cell calcium*. **24(5)**: 405-416.
- Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J. D., Sherman, N. E., Fox, J. W. 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*. **54(6)**:802-817.
- Diego-García, E., Schwartz, E., D'Suze, G., Román-González, S., Batista, C. V. F., García, B. I., Rodríguez de la Vega, R., Possani, L. D. 2007. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides*. **28**: 31-37.
- D'Suze G, Sevcik C, Ramos M. 1995. Presence of curarizing polypeptides and a pancreatitis-inducing fraction without muscarinic effects in the venom of the Venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon*. **33(3)**: 333-345.
- D'Suze G., Salazar, V., Díaz, P., Sevcik, C., Azpurua, H., Bracho, N. 2004. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon*. **44(8)**: 851-860.
- D'Suze G., Sandoval M., Sevcik C. 2015. Characterizing *Tityus discrepans* scorpion venom from a fractal perspective: Venom complexity effects of captivity, sexual dimorphism, differences among species. *Toxicon* 108: 62-72.
- D'Suze, G., Schwartz, E. F., García-Gómez, B. I., Sevcik, C., Possani, L. D. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie*. **91(8)**: 1010-1019.
- Dubin, A. E., Patapoutian, A. 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*. **120(11)**: 3760-3772.
- Dudzinski, D. M., Igarashi, J., Greif, D., Michel, T. 2006. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **46**: 235-276.
- Dunn, P. M., Blakeley, A. G. 1988. Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse *vas deferens*. *British journal of pharmacology*. **93(2)**: 243-245.
- Dux, L., Martonosi, A. 1983. Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca²⁺-ATPase vesicles treated with vanadate. *Journal of Biological chemistry*. **258(4)**: 2599-2603.

- Egelman, D. M., Montague, P. R. 1999. Calcium dynamics in the extracellular space of mammalian neural tissue. *Biophysical Journal*. **76(4)**: 1856-1867.
- Ferguson, S. S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological review*. **53(1)**: 1-24.
- Forsyth P., Sevcik C., Martínez R., Castillo C., D' Suze G. 2012. Bactridine's Effects on DUM Cricket Neurons under Voltage Clamp Conditions. *Journal of Insects Physiology*. **58**: 1676-1685.
- Förstermann, U., Sessa, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. **33(7)**: 829-837.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., Schiöth, H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*. **63(6)**: 1256-1272.
- Freissmuth, M., Boehm, S., Beindl, W., Nickel, P., Ijzerman, A. P., Hohenegger, M., Nanoff, C. 1996. Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors. *Molecular pharmacology*. **49(4)**: 602-611.
- Fresu, L., Dehpour, A., Genazzani, A. A., Carafoli, E., Guerini, D. 1999 Plasma membrane calcium ATPase isoforms in astrocytes. *Glia*. **28(2)**:150-155.
- Froy O, Gurevitz M. 2003. New insight on scorpion divergence inferred from comparative analysis of toxin structure, pharmacology and distribution. *Toxicon*. **42(5)**:549-55.
- Garaschuk, O., Hanse, E., Konnerth, A. 1998. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *The Journal of physiology*. **507(1)**: 219-236.
- Geiger, J. R., Melcher, T., Koh, D. S., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Jonas, P., Monyer, H. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. **15(1)**: 193-204.
- Gonzalez-Sponga, M. A. 2011. Escorpiones, características, distribución geográfica y comentarios generales. *Paniagua Solis JF. Emergencias por a nimalas ponzoñosos en las Américas. Mexico: México: Documaster, SA de CV, 529.*
- Grienberger, C., Konnerth, A. 2012. Imaging calcium in neurons. *Neuron*. **73(5)**: 862-885.
- Griffin, J. W., Thompson, W. J. 2008. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia*. **56(14)**: 1518-1531.
- Grolleau, F., Stankiewicz, M., Kielbasiewicz, E., Martin-Eauclaire, M. F., Lavialle, C., De Vente, J., & Lapied, B. 2006. Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca²⁺ entry is the final step involved in the neurotoxic effect of *Tityus serrulatus* scorpion β -toxin. *European Journal of Neuroscience*. **23(6)**: 1465-1478.
- Grover, A. K. 1985. Ca-pumps in smooth muscle: one in plasma membrane and another in endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* **6(3)**: 227-236.
- Gu, Y., Chen, Y., Zhang, X., Li, G. W., Wang, C., Huang, L. Y. M. 2010. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. *Neuron glia biology*. **6(01)**: 53-62.
- Guerini D., Coletto L., Carafoli E. 2005. Exporting calcium from cells. *Cell Calcium*. **38**:281-289.

- Gurevitz M, Karbat I, Cohen L, Ilan N, Kahn R, Turkov M, Stankiewicz M, Stühmer W, Dong K, Gordon D. 2007. The insecticidal potential of scorpion betatoxins. *Toxicol.* **49(4)**:473-89.
- Gutierrez, A. M., Lou, X., Erik, A., Persson, G., & Ring, A. 1999. Ca²⁺ response of rat mesangial cells to ATP analogues. *European journal of pharmacology.* **369(1)**: 107-112.
- Hamilton, S. L. 2005. Ryanodine receptors. *Cell calcium* **38(3)**: 253-260.
- Hanani, M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain research reviews.* **48(3)**: 457-476.
- Haugland, R. P., Spence, M. T., Johnson, I. D. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals.* Molecular Probes.
- Hein, L., Meinel, L., Pratt, R. E., Dzau, V. J., Kobilka, B. K. 1997. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Molecular Endocrinology.* **11(9)**: 1266-1277.
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., Stamler, J. S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **6(2)**: 150-166.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., Ober, W. C. 2001. *Integrated Principles of Zoology* (Vol. 15). New York: McGraw-Hill.
- Hild, W., Tasaki, I. 1962. Morphological and physiological properties of neurons and glial cells in tissue culture. *Journal of neurophysiology,* **25(2)**: 277-304.
- Hoiting, B., Molleman, A., Nelemans, A., Den Hertog, A. 1990. P2-purinoceptor-activated membrane currents and inositol tetrakisphosphate formation are blocked by suramin. *European journal of pharmacology.* **181(1)**: 127-131.
- Ikura, M., Osawa, M., Ames, J. B. 2002. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays.* **24(7)**: 625-636.
- Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K., Takanaka, A. 1991. Selective and competitive antagonism by suramin of ATP-stimulated catecholamine-secretion from PC12 pheochromocytoma cells. *British journal of pharmacology.* **102(3)**: 581-584.
- Iwai, N., Inagami, T. 1992. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS letters.* **298(2-3)**: 257-260.
- Joya, G., D'Suze, G., Salazar, V., Rosales, A., Sevcik, C., Visbal, G., Ferreira, A. T. S., Perales, J. 2011. Scorpion toxins modify phytopathogenic fungus physiology. A possible source of new fungicides. *J. Agric. Food. Chem.* **59**: 6327-6337.
- Kandel E., Schwartz J., Jessell T. 2001. *Principios de Neurociencia.* McGraw Hill. Cuarta Edición Madrid, España.
- Kang-Decker, N., Cao, S., Chatterjee, S., Yao, J., Egan, L. J., Semela, D., Mukhopadhyay D y colaboradores. 2007. Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *Journal of Cell Science.* **120(3)**: 492-501.
- Kaschina, E., Unger, T. 2003. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood pressure.* **12(2)**: 70-88.

- Kettenmann H., Ransom B, 2013. Neuroglia. Oxford University Press. Tercera Edición. New York, USA.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., Clapham, D. E. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*: **427(6972)**: 360-364.
- Kobayashi K., Fukuoka T., Yamanaka H., Dai Y., Obata K., Tokunaga A., Noguchi K. 2006. Neurons and Glial Cells Differentially Express P2Y Receptor mRNAs in the Rat Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord. *The Journal of comparative Neurology*. **498**: 443-454.
- Krasznai, Z., Morisawa, M., Krasznai, Z. T., Morisawa, S., Inaba, K., Bazsane, Z. K., ... Marian, T. 2003. Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. *Cell motility and the cytoskeleton*. **55(4)**: 232-243.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A., Verkhratsky, A. 2006. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *The Journal of neuroscience*. **26(10)**: 2673-2683.
- Lambert, J. H. 1760. Photometria, sive de Mensura et Gradibus Luminis, Colorum et Umbrae. Augsburg, Alemania.
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., Culotta, V. C. 1995. Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Molecular and Cellular Biology*. **15(3)**: 1382-1388.
- Liu R., Gutiérrez A., Ring A. 2002. Nitric Oxide Induces Resensitization of P2Y Nucleotide Receptors in Cultured Rat Mesangial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. **13**: 313-312.
- Liu R., Persson E. 2004. Angiotensin II Stimulates Calcium and Nitric Oxide Release From Macula Densa Cells Through AT1 Receptors. *Hypertension*. **43**: 649-653.
- Lo, K. J., Luk, H. N., Chin, T. Y., Chueh, S. H. 2002. Store depletion-induced calcium influx in rat cerebellar astrocytes. *British journal of pharmacology*. **135(6)**: 1383-1392.
- Malarkey, E. B., Ni, Y., Parpura, V. 2008. Ca²⁺ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca²⁺ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia*. **56(8)**: 821-835.
- Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., Lamas, S. 2011. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. **51(1)**: 17-29.
- Matute, C., Alberdi, E., Domercq, M., Sánchez-Gómez, M. V., Pérez-Samartín, A., Rodríguez-Antigüedad, A., Pérez-Cerdá, F. 2007. Excitotoxic damage to white matter. *Journal of Anatomy* **210(6)**: 693-702.
- Mazzei de Dávila, C. A., Dávila-Spinetti, D. F., Ramoni-Perazi, P., Donis, H. J., Santiago, J., Villarroel, V., Arata de Bellabarba, G. 2010. Epidemiología, clínica y terapéutica del accidente escorpiónico en Venezuela. *Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas*. México: Instituto Bioclon, SA de CV, 115-146.
- Mettlen, M., Pucadyil, T., Ramachandran, R., Schmid, S. L. 2009. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Society Transactions*. **37(5)**: 1022-1026.
- Michelangeli, F., East, J. M. 2011. A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochemical Society Transactions*. **39(3)**: 789.

- Micu, I., Jiang, Q., Coderre, E., Ridsdale, A., Zhang, L., Woulfe, J., Yin, X., Trapp, B.D., McRory, J.E., Rehak, R., Zamponi, G.W., Wang, W., Stys P.K. 2006. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature*. **439(7079)**: 988-992.
- Minelli, A., Castaldo, P., Gobbi, P., Salucci, S., Magi, S., Amoroso, S. 2007. Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell calcium*. **41(3)**: 221-234.
- Misquitta, C. M., Mack, D. P., Grover, A. K. 1999. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺(SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell calcium*. **25(4)**: 277-290.
- Morell, P., Quarles, R. H. 1999. Myelin formation, structure and biochemistry. Philadelphia: Lippincott-Raven. Sexta Edición.
- Murad, F. 2011. Nitric oxide: the coming of the second messenger. *Rambam Maimonides Medical Journal*. **2(2)**.
- Murín, R., Verleysdonk, S., Raeymaekers, L., Kaplán, P., Lehotský, J. 2006. Distribution of secretory pathway Ca²⁺ ATPase (SPCA1) in neuronal and glial cell cultures. *Cellular and molecular neurobiology*. **26(7)**:1353-1363.
- Nedergaard, M., Rodríguez, J. J., Verkhratsky, A. 2010. Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell calcium*. **47(2)**: 140-149.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. **(307)**:462-465.
- Oh, Y. 1997. Ion channels in neuroglial cells. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. **13(1)**: 1-9.
- Ozawa K., Whalen E.J., Nelson C., Mu Y., Hess DT, Lefkowitz R.J., Stamler J.S. 2008. S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell*. **31(3)**:395-405.
- Pannese, E. 2010. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (CGSs) in sensory ganglia. *Neuron glia biology*. **6(01)**: 3-10.
- Patzak A., Lai E.Y., Mrowka R., Steege A., Persson P.B., Persson E. 2004. *Kidney International*. **66**: 1949-1958.
- Patzak, A., Lai, E. Y., Mrowka, R., Steege, A., Persson, P. B., Persson, A. E. G. 2004. AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney international*. **66(5)**: 1949-1958.
- Pavel, J., Oroszova, Z., Hricova, L., Lukacova, N. 2013. Effect of subpressor dose of angiotensin II on pain-related behavior in relation with neuronal injury and activation of satellite glial cells in the rat dorsal root ganglia. *Cellular and molecular neurobiology*. **33(5)**: 681-688.
- Pavel, J., Tang, H., Brimijoin, S., Moughamian, A., Nishioku, T., Benicky, J., Saavedra, J. M. 2008. Expression and transport of Angiotensin II AT 1 receptors in spinal cord, dorsal root ganglia and sciatic nerve of the rat. *Brain research*. **1246**: 111-122.
- Pavenstadt H., Gloy J., Leipziger J., Klar B., Pfeilschifter J., Schollmeyer P., Greger R. 1993. Effect of extracellular ATP on contraction, cytosolic calcium activity, membrane voltage and ion currents of rat mesangial cells in primary culture. *Br J Pharmacol*. **109**: 953-959.

- Peigneur, S., Sevcik, C., Tytgat, J., Castillo, C., D'Suze, G. 2012. Subtype specificity interaction of bactridines with mammalian, insect and bacterial sodium channels under voltage clamp conditions. *FEBS Journal*. **279**: 4025–4038.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **3(9)**: 639-650.
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., Pozzan, T. 2011. Ca²⁺ signalling in the Golgi apparatus. *Cell calcium*. **50(2)**: 184-192.
- Porter JT., McCarthy, K., 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Progress in neurobiology*. **51(4)**: 439-455.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European Journal of Biochemistry*. **264(2)**: 287-300.
- Prochnicka-Chalufour A., Corzo, G., Satake., H., Martin-Eauclaire M.F., Murgia A.N., Prestipino G., D' Suze G., Possani L.D., Delepierre M. 2006. The Solution Structure of discrepin, a new K⁺-channel blocking peptide from the sub-family α -KTx15. *Biochemistry*. **45(6)**: 1795-1804.
- Ramírez-Bello, V., Sevcik, C., Peigneur, S., Tytgat, J., & D'Suze, G. 2014. Macrophage alteration induced by inflammatory toxins isolated from Tityus discrepans scorpion venom. The role of Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Toxicon*. **82**: 61-75.
- Randall D., Burggren W., French K. 1997. Animal Physiology. McGraw-Hill. Cuarta Edición. San Francisco, USA.
- Rojas-Runjaic, F. J., De Sousa, L. 2007. Catálogo de los escorpiones de Venezuela (Arachnida: Scorpiones). *Boletín de la SEA*. **(40)**: 281-307.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C. F. 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*. **280(5369)**: 1596-1599.
- Ruas, M., Rieorf, K., Arredouani, A., Davis, L. C., Lloyd-Evans, E., Koegel, H., Galione, A. 2010. Purified TPC isoforms form NAADP receptors with distinct roles for Ca²⁺ signaling and endolysosomal trafficking. *Current biology*. **20(8)**: 703-709.
- Ruscheweyh, R., Goralczyk, A., Wunderbaldinger, G., Schober, A., Sandkühler, J. 2006. Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons. *Neuroscience*. **141(2)**: 977-988.
- Sargent, P. B. 1993. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual review of neuroscience*. **16(1)**: 403-443.
- Sharma, G., Vijayaraghaan, S. 2002. Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *Journal of neurobiology*. **53(4)**: 524-534.
- Shin-ichiro M., Sadashiva K., Saku K. Angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. 2011. *Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System*. **12(1)**:115-121.
- Sontheimer, H., Black, J. A., Waxman, S. G. 1996. Voltage-gated Na⁺ channels in glia: properties and possible functions. *Trends in Neurosciences*. **19(8)**: 325-331.
- Soto E., Guadarrama L. Cromatografía de fase reversa. [En línea] [Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf. [Consulta: 18 de julio de 2015].

- Stotz, S. C., Jarvis, S. E., Zamponi, G. W. 2004. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *The Journal of physiology*. **554(2)**: 263-273.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D. E. 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*. **29(3)**: 645-655.
- Suadicani, S. O., Cherkas, P. S., Zuckerman, J., Smith, D. N., Spray, D. C., Hanani, M. 2010. Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia. *Neuron glia biology*. **6(01)**: 43-51.
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., Cull-Candy, S. G. 1996. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *The Journal of Physiology* **492(1)**: 129-142.
- Trebak, M., Lemonnier, L., Smyth, J. T., Vazquez, G., Putney Jr, J. W. 2007. Phospholipase C-coupled receptors and activation of TRPC channels. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. 593-614. Springer Berlin Heidelberg.
- Tyson, J. R., Snutch, T. P. 2013. Molecular nature of voltage-gated calcium channels: structure and species comparison. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*. **2(5)**: 181-206.
- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., Babu, M. M. 2013. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. **494(7436)**: 185-194.
- Verkhratsky, A. 2006. Glial calcium signaling in physiology and pathophysiology. *Acta Pharmacologica Sinica*. **27(7)**: 773-780.
- Verkhratsky, A., Butt, A. 2013. Neuroglia: definition, classification, evolution, numbers, development. *Glial Physiology and Pathophysiology*. **73**-104.
- Verkhratsky, A., Parpura, V. 2014. Store-operated calcium entry in neuroglia. *Neuroscience bulletin*. **30(1)**: 125-133.
- Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J., Parpura, V. 2012. Calcium signalling in astroglia. *Molecular and cellular endocrinology*. **353(1)**: 45-56.
- Verkhratsky, A., Toescu, E. C. 2006. Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration. *Journal of cellular and molecular medicine*. **10(4)**: 869-879.
- Villa, G., Fumagalli, M., Verderio, C., Abbracchio, M. P., Ceruti, S. 2010. Expression and contribution of satellite glial cells purinoceptors to pain transmission in sensory ganglia: an update. *Neuron glia biology*. **6(01)**: 31-42.
- Vukelic, S., Griendling, K. K. 2014. Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor a paradigm shift. *Circulation research*. **114(5)**: 754-757.
- Walz W, Gimpl G, Ohlemeyer C, Kettenmann H. 1994. Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J Neurosci Res*. **38**: 12-18.
- Wang, G., Moniri, N. H., Ozawa, K., Stamler, J. S., Daaka, Y. 2006. Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103(5)**: 1295-1300.
- Weiss, E., Lang, H. J., Bernhardt, I. 2004. Inhibitors of the K⁺(Na⁺)/H⁺ exchanger of human red blood cells. *Bioelectrochemistry*. **62(2)**: 135-140.

- Winder, D. G., Conn, P. J. 1996. Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuronal communication. *Journal of neuroscience research*. **46(2)**: 131-137.
- Wu, L. J., Sweet, T. B., Clapham, D. E. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacological reviews*. **62(3)**: 381-404.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., Missiaen, L. 2003. PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *Pflügers Archiv*. **446(2)**: 148-153.
- Zhang, X., Chen, Y., Wang, C. L. Y. H., Huang, L. Y. 2007. Neuronal somatic ATP release triggers neuron–satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104(23)**: 9864-9869.
- Zhang, X. U., Verge, V., Wiesenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Bredt, D., Snyder, S. H., Hökfelt, T. 1993. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *Journal of Comparative Neurology*. **335(4)**: 563-575.
- Zhu S, Huys I, Dyason K, Verdonck F, Tytgat. 2004. Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *J. Proteins*. **54(2)**:361-70.
- http://www.bioind.com/page_143 [Consulta 30 de marzo de 2016]