

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS MACROCORRIENTES DE
CALCIO PRESENTES EN LA NEURONA C1 DE *HELIX* Y SU PAPEL EN LA
REGULACIÓN DE LA EXCITABILIDAD NEURONAL

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Biomédicas para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias
Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular

MARÍA LAURA RÍOS REYES

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis papás, gracias por su esfuerzo, su ejemplo y su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo le agradezco a Dios la oportunidad que me ha dado de realizar esta maestría y por todas las personas que ha puesto en mi camino durante este proceso.

Le agradezco enormemente a mis papás por su esfuerzo, por estar presentes, por apoyarme y amarme en todo momento. Gracias mami por darme las mejores palabras de guía y amor cuando más las necesitaba.

A Mario, cuando comencé la maestría era mi novio y ahora que la termino ya es mi esposo. Gracias por impulsarme a soñar en grande, por creer en mi incluso en momentos en que yo no lo he hecho, por escucharme cuando ocupo desahogarme y reconfortarme cuando las cosas no han salido de la forma en que yo esperaba.

A mis hermanos les agradezco su compañía y su amor siempre presente a pesar las distancias físicas. A Diego en especial le agradezco el haberme guiado con la escritura de la tesis. A mi perrita, mi Maggie bebé, le agradezco su compañía, su presencia siempre me ha brindado serenidad.

A Oscar, mi amigo, tutor, excompañero de oficina y jefe, le agradezco el haberme contagiado el gusto y la curiosidad por la neurofisiología. Gracias por haberme abierto las puertas del laboratorio, por siempre escuchar mis ideas y aclarar mis dudas.

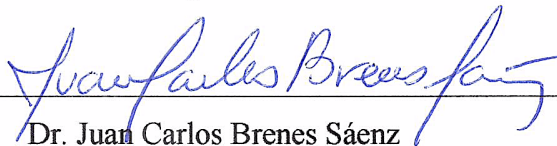
A Sil Monge le agradezco su amistad, el ser una persona en la que encuentro comprensión, paz, luz y sonrisas; gracias por tantos momentos compartidos. A Sil Calvo, mi compañera de maestría, le agradezco por todos los momentos que pasamos en el laboratorio, todos los errores que cometimos y el aprendizaje que generamos. A mis amigas de fisio, Abi, Monse, Laudy, Nadi y Mariela, gracias por su compañía y su amistad, por tantas risas y momentos que hemos compartido dentro y fuera del trabajo. A Fofó le agradezco todas las veces que me ha escuchado hablar sobre la tesis y por decirme la frase que me ha impulsado durante los últimos años.

A Fornaguera y Adarli les agradezco los consejos y el conocimiento que me han compartido durante estos años de maestría.

Muchas gracias.

Ma. Laura Ríos

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular.



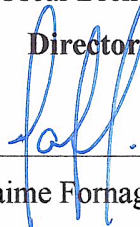
Dr. Juan Carlos Brenes Sáenz

**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



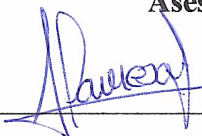
Dr. Oscar Brenes García, PhD.

Director de Tesis



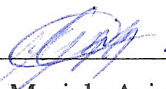
Dr. Jaime Fornaguera Trías, PhD.

Asesor



Dra. Adarli Romero Vásquez, PhD.

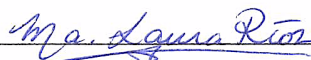
Asesora



Dra. Mariela Arias Hidalgo, PhD.

Directora

Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas



María Laura Ríos Reyes

Candidata

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos	iii
Hoja aprobación.....	iv
Tabla de contenido.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas	xii
1. Introducción.....	1
2. Justificación	12
3. Objetivo general.....	13
3.1. <i>Objetivos específicos</i>	13
4. Materiales y métodos	14
4.1. <i>Animales</i>	14
4.2. <i>Soluciones</i>	14
4.3. <i>Aislamiento de neuronas C1</i>	14
4.4. <i>Análisis de las macrocorrientes de calcio</i>	15
4.5. <i>Identificación de los canales de calcio implicados en las macrocorrientes</i>	18

4.6.	<i>Análisis de la excitabilidad neuronal</i>	21
4.7.	<i>Análisis estadístico de los datos</i>	23
5.	Resultados	24
5.1.	<i>Análisis de las macrocorrientes de calcio</i>	24
5.2.	<i>Identificación de los canales de calcio implicados en las macrocorrientes</i>	25
5.3.	<i>Papel de los canales Cav 2.1 y Cav2.2 en la excitabilidad neuronal</i>	28
6.	Discusión	31
6.1.	<i>Análisis de las macrocorrientes de calcio</i>	31
6.2.	<i>Identificación de los canales de calcio implicados en las macrocorrientes</i>	33
6.3.	<i>Papel de los canales Cav2.1 y Cav2.2 en la excitabilidad neuronal</i>	35
6.4.	<i>Potenciales limitaciones</i>	37
7.	Conclusiones	39
8.	Referencias.....	40

Resumen

En las neurociencias, se han desarrollado modelos animales invertebrados que se han utilizado para el estudio de los procesos moleculares y celulares involucrados en el funcionamiento de las neuronas y de las sinapsis. Los invertebrados han sobresalido a lo largo de la historia, y lo hacen aún hoy en día, como modelos biológicos para el estudio del sistema nervioso a nivel celular, debido a la sencillez de los sistemas neuronales y a su gran resistencia a la manipulación experimental. Entre ellos, los caracoles de tierra del género *Helix* mantienen las características antes mencionadas y además brindan una gran facilidad para su manejo en el laboratorio. No obstante, sus características electrofisiológicas no han sido completamente descritas, y conocer a cabalidad un modelo biológico es determinante para poder explotar sus capacidades. En este trabajo, mediante el uso de la técnica de *patch clamp*, se caracterizaron las macrocorrientes de calcio de las neuronas serotoninérgicas C1 de los caracoles *Helix aspersa*. Las neuronas C1 presentaron un E_m de -45,5 mV y generaron corrientes de alto umbral, con un $V_{1/2}$ de activación de -27,2 mV y una fuerte dependencia de voltaje. Además, las macrocorrientes presentaron una inactivación parcial, con un $V_{1/2}$ de inactivación de -13,1 mV y una menor dependencia de voltaje. La corriente estaba mediada por canales Ca_v1 , $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$. Las corrientes dominantes son las de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ y estos están implicados parcialmente en la despolarización de los potenciales de acción e indirectamente en la posthiperpolarización, posiblemente regulando canales BK.

Abstract

In neuroscience, invertebrate animal models have been developed to study molecular and cellular processes involved in the functioning of neurons and synapses. Invertebrates have had an outstanding role throughout history, and they still do, as biological models for the study of the nervous system at the cellular level, because of the simplicity of their neuronal systems and their high resistance to experimental manipulation. Among them, the land snails of the genus *Helix* present the previously described characteristics while being easy to maintain in the laboratory. However, their electrophysiological characteristics have not been completely described, and thoroughly knowing the biological model is imperative to exploit all its capabilities. The calcium macrocurrents of the serotonergic C1 neuron of the snail *Helix aspersa* were described using the patch clamp technique. The C1 neurons presented a resting potential of -45,5 mV and high voltage-activated currents, with a half activation voltage of -27,2 mV with a high voltage dependency. Also, the macrocurrents presented a partial inactivation, with a half inactivation voltage of -13,1 mV and a lower voltage dependency. The current was mediated by Cav1, Cav2.1, Cav2.2, and Cav2.3 channels. Cav2.1 and Cav2.2 were predominantly involved in the currents and were partially implicated in the depolarization phase of the action potentials and indirectly in the afterhyperpolarization phase, possibly by regulating BK channels.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de los canales de calcio voltaje dependientes de mamíferos.	7
Cuadro 2. Inhibidores de canales de calcio voltaje dependientes, canales sobre los cuales actúan y concentración final utilizada.	19

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de los canales de calcio voltaje dependientes de músculo esquelético. .6	6
Figura 2. <i>Helix aspersa</i>	10
Figura 3. Vista ventral del ganglio cerebral de <i>Helix</i> donde se señala la posición de las neuronas C1.	11
Figura 4. Protocolo para la obtención de la curva I-V de las macrocorrientes de calcio	17
Figura 5. Protocolo de inactivación	18
Figura 6. Protocolo de la rampa de voltaje	19
Figura 7. Corriente máxima de calcio normalizada a los 10, 20 y 30 min después de que se agregó ω -conotoxina CVIB y SNX-482 (n = 3) en comparación al estado control	20
Figura 8. Curva I-V de calcio después de que se agregó DMSO en comparación al estado control	21
Figura 9. Mediciones realizadas para el análisis de la forma del potencial de acción.....	23
Figura 10. Relación corriente-voltaje de las macrocorrientes de calcio	24
Figura 11. Curvas de activación e inactivación en estado estable de las macrocorrientes de calcio	25
Figura 12. Registro representativo de la corriente de calcio generada ante un estímulo en rampa en las células en estado control.	25
Figura 13. Curva I-V de calcio y corriente máxima de calcio normalizada a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB.....	26
Figura 14. Curva I-V de calcio y corriente máxima de calcio normalizada a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIE y luego de 20 min de que se agregó la cilnidipina a las mismas células.....	27
Figura 15. Curva I-V de calcio y corriente máxima de calcio normalizada a los 20 min después de que se agregó el SNX-482.....	28

Figura 16. Potencial de membrana, reobase y frecuencia de disparo ante estímulos crecientes a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB29

Figura 17. Cambios observados en el tiempo transcurrido al pico, el tiempo de despolarización 10-90% y la amplitud de la posthiperpolarización a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB30

Lista de abreviaturas

C_{av}	Canales de calcio voltaje dependientes
E_m	Potencial de membrana en reposo
HVA	High voltage activated
I-V	Corriente-voltaje
K_v	Canales de potasio voltaje dependientes
LVA	Low voltage activated
Na_v	Canales de sodio voltaje dependientes
TEA	Tetraetilamonio
V_m	Potencial de membrana
V_{rev}	Potencial de reversión

1. Introducción

Uso de invertebrados como modelos experimentales en neurociencias

El principal objetivo de las neurociencias es comprender cómo funciona el sistema nervioso y cómo se altera su funcionamiento en las diferentes patologías. En el caso del cerebro humano, su estudio es difícil debido a la alta complejidad de sus circuitos y de los comportamientos humanos. Por otro lado, existen aspectos éticos complejos que deben ser resueltos y que hacen la investigación, dependiendo del tema, muy problemática. (1)

Debido a las razones antes planteadas y a la poca accesibilidad a tejido humano sano, se han utilizado modelos animales para el estudio del sistema nervioso. Cerca de un 75% de las investigaciones realizadas en neurociencias utilizan ratones y ratas como modelos, además del tejido humano. (2) Incluso se ha dado un incremento en el uso de ratones de un 10% entre 1988-1997 a un 40% en la última década. (3)

El centrar la investigación en un número tan reducido de especies provoca que se limite nuestro conocimiento sobre los mecanismos neuronales más conservados, así como la comprensión sobre la evolución del sistema nervioso. El estudiar el sistema nervioso de una mayor variedad de especies nos permite complementar los estudios hechos en los modelos más comunes, pudiendo establecer especies que podrían ser modelos animales más apropiados para algunas investigaciones, especialmente aquellas que se enfocan en los mecanismos moleculares. (2–5)

En las ciencias biológicas, la discusión sobre la elección de los modelos experimentales existe desde hace muchos años. En 1929, August Krogh expuso que “para una gran cantidad de problemas habrá algún animal de elección o algunos de esos animales en los que pueda estudiarse más convenientemente”. (6) Es necesario reconocer que todo modelo tiene siempre sus limitaciones, pero lo importante es considerar si es el óptimo para la pregunta específica de investigación que desee contestarse, en lugar de siempre utilizar un animal “estándar” para contestar todas las preguntas. (3) El estudio de especies “no comunes” ha favorecido el descubrimiento de hallazgos inesperados, que han resultado de gran utilidad para la ciencia, como por el ejemplo el descubrimiento de la proteína verde fluorescente en medusas, el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) en cangrejos, las conotoxinas en los conos marinos, entre muchísimos otros hallazgos. (7)

Los invertebrados históricamente han sido de gran importancia para el desarrollo de las neurociencias, estando involucrados en importantes descubrimientos, como las bases iónicas de los potenciales de acción, (8) los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria, (9) la generación de patrones rítmicos, (5,10) entre otros. Estos hechos demuestran cómo el estudio de sistemas menos complejos brinda un mejor entendimiento de la función de los sistemas nerviosos más derivados, como es el caso de los mamíferos, incluyendo al ser humano. (4)

El uso de invertebrados como modelos experimentales presenta múltiples ventajas en términos de investigación, manipulación experimental y economía. Estos animales poseen un sistema nervioso sencillo y con neuronas que pueden ser identificadas de forma individual, se conocen muchos de sus circuitos neuronales y los reflejos o comportamientos a los que estos circuitos se asocian. Estas características permiten reconstruir, en un cultivo celular, sinapsis que se encuentran en el animal *in vivo*. (1,9,10) Además, presentan neuronas de gran tamaño cuyos somas poseen diámetros que varían desde los 100 μm hasta 1 mm, mientras que la mayor parte de las neuronas de humanos van desde los 5 μm hasta 135 μm de diámetro. (11) Esto permite que las neuronas de invertebrados sean fáciles de identificar y que sean altamente resistentes a la manipulación experimental, por ejemplo permiten que puedan ser inyectadas con compuestos marcadores, anticuerpos, constructos genéticos y proteínas y también permiten la obtención de registros intracelulares. (1,9,10) Aunado a todo lo anterior, en términos de alojamiento y economía, muchos invertebrados tienen ciclos de vida cortos, son muy prolíficos y sus requisitos de alojamiento y alimentación suelen ser sencillos, lo cual implica una inversión económica significativamente menor que la que se realiza al utilizar especies de uso más común. (7,12)

En la actualidad se busca utilizar métodos de investigación que reduzcan el uso de animales de laboratorio, como por ejemplo el uso de cultivos celulares. Sin embargo, es importante mencionar que los cultivos celulares neuronales utilizados en la literatura provienen de líneas neuronales secundarias derivadas de tumores, debido a que la gran mayoría de células neuronales maduras no experimentan división celular. Estas células tumorales tienen la desventaja de que pueden presentar diferencias en sus características

morfológicas, celulares y moleculares, y por ello pueden no representar adecuadamente las propiedades fisiológicas de la célula. (13)

Por su parte, los cultivos primarios no son derivados de tumores por lo que es más probable que presenten las propiedades que tienen las neuronas *in vivo*, sin embargo, no son inmortales, son más difíciles de aislar y de mantener en cultivo, de modo que la cantidad de células disponibles suele ser más limitada, y es necesario separarlas de los otros tipos de células de manera que no interfieran en los análisis. (13) Además, los cultivos primarios *in vitro* derivados de mamíferos forman conexiones sinápticas inespecíficas, que no se presentaban en su tejido de origen, lo que constituye una desventaja al no poder asegurar que se comportarán como las sinapsis fisiológicas. (14)

Por las características que fueron mencionadas anteriormente, se considera que las neuronas de los invertebrados son de gran utilidad para la realización de cultivos neuronales primarios, comparadas con los cultivos celulares derivados de células tumorales y con los cultivos primarios provenientes de mamíferos.

Electrofisiología

En el sistema nervioso, la transmisión de información depende de señales eléctricas. Actualmente, sabemos que en reposo todas las células de nuestro cuerpo tienen una mayor cantidad de cargas negativas en su interior en comparación con el medio extracelular que las rodea, generándose una diferencia de carga eléctrica que se conoce como potencial de membrana (V_m), el cual es medido en milivoltios (mV). La medición de este parámetro se realiza colocando un electrodo en el medio extracelular y otro en el interior de la célula y determinando la diferencia de voltaje con un voltímetro, llevando el valor del electrodo extracelular a 0 mV. (15)

Cuando el potencial de membrana se hace menos negativo que en el estado de reposo, incluso pudiendo alcanzar valores positivos, se conoce como despolarización. La fase durante la cual el potencial de membrana regresa al valor en reposo, posterior a una despolarización, se conoce como repolarización. Mientras que si el potencial de membrana se hace más negativo que en el estado de reposo se conoce como hiperpolarización. (15) En las neuronas, se genera un tipo especial de señales eléctricas que se conocen como

potenciales de acción, estos permiten la transmisión de información dentro del sistema nervioso a una alta velocidad y en ausencia de decremento y presentan 3 fases: despolarización, repolarización y posthiperpolarización. (15)

El movimiento neto de cargas por unidad de tiempo se conoce como corriente eléctrica y a nivel celular es medido en el rango de los nanoamperios (nA). En el caso de las membranas celulares estas corrientes son dadas por el flujo de iones cargados, en lugar del flujo de electrones que se da en los alambres metálicos. El movimiento de los iones va a estar mediado por diferentes proteínas de membrana, las cuales pueden ser canales iónicos, transportadores o bombas iónicas. (15)

En 1949, Cole y Marmont diseñaron la técnica de voltaje controlado, la cual permite llevar el potencial de membrana de una célula a un valor determinado por el experimentador y medir las corrientes iónicas que se desencadenan. (16) En 1976, Erwin Neher y Bert Sakmann fueron los primeros en poder evaluar el comportamiento de los canales iónicos individuales ubicados en un pequeño segmento de la membrana celular utilizando micropipetas, técnica que llamaron *patch clamp*. Los investigadores descubrieron que generando presión sobre la membrana de la célula con pipetas de punta roma y realizando una ligera succión, la resistencia entre la pipeta y la membrana alcanzaba valores dentro del rango de los gigaohm (GΩ), lo cual permitió realizar registros estables. Actualmente, este método se considera el estándar de oro para evaluar las propiedades electrofisiológicas de las membranas celulares y el comportamiento de los diferentes canales iónicos. (17–19)

La técnica de *patch clamp* puede realizarse en diferentes configuraciones, donde cada una de ellas brinda la oportunidad de obtener diferente información sobre el comportamiento de los canales iónicos. (17,20)

Para la realización de este trabajo se utilizó la configuración de *whole-cell*, ya que permite controlar el voltaje de la célula y medir las corrientes de todos los canales presentes en la célula (macrocorrientes), así como medir las corrientes específicas de los canales de interés, ya sea bloqueando y/o modificando las composiciones de los medios intra o extracelular. (19,21) Para obtener la configuración de *whole-cell*, primero se debe ejercer un leve pulso de succión que formará un sello entre las paredes de la pipeta de registro y la

membrana de la célula, de manera que las cargas no se escapen hacia el medio extracelular. La resistencia de este sello alcanza el orden de los gigaohms, motivo por el cual se conoce como el giga sello. Posteriormente, se debe realizar un pulso de succión o de corriente, el cual provoca que se rompa la membrana que se encuentra dentro de la pipeta, de modo que el lumen de la pipeta esté en contacto directo con el interior de la célula, generándose así no solo una continuidad física sino también una continuidad eléctrica de baja resistencia entre la pipeta y la célula. (17,22)

Canales de calcio voltaje dependientes

Dentro de las corrientes iónicas que podemos analizar mediante la técnica de *patch clamp* se encuentran las corrientes de calcio. Este ion no solo tiene la capacidad de cambiar el potencial eléctrico de una membrana, sino que también puede actuar como segundo mensajero en diversas vías de señalización celular, tal como los procesos de secreción hormonal, la liberación de neurotransmisores, el acople excitación-transcripción, el acople excitación-contracción y la actividad marcapaso espontánea de algunas neuronas, músculos y células secretoras. (23,24)

El calcio ingresa a las células principalmente por canales de calcio voltaje dependientes (Ca_v), los cuales se abren debido a una despolarización de la membrana. De acuerdo con el potencial de membrana al cual son activados, los Ca_v se subdividen en aquellos que se activan en respuesta a grandes despolarizaciones de la membrana o HVA (high voltage activated, por sus siglas en inglés) y aquellos que se activan ante pequeños cambios en el potencial de membrana o LVA (low voltage activated, por sus siglas en inglés). (25)

Los HVA son complejos proteicos heteromultiméricos, compuestos por la subunidad α_1 , que conforma el poro, y que está coensamblada con las subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$. Los canales de calcio de músculo esquelético pueden además asociarse con la subunidad γ (Fig. 1). Por su parte, los LVA están formados solamente por una subunidad α . (25)

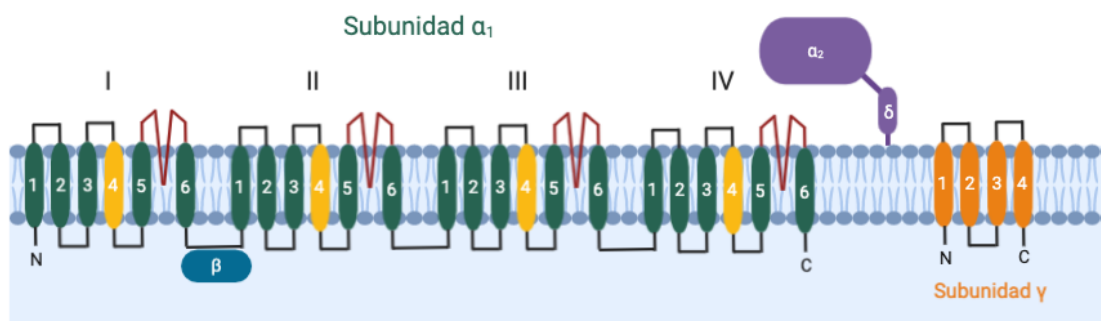


Figura 1. Estructura de los canales de calcio voltaje dependientes de músculo esquelético (Elaboración propia).

La subunidad $\alpha 1$ determina las principales propiedades biológicas y farmacológicas de cada tipo de canal. Esta subunidad está codificada por diversos genes (ver cuadro 1), y está compuesta por cuatro dominios, que están unidos formando una sola cadena polipeptídica. Cada dominio se encuentra conformado por seis hélices transmembrana, numeradas del uno al seis (S1 a S6). Las hélices transmembrana de S1 a S4 conforman el dominio sensible a voltaje, de estas hélices la S4 es el sensor de voltaje real, esto debido a los residuos cargados positivamente de argininas o lisinas que se ubican cada 3 a 4 posiciones. El módulo formador del poro está compuesto por las hélices S5 y S6, las asas P que las conectan y el filtro de selectividad. Las asas P contienen aminoácidos cargados negativamente altamente conservados que cooperan en la formación del poro. El poro de los Cav es selectivo para cationes como el calcio, el bario y el estroncio. (25,26)

Existen cuatro isoformas de la subunidad β , codificadas por los genes *CACNB1-4*. Esta subunidad se asocia con la subunidad $\alpha 1$ en la región citoplasmática que une los dominios I y II. La subunidad β cumple un papel importante en el plegamiento del canal, en su movilización hacia la superficie de la membrana celular y en la determinación de su localización en dominios específicos de la membrana (estos procesos en conjunto se conocen como “trafficking”). Además, se ha relacionado con alteraciones en la cinética de los canales HVA, es decir, con los cambios conformacionales relacionados con los diferentes estadios del canal (proceso que se conoce como “gating”). (24,25)

Las subunidades $\alpha 2$ y δ son codificadas por los mismos genes (*CACNA2D1-4*), a partir de los cuales se forma una pre-proteína que es escindida proteolíticamente, pero las subunidades permanecen unidas por un puente disulfuro formado previamente. (27) La

subunidad δ se encuentra unida a la capa exterior de la membrana plasmática por un glicofosfatidil que a su vez está unido a un residuo de cisteína. (28) Las subunidades $\alpha 2\delta$ se relacionan con el trafficking de los HVA, así como con modulaciones de sus propiedades biofísicas. (24)

Todos los canales HVA se asocian con la calmodulina, razón por la cual algunos investigadores la consideran como la cuarta subunidad de los Ca_v . (25) La calmodulina es responsable del proceso de “inactivación dependiente de calcio” que sufren algunos tipos de Ca_v . Este proceso actúa como un retrocontrol negativo que limita la entrada de calcio al citosol. (26,29)

Los Ca_v presentan una gran variabilidad estructural y funcional. Esta variabilidad está dada según los diferentes genes que codifican la subunidad $\alpha 1$, los genes que codifican a las subunidades auxiliares y además el hecho de que todas las subunidades pasan por procesos de splicing alternativo. (24)

En mamíferos, los Ca_v se clasifican de acuerdo con el tipo de subunidad $Ca_v\alpha 1$ que posean, dividiéndose de este modo en tres diferentes familias: $Ca_v 1$, $Ca_v 2$ y $Ca_v 3$. (25) En el cuadro 1 se resume la clasificación de los Ca_v así como los genes que codifican para sus respectivas unidades $\alpha 1$.

Cuadro 1. Clasificación de los canales de calcio voltaje dependientes de mamíferos.

Voltaje de activación	Familia de la subunidad $\alpha 1$	Subtipo	Tipos de corriente	Gen codificante de la subunidad $\alpha 1$
HVA	$Ca_v 1$	$Ca_v 1.1$	Tipo L	<i>CACNAIS</i>
		$Ca_v 1.2$		<i>CACNAIC</i>
		$Ca_v 1.3$		<i>CACNAID</i>
		$Ca_v 1.4$		<i>CACNAIF</i>
	$Ca_v 2$	$Ca_v 2.1$	Tipo P/Q	<i>CACNAIA</i>
		$Ca_v 2.2$	Tipo N	<i>CACNAIB</i>
		$Ca_v 2.3$	Tipo R	<i>CACNAIE</i>
LVA	$Ca_v 3$	$Ca_v 3.1$	Tipo T	<i>CACNAIG</i>
		$Ca_v 3.2$		<i>CACNAIH</i>

		Ca _v 3.3		CACNAII
--	--	---------------------	--	---------

Los canales de la familia Ca_v1 también son conocidos como canales de calcio tipo L, debido a la corriente de entrada de larga duración, generada por su lenta inactivación y al hecho de presentar una gran conductancia unitaria (“Large”). (27) Tal como se muestra en el cuadro 1, los Ca_v1 se clasifican en cuatro diferentes tipos: Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3 y Ca_v1.4. Los Ca_v1.1 se expresan únicamente en los túbulos T del músculo esquelético donde están implicados en el proceso de acople excitación-contracción. (30) Los Ca_v1.2 se encuentran en los miocitos cardiacos ventriculares, las células de músculo liso, en tejido secretor y en las dendritas y cuerpos neuronales de diversas regiones del sistema nervioso central. Los canales Ca_v1.3 se ubican principalmente en las células del nodo sinoatrial, las células ciliadas auditivas, algunos tejidos endocrinos y en las neuronas de algunas regiones del sistema nervioso central. Por su parte, los canales Ca_v1.4 se expresan únicamente en la retina donde participan del proceso de transducción sensorial. (24,25)

Los Ca_v2 se subclasifican de acuerdo a su sensibilidad a diferentes bloqueadores en canales tipo P/Q, N y R. Se ubican principalmente en neuronas, tanto en las dendritas y los cuerpos neuronales como en las zonas activas presinápticas (zonas de acople vesicular), ahí participan de la despolarización neuronal y de la liberación de neurotransmisores. (31)

Los canales de la familia Ca_v3 también son conocidos como canales de calcio tipo T, debido a su corriente transitoria y al hecho de tener una conductancia unitaria pequeña (“Tiny”). Estos se ubican en las dendritas y cuerpos neuronales de todas las regiones cerebrales, así como en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal y en las glándulas adrenales. Se relacionan con procesos de exocitosis de hormonas y neurotransmisores así como con la regulación de la excitabilidad neuronal. Como se mencionó anteriormente, estos canales no requieren de un coensamblaje con las subunidades auxiliares para funcionar, sin embargo, si pueden ser regulados funcionalmente por ellas. (27,30)

En el caso de los invertebrados protostomados (ej. artrópodos, nemátodos y moluscos), estos poseen un único gen para cada uno de los tres tipos de Ca_v. (32) Algunos ejemplos de Ca_v que ya han sido clonados en moluscos son: Ca_v no tipo L en el calamar *Loligo bleekeri*, (33) Ca_v tipo L y no tipo L en la babosa marina *Aplysia californica* (34) y

Ca_v tipo L (LCa_v1), no tipo L (LCa_v2) y tipo T (LCa_v3), con dos variantes en el splicing del extremo C terminal en los LCa_v1 y los LCa_v2, en el gran caracol de estanque *Lymnaea stagnalis*. (35)

Las subunidades $\alpha 1$ de los Ca_v son altamente conservadas entre vertebrados e invertebrados. La similitud es mayor en los dominios transmembrana y en las regiones del poro, donde siempre se encuentra el motivo EEEE. Los dominios intracelulares varían más, excepto en la región citoplasmática que une los dominios I y II que corresponde con el sitio de interacción con la subunidad β y en la cola carboxilo proximal. (36) En el caso de los canales LCa_v2 de *Lymnaea stagnalis*, la principal diferencia se encontró en la región citoplasmática que une los dominios II y III, donde en mamíferos se encuentra el locus del sitio de interacción de las proteínas sinápticas (*synprint*), pero que en los LCa_v2 estaba ausente por lo que esta región era mucho más corta. (35)

En *Lymnaea*, los canales LCa_v1 comparten características funcionales y estructurales con los Ca_v1 de mamíferos, son activados a altos voltajes, presentan una inactivación lenta, son sensibles a dihidropiridinas y presentan inactivación dependiente de calcio. (37)

Los Ca_v2 de invertebrados también poseen características funcionales semejantes a los Ca_v2.2 de mamíferos. En *Lymnaea*, se observó que los LCa_v2 son indispensables en el proceso de transmisión sináptica. Por el contrario, cuando utilizaban un anti-sentido de LCa_v1 solo se afectaba levemente el proceso de transmisión y se generaba una fatiga de la respuesta postsináptica ante estímulos de larga duración. (35)

Los Ca_v3 en invertebrados presentan la misma cinética transitoria y una ventana de corriente semejante a las reportadas en mamíferos, pero son proteínas de mayor peso molecular a las expresadas en mamíferos. (38)

Caracoles como modelos experimentales

Los caracoles de tierra del género *Helix* (Fig. 2) son moluscos pulmonados de amplia distribución a nivel global. Estos animales han sido utilizados como modelos biológicos en múltiples estudios comportamentales y neurofisiológicos. (39–42)



Figura 2. *Helix aspersa* (Foto propia).

Para hacer un uso adecuado de un modelo, es necesario conocer su funcionamiento y sus características. Mediante estudios electrofisiológicos y de inmunohistoquímica, se han identificado algunos de los canales iónicos presentes en las neuronas de *Helix*. En estos estudios se ha demostrado que los diferentes tipos de canales voltaje dependientes presentan una distribución variada en las diferentes partes del sistema nervioso de los caracoles así como en su localización a nivel de la membrana celular. (43–45)

En *Helix* se ha descrito la presencia de canales de sodio voltaje dependientes similares a los $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$. Se ha determinado también la presencia de múltiples tipos de canales de potasio, entre los que se encuentran los canales de potasio voltaje dependientes $K_v2.1$, $K_v3.4$ y $K_v4.3$, así como de canales de potasio sensibles a calcio de baja conductancia (SK2 y SK3) y de alta conductancia (BK), entre otros. Y además, se ha reportado que dentro de una misma localización del sistema nervioso, la presencia y distribución de cada tipo de canal, varía de acuerdo con el tamaño de los somas neuronales. (43,44,46)

En relación con los canales de calcio, en las neuronas de *Helix* se han identificado canales de calcio voltaje dependientes similares a Ca_v1 , $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y Ca_v3 . (43,47) Además, se ha descrito el comportamiento de las macrocorrientes, así como su presencia en diferentes regiones del sistema nervioso de *Helix*. (43,48,49)

Modelo celular

La neurona C1 de *Helix*, también conocida como neurona metacerebral gigante, se ubica en la cara ventral de cada hemiganglio del ganglio cerebral (Fig. 3). Estas neuronas tienen un diámetro aproximado de 100 a 150 μm , son interneuronas serotoninérgicas y poseen un potencial de membrana en reposo cercano a los -50 mV . (40,50–52)

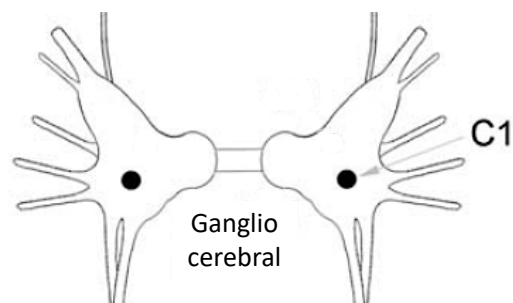


Figura 3. Vista ventral del ganglio cerebral de *Helix* donde se señala la posición de las neuronas C1. Modificado de Fiumara et al. (40)

In vivo, la neurona C1 recibe aferencias de quimiorreceptores presentes en el labio y hace sinapsis con diferentes células, una de las más importantes es la sinapsis química excitatoria que se forma con la neurona B2 (o célula M) del ganglio bucal, formando en conjunto el circuito involucrado en el reflejo salival de la alimentación. (40,50,51) Se han utilizado las neuronas de *Helix* para evaluar aspectos como actividad neuronal, conectividad, crecimiento de neuritas, formación de sinapsis, plasticidad y patrones neuronales de tipo epiléptico. (39–42)

Las neuronas de *Helix* también han sido utilizadas para evaluar los mecanismos implicados en la actividad neuronal de tipo epiléptica, la cual puede tener diferentes causas. (42,53) Existe evidencia científica de que modificaciones en las proteínas sinapsinas pueden asociarse con el desarrollo de epilepsia. Las sinapsinas son proteínas presinápticas que regulan la transmisión sináptica, el crecimiento neuronal y la sinaptogénesis. (54) Utilizando las células C1 de *Helix*, se logró observar que al silenciar la sinapsina se incrementaba la excitabilidad de la célula, esto asociado a un aumento en las corrientes de entrada de calcio y en las corrientes de salida de potasio a través de canales BK, sin embargo, no se ha descrito cuáles son los tipos de canales de calcio que están involucrados en este fenómeno. (53)

2. Justificación

Los caracoles son modelos biológicos idóneos para la investigación del funcionamiento neuronal y la comunicación sináptica, debido a que presentan neuronas de gran tamaño, las cuales son fáciles de identificar y de manipular, permitiendo la realización de registros intracelulares, así como la inyección de marcadores, anticuerpos o constructos genéticos. (1,9,10) Sin embargo, para poder utilizar adecuadamente un modelo animal es de suma importancia conocerlo en detalle, lo cual incluiría en este caso el determinar sus características electrofisiológicas, como por ejemplo el conocer las bases iónicas que modulan su comportamiento.

En ese sentido, se sabe que existen diferentes tipos de Ca_v en *Helix*, (43) sin embargo, no se conoce cuáles están presentes en la neurona C1 y cuál es su contribución a las macrocorrientes. Se sabe que un aumento en la actividad de estos canales se relaciona con hiperexcitabilidad celular, (53) pero se desconoce el papel que cumplen en un estado fisiológico.

Por lo tanto, la investigación propuesta pretende caracterizar las macrocorrientes de calcio y su papel en la excitabilidad neuronal de las neuronas C1 de los caracoles de tierra *Helix aspersa*. Esta tesis formó parte del proyecto de investigación “Etapa II: Papel del calcio intracelular en los mecanismos de excitabilidad neuronal y en el mecanismo de acción de la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*” (número de proyecto 741-B8-657 de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica), en el cual se buscó elucidar los tipos de canales de calcio presentes en este modelo celular, su distribución y su papel en excitabilidad neuronal y en la liberación de neurotransmisores. Considerando que los caracoles *Helix* han demostrado ser un modelo adecuado para comprender los mecanismos celulares implicados en las convulsiones, (42) se cree que este estudio aportará evidencia que podría ser utilizada en la búsqueda de posibles opciones de tratamientos antiepilépticos.

3. Objetivo general

Determinar la composición de las macrocorrientes de calcio y su papel en la regulación de la excitabilidad de las neuronas C1 del gasterópodo *Helix aspersa*.

3.1. Objetivos específicos

1. Caracterizar el comportamiento de las macrocorrientes de calcio a diferentes voltajes.
2. Identificar farmacológicamente los canales responsables de las macrocorrientes de calcio.
3. Caracterizar la excitabilidad neuronal a través de diversos indicadores intrínsecos.
4. Determinar el aporte de los diferentes tipos de canales de calcio en la modulación de la excitabilidad neuronal.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales

Para este estudio se utilizaron caracoles de tierra *Helix aspersa* juveniles, con conchas de aproximadamente 2 cm de diámetro, los cuales fueron adquiridos mediante un productor local. Los animales se mantuvieron en grupos, en cajas plásticas de 55 cm x 40 cm x 27,5 cm, ventiladas, a una temperatura ambiente de entre 20-25°C, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad de 6am a 6pm. Los animales fueron alimentados una vez por semana con lechuga y pienso para gallina ponedora suplementado con calcio. La limpieza de las cajas se realizó una vez por semana.

4.2. Soluciones

Para el mantenimiento de las células C1 aisladas y los registro de potencial de membrana se utilizó medio extracelular una solución de L15 modificado para *Helix*, el cual estaba compuesto por (en mM): 6,974 CaCl₂, 4,922 MgCl₂, 0,348 MgSO₄, 5,335 KCl, 0,189 KH₂PO₄, 66,520 NaCl y 0,574 Na₂HPO₄. El medio intracelular fisiológico para los registro de potencial de membrana estaba compuesto por (en mM): 3 NaCl, 100 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES, a un pH de 7,4 (con KOH).

Para el registro de las macrocorrientes de calcio se utilizó un medio extracelular sin sodio ni potasio y bajo en calcio, compuesto por (en mM): 105 tetraetilamonio (TEA), 2 CaCl₂, 10 MgCl₂ y 10 HEPES, a un pH de 7,4 (con CsOH). Por su parte, el medio intracelular era libre de potasio y estaba compuesto por (en mM): 3 NaCl, 100 CsCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES y 5 EGTA, llevado a un pH de 7,4 con CsOH.

4.3. Aislamiento de neuronas C1

El aislamiento de las neuronas C1 se realizó de acuerdo con los protocolos descritos por Ghirardi et al. (39) y modificados por Brenes et al. (53)

Los animales fueron anestesiados mediante la inyección de 1,5-2 ml de una solución isotónica de MgCl₂ a nivel del pie. Tras evaluar el estado de anestesia del caracol y su relajación muscular mediante inspección visual y estímulos táctiles, se realizó la eutanasia de este mediante evisceración por remoción de la concha.

Los extremos del pie del caracol fueron fijados a una placa con elastómero de silicona y, en un estereoscopio (Olympus SZ61, Japón) y con ayuda de equipo instrumental de microcirugía, se realizó la remoción quirúrgica del ganglio cerebral, el cual se identifica fácilmente por su ubicación y apariencia anatómica.

Posteriormente, los ganglios fueron incubados a 34°C por 4 horas en Proteasa XIV (Sigma Aldrich, USA) filtrada y diluida con medio L15 modificado a una concentración de 0,4 U/ml.

Pasado el tiempo de digestión enzimática, se realizaron 2 lavados a temperatura ambiente con medio L15 modificado.

Mediante microcirugía, y basado en la ubicación y morfología, se identificaron y aislaron ambas neuronas C1 del ganglio cerebral de cada caracol. Las neuronas fueron transferidas a un plato de cultivo, previamente tratado con albúmina sérica bovina al 5%, para evitar la adhesión celular, con medio L15 modificado. Se cultivaron en suspensión por un periodo aproximado de 24 h, para permitir que se diera la retracción de los procesos neuronales, generando un modelo celular llamado configuración de soma. (40,53)

4.4. Análisis de las macrocorrientes de calcio

El registro de las macrocorrientes se realizó siguiendo los protocolos de Brenes et al. (53) Las neuronas en configuración de soma fueron transferidas a un plato con 3 ml de medio extracelular sin sodio ni potasio y bajo en calcio a temperatura ambiente. El plato no se movilizó por un periodo aproximado de 30 minutos para permitir la adhesión de las células.

Mediante el uso de un puller horizontal de micropipetas (P-1000, Flaming/Brown, Micropipette Puller, Sutter Instrument, EUA), se obtuvieron pipetas de borosilicato, las cuales se rellenaron con medio intracelular libre de potasio a temperatura ambiente.

Durante la realización de los registros se utilizó un microscopio de luz invertida (Nikon Eclipse TS100, Japón). El registro de corrientes se obtuvo mediante la técnica de *patch clamp*, utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, EUA) en modo de voltaje controlado, los datos fueron convertidos por el traductor analógico-digital

Axon™ Digidata 1550B (Molecular Devices, EUA) y registrados utilizando los software Axoscope 11.1 y Clampex 11.1 en una PC.

Para el registro de las corrientes de calcio se realizaron los *patch clamp* en configuración “*whole-cell*”. Para esto, primero se sumergió la pipeta conteniendo medio intracelular libre de potasio, ejerciendo presión positiva, y el cable de tierra en el medio extracelular. Se utilizaron solamente micropipetas con resistencias de 2-3 M Ω .

Durante la aproximación de la pipeta hacia la célula, se mantuvo la presión positiva para evitar que ingresaran detritos o medio extracelular a la pipeta. Una vez cerca de la célula, se retiró la presión positiva y se ajustó el valor de corriente a 0 pA.

Posterior al contacto con la célula se ejerció una leve presión negativa. Cuando la resistencia alcanzó un valor dentro del rango de los G Ω (formación del “giga sello”), se ejerció un último pulso rápido de presión negativa hasta que se diera la apertura de la célula.

Utilizando el programa Multiclamp 700B Commander software (Molecular Devices, EUA), se compensaron el componente rápido y el componente lento de la corriente capacitiva. Durante la obtención de los registros se monitorearon la capacitancia (Cm) y la resistencia de la membrana (Rm), la resistencia de acceso (Ra) y la tau. Los criterios que se tomaron en cuenta para considerar los registros en el análisis, fue que durante toda la duración del registro, las células presentaran una relación Rm/Ra mayor a 10, que la Cm se encontrara entre 1,5 y 3 nF. En algunas células, además se monitoreó la resistencia interna (Rin) y se descartaron aquellas células en que la Rin se hubiese modificado en más de una desviación estándar de las Rin en estado control.

Para la determinación de la relación corriente-voltaje (I-V) de las macrocorrientes de calcio se utilizó el siguiente protocolo: el potencial de membrana se mantuvo a -50 mV por 55 ms, se generaron gradas de voltaje de 10 mV que iban desde -60 mV a +80 mV por periodos de 200 ms y posteriormente se mantuvo en un potencial final de -50 mV por 55 ms (Fig. 4).

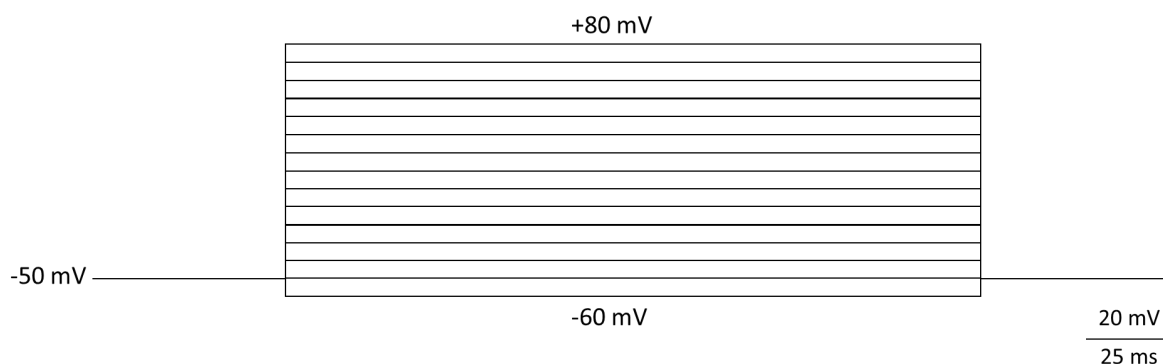


Figura 4. Protocolo para la obtención de la curva I-V de las macrocorrientes de calcio (Elaboración propia).

Para el análisis de los registros se utilizó el software Clampfit versión 11.1.0.23 (Molecular Devices, EUA) en una PC. Para la elaboración de la curva I-V, se determinó la corriente máxima obtenida en cada uno de los voltajes de prueba.

Para elaborar la curva de activación se calcularon las conductancias (G) de cada una de las células en estado control mediante la ecuación $G = I / (V_m - V_{rev})$. Donde V_{rev} es el potencial de reversión de cada célula, V_m es el potencial de membrana de prueba e I es la corriente máxima alcanzada en el V_m analizado; posteriormente se normalizaron los datos con la conductancia máxima ($G_{m\acute{a}x}$) de cada célula. Utilizando el programa Clampfit, se ajustaron los datos utilizando la ecuación de Boltzmann: $I(V) = \frac{G_{m\acute{a}x}(V - V_{rev})}{1 + \exp^{-z_{act}(V - V_{1/2})F/RT}}$.

Donde V_{rev} es el potencial de reversión, $G_{m\acute{a}x}$ es la conductancia máxima, z_{act} es la valencia aparente del gating, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se alcanzó la mitad de la activación, F es la constante de Faraday, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. A partir de este cálculo se obtuvo el valor de $V_{1/2}$ de la activación y el valor k , que corresponde con la pendiente de la curva de activación.

Para la determinación del comportamiento de inactivación de las macrocorrientes de calcio se utilizó el siguiente protocolo: el potencial de membrana se mantuvo a -50 mV por 111 ms, se generaron gradas de voltaje de 10 mV que iban desde -60 mV a +80 mV por periodos de 200 ms, posteriormente se mantuvo un potencial de membrana de -10 mV por 200 ms y por último se regresó a un potencial de membrana final de -50 mV por 200 ms (Fig. 5).

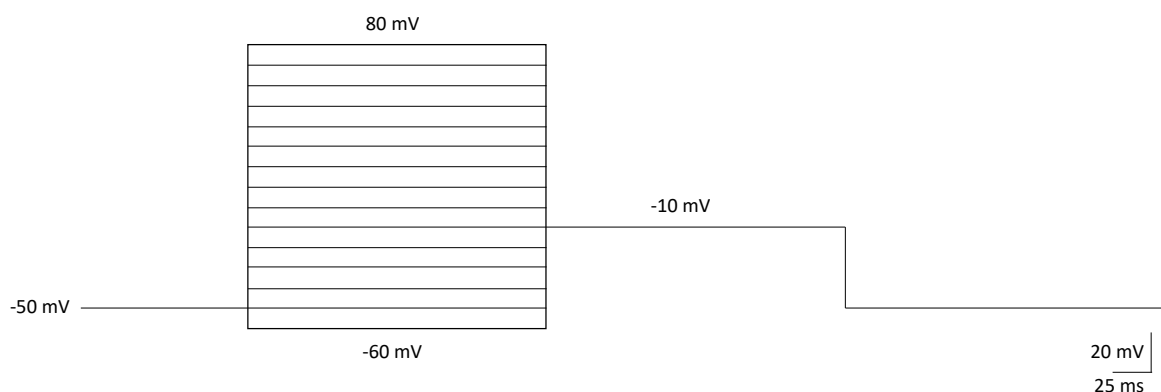


Figura 5. Protocolo de inactivación (Elaboración propia).

Para elaborar la curva de inactivación se determinó la corriente máxima generada durante el estímulo de -10 mV posterior a cada una de las gradas de voltaje. Los valores obtenidos se normalizaron con la corriente máxima obtenida para cada célula. Posteriormente, utilizando el programa Clampfit, se ajustó la curva de inactivación utilizando la ecuación de Boltzmann $I(V) = \frac{I_{m\acute{a}x}}{1 + \exp^{z_{inact}(V - V_{1/2})F/RT}}$. Donde V es el potencial prepulso, $I_{m\acute{a}x}$ es la corriente máxima, z_{inact} es la valencia aparente de la compuerta de inactivación, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se alcanzó la mitad de la inactivación, F es la constante de Faraday, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. A partir de este cálculo se obtuvieron los valores de $V_{1/2}$ y k de la inactivación.

4.5. Identificación de los canales de calcio implicados en las macrocorrientes

Para determinar si las células C1 de *Helix* poseen canales LVA y HVA se utilizó una rampa de voltaje. Para ello, las células se mantuvieron a -80 mV por 50 ms y después se aumentó el voltaje a una tasa de 0,2 mV/ms hasta alcanzar un voltaje de +50 mV, regresando nuevamente a -50 mV por 70 ms (Fig. 6). Utilizando el software Clampfit se analizaron los registros de rampa, determinando el número de picos de corriente y el potencial de membrana al cual se observaban.

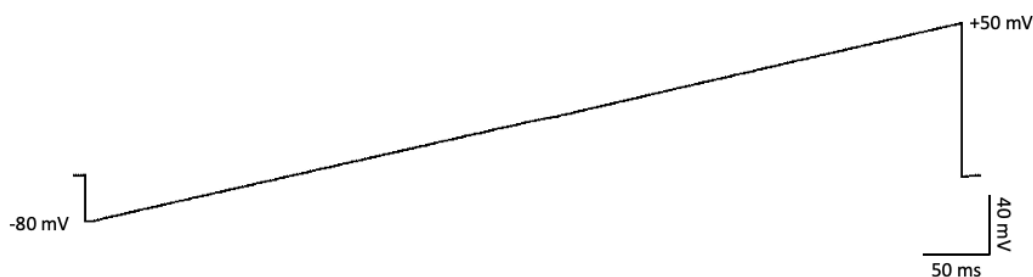


Figura 6. Protocolo de la rampa de voltaje (Elaboración propia).

Para identificar los tipos específicos de Ca_v presentes en las células C1 de *Helix* se utilizaron los siguientes bloqueadores: conotoxina CVIB, SNX-482, cilnidipina y conotoxina CVIE. Estos fueron adquiridos de Alomone Labs (Israel).

Se utilizaron las concentraciones reportadas en la literatura para cada bloqueador (cuadro 2); sin embargo, se aumentó el tiempo de exposición para prevenir una baja afinidad de los canales de *Helix* por los bloqueadores pero sin comprometer la estabilidad de los registros. Se realizó una prueba piloto para evaluar la duración adecuada y, considerando que el comportamiento de las curvas no sugirió mayor diferencia entre los 20 y los 30 min de exposición (Fig. 7), se determinó realizar las mediciones a los 20 minutos.

Cuadro 2. Inhibidores de canales de calcio voltaje dependientes, canales sobre los cuales actúan y concentración final utilizada.

Inhibidor	Ca_v sobre los que actúa	Concentración final en el plato	Referencia
Cilnidipina	Ca_v1 y $Ca_v2.2$	1 μ M	(55)
ω -Conotoxina CVIB	$Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$	10 nM	(56)
ω -Conotoxina CVIE	$Ca_v2.2$	100 nM	(57)
SNX-482	$Ca_v2.3$	20 nM	(58)

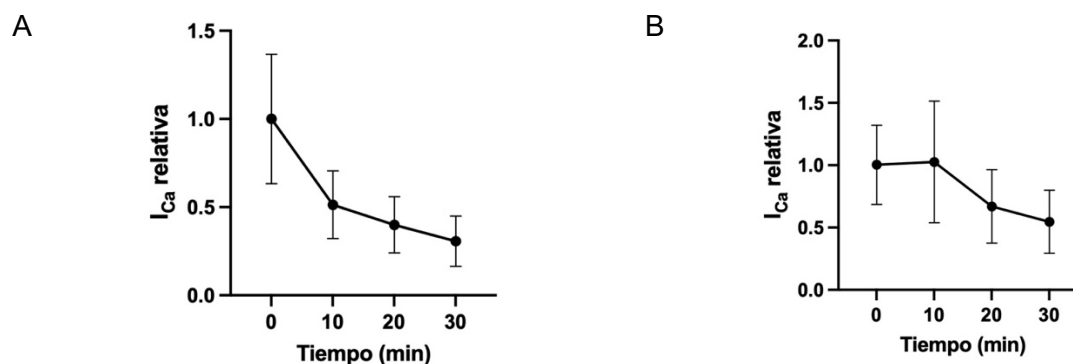


Figura 7. Corriente máxima de calcio normalizada a los 10, 20 y 30 min después de que se agregó (A) ω -conotoxina CVIB ($n = 3$) y (B) SNX-482 ($n = 3$) en comparación al estado control. Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar.

Todos los bloqueadores fueron disueltos en agua destilada, con excepción de la cilnidipina, que fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) para una concentración final de 0,011%. Debido a que se han reportado alteraciones en la permeabilidad de las membranas por DMSO, (59) se evaluó si la concentración utilizada generaba algún cambio sobre las corrientes de la célula a los 10 y 20 min de exposición (Fig. 8) y no se encontraron diferencias significativas (voltaje $F_{(1,28,3.81)} = 33,64$, $p = 0,004$, tratamiento $F_{(1,34,4.03)} = 1,64$, $p = 0,28$, interacción $F_{(2,05,6.15)} = 1,48$, $p = 0,30$, ANOVA de dos vías). En el caso de la cilnidipina, la dilución y el almacenamiento se realizó en oscuridad debido a que la droga es sensible a la luz. Posterior a la dilución, los bloqueadores fueron alicuotados y se mantuvieron a -20°C hasta el momento en que fueran a ser utilizados.

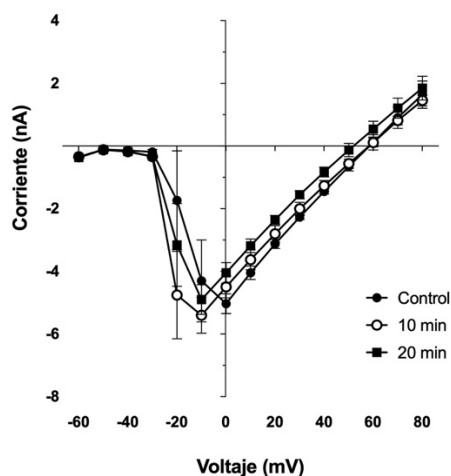


Figura 8. Curva I-V de calcio. Macrocorrientes de calcio a los 10 min (círculos blancos) y 20 min (cuadrados negros) después de que se agregó DMSO en comparación al estado control (círculos negros). Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar.

Una vez registrada la curva I-V, la inactivación y la rampa de voltaje en estado control, se procedió a agregar al medio extracelular del plato un tipo de bloqueadores de canales de calcio por célula. A los 20 minutos de haber agregado el bloqueador se repitieron todos los protocolos para evaluar el efecto del bloqueo sobre las macrocorrientes de calcio. Debido al traslape en la capacidad de bloqueo de los $Ca_v2.2$ por parte de la ω -conotoxina CVIE y de la cilnidipina, al finalizar los registros con conotoxina CVIE se añadió cilnidipina y pasados 20 minutos se repitieron los registros, para poder determinar la presencia de canales Ca_v1 .

4.6. Análisis de la excitabilidad neuronal

Los protocolos de registro para evaluar la excitabilidad neuronal de las neuronas C1 se realizaron de acuerdo a los establecido por Brenes, et al. (53)

Las neuronas en configuración de soma se transfirieron a un plato con 3 ml de medio L15 modificado a temperatura ambiente. El plato no se movilizó por un periodo aproximado de 30 minutos para permitir la adhesión de las células. Las pipetas de borosilicato se rellenaron con medio intracelular fisiológico a temperatura ambiente.

El registro de potencial de membrana se obtuvo mediante la técnica de *patch clamp*, utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, EUA) en modo de corriente controlada. Del mismo modo en que se explicó anteriormente, se verificó que la

resistencia de la pipeta con medio intracelular se encuentre entre 2 y 3 M Ω . Estando la pipeta en contacto con el medio se ajustó el valor de voltaje a 0 mV y se compensaron los artefactos en el voltaje generados durante la inyección de corriente a través de las pipetas. Una vez se logró el acceso a la neurona, se determinó el valor del potencial de membrana en reposo (E_m).

Para determinar la frecuencia media de disparo se determinó el número de potenciales de acción que disparó la célula ante estímulos despolarizantes de 500 ms de duración y de 0,5, 1,0 y 1,5 nA de intensidad, el resultado se reportó en Hz.

Para determinar la reobase de la célula, se aplicaron pulsos de 50 ms de amperaje creciente, comenzando en 0,5 nA y realizando incrementos de 0,01 nA, hasta llegar a generar al menos tres potenciales de acción independientes consecutivos y a una frecuencia de 1 Hz.

Para el análisis de la forma de los potenciales de acción se utilizó el programa Clampfit versión 11.1.0.23. Para analizar la forma de la fase de despolarización de los potenciales de acción, se analizó el primer potencial de acción generado ante una corriente despolarizante de 1,0 nA de intensidad. Se determinaron los siguientes valores: amplitud del pico (mV), tiempo transcurrido al pico (ms), tiempo de despolarización 10-90% (ms), tiempo de despolarización al 63% o tau de la despolarización (ms) y pendiente de despolarización máxima (mV/ms) (Fig. 9).

Para analizar la forma de la fase de repolarización de los potenciales de acción, se promediaron seis potenciales de acción generados al estimular con el valor de reobase respectivo para cada célula. Se determinaron los siguientes valores: tiempo de repolarización al 37% o tau de la repolarización (ms), pendiente de la repolarización 90-10% (mV/ms), amplitud de la posthiperpolarización (mV) y pendiente de repolarización máxima (mV/ms) (Fig. 9).

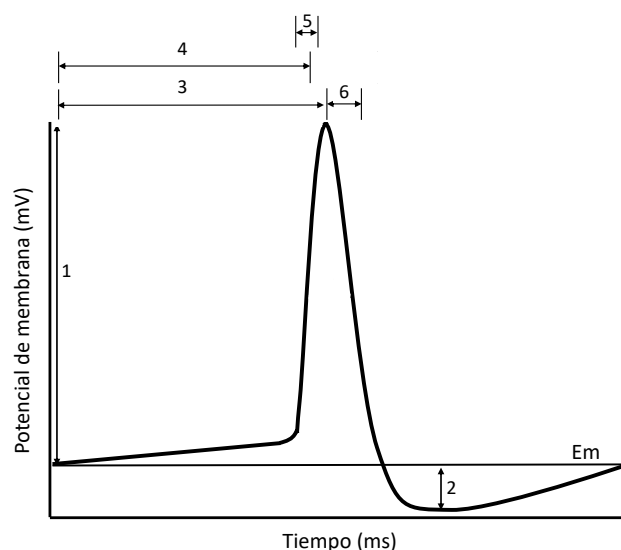


Figura 9. Mediciones realizadas para el análisis de la forma del potencial de acción. Amplitud del pico (1), amplitud de la posthiperpolarización (2), tiempo al pico (3), tau de la despolarización (4), tiempo de despolarización 10-90% (5) y tau de la repolarización (6) (Elaboración propia).

Una vez registrados el E_m , la frecuencia de disparo y la reobase en estado control, se agregó ω -conotoxina CVIB (concentración final: 10 nM) para evaluar el efecto del bloqueo sobre cada una de estas variables y sobre la forma y el comportamiento de los potenciales de acción.

4.7. Análisis estadístico de los datos

Los datos se reportan como promedio \pm error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism 9. Para el análisis de las curvas I-V y las frecuencias de disparo, según los datos obtenidos se realizó un ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de Bonferroni, ANOVA de una vía de medidas repetidas o un modelo de efectos mixtos. Las diferencias estadísticas de la corriente máxima de calcio, el potencial de membrana en reposo, la reobase y los cambios en la forma de los potenciales de acción se determinaron mediante la prueba t de Student. Los niveles de significancia se establecieron en $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Análisis de las macrocorrientes de calcio

La activación de las macrocorrientes de calcio comenzó a partir de los -40 mV (Fig. 10). Como se observa en la curva corriente-voltaje, el pico de las macrocorrientes se encontraba entre -20 mV y -10 mV ($n = 49$). Asimismo, se observó que la reversión de las macrocorrientes de calcio se dio a $+53,1 \pm 3,54$ mV ($n = 43$).

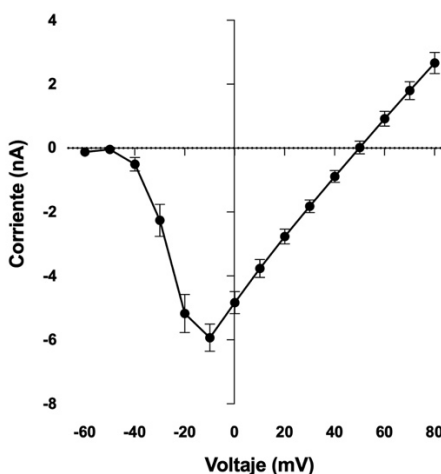


Figura 10. Relación corriente-voltaje de las macrocorrientes de calcio ($n = 49$). Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar.

La curva de activación de las macrocorrientes de calcio presentó una alta dependencia al voltaje entre -50 mV y 0 mV (Fig. 11). Al ajustar las curvas individuales de activación a la ecuación de Boltzmann se obtuvo un valor de $V_{1/2} = -27,2 \pm 1,3$ mV y un valor absoluto de $k = 1,2 \pm 0,3$ ($n = 42$). Por otro lado, al evaluar el comportamiento de la inactivación ante un pulso de prueba de -10 mV, se evidenció que las macrocorrientes de calcio no se inactivaban completamente al incrementar el voltaje, sino que presentaban solo una inactivación parcial (Fig. 11). Al ajustar cada una de las curvas individuales de inactivación a la ecuación de Boltzmann se obtuvo un valor de $V_{1/2} = -13,1 \pm 1,7$ mV y un valor absoluto de k de $8,6 \pm 1,2$ ($n = 17$).

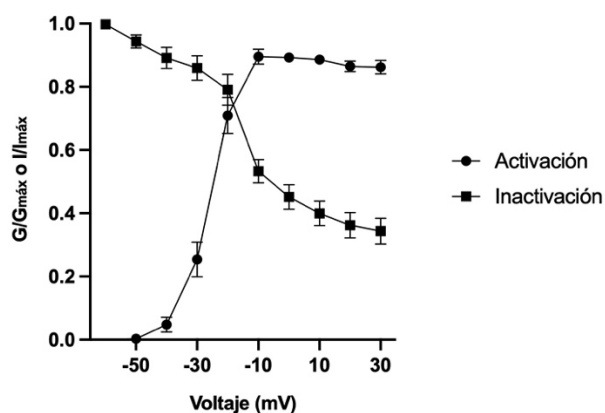


Figura 11. Curvas de activación e inactivación en estado estable de las macrocorrientes de calcio. $G/G_{máx}$ para la curva de activación. $I/I_{máx}$ para la curva de inactivación. Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar. Cada punto de la curva de activación se obtuvo del promedio de 42 células y cada punto de la curva de inactivación se obtuvo del promedio de 17 células.

5.2. Identificación de los canales de calcio implicados en las macrocorrientes

Para determinar la posible existencia de diferentes poblaciones de canales LVA y HVA se realizó una rampa de voltaje, donde se varió gradualmente el potencial de membrana comenzando en -80 mV y hasta alcanzar un valor de $+50$ mV. Todas las células presentaron un único pico de corriente, el cual se observó a un potencial de membrana de $-12,32 \pm 0,89$ mV ($n = 43$) (Fig. 12), lo que sugiere la ausencia de canales Ca_v3 .



Figura 12. Registro representativo de la corriente de calcio generada ante un estímulo en rampa en las células en estado control.

Para identificar los tipos de canales de calcio HVA presentes en las células C1 de *Helix*, se realizó una disección farmacológica de las macrocorrientes de calcio mediante el uso de bloqueadores.

Para determinar la presencia de canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ se utilizó la ω -conotoxina CVIB. Se observó una reducción significativa en el pico máximo de las corrientes de entrada de calcio entre -20 y 10 mV después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB ($n = 7$) (voltajes $F_{(14, 90)} = 6,322$, $p < 0,0001$, tratamiento $F_{(1, 85)} = 23,26$, $p < 0,0001$, interacción $F_{(14,85)} = 3,166$, $p = 0,005$, modelo de efectos mixtos) (Fig. 13A). La corriente máxima de calcio disminuyó en un 65,8% en comparación con los controles (control = $-3,47 \pm 0,84$ nA vs. ω -Conotoxina CVIB = $-1,20 \pm 0,34$ nA, $n = 6$; $t_{(5)} = 2,836$, $p < 0,05$, prueba t pareada) (Fig. 13B). Al agregar la ω -Conotoxina CVIB, no se generó una diferencia significativa en el V_{rev} de las corrientes (control = $35 \pm 9,8$ mV vs. ω -Conotoxina CVIB = $21,8 \pm 16$ mV, $n = 6$; $t_{(5)} = 1,007$, $p = 0,36$, prueba t pareada).

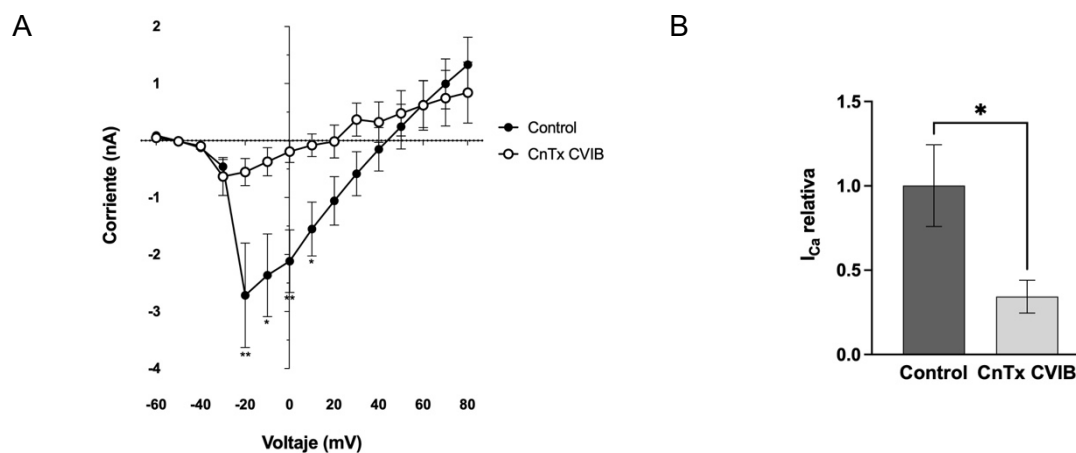


Figura 13.(A) Curva I-V de calcio. Cambios observados en las macrocorrientes de calcio a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB (CnTx CVIB, círculos blancos) en comparación al estado control (círculos negros). (B) Corriente máxima de calcio normalizada. Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Para determinar de manera más específica la presencia de corrientes de calcio mediadas por canales $Ca_v2.2$ se utilizó la ω -conotoxina CVIE. Asumiendo que estos canales se encontraban bloqueados, posteriormente se utilizó el bloqueador cilnidipina para determinar la presencia de canales Ca_v1 . En la curva I-V, luego de 20 min de haber agregado la ω -Conotoxina CVIE se observó una reducción significativa en las corrientes de entrada de calcio entre -10 y 50 mV ($n = 7$) (Fig. 14A). Asimismo, luego de 20 min de haber agregado la cilnidipina se observó una reducción significativa en las corrientes de entrada de calcio entre -10 y 30 mV en comparación con las corrientes en presencia de solo la ω -conotoxina CVIE ($n = 7$) (voltaje $F_{(1,505, 9,03)} = 29,59$, $p = 0,0002$, tratamiento $F_{(1,26, 7,56)}$

= 22,02, $p = 0,0013$, interacción $F_{(1,768, 10,61)} = 4,933$, $p = 0,03$, ANOVA de dos vías) (Fig. 14A). La ω -conotoxina CVIE provocó que la corriente máxima de calcio se redujera en un 22,8%, pasando de $-9,4 \pm 1,2$ nA a $-7,23 \pm 0,99$ nA ($n = 7$). De igual manera, 20 min posterior a la adición de cilnidipina, la corriente máxima de calcio se redujo un 15% más, alcanzando valores de $-5,83 \pm 1$ nA ($n = 7$) ($F_{(1,095, 6,572)} = 19,72$, $p = 0,0032$, ANOVA de una vía de medidas repetidas) (Fig. 14B). Al agregar ω -conotoxina CVIE y, posteriormente, al agregar cilnidipina no se generó una modificación significativa del V_{rev} (control = $53,7 \pm 4$ mV vs. ω -conotoxina CVIE = $48,6 \pm 5,5$ mV vs. Cilnidipina = $42,4 \pm 3,5$ mV) ($F_{(1,377, 8,26)} = 9,26$, $p = 0,01$, ANOVA de una vía de medidas repetidas).

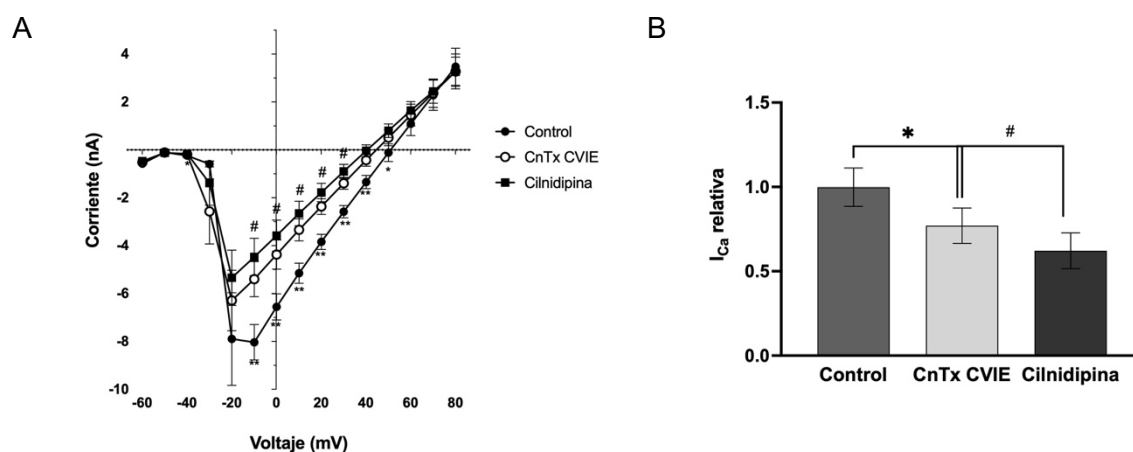


Figura 14. (A) Curva I-V de calcio. Cambios observados en las macrocorrientes de calcio de las células control (círculos negros) luego de 20 min de que se agregó la ω -conotoxina CVIE (CnTx CVIE, círculos blancos) y luego de 20 min de que se agregó la cilnidipina (cuadrados negros) a las mismas células. (B) Corriente máxima de calcio normalizada. Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ al comparar el efecto de la conotoxina CVIE en relación con el estado control y # $p < 0,05$ al comparar el efecto de cilnidipina + conotoxina CVIE contra solo conotoxina CVIE.

Para determinar la presencia de macrocorrientes de calcio mediadas por canales $Ca_v2.3$ se utilizó la toxina SNX-482. Se observó una reducción significativa en las corrientes de entrada de calcio entre -20 y 30 mV ($n = 15$) (voltajes $F_{(14, 210)} = 27,78$, $p < 0,0001$, tratamiento $F_{(1, 210)} = 111$, $p < 0,0001$, interacción $F_{(14,210)} = 3,774$, $p < 0,0001$, ANOVA de dos vías) (Fig. 15A). Además, la corriente máxima de calcio se redujo en un 39,7% (control = $-8,02 \pm 0,77$ nA vs. SNX-482 = $-4,85 \pm 0,96$ nA, $n = 15$; $t_{(14)} = 5,234$, $p < 0,0005$, prueba t pareada) (Fig. 15B). Al agregar el SNX-482, no se generó una diferencia

significativa en el V_{rev} de las corrientes (control = 37 ± 4 mV vs. SNX-482 = $31 \pm 6,3$ mV, $n = 15$; $t_{(14)} = 0,89$, $p = 0,39$, prueba t pareada).

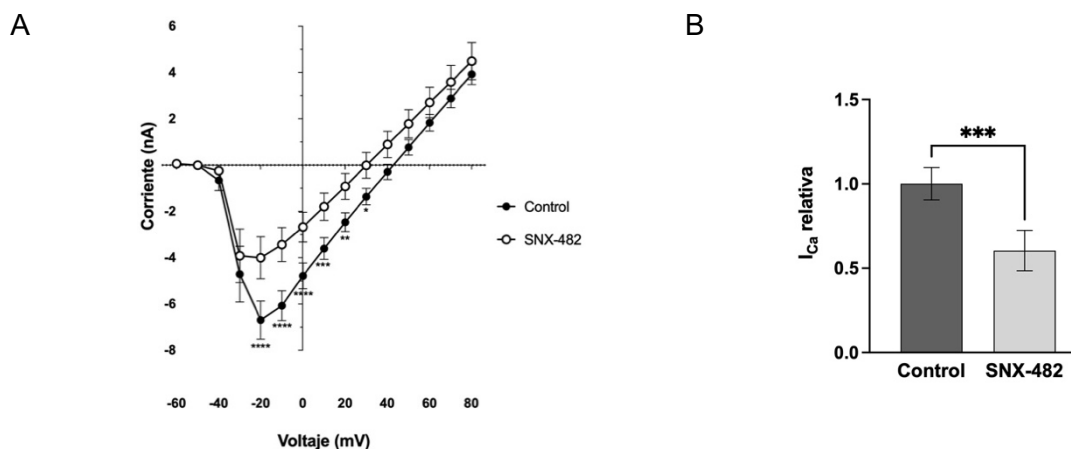


Figura 15. (A) Curva I-V de calcio. Cambios observados en las macrocorrientes de calcio a los 20 min después de que se agregó el SNX-482 (círculos blancos) en comparación al estado control (círculos negros). (B) Corriente máxima de calcio registrada. Cada dato se reporta como el promedio \pm error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.3. Papel de los canales $Ca_v 2.1$ y $Ca_v 2.2$ en la excitabilidad neuronal

El inhibidor que tuvo el mayor efecto sobre las corrientes de calcio fue a ω -conotoxina CVIB por lo que se procedió a analizar la excitabilidad celular en presencia de esta. Como era esperado, el bloqueo de los canales $Ca_v 2.1$ y $Ca_v 2.2$ con la ω -conotoxina CVIB no generó cambios significativos en el potencial de membrana en reposo ($-45,5 \pm 2,2$ mV, $n = 20$ en los controles; vs. $-46,7 \pm 3,0$ mV, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,76$, t de student) (Fig. 16A), la reobase ($0,768 \pm 0,12$ nA, $n = 12$ en los controles; vs. $0,979 \pm 0,15$ nA, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,30$, t de student) (Fig. 16B). La frecuencia de disparo ante estímulos crecientes tampoco presentó cambios significativos (0,5 nA: $2,53 \pm 0,8$ Hz; 1 nA: $7,33 \pm 1,0$ Hz; 1,5 nA: $9,47 \pm 1,2$ Hz; $n = 15$ en los controles; vs. 0,5 nA: $2,86 \pm 1,5$ Hz; 1 nA: $7,71 \pm 1,87$ Hz; 1,5 nA: $11,71 \pm 2,1$ Hz; $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) (estímulo $F_{(3,80)} = 31,41$, $p < 0,0001$, tratamiento $F_{(1,80)} = 0,76$, $p = 0,39$, interacción $F_{(3,80)} = 0,36$, $p = 0,78$, ANOVA de dos vías) (Fig. 16C).

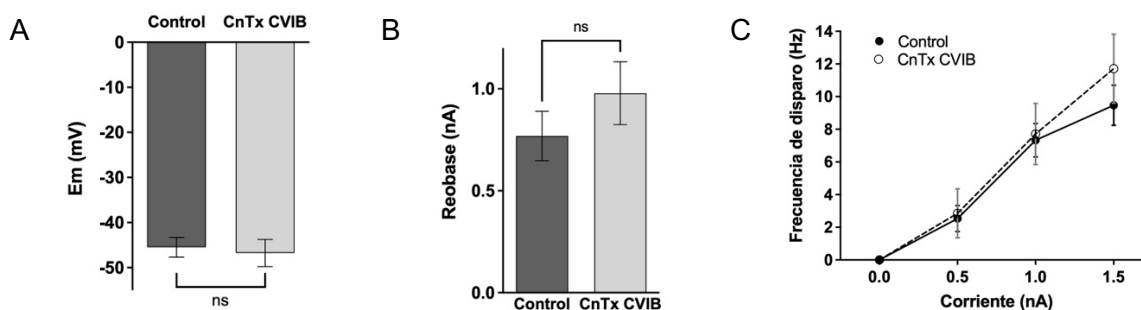


Figura 16. Potencial de membrana (A), rebase (B) y frecuencia de disparo ante estímulos crecientes (C) a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB (CnTx CVIB).

En la fase de despolarización de los potenciales de acción de las C1, la exposición a la ω -conotoxina CVIB generó un aumento en el tiempo transcurrido al pico, sin embargo este cambio no fue significativo ($26,8 \pm 4,21$ ms, $n = 4$ en los controles; vs. $40,3 \pm 7,6$ ms, $n = 4$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,09$, t de student pareada) (Fig. 17A). Además, se observó aumento en el tiempo de despolarización 10-90%, aunque este cambio tampoco fue significativo ($16,8 \pm 2,9$ ms, $n = 6$ en los controles; vs. $30,9 \pm 6,7$ ms, $n = 5$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,07$, t de student) (Fig. 17B).

No se observaron cambios en la amplitud del pico ($77,9 \pm 3$ mV, $n = 7$ en los controles; vs. $76,6 \pm 3,9$ mV, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,77$, t de student pareada), la tau de despolarización ($4,6 \pm 1,1$ ms, $n = 6$ en los controles; vs. $7,6 \pm 2,1$ ms, $n = 5$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,22$, t de student), ni en la pendiente de despolarización máxima ($29,8 \pm 2,8$ mV/ms, $n = 7$ en los controles; vs. $29,4 \pm 2$ mV/ms, $n = 5$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,93$, t de student).

En la fase de repolarización de los potenciales de acción, 20 minutos posterior a la exposición a la ω -conotoxina CVIB se observó una disminución en la amplitud de la posthiperpolarización, sin embargo, este cambio no fue significativo ($-9,19 \pm 0,7$ mV, $n = 7$ en los controles; vs. $-6,27 \pm 1,1$ mV, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,052$, t de student) (Fig. 17C).

No se observaron cambios en la tau de repolarización ($6,29 \pm 1,1$ ms, $n = 7$ en los controles; vs. $5,45 \pm 0,9$ ms, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,56$, t de student), la

pendiente de la repolarización 90-10% ($-14 \pm 1,85$ mV/ms, $n = 7$ en los controles; vs. $-14,5 \pm 1,9$ mV/ms, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,66$, t de student pareada) ni en la pendiente de repolarización máxima ($-22,4 \pm 4,3$ mV/ms, $n = 7$ en los controles; vs. $-19,9 \pm 1,9$ mV/ms, $n = 7$ con la ω -conotoxina CVIB) ($p = 0,54$, t de student pareada).

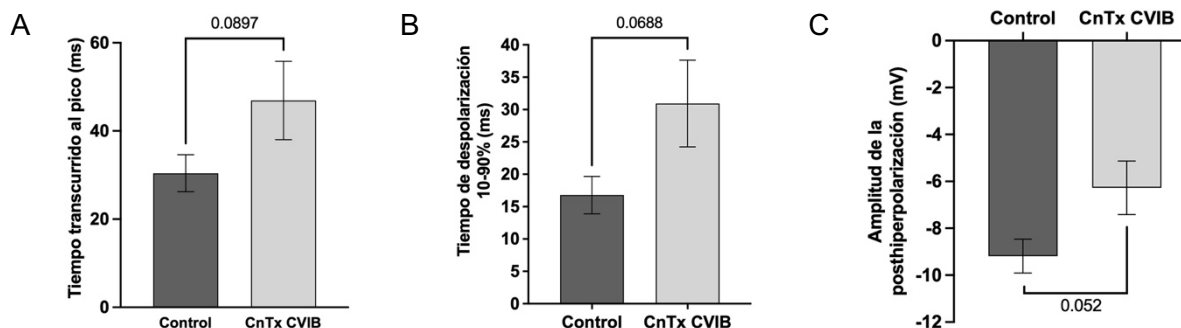


Figura 17. Cambios observados en el tiempo transcurrido al pico (A), el tiempo de despolarización 10-90% (B) y la amplitud de la posthiperpolarización (C) a los 20 min después de que se agregó la ω -conotoxina CVIB (CnTx CVIB).

6. Discusión

6.1. Análisis de las macrocorrientes de calcio

Al evaluar en las células C1 de *Helix* las macrocorrientes de calcio ante pulsos de diferente voltaje, la activación de las corrientes se comienza a dar a partir de los -40 mV, observándose el pico máximo de corriente entre -20 mV y -10 mV y la reversión de las corrientes a $+53,1 \pm 3,54$ mV. Estos valores asemejan los obtenidos en neuronas de *Helix* en otros laboratorios (53) y en otras especies. Por ejemplo, en motoneuronas maduras de ratón, al utilizar concentraciones bajas o fisiológicas de calcio extracelular (1-3mM), se observó la activación de las corrientes de entrada de calcio a partir de -40 mV, con el pico de corriente entre -10 y 0 mV y con reversión a +40 mV. (60) En motoneuronas y en neuronas sensoriales de lampreas, la activación de las corrientes se observó entre -40 y -30 mV. (61) Y en las células cromafines de rata, la activación se dio a partir de los -40 mV, obteniéndose el pico de corriente a 0 mV y generándose la reversión de la corriente entre +50 y +60 mV. (62)

El potencial de membrana al cual se observó la reversión de las corrientes no se asemeja a los valores teóricos esperados para el potencial de equilibrio del calcio, el cual según la ecuación de Nernst suele encontrarse en valores cercanos a los +135 mV. (15) Uno de los posibles motivos por los cuales se ha justificado este comportamiento, es que se estén generando corrientes de salida de cationes monovalentes a través de los Cav . Este comportamiento ha sido reportado con cationes como el cesio, que fue agregado en el medio intracelular para eliminar las corrientes de potasio. (63)

Las curvas de activación relacionan el porcentaje de la conductancia máxima con el voltaje de la membrana, de modo que permiten visualizar la dependencia al voltaje que posee el proceso de activación de los canales. (64) La forma de la curva de activación refleja la naturaleza del *gating* de los canales, generado por el movimiento de cargas en el dominio sensor de voltaje del canal ante un cambio en el campo magnético de la membrana. (65)

En el caso de las células C1 de *Helix aspersa*, la curva de activación presentó una pendiente pronunciada, lo cual indica una alta dependencia al voltaje entre -50 mV y 0 mV, obteniéndose un valor de potencial de activación media ($V_{1/2}$ de activación) de $-27,2 \pm 1,3$

mV y un valor de pendiente (k) de $1,2 \pm 0,3$. La dependencia al voltaje es semejante a la observada en las macrocorrientes de calcio de motoneuronas maduras de ratón (P9-P16); sin embargo, en estas células el valor de $V_{1/2}$ y de k tendió a valores más positivos a los observados en *Helix* ($V_{1/2} = -15,8$ mV, $k = 4,7$). (60) Es importante recordar que estos valores pueden ser altamente variables entre modelos celulares y ante diferentes condiciones, ya que la dependencia del voltaje es modulada, no solamente por la estructura de la subunidad formadora del poro, sino también por la composición de lípidos de la membrana, los iones intracelulares, las subunidades moduladoras de los canales y los procesos postraduccionales. (66)

Por su parte, las curvas de inactivación permiten determinar la dependencia al potencial de membrana de la inactivación en estado estacionario. Estas se obtienen generando un pulso inicial o prepulso lo suficientemente largo para provocar que los canales se inactiven por completo, seguido de un segundo pulso (o pulso de prueba) que posee una duración y un voltaje fijo en el cual se mide la corriente generada por los canales que aún no han sufrido inactivación o que presentan un grado de inactivación parcial. (65)

Al evaluar el comportamiento de la inactivación ante un pulso de prueba de -10 mV y ajustando los promedios a la ecuación de Boltzmann se obtuvo un valor de potencial de inactivación media ($V_{1/2}$ de inactivación) de $-13,1 \pm 1,7$ mV. Este valor fue semejante a lo reportado para LCa_v1a en *Lymnaea stagnalis* ($V_{1/2} = -15$ mV), (37) pero más positivo que los valores reportados para LCa_v2 en esta misma especie ($V_{1/2} = -39,3$ mV) (67) y $Ca_v2.2$ en rata ($V_{1/2} = -49,1$ mV). (67) La pendiente de inactivación presentó valores semejantes a los reportados en motoneuronas de ratón ($k = 7$) (60) y en canales LCa_v2a de *L. stagnalis* ($k = 8,04$). (68)

Las macrocorrientes de calcio de las neuronas C1 de *Helix aspersa* presentaron una inactivación incompleta. Este hallazgo coincide con lo descrito previamente en neuronas del ganglio subesofágico de *Helix aspersa*, donde las corrientes de calcio presentaron una inactivación parcial ante pulsos de prueba de una duración semejante. En estas neuronas se determinó que la inactivación era dependiente tanto de voltaje como de calcio. (69) En nuestro caso, el grado de inactivación observada también pudo ser afectado por la presencia de EGTA en el medio intracelular, ya que este bloqueante de calcio podría estar evitando

que se genere la inactivación dependiente de calcio. (63) Funcionalmente, esta inactivación incompleta provocaría que las corrientes de entrada de calcio se mantengan por más tiempo, lo cual puede tener implicaciones tanto en la morfología de los potenciales de acción como en la regulación de la excitabilidad celular. Es sabido que los potenciales de acción en la neurona C1 de *Helix* son dependientes tanto de sodio, como de calcio, por lo que la inactivación parcial tendría un efecto en la duración total y el grosor de los potenciales de acción. (45) Además, el calcio puede participar en el reclutamiento y mantenimiento de la corriente de salida de potasio mediada por canales BK, como se discutirá más adelante.

Con esta nueva información se está construyendo un modelo matemático que reproduzca el comportamiento eléctrico de las neuronas de *Helix*, con el fin de evaluar los posibles cambios que puedan ser producidos por el aumento de las macrocorrientes de calcio.

6.2. Identificación de los canales de calcio implicados en las macrocorrientes

Durante una rampa de despolarización gradual, todas las células del estudio presentaron un único pico de corriente a un potencial de membrana de $-12,32 \pm 0,89$ mV ($n = 43$), lo que sugiere que las células C1 de *H. aspersa* en configuración de soma poseen en su membrana solamente canales HVA. Este hallazgo difiere con lo reportado para la neurona cerebral gigante de *L. stagnalis*, donde al realizar un protocolo semejante pero con somas axotomizados, se diferenciaban dos picos de corriente indicando la presencia de canales LVA y HVA. (70)

Al exponer las células C1 a la ω -conotoxina CVIB se observó que las corrientes máximas de calcio se redujeron en un 65,8%. Esta toxina, producida por el cono marino *Conus catus*, es considerada un inhibidor moderado de $Ca_v2.1$ y un inhibidor leve de $Ca_v2.2$ en mamíferos (56), siendo su capacidad de bloqueo y de recuperación del bloqueo independientes del voltaje, es decir, puede bloquear los canales se encuentren estos cerrados, activos o inactivos. (71)

Para determinar si las células C1 expresan canales semejantes a ambos subtipos o solamente a uno de ellos, se expuso las células al bloqueador ω -conotoxina CVIE

generándose una reducción de un 22,8% en las corrientes máximas de calcio. La ω -conotoxina CVIE también es producida por el cono marino *Conus catus* y se considera dentro de las ω -conotoxina más selectivas para los $Ca_v2.2$. (57,72)

Si bien no se puede excluir la posibilidad de corrientes inespecíficas o insensibles a los inhibidores utilizados, el hecho de que la inhibición de la corriente máxima de calcio generada por la ω -conotoxina CVIE fuera considerablemente menor al observado con la ω -conotoxina CVIB sugiere que estas células también presentan en su membrana canales semejantes a los $Ca_v2.1$.

Posterior al bloqueo de los $Ca_v2.2$, se expuso a las células a cilnidipina. Esta droga es un bloqueador orgánico de Ca_v1 y $Ca_v2.2$, cuya acción tarda en iniciar, pero es de larga duración. (55,73) El hecho de que se observaran diferencias en la curva I-V y una disminución en las corrientes máximas de calcio, sugiere que los canales Ca_v1 forman parte de los canales expresados en la membrana de las células C1 de *Helix aspersa*. Ya en estudios previos se ha demostrado que los canales LCa_v1 de invertebrados son sensibles a las dihidropiridinas, observándose efectos semejantes a los generados en mamíferos. (37) No se evaluó la existencia de subtipos de canales Ca_v1 debido a la falta de disponibilidad de inhibidores específicos.

Por último, la exposición de las células C1 al bloqueador SNX-482 provocó una reducción significativa en las corrientes de entrada de calcio entre -20 y 30 mV, así como una reducción del 39,7% en la corriente máxima de calcio, lo cual sugiere la presencia de canales $Ca_v2.3$.

El bloqueador SNX-482 es una toxina aislada del veneno de la tarántula africana *Hysterocrates gigas* que a las concentraciones utilizadas bloquea con alta afinidad y rápida e irreversiblemente los canales $Ca_v2.3$. Si se encuentra a concentraciones mayores a 200 nM puede bloquear parcial y reversiblemente los canales $Ca_v1.2$ y a concentraciones mayores a 500 nM genera un efecto leve sobre los canales $Ca_v2.2$. (58,74) Sin embargo, a las concentraciones empleadas en este estudio su efecto principal está restringido a los $Ca_v2.3$.

Además, semejante a lo que se ha reportado previamente en células tsa-201 transfectadas con subunidades $\alpha_{1E} + \beta_{2a} + \alpha_2\delta$, (74) al exponer a las células C1 de *Helix* al

bloqueador SNX-482 el efecto principal se dio solo en las corrientes de entrada de calcio, lo que indica que el bloqueo es dependiente del potencial de membrana.

Basados en los datos actuales se puede señalar a los canales Ca_v2 como los canales dominantes en las células C1 de *Helix*, con una menor contribución de canales Ca_v1 y se descarta la presencia de Ca_v3 en este grupo celular. Además, dentro de la familia Ca_v2 es evidente la existencia de subtipos similares a los $Ca_v2.1$, 2.2 y 2.3 descritos en mamíferos, los cuales tienen diferencias en sus sensibilidades a diferentes inhibidores.

La presencia de múltiples tipos de Ca_v involucrados en las corrientes de calcio de neuronas serotoninérgicas ya ha sido reportada previamente. Por ejemplo, en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos caudales de Rafé en ratas neonatales, las macrocorrientes de calcio están compuestas principalmente por corrientes tipo N ($Ca_v2.2$) y tipo P/Q ($Ca_v2.1$), así como una importante corriente residual (tipo R, $Ca_v2.3$) y solo una pequeña parte es dada por corrientes tipo L (Ca_v1) y tipo LVA (Ca_v3). (75)

En el caso de neuronas serotoninérgicas de invertebrados, en las neuronas Retzius, presentes en los ganglios segmentales de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, los canales Ca_v1 se han relacionado con la exocitosis somática de serotonina ante despolarizaciones prolongadas. (76)

A diferencia de los vertebrados, en invertebrados se consideraba la existencia de un solo tipo de Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 , (77) basándose principalmente en los estudios con *Lymnaea stagnalis*. Sin embargo, el presente trabajo y los estudios realizados por los grupos de investigación de Azanza, (43) Battonyail (46) y Kiss (44) demuestran la existencia en moluscos como *Helix* de algunos de los diferentes subtipos de canales iónicos descritos en mamíferos.

6.3. Papel de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en la excitabilidad neuronal

Además de la exocitosis de neurotransmisores, otra función de los canales de calcio es la regulación de la excitabilidad celular. Por esta razón, se seleccionó el inhibidor con mayor efecto sobre las macrocorrientes y se evaluó la excitabilidad tomando como marcadores el potencial de reposo, la reobase y la frecuencia de disparo ante estímulos de intensidad creciente. No se observó un efecto significativo en ninguna de las variables

mencionadas. Lo que sugiere que, en condiciones normales las corrientes basales de calcio no contribuyen de forma significativa a la excitabilidad de estas neuronas. Sin embargo, se ha reportado que, en condiciones patológicas, un aumento de estas corrientes influye significativamente en la excitabilidad neuronal. (42,53)

A pesar de lo anterior, fue posible evidenciar la participación parcial de las corrientes de calcio en las diferentes fases de los potenciales de acción, incluso en condiciones basales. Al bloquear los canales $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ con la ω -conotoxina CVIB, en las neuronas C1 se observó un leve aumento en la duración de la despolarización. Los resultados sugieren que el bloqueo de los canales tiene un mayor efecto sobre el tercio final de la fase de despolarización, ya que no hubo diferencias entre las taús de despolarización entre las células en estado control y las células en presencia de la ω -conotoxina CVIB, pero sí se observó una diferencia en el tiempo transcurrido al pico.

Que el bloqueo generado por la ω -conotoxina CVIB afectara en parte la fase de despolarización de los potenciales de acción de las neuronas C1 es un hallazgo que confirma reportes previos, los cuales indicaban que la despolarización de las neuronas C1 de *Helix* es dependiente tanto de sodio, como de calcio. (53) Además, en este mismo estudio, se reportó que un aumento en las corrientes de calcio se relacionaba con un incremento en las corrientes de salida de potasio por canales BK. (53) Este factor podría explicar el por qué una reducción en las corrientes de entrada de calcio podría provocar que la repolarización iniciara de manera más tardía, ya que se retardaría la apertura de los canales BK.

Por otra parte, el bloqueo de los canales $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ también provocó una disminución en la amplitud de la posthiperpolarización, efecto que ya ha sido reportado previamente en neuronas serotoninérgicas de ratas neonatales. (75) Sin embargo, en esta investigación observaron que la disminución en la posthiperpolarización provocaba un incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las neuronas, efecto que no fue observado en las neuronas C1 de *Helix aspersa*.

Como se mencionó anteriormente, el aumento en las corrientes de calcio generó un incremento en las corrientes de salida de potasio por canales BK, lo cual generó un incremento en la amplitud de la posthiperpolarización. (53) Por lo tanto, es factible que al

disminuir la corriente de entrada de calcio por el bloqueo de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, se redujera la corriente de salida de potasio por canales BK lo cual provocaría la disminución en la amplitud de la posthiperpolarización encontrada en nuestros hallazgos.

6.4. Potenciales limitaciones

La selección de las concentraciones usadas para los bloqueadores se hizo utilizando las concentraciones finales reportadas en la literatura y no en todos los casos se logró obtener valores probados en células de invertebrados. Para compensar esto, se evaluó cómo se modificaba el efecto del bloqueador en el tiempo y se seleccionó el tiempo a partir del cual ya no se observaba un aumento en el bloqueo.

Sin embargo, otra posibilidad hubiera sido realizar pruebas preliminares evaluando concentraciones crecientes del bloqueador para determinar la concentración máxima que generaba efecto y a partir de esta concentración disminuir los tiempos de aplicación hasta encontrar el ideal. De este modo quizás se hubiese podido reducir la duración de los registros, lo cual habría permitido utilizar varios bloqueadores en una misma célula, sin que el tiempo del registro pudiera comprometer la calidad del mismo.

No obstante, esta estrategia aumenta exponencialmente la necesidad de toxinas cuyo volumen es reducido y precio es alto, así como el sacrificio de un mayor número de animales para obtener un número mayor de células y finalmente el consumo de más insumos de laboratorio para poder realizar las curvas de dosis/respuesta, lo que metodológica y económicamente dificulta su factibilidad.

No se recomienda utilizar la disección farmacológica como único criterio para la identificación de la población de Ca_v s en una célula, ya que la afinidad de muchos de los bloqueadores puede verse afectada por factores como el potencial de membrana en reposo, la frecuencia de disparo de los potenciales de acción, las condiciones iónicas extracelulares y la naturaleza de la isoforma del canal de calcio. (77) Otras técnicas que se utilizan para estudiar los Ca_v s es mediante marcaje con anticuerpo, clonación y expresión heteróloga *in vitro*, manipulación genética *in vitro* mediante la utilización de ARN antisentido o plásmidos de expresión. (78) Sin embargo, la utilización de técnicas moleculares sobrepasa los objetivos del trabajo y las capacidades de nuestro laboratorio y la disección mediante

anticuerpos no formó parte de los objetivos del presente proyecto, sin embargo, sí se está llevando a cabo en otro proyecto paralelo.

La presencia de la pandemia de SARS-CoV-2 y las limitaciones de acceso a los laboratorios dificultaron la realización de los experimentos. Además, la obtención de los reactivos y equipos necesarios para realizar los registros fue complejo debido a que la electrofisiología es aún un área naciente en Costa Rica y estos resultados comprenden los primeros registros de corrientes iónicas neuronales logrados en el país.

7. Conclusiones

En conclusión, las macrocorrientes de calcio de las neuronas C1 de *Helix aspersa* en configuración de soma se activan a partir de los -40 mV, presentan su pico de corriente entre los -20 y -10 mV, la activación es altamente dependiente de voltaje y presentan una inactivación parcial. Esta macrocorriente está dada únicamente por Ca_v s tipo HVA, específicamente por canales semejantes a los Ca_v1 , $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$.

La presencia de estos canales semejantes a los descritos en mamíferos, en conjunto con las ventajas descritas en este modelo, hace pensar que pueda ser de utilidad para entender procesos complejos que se puedan extrapolar a otras especies más derivadas a nivel filogenético.

En relación con sus parámetros de excitabilidad, las células C1 de *Helix aspersa* presentan un potencial de membrana en reposo de aproximadamente -45,5 mV, poseen una reobase de aproximadamente 0,768 nA para un estímulo de 50 ms, no disparan potenciales de acción de manera espontánea y su frecuencia de disparo aumenta conforme aumenta la intensidad del estímulo. Estos parámetros no se ven afectados de forma significativa por la inhibición de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$.

Sin embargo, en las células C1 de *Helix aspersa*, los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ están implicados parcialmente en la duración de la fase de despolarización, así como en la amplitud de la fase de posthiperpolarización, lo cual probablemente este mediado por el efecto de las corrientes de calcio sobre los canales BK.

8. Referencias

1. Schmold N, Syed NI. Molluscan neurons in culture: Shedding light on synapse formation and plasticity. *J Mol Histol.* 2012;43(4):383–99.
2. Manger PR, Cort J, Ebrahim N, Goodman A, Henning J, Karolia M, et al. Is 21st century neuroscience too focussed on the rat/mouse model of brain function and dysfunction? *Front Neuroanat.* 2008;2:1–7.
3. Lambert K, Kent M, Vavra D. Avoiding Beach’s Boojum Effect: Enhancing bench to bedside translation with field to laboratory considerations in optimal animal models. *Neurosci Biobehav Rev [Internet].* 2019;104:191–6.
4. Keifer J, Summers CH. Putting the “biology” back into “neurobiology”: The strength of diversity in animal model systems for neuroscience research. *Front Syst Neurosci.* 2016;10(AUG):1–9.
5. Romanova E V., Sweedler J V. Animal Model Systems in Neuroscience. *ACS Chem Neurosci.* 2018;9(8):1869–70.
6. Krogh A. The progress of physiology. *American Journal of Physiology-Legacy Content.* 1929 Oct 1;90(2):243–51.
7. Brenowitz EA, Zakon HH. Emerging from the bottleneck: Benefits of the comparative approach to modern neuroscience. *Trends Neurosci.* 2015;38(5):273–8.
8. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952 Aug 28;117(4):500–44.
9. Kandel ER. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science (1979).* 2001 Nov 2;294(5544):1030–8.
10. Giachello CNG, Montarolo PG, Ghirardi M. Synaptic functions of invertebrate varicosities: What molecular mechanisms lie beneath. *Neural Plast.* 2012;2012.

11. Moroz LL. *Aplysia*. *Current Biology*. 2011;21(2):60–1.
12. Balogun WG, Cobham AE, Amin A, Seeni A. Using invertebrate model organisms for neuroscience research and training: an opportunity for Africa. *Metab Brain Dis*. 2018;33(5):1431–41.
13. Gordon J, Amini S, White MK. General Overview of Neuronal Cell Culture. In: *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*. 2013. p. 1–8.
14. Banker G, Goslin K, editors. *Culturing Nerve Cells*. 2nd ed. The MIT Press; 1998.
15. Boron W, Boulpaep E. Electrophysiology of the cell membrane. In: *Medical Physiology*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 141–65.
16. Verkhratsky A, Krishtal OA, Petersen OH. From Galvani to patch clamp: The development of electrophysiology. *Pflugers Arch*. 2006;453(3):233–47.
17. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*. 1984;46:455–72.
18. Nilius B. *Pflügers Archiv* and the advent of modern electrophysiology: From the first action potential to patch clamp. *Pflugers Arch*. 2003;447(3):267–71.
19. Zhao Y, Inayat S, Dikin DA, Singer JH, Ruoff RS, Troy JB. Patch clamp technique: Review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanoengineering and Nanosystems*. 2008;222(1):1–11.
20. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85–100.
21. Kornreich BG. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*. 2007;9(1):25–37.

22. Petersen CCH. Whole-Cell Recording of Neuronal Membrane Potential during Behavior. *Neuron*. 2017;95(6):1266–81.
23. Carafoli E, Krebs J. Why calcium? How calcium became the best communicator. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(40):20849–57.
24. Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *Journal of Physiology*. 2016;594(19):5369–90.
25. Simms BA, Zamponi GW. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*. 2014;82(1):24–45.
26. Hering S, Zangerl-Plessl EM, Beyl S, Hohaus A, Andranovits S, Timin EN. Calcium channel gating. *Pflugers Arch*. 2018;470(9):1291–309.
27. Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv*. 2018;2:239821281879480.
28. Zamponi GW. A Crash Course in Calcium Channels. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(12):2583–5.
29. Ben-Johny M, Dick IE, Sang L, Limpitikul WB, Kang PW, Niu J, et al. Towards a Unified Theory of Calmodulin Regulation (Calmodulation) of Voltage-Gated Calcium and Sodium Channels. *Curr Mol Pharmacol*. 2015 Feb;8(2):188–205.
30. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*. 2015;67(4):821–70.
31. Benarroch EE. Neuronal voltage-gated calcium channels: Brief overview of their function and clinical implications in neurology. *Neurology*. 2010 Apr 20;74(16):1310–5.

32. Senatore A, Raiss H, Le P. Physiology and evolution of voltage-gated calcium channels in early diverging animal phyla: Cnidaria, placozoa, porifera and ctenophora. *Front Physiol.* 2016 Nov 4;7.
33. Kimura T, Shouno O, Hirota K, Saito T, Matsumoto G, Sato C. Molecular Cloning and Characterization of a Putative Neural Calcium Channel α 1-Subunit from Squid Optic Lobe. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230:147–54.
34. White BH, Kaczmarek LK. Identification of a Vesicular Pool of Calcium Channels in the Bag Cell Neurons of *Aplysia californica*. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 1997 Mar 1;17(5):1582–95.
35. Spafford JD, Munno DW, van Nierop P, Feng ZP, Jarvis SE, Gallin WJ, et al. Calcium channel structural determinants of synaptic transmission between identified invertebrate neurons. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 Feb 7;278(6):4258–67.
36. Jeziorski MC, Greenberg RM, Anderson PA. The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca(2+) channels. *Journal of Experimental Biology* [Internet]. 2000 Mar 1;203(5):841–56.
37. Spafford JD, Dunn T, Smit AB, Syed NI, Zamponi GW. In vitro characterization of L-type calcium channels and their contribution to firing behavior in invertebrate respiratory neurons. *J Neurophysiol.* 2006;95(1):42–52.
38. Senatore A, Spafford JD. Transient and big are key features of an invertebrate T-type channel (LCav3) from the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(10):7447–58.
39. Ghirardi M, Casadio A, Santarelli L, Montarolo PG. *Aplysia* hemolymph promotes neurite outgrowth and synaptogenesis of identified *Helix* neurons in cell culture. *Invertebrate Neuroscience.* 1996;2(1):41–9.
40. Fiumara F, Leitinger G, Milanese C, Montarolo PG, Ghirardi M. In vitro formation and activity-dependent plasticity of synapses between *Helix* neurons involved in the

- neural control of feeding and withdrawal behaviors. *Neuroscience*. 2005;134(4):1133–51.
41. Massobrio P, Giachello CNG, Ghirardi M, Martinoia S. Selective modulation of chemical and electrical synapses of *Helix* neuronal networks during in vitro development. *BMC Neurosci*. 2013;14(1):1.
 42. Brenes O, Carabelli V, Gosso S, Romero A, Carbone E, Montarolo PG, et al. Subconvulsant doses of pentylentetrazol uncover the epileptic phenotype of cultured synapsin-deficient *Helix* serotonergic neurons in the absence of excitatory and inhibitory inputs. *Epilepsy Res [Internet]*. 2016;127:241–51.
 43. Azanza MJ, Pérez-Castejón C, Pes N, Pérez-Bruzón RN, Aisa J, Junquera C, et al. Characterization by immunocytochemistry of ionic channels in *Helix aspersa* suboesophageal brain ganglia neurons. *Histol Histopathol*. 2008;23(4):397–406.
 44. Kiss T, László Z, Pirger Z. Cellular localization and kinetic properties of Na V1.9-, Na V1.8-, and Na V1.7-like channel subtypes in *Helix pomatia*. *Neuroscience*. 2012;203:78–90.
 45. Brenes O. Invertebrate neurons as a simple model to study the hyperexcitable state of epileptic disorders in single cells, monosynaptic connections, and polysynaptic circuits. *Biophys Rev [Internet]*. 2022;553–68.
 46. Battonyai I, Krajcs N, Serfozo Z, Kiss T, Elekes K. Potassium channels in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*: Localization and functional characterization. *Neuroscience*. 2014;268:87–101.
 47. Kiss T, Osipenko ON. Opposite effects of molluscan neuropeptides CARP and MIP on LVA Ca-currents in *Helix pomatia* L. neurons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Comparative*. 1991;99(1–2):21–7.
 48. Kostyuk PG, Krishtal OA, Doroshenko PA. Calcium currents in snail neurones. *Pflugers Arch [Internet]*. 1974;348(2):83–93.

49. Akaike N, Lee KS, Brown AM. The Calcium Current of Helix Neuron. *J Gen Physiol.* 1978;71:509–31.
50. Cottrell GA, Macon JB. Synaptic connexions of two symmetrically placed giant serotonin-containing neurones. *J Physiol.* 1974 Jan 1;236(2):435–64.
51. Cottrell GA. Identified amine-containing neurones and their synaptic connexions. *Neuroscience.* 1977 Feb;2(1):1–18.
52. Massobrio P, Tessadori J, Chiappalone M, Ghirardi M. In Vitro Studies of Neuronal Networks and Synaptic Plasticity in Invertebrates and in Mammals Using Multielectrode Arrays. *Neural Plast.* 2015;2015:1–18.
53. Brenes O, Vandael DHF, Carbone E, Montarolo PG, Ghirardi M. Knock-down of synapsin alters cell excitability and action potential waveform by potentiating BK and voltage-gated Ca²⁺ currents in Helix serotonergic neurons. *Neuroscience [Internet].* 2015;311:430–43.
54. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 2010;91(4):313–48.
55. Uneyama H, Takahara A, Dohmoto H, Yoshimoto R, Inoue K, Akaike N. Blockade of N-type Ca²⁺ current by cilnidipine (FRC-8653) in acutely dissociated rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol.* 1997;122(1):37–42.
56. Lewis RJ, Nielsen KJ, Craik DJ, Loughnan ML, Adams DA, Sharpe IA, et al. Novel ω -conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *Journal of Biological Chemistry [Internet].* 2000;275(45):35335–44.
57. Adams DJ, Callaghan B, Berecki G. Analgesic conotoxins: Block and G protein-coupled receptor modulation of N-type (Ca V_{2.2}) calcium channels. *Br J Pharmacol.* 2012;166(2):486–500.

58. Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen XH, Hopkins W, et al. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*. 1998;37(44):15353–62.
59. Murai Y, Uneyama H, Ishibashi H, Takahama K, Akaike N. Preferential inhibition of L- and N-type calcium channels in the rat hippocampal neurons by cilnidipine. *Brain Res*. 2000;854(1–2):6–10.
60. Carlin KP, Jiang Z, Brownstone RM. Characterization of calcium currents in functionally mature mouse spinal motoneurons. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2000 May;12(5):1624–34.
61. el Manira A, Bussi eres N. Calcium channel subtypes in lamprey sensory and motor neurons. *J Neurophysiol*. 1997;78(3):1334–40.
62. Gand a L, Borges R, Albillos A, Garc a AG. Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 1995;430(1):55–63.
63. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc; 2001.
64. Molleman A. *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*. 1st ed. West Sussex: Wiley; 2003. 132–136 p.
65. Standen NB, Davies NW, Langton PD. Separation and analysis of macroscopic currents. In: Ogden D, editor. *Microelectrode techniques The Plymouth Workshop Handbook*. 2nd ed. Cambridge: The Company of Biologists Limited; 1994. p. 37–52.
66. Loussouarn G, Tarek M. Mechanisms of ion channels voltage-dependency: All about molecular sensors, gates, levers, locks, and grease. *Front Pharmacol*. 2012;3 SEP.
67. Huang X, Sen atore A, Dawson TF, Quan Q, Spafford JD. G-proteins modulate invertebrate synaptic calcium channel (LCa v2) differently from the classical voltage-dependent regulation of mammalian Cav2.1 and Cav2.2 channels. *Journal of Experimental Biology*. 2010;213(12):2094–103.

68. Spafford JD, Chen L, Feng ZP, Smit AB, Zamponi GW. Expression and modulation of an invertebrate presynaptic calcium channel $\alpha 1$ subunit homolog. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(23):21178–87.
69. Brown AM, Morimoto K, Tsuda Y, Wilson DL. Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in *Helix aspersa*. Vol. 320, *J. Physiol*. 1981.
70. Staras K, Györi J, Kemenes G. Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2002 Jan;15(1):109–19.
71. Motin L, Yasuda T, Schroeder CI, Lewis RJ, Adams DJ. ω -Conotoxin CVIB differentially inhibits native and recombinant N- and P/Q-type calcium channels. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25(2):435–44.
72. Berecki G, Motin L, Haythornthwaite A, Vink S, Bansal P, Drinkwater R, et al. Analgesic ω -Conotoxins CVIE and CVIF Selectively and Voltage-Dependently Block Recombinant and Native N-Type Calcium Channels. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2010 Feb 14;77(2):139–48.
73. Uchida R, Yamazaki J, Kitamura K. Characterization of Ca^{2+} current inhibition by cilnidipine using a β -subunit antisense oligonucleotide. *Eur J Pharmacol*. 2003;466(1–2):53–62.
74. Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, et al. Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of $\alpha 1E$ (CaV2.3) calcium channels. *Biophys J*. 2001;81(1):79–88.
75. Bayliss DA, Li YW, Talley EM. Effects of Serotonin on Caudal Raphe Neurons: Inhibition of N- and P/Q-Type Calcium Channels and the Afterhyperpolarization. *J Neurophysiol* [Internet]. 1997 Mar 1;77(3):1362–74.

76. De-Miguel FF. The Thermodynamically Expensive Contribution of Three Calcium Sources to Somatic Release of Serotonin. 2022.
77. Tyson JR, Snutch TP. Molecular nature of voltage-gated calcium channels: Structure and species comparison. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 2013;2(5):181–206.
78. Senatore A, Spafford JD. Voltage-Gated Calcium Channels in Invertebrates. In: Zamponi GW, Weiss N, editors. *Voltage-Gated Calcium Channels* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 115–58.