



**CARACTERIZACIÓN DE CANALES DE POTASIO
DEPENDIENTES DE CALCIO DE LOS CILIOS DE LAS
NEURONAS OLFATORIAS DE RATA INCORPORADOS
EN BICAPAS PLANAS DE FOSFOLÍPIDOS**

**Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Facultad de Ciencias

por

Karen Lorena Castillo Huera

Tutores: Dr. Daniel Wolff Fernández

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña



“CARACTERIZACIÓN DE CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE CALCIO DE LOS CILIOS DE LAS NEURONAS OLFATORIAS DE RATA INCORPORADOS EN BICAPAS PLANAS DE FOSFILÍPIDOS”.

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

KAREN LORENA CASTILLO HUERA

Directores de Memoria de Título

Dr. Daniel Wolf Fernández

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Julio Alcayaga Urbina

Presidente Comisión

Dra. Cecilia Vergara Montecinos

Santiago de Chile, 10 mayo 2005



A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente a todas las personas que hicieron posible que esta tesis llegara a buen termino.

Primero que todo a mi familia que siempre me a dado su amor y su respaldo en cada una de las metas que me he propuesto hasta hoy, sin ustedes esto no sería posible, los amo.

A mis tutores Juan Bacigalupo y Daniel Wolff, que creyeron en mí, fueron muy buenos guías y me brindaron siempre su apoyo en los momentos de dificultad y en los de éxito.

A quienes me enseñaron a dar mis primeros pasos en el laboratorio: Francisco Morera, Orlando Jorquera y Verónica Saavedra.

A Ricardo Delgado, Javier Díaz, Osvaldo Alvarez, Julio Alcayaga, Romina Vargas y Carolina González por su ayuda sincera, oportuna y desinteresada cuando lo necesité.

A todos los miembros del laboratorio de Fisiología Celular que hicieron muy grato el tiempo de realización de esta tesis: Jeannete, Danny, Jorge, Javier, Pablo, Verónica, Lorena, Lupe, Romina, Carolina, Claudio, Maurizio, Vivi O, Vivi V, Ricardo, Julio, Osvaldo, Cecilia, Daniel, Juan.

A todos los amigos y amigas.

Finalmente a las fuentes de financiamiento: Proyecto Fondecyt 120964 y al Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología

A todos, sinceramente, tantísimas GRACIAS.

INDICE DE MATERIAS

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Hipótesis	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	30
I.- Optimización del método de obtención de una preparación altamente purificada en membrana de cilios de neuronas olfatorias.	30
II.- Registro de canales de K⁺ procedentes de una fracción altamente purificada y enriquecida en membrana ciliar mediante la técnica de incorporación en bicapas planas de fosfolípidos.	34
II.1 Canal de K ⁺ dependiente de Ca ²⁺ de baja conductancia, SK _{Ca}	35
II.2 Canal de potasio dependiente de calcio de conductancia intermedia IK _{Ca}	41
II.2A Canal IK _{Ca} -1	42
II.2B Canal IK _{Ca} -2	47

II.2C Canal $I_{K_{Ca-3}}$	52
II.2D Canal $I_{K_{Ca-4}}$	55
II. 3 Canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de alta conductancia, BK_{Ca}	60
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1: Cámara de registro de canales iónicos.

Esquema 2: Diagrama de flujo del sistema de registro de canales iónicos.

Tabla 1: Concentraciones efectivas de los agentes farmacológicos

Figura 1: Esquema del sistema olfatorio.

Figura 2: Tipo de respuestas frente a un estímulo odorífero.

Figura 3: Inmunodetección por western blot de ACIII en fracciones de membrana de cilios olfatorios.

Figura 4: Inmunodetección por western blot del canal CNG en fracciones de membrana de cilios olfatorios.

Figura 5: Inmunodetección por western blot del canal de sodio activado por voltaje en fracciones de membrana de cilios olfatorios.

Figura 6: Registros de corrientes unitarias del canal SK_{Ca} a distintas concentraciones de Ca^{2+} .

Figura 7: Curva de dependencia de Ca^{2+} del canal SK_{Ca} .

Figura 8: Curva I/V para el canal SK_{Ca} .

Figura 9: Efecto de apamina sobre el canal SK_{Ca} .

Figura 10: Disminución del P_o para el canal SK_{Ca} .

Figura 11: Inmunodetección por western blot del canal SK_{Ca} en fracciones de membrana de cilios olfatorios.

Figura 12: Registros de corriente del canal IK_{Ca-1} a distintas concentraciones de Ca^{2+} .

Figura 13: Registros de corrientes para los dos estados de IK_{Ca-1} .

Figura 14: Curva I/V para el canal IK_{Ca-1} .

Figura 15: Curva de dependencia de Ca^{2+} para el canal IK_{Ca-1} .

- Figura 16:** Registros de corriente unitaria del canal IK_{Ca-1} en presencia de CLT.
- Figura 17:** Variación de P_0 en presencia de CLT para el canal IK_{Ca-1} .
- Figura 18:** Registros de corrientes del canal IK_{Ca-2} a distintos potenciales.
- Figura 19:** Curva I/V para el canal IK_{Ca-2} .
- Figura 20:** Registros de corriente unitaria del canal IK_{Ca-2} en presencia de CLT.
- Figura 21:** Disminución de P_0 del canal IK_{Ca-2} en presencia de CLT.
- Figura 22:** Variación de la fracción de tiempo abierto para el canal IK_{Ca-2} en presencia de ChTx.
- Figura 23:** Registros de corrientes del canal IK_{Ca-3} a distintos potenciales.
- Figura 24:** Curva I/V para el canal IK_{Ca-3} .
- Figura 25:** Registros de corriente unitaria del canal IK_{Ca-3} a distintas concentraciones de Ca^{2+} .
- Figura 26:** Curva de dependencia de Ca^{2+} para el canal IK_{Ca-3} .
- Figura 27:** Registros de corriente unitaria para el canal IK_{Ca-4} a distintos potenciales.
- Figura 28:** Curva I/V para el canal IK_{Ca-4} .
- Figura 29:** Registros de corriente unitaria del canal IK_{Ca-4} en presencia de Ca^{2+} .
- Figura 30:** Curva dependencia de Ca^{2+} para el canal IK_{Ca-4} .
- Figura 31:** Registros de corriente unitaria del canal IK_{Ca-4} en presencia de ChTx.
- Figura 32:** Variación de P_0 del canal IK_{Ca-4} en presencia de ChTx.
- Figura 33:** Registros de corrientes del canal BK_{Ca} a distintos potenciales.
- Figura 34:** Curva I/V para el canal BK_{Ca} .
- Figura 35:** Registros de corrientes del canal BK_{Ca} a distintas concentraciones de Ca^{2+} .
- Figura 36:** Dependencia de la concentración de Ca^{2+} para el canal BK_{Ca} .
- Figura 37:** Registros de corriente del canal BK_{Ca} en presencia de IbTx.
- Figura 38:** Variación de P_0 en presencia de IbTx para el canal BK_{Ca} .

Figura 39: Registros de corrientes del canal BK_{Ca} frente a IbTx 2 nM.

Figura 40: Variación de P_0 en presencia de IbTx 2 nM.

Figura 41: Variación de P_0 en presencia de IbTx 2 y 8 nM.

Figura 42: Registros de corrientes del canal BK_{Ca} en presencia de ChTx.

Figura 43: Variación de P_0 en presencia de ChTx para el canal BK_{Ca}.

Figura 44: Inmunodetección del canal BK_{Ca} en fracciones de membrana de cilios olfatorios.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIII: adenilil ciclase III

AgCl: cloruro de plata

AMPc: adenosin 3'-5'-monofosfato cíclico

ATP: adenosin 5'-trifosfato

BK_{Ca}: canal de potasio activado por calcio de alta conductancia

BSA: seroalbúmina de bovino

Ca²⁺: ion calcio

CaCl₂: cloruro de calcio

ChTx: caribdotoxina

cis: lado de la cámara de registro en el que se aplica el potencial eléctrico.

Cl⁻: ion cloruro

CLT: Clotrimazol

CNG: canal activado por nucleótidos cíclicos

EDTA: ácido etilendiamonotetraacético

EGTA: ácido etilenglicol-bis-(β-amino-etileter) N, N, N', N'-tetraacético

g: conductancia (en los gráficos corriente-voltaje), aceleración de gravedad (en las centrifugaciones)

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico

I: corriente

IbTx: Iberiotoxina

IK_{Ca}: canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia

K⁺: ion potasio

KAc: acetato de potasio

K_{Ca}: canal de potasio activado por calcio

KCl: cloruro de potasio

$K_{0.5}$: concentración de Ca^{2+} a la cual la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto es la mitad de la máxima.

mM: milimolar

mg: miligramo

mL: mililitro

mV: milivoltio

n: numero de Hill en los gráficos P_0 versus Ca^{2+} y numero de experimentos en el resto de los casos

NaCl: cloruro de sodio

NSO: neurona sensorial olfatoria

OBP: odorant-binding protein

PA: potenciales de acción

pA: picoamperio

PBS : buffer salino fosfato

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

pF: picofaradio

PMSF: fenilmetanosulfonil fluoruro

P_0 : fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto

POPC: 1-palmitoil-2-oleil fosfatidilcolina

POPE: 1-palmitoil-2-oleil fosfatidiletanolamina

pS: picosiemens

RO: receptor de olores

SK_{Ca} : canal de potasio activado por calcio de baja conductancia

TBS: buffer salino Tris

trans: lado de la cámara donde se encuentra la tierra virtual, opuesto al *cis*.

μM : micromolar

V: voltio

RESUMEN

En las neuronas receptoras olfatorias los odorantes gatillan respuestas excitatorias e inhibitorias, asociadas a un aumento y una disminución en la frecuencia de los potenciales de acción, respectivamente. En la respuesta inhibitoria participan canales dependientes de nucleótidos cíclicos que mediante una cascada activada por AMP cíclico (AMPC) activan canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}). Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio usando patch clamp demostraron la existencia de canales K_{Ca} de conductancia baja, intermedia y alta en los cilios olfatorios (Delgado *et al.*, 2003). En el presente estudio, llevamos a cabo una caracterización biofísica y farmacológica de los canales K_{Ca} ciliares. Esto se realizó estudiando los canales K_{Ca} provenientes de una fracción purificada de membranas de cilios olfatorios, incorporados en bicapas planas de fosfolípidos. La pureza de la preparación se confirmó por western blot utilizando un anticuerpo contra el canal de sodio dependiente de voltaje, y el análisis de enriquecimiento se llevó a cabo usando anticuerpos contra adenilil ciclasa III (ACIII) y el canal de transducción CNG. El tejido olfatorio se extrajo de ratas adultas sacrificadas con una sobredosis de anestesia. Los canales K_{Ca} de conductancias baja (S), intermedia (I) y alta (B), fueron incorporados en las bicapas en soluciones simétricas de K^+ 100 mM. El canal SK_{Ca} exhibió una conductancia de 16 pS, insensibilidad al voltaje, una $K_{0.5}$ por Ca^{2+} de 40 μ M y fue bloqueado por apamina. Se identificaron cuatro canales IK_{Ca} distintos. Uno (IK_{Ca} -1) presentó dos niveles de conductancia de 30 pS y 50 pS, su $K_{0.5}$ por Ca^{2+} fue de 60 μ M, era sensible a clotrimazol e insensible al voltaje y a caribdotoxina (ChTx). Otro canal IK_{Ca} (IK_{Ca} -2) mostró una conductancia de 60 pS y era sensible a clotrimazol. Los otros dos canales IK_{Ca} llamados IK_{Ca} -3 e IK_{Ca} -4, presentaron conductancias de 80 y 50 pS, una $K_{0.5}$ para dependencia de calcio de 36 μ M para IK_{Ca} -3 y 43 μ M para IK_{Ca} -4, y sensibilidad a ChTx

para $I_{K_{Ca-4}}$. También identificamos un canal BK_{Ca} con una conductancia de 210 pS, su $K_{0.5}$ para Ca^{2+} fue 63 μ M y que era sensible a iberiotoxina y ChTx. Los canales SK_{Ca} , BK_{Ca} y uno de los IK_{Ca} eran muy similares a los registrados mediante patch clamp, en cuanto a su conductancia unitaria, dependencia de calcio y aspecto cinético, sugiriendo que corresponden a los mismos canales K_{Ca} . La presencia de los canales SK_{Ca} (SK3) y BK_{Ca} en la fracción ciliar se confirmó mediante western blot. La caracterización biofísica y farmacológica de los canales K_{Ca} permitirá determinar la contribución de cada uno de ellos a la corriente hiperpolarizante en la respuesta inhibitoria en las neuronas olfatorias.

ABSTRACT

In olfactory receptor neurons, odorants elicit excitatory and inhibitory responses associated to increases and a decreases in the action potential frequency. In the inhibitory response participate cyclic nucleotide gated channels that via the cyclic AMP cascade activates Ca^{2+} -dependent K^+ (K_{Ca}) channels. Patch-clamp studies performed in our laboratory demonstrated the presence of low, intermediate and high conductance K_{Ca} channels in the olfactory cilia (Delgado et al., 2003). In the present study, we carried out the biophysical and pharmacological characterization of ciliary K_{Ca} channels. This was addressed by studying the K_{Ca} channels from a purified rat olfactory cilia membrane fraction, incorporated into planar phospholipid bilayers. The purity of preparation was confirmed by western blotting, using voltage-dependent sodium channel antibody and the enrichment analysis was carried out using antibodies against adenyl cyclase III (ACIII) and the transducción channel CNG. Olfactory tissue was obtained from adult rats sacrificed with an anaesthesia overdose. Low (S), intermediate (I) and high (B) conductance K_{Ca} channels, were incorporated into the bilayers, in symmetrical 100 mM K^+ solutions. The SK_{Ca} channel showed a 16 pS conductance, insensitivity to voltage, a $\text{K}_{0.5}$ for Ca^{2+} of 40 μM and was blocked by apamin. Four different IK_{Ca} channels were identified. One ($\text{IK}_{\text{Ca}}-1$) presented two conductance levels, of 30 pS and 50 pS, its $\text{K}_{0.5}$ for Ca^{2+} was 60 μM , was sensitive to clotrimazole and insensitive to voltage and charybdotoxin (ChTx). Other IK_{Ca} channel ($\text{IK}_{\text{Ca}}-2$) showed an open conductance of 60 pS and was sensitive to clotrimazole. Another two IK_{Ca} channels named $\text{IK}_{\text{Ca}}-3$ and $\text{IK}_{\text{Ca}}-4$, presented conductances of 80 and 50 pS and, calcium dependence $\text{K}_{0.5}$ of 36 μM for $\text{IK}_{\text{Ca}}-3$ and 43 μM for $\text{IK}_{\text{Ca}}-4$, and ChTx sensitivity for $\text{IK}_{\text{Ca}}-4$. We also identified a BK_{Ca} channel with a 210 conductance, $\text{K}_{0.5}$ for Ca^{2+} was 63 μM and sensitive to iberiotoxin and ChTx. The SK_{Ca} , the BK_{Ca} and one of the IK_{Ca}

channels characterized on bilayers, were very similar to the K_{Ca} channels, recorded by patch-clamp, regarding their unitary conductance, calcium dependence and kinetic aspect, suggesting that they correspond to the same K_{Ca} channels. The presence of the SK_{Ca} (SK3) and the BK_{Ca} channels in the ciliary fraction was confirmed by Western blotting. Biophysical and pharmacological characterization of the ciliary K_{Ca} channels would allow determine the contribution of each K_{Ca} channel to the hiperpolarizing current in the inhibitory response of olfactory neurons.

INTRODUCCIÓN

El sentido del olfato permite detectar en el aire compuestos químicos volátiles de bajo peso molecular llamados olores u odorantes. En la mayoría de los animales se han desarrollado dos sistemas olfatorios: el sistema olfatorio principal, que permite percibir los odorantes; y el sistema vomeronasal, implicado en la detección de feromonas.

Los avances en la codificación de genomas eucariotas y el diseño de técnicas electrofisiológicas y de biología molecular han permitido lograr una amplia comprensión del funcionamiento del sistema olfatorio y de cómo éste logra distinguir entre miles de olores distintos.

Estructura del epitelio olfatorio

El órgano donde reside el sistema olfativo se ilustra en la Figura 1. Las moléculas de olor entran en contacto directo con los cilios de las neuronas olfatorias de la mucosa del epitelio olfatorio. Este epitelio está constituido por células basales, y neuronas sensoriales olfatorias (NSOs) alojadas entre las células de soporte de la mucosa. Típicamente el neuroepitelio posee alrededor de 10^7 NSOs, que son neuronas bipolares con una dendrita que se alza hacia la superficie del tejido, termina en el denominado botón dendrítico, desde el cual emergen entre 8 a 30 cilios, de alrededor de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro y 30 a $200 \mu\text{m}$ de largo (Figura 1, inferior derecha). Un axón se proyecta desde el otro polo de la neurona hasta una región del cerebro conocida como bulbo olfatorio, donde convergen con los axones de otras NSOs para interactuar con células post-sinápticas y formar estructuras conocidas como glomérulos. Éstos últimos están formados por los axones de las NSOs y las dendritas de las principales células de proyección del bulbo, que son las células mitrales. Los axones de las NSOs hacen

sinapsis con las dendritas de 5-25 células mitrales en cada glomérulo, el que recibe sinapsis provenientes de neuronas que poseen un mismo tipo de proteína receptora de odorantes.

Cerca de la superficie sensora de la mucosa se encuentran las células basales, capaces de dividirse y diferenciarse para generar NSOs maduras, que reemplazan a las NSOs que van muriendo. Este recambio ocurre durante toda la vida de los vertebrados (Leffingwell, 2001).

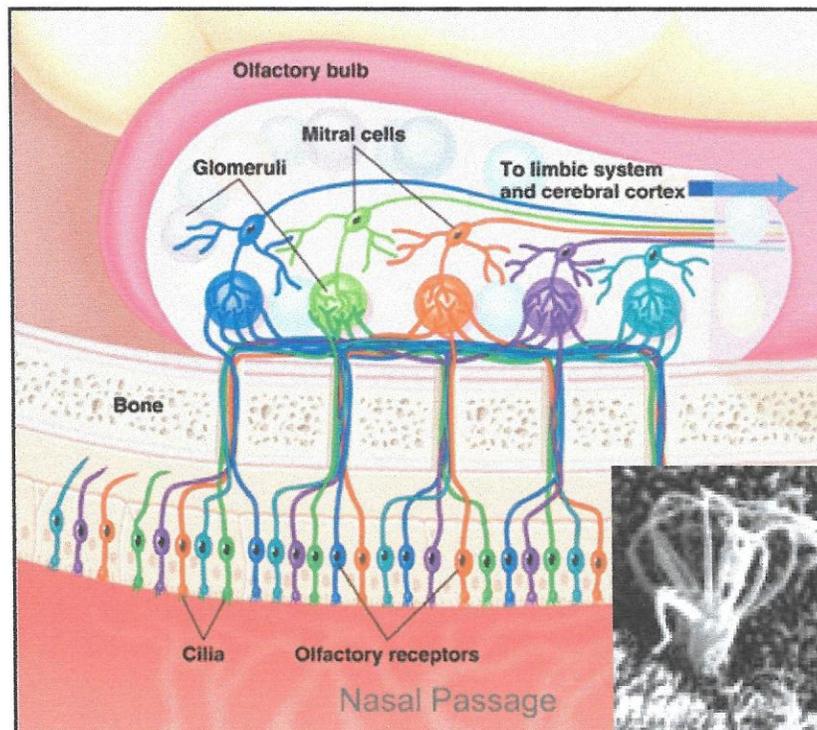


Figura 1.- Esquema del sistema olfatorio que muestra las proyecciones axonales desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo. En la parte inferior derecha se muestra una microfotografía de barrido de los cilios de una neurona olfatoria (adaptado de Morrison y Costanzo, 1990)

Transducción sensorial del olfato

Los cilios de las neuronas del epitelio olfatorio constituyen el lugar de transducción sensorial del olfato. La transducción olfatoria comienza cuando un compuesto volátil accede al neuroepitelio nasal, donde residen millones de células sensoriales olfatorias distintas. El paso de los compuestos hidrofóbicos de "olor" a través del mucus hacia los cilios al parecer es facilitado por proteínas globulares especializadas llamadas OBP (odorant-binding protein). Cuando el olor interactúa con un cilio quimiosensor apropiado se gatilla el proceso de transducción. Se produce una corriente de entrada que desencadena el disparo de potenciales de acción (PA), los que se propagan por las vías olfatorias, siendo decodificados por centros cerebrales superiores. En la mayoría de las neuronas sensoriales olfatorias la señal de transducción parece ser mediada por la proteína G específica de las células olfatorias G_{olf} , vía G_{olf} /Adenilil ciclasa III/AMPC, que se describe más adelante (Firestein, 2001).

El descubrimiento de los receptores de olores (RO) en mamíferos reveló que éstos están codificados por numerosos genes (Buck y Axel, 1991; Buck, 1992), y que constituyen la familia más numerosa de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), y probablemente la familia génica más grande de todo el genoma (2% del total de genes). En humanos existen alrededor de 350 genes y 560 pseudogenes que codifican RO (Guengerich, 1993); en ratón se han identificado 1300 genes, de los cuales un 20% son pseudogenes, mientras que los peces y anfibios tienen sólo 100 genes que codifican RO (Zhang y Firestein, 2002). Los ROs comparten muchas características con otros GPCRs, incluyendo una región codificadora que carece de intrones; su estructura primaria predice la existencia de siete dominios de hélices α transmembranares conectados por lazos intracelulares y extracelulares de longitudes variables. Hay muchas características que sólo se encuentran en estos receptores,

tales como un segundo lazo extracelular muy largo, un par de cisteínas conservadas y localizadas en ese mismo lazo, así como otras secuencias cortas, las que dan especificidad e identidad a los RO (Mombaerts, 1999a). Mediante comparación de secuencias se ha determinado que existe entre 40% a 90% de identidad dentro de la familia de los ROs (Pipel y Lancet, 1999). Lo más notable es la existencia de una región hipervariable formada por una serie de 17 residuos localizados en los segmentos transmembrana 3, 4 y 5, que muestran divergencias particularmente grandes. Se postula que esta zona corresponde a la región determinante de la complementariedad de los olores. Las hélices 3, 4 y 5 parecen enfrentarse formando un bolsillo en el interior de la proteína receptora, el que por comparación con otros GPCRs podría ser el sitio de enlazamiento para sus ligandos. La gran variabilidad de esta región proporciona una base molecular para entender el rango, la diversidad y el alto número de olores que pueden ser detectados y discriminados por los mamíferos.

Recientes estudios genético-moleculares han mostrado que todas las NSOs que expresan un mismo RO, independiente de donde se encuentren en la capa epitelial, convergen hasta un único punto en el bulbo olfatorio (Mombaerts 1999b), que es precisamente su glomérulo específico (uno por cada tipo de receptor), de modo que toda la información olfativa recibida por esas NSOs localizadas en distintas zonas del epitelio olfatorio es transmitida a su glomérulo, y transferida a las células mitrales del bulbo olfatorio.

La unión de la molécula de olor a su receptor gatilla una cascada de eventos que transforman la energía química de la interacción en un cambio en el potencial de membrana de la NSO. El ligamen del odorante produce cambios conformacionales en el receptor que inducen su acoplamiento a una proteína G de la clase de las proteínas G estimuladoras (G_s), específicas del olfato (G_{olf}) compuesta por tres subunidades α , β

y γ , dos de las cuales son reguladoras. Cuando el olor se une a su OR se producen cambios conformacionales que ocasionan que se acople a G_{olf} , desencadenándose la cascada de transducción de señales que provoca que el GDP sea reemplazado por GTP. Posteriormente, G_{olf} estimula a la proteína efectora en este sistema, la adenilil ciclasa tipo III olfatoria (ACIII) que convierte al ATP en el mensajero secundario AMP cíclico (AMPC). En el caso de las NSOs, el AMPC se une en la cara intracelular de un canal catiónico inespecífico, que es activado por nucleótidos cíclicos llamado CNGC (cyclic nucleotide-gated channel), que conduce cationes (Firestein y Zuffal, 1994). Las NSOs en reposo normalmente mantienen un voltaje de reposo de alrededor de -65 mV, en promedio (interior respecto del exterior). Cuando los CNGC se abren, la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} hace que el interior celular se vuelva menos negativo. Si los canales se abren en cantidad y coordinación espacio-temporal adecuadas, la célula logra llegar al potencial umbral para la activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, generándose potenciales de acción (PA), los que se propagan a lo largo del axón, que cruza la placa cribiforme y llega al bulbo olfatorio, donde hace sinapsis con las neuronas mitrales.

La cascada de mensajeros secundarios permite la amplificación e integración de los eventos de unión del olor. Un receptor activado por un determinado olor puede, a su vez, activar decenas de G_{olf} , cada una de las cuales puede activar a su vez una molécula de ACIII capaz de producir miles de moléculas de cAMP por segundo en un proceso de alta ganancia. Recientes cálculos estequiométricos sugieren que sólo se requieren 3 moléculas de cAMP para abrir un CNGC; sin embargo, cientos de miles de iones pueden cruzar la membrana a través de un solo canal abierto. Adicionalmente, un número reducido de canales abiertos al mismo tiempo permite conducir suficiente

corriente para inducir la generación de PA (Kleene y Gesteland, 1991). Al respecto, cabe destacar que estudios realizados en ratones genéticamente alterados en los cuales varios componentes de esta cascada han sido suprimidos (Golf, ACIII o el canal CNG), han indicado que la vía del cAMP es la ruta más común para todas las NSOs, ya que los individuos que carecen de alguno de dichos componentes resultan ser anósmicos, es decir, incapaces de percibir olores (Brunet, Gold, y Ngai, 1996).

Respuesta excitatoria

Durante el proceso de despolarización de la membrana, existe un mecanismo de amplificación adicional y único en las NSOs. Los iones Ca^{2+} que entran a través del canal CNG activan otro canal iónico, que es selectivo a Cl^- . Los canales de Cl^- neuronales comúnmente median respuestas inhibitorias, ya que los iones Cl^- suelen estar distribuidos de tal manera que su concentración extracelular es mayor que la intracelular y por ello entran a la célula a través de un canal abierto hiperpolarizando la célula. Sin embargo, este no es el caso en las NSOs, que mantienen una concentración intracelular inusualmente alta de Cl^- , y en consecuencia hay una salida neta de Cl^- cuando estos canales son activados. De esta manera la corriente de Cl^- despolariza aún más a las células, aumentando así la magnitud de la respuesta, que en este caso corresponde a una respuesta de tipo excitatoria, aumentando el número de PA generados en las neuronas olfatorias con la llegada de un estímulo odorífero. La respuesta excitatoria ha sido bastante bien estudiada en numerosas especies de vertebrados (Shepherd y Firestein, 1991; Kaupp, 1991; Klenne y Gesteland, 1991; Kurahashi y Yau, 1993; Lowe y Gold, 1993; Nakamura y Gold, 1987; Zufall y cols, 1994; Leinders-Zufall y cols, 1995). Cabe destacar que las neuronas olfatorias descargan PAs de manera espontánea, es decir, en ausencia de estímulo; de modo

que es sobre ese basal que aumenta la descarga de PA durante la respuesta excitatoria (Figura 2).

Respuesta inhibitoria

Las NSOs también pueden responder frente a un estímulo odorífero disminuyendo la frecuencia de descargas de sus PAs como se muestra en la Figura 2, lo que se conoce como respuesta inhibitoria.

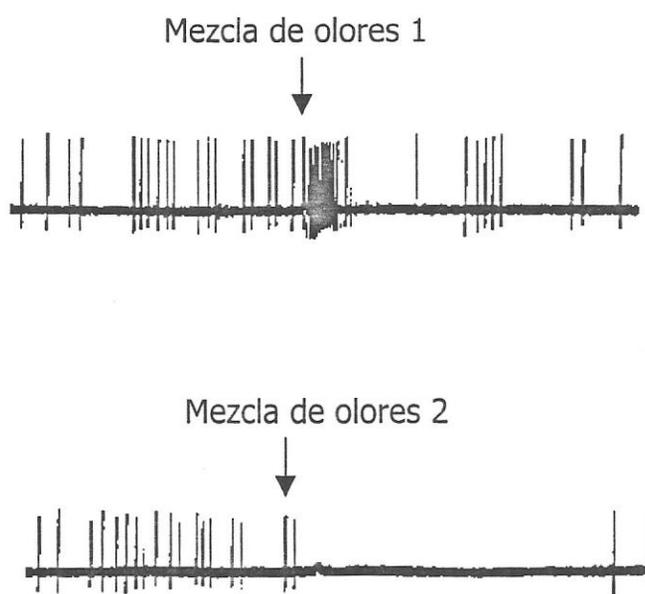


Figura 2.-Tipos de respuesta frente a un estímulo odorífero. El primer trazo corresponde a la respuesta excitatoria, se observa un aumento la frecuencia de disparos de los potenciales de acción, luego de agregar odorantes. En el trazo inferior se observa el fenómeno inhibitorio, el que se manifiesta como una disminución en la frecuencia de descarga de los PA. Ambas respuestas se pueden observar en una misma neurona. Adaptado de Morales y cols. 1994, *Proc. R. Lond. B*, 257.

Estudios electrofisiológicos realizados a fines de la década de los 60, utilizando técnicas de registro extracelular en la mucosa olfatoria, sugirieron que ciertos

odorantes inhiben la actividad eléctrica de las NSOs (Gesteland y cols, 1965; O'Connell y Mozell, 1969); posteriormente esta observación fue corroborada en estudios hechos en NSOs de *Necturus* en condiciones de corriente controlada (Dionne, 1992), donde se encontró que una mezcla de aminoácidos con efecto inhibitorio inducía una hiperpolarización de las células olfatorias, sin que se definiera que conductancia era la responsable de esta respuesta.

De la respuesta inhibitoria se sabe mucho menos que de la excitatoria, aunque su presencia se ha observado en distintos vertebrados como *Necturus* (Dionne, 1992), *Caudiververa caudiververa* (Morales y cols, 1994), *Xenopus* (Morales y cols, 1994; Vogler y Schild, 1999), en rata (Sanhueza y cols., 2000) y ratón (Delay y Restrepo, 2004). Se conocen con cierto detalle las bases moleculares de la inhibición en el sapo chileno *Caudiververa caudiververa* y en la rata. Se ha determinado que en ambas especies la inhibición inducida por olores ocurre como producto de la activación de canales de K^+ presentes en los cilios olfatorios, lo que ocasiona la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante cuyo efecto es disminuir temporalmente la frecuencia de disparo de los PA. Los canales de K^+ ciliares que participan de la respuesta inhibitoria son, al igual que el canal de Cl^- de la respuesta excitatoria, activados por el Ca^{+2} que entra a la célula como consecuencia de la detección de olores. Hay evidencias que indican que tanto la respuesta excitatoria como la inhibitoria están bajo control de la misma ruta de entrada de Ca^{2+} , o sea, la activación del canal CNG vía G_{olf} -ACIII-AMPC (Madrid, comunicación personal). Cabe destacar que tanto la respuesta excitatoria como la inhibitoria han sido registradas en una misma neurona, (Morales y cols., 1994; Sanhueza y cols.,2000; Madrid R, Tesis Doctoral, 2001).

Por otro lado se demostró que el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por ciertos odorantes en la langosta marina, es el resultado de la activación por cAMP de una conductancia de K^+ que causa una disminución en la actividad eléctrica de la neurona (Michel y Ache, 1992; Ache, 1994). Posteriormente se demostró que la inhibición en NSOs de *Caudiverbera caudiverbera*, inducida por una mezcla de odorantes pútridos, se debe al desarrollo de un potencial de receptor hiperpolarizante generado por la activación de una conductancia apical de K^+ dependiente de Ca^{2+} , sensible a ChTx. Se demostró además, en experimentos en célula completa de NSO de rata, que la corriente de K^+ a través de estos canales es de mayor magnitud cuando el estímulo odorífero se dirige a los cilios que cuando se aplica al cuerpo celular (Morales y cols, 1994, 1995). Esta conductancia de Ca^{2+} activada por odorantes participa aumentando la conductancia de K^+ responsable de la inhibición (Morales y cols, 1997). La corriente de K^+ inhibitoria es proporcional a la concentración de Ca^{2+} extracelular y es sensible a bloqueadores de canales de Ca^{2+} como nifepidina. Las corrientes inhibitorias activadas por odorantes han sido descritas también en *Xenopus leavis* (Morales y cols, 1994) y en la rata donde se observó mediante estudios de corrientes macroscópicas, que pueden ser activadas tanto por odorantes pútridos como florales los que revelaron que dichas corrientes K_{Ca} eran sensibles a ChTx (Sanhueza y cols, 2000). Estudios electrofisiológicos de fracciones de membranas de cilios olfatorios de *Caudiverbera caudiverbera*, cuya pureza no fue determinada, realizados en bicapas planas de fosfolípidos, permitieron registrar corrientes unitarias de un canal K^+ activado por concentraciones micromolares de Ca^{+2} con una conductancia de 240 pS en KCl 200 mM, el cual era sensible a ChTx (Jorquera y cols, 1995).

Recientemente se logró registrar directamente corrientes unitarias de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} en parches de membrana escindidos de los cilios de las

NSOs de *Caudiverbera* y de rata, mediante la técnica de patch-clamp, lo que constituye la evidencia más contundente de la presencia de canales K_{Ca} en estas estructuras. Se identificaron canales de K^+ dependientes de Ca^{+2} de baja conductancia (12 pS), de conductancia intermedia (uno de 60 pS, y otro con dos estados de conductancia de 30 y 60 pS), y de alta conductancia (210 pS). Además, los autores inmunolocalizaron canales BK_{Ca} en estos mismos organelos (Delgado y cols, 2003). Adicionalmente se ha observado que los cilios olfatorios presentan actividad de canales de potasio cuando son estimulados con olores (Delgado y Bacigalupo, 2004).

Otras evidencias que apoyan la existencia de canales K_{Ca} en los cilios olfatorios, provienen de registros de corrientes macroscópicas inducidas por la liberación de Ca^{+2} enjaulado (Madrid R, Tesis Doctoral, 2001; Delgado y Bacigalupo, comunicación personal). Es importante destacar que en el soma y en la dendrita también es posible encontrar canales de K^+ dependientes de Ca^{+2} , los que tienen una importante participación en la generación del patrón de descarga de las respuestas excitatorias (Madrid R, Tesis Doctoral, 2001). Sin embargo, estos últimos se diferencian farmacológicamente de los canales de transducción, ya que su sensibilidad a ChTx (Delgado y Labarca, 1993) es mucho menor que la de los canales ciliares y son insensibles a IbTx (Schmachtenberg y Bacigalupo, 2000; Madrid R, Tesis Doctoral, 2001).

Los antecedentes expuestos respaldan fuertemente la existencia de canales de K^+ dependiente de Ca^{+2} en los cilios de las neuronas olfatorias. Sin embargo, los canales K_{Ca} ciliares no han sido suficientemente bien caracterizados, lo que se debe principalmente a las dificultades técnicas para hacerlo dado el pequeño tamaño de los organelos ciliares. Sin embargo, son de gran importancia en la olfacción ya que son los

responsables de generar respuestas de carácter inhibitorio frente a una molécula de olor determinada. Para una comprensión completa del fenómeno olfativo, es necesario estudiar los canales K_{Ca} , de modo tal que sea posible entender el fenómeno inhibitorio tan bien como el excitatorio.

Tipos de canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca})

Hasta el momento se han descrito tres subfamilias de canales K_{Ca} que se distinguen por sus características moleculares, su conductancia unitaria, su cinética y su farmacología. Todos los canales K_{Ca} tienen en común una dependencia de la concentración de calcio intracelular para su activación. La característica más prominente para describir un canal es su conductancia unitaria, medida en picosiemens (pS), la que da un índice del número de iones que pasa a través de un canal abierto. En términos generales los K_{Ca} se dividen en tres subfamilias: canales de potasio activados por calcio, de baja conductancia SK_{Ca} , entre 2-25 pS, de conductancia intermedia IK_{Ca} , entre 25-100 pS y de alta conductancia BK_{Ca} , de 100-250 pS (Vergara y cols., 1998; Jensen y cols., 2001). Algunos de estos canales son inhibidos por TEA, y por agentes farmacológicos como las toxinas de escorpión Caribdotoxina (ChTx) e Iberiotoxina (IbTx) o uno de los componentes del veneno de abeja, conocido como apamina.

Respecto a su estructura, se sabe que los canales SK_{Ca} tienen una topología muy similar a los canales de K^+ activados por voltaje, exhibiendo seis dominios transmembrana y sus extremos amino y carboxilo intracelulares. La subunidad α que forma el poro de este canal tiene entre 535-575 aminoácidos, y se encuentra principalmente en neuronas y músculo. Los canales SK_{Ca} unen calmodulina (CaM) constitutivamente en el extremo C-terminal, lo que les confiere la sensibilidad a Ca^{2+} . Son bloqueados de forma específica e irreversible por la toxina de abeja apamina, que

al entrar en contacto con el poro del canal impide el paso de iones a través de él. Cabe destacar que también existen canales SK_{Ca} que son insensibles a apamina.

En relación a los canales IK, el primero descrito fue el denominado canal de Gardos, hace varias décadas atrás, y ha sido ampliamente estudiado logrando determinarse su selectividad, y modulación (Wolff y cols, 1988; Anderson y cols, 2002; Jensen y cols, 2001; Malik-Hall y cols, 2000; Syme y cols, 2000). La identidad molecular de este tipo de canales IK_{Ca} fue resuelta durante 1997 por varios investigadores (Ishii y cols, 1997; Joiner y cols, 1997; Logsdon y cols, 1997; Jensen y cols, 1998), revelándose que posee subunidades α , que forman el poro, de 427 aminoácidos, con seis segmentos transmembrana, y los extremos amino y carboxilo terminal, intracelulares. Entre los segmentos S5 y S6 hay un lazo hidrofóbico que contiene la secuencia GYG, que ha sido establecida como la secuencia marcadora del poro de los canales de potasio. La secuencia aminoacídica del canal IK_{Ca} posee regiones de consenso para sitios de fosforilación por proteína quinasa A o C; sin embargo, se sabe muy poco respecto a la modulación de los canales IK_{Ca} por dichas proteínas. Existen estudios en que se plantea que los canales IK_{Ca} tienen regulación dependiente de calmodulina (Khanna y cols, 1999; Fanger y cols, 1999). Este tipo de canales K_{Ca} se encuentra en tejidos tan diversos como células endoteliales, eritrocitos, células epiteliales, miocitos, linfocitos T y B y células inmaduras de músculo liso. También se han descrito otros canales IK_{Ca} , cuyas propiedades son distintas y menos conocidas que las del canal Gardos.

Los canales BK_{Ca} son los canales de K^+ activados por Ca^{2+} que más se han estudiado. Están ampliamente distribuidos en el cerebro, músculo esquelético, cóclea e islotes pancreáticos, habiéndose encontrado incluso en la membrana interna de las mitocondrias (Siemen y cols, 1999). Son activados tanto por el voltaje como por calcio

intracelular y ambos estímulos causan salida de K^+ que hiperpolariza la membrana. Los canales BK_{Ca} pertenecen a la superfamilia de los canales Kv, en la que el canal funcional está formado por un tetrámero de subunidades α formadoras de poro, que pueden interactuar con subunidades auxiliares β . Se han identificado cuatro subunidades reguladoras β del canal BK_{Ca} , que se unen al canal y modulan su actividad y su perfil farmacológico. Cada subunidad del canal BK_{Ca} posee 1194 aminoácidos, una topología de siete segmentos transmembrana (S0-S6), incluyendo el sensor de voltaje en S4 y la región del poro entre S5 y S6; con el segmento S0 hacia la región N-terminal. En estos canales existe un sitio de unión a calcio intracelular en el extremo C-terminal denominado "calcium bowl".

Caracterización de canales mediante toxinas

Para la caracterización de canales iónicos se utilizan toxinas o agentes farmacológicos, algunos de los cuales ejercen efectos específicos sobre un tipo determinado de canal, permitiendo discriminar los tipos de canales que contribuyen a la generación de una corriente (Lopatin y Nichols, 2001). Además, dichos compuestos, permiten separar canales selectivos al mismo ion, pero que poseen distinta conductancia, por ejemplo, canales de potasio de conductancia baja, intermedia o alta, constituyendo una poderosa herramienta para el estudio de estas proteínas. A diferencia del Ca^{2+} que actúa desde lado interno (intracelular) de los canales, las toxinas y otros agentes farmacológicos, lo hacen, en general, desde la cara externa (extracelular) de los canales iónicos.

Una variedad de compuestos, incluyendo toxinas peptídicas de escorpión son usadas para caracterizar estos canales debido a su efecto sobre la actividad: caribdotoxina (ChTx), es un bloqueador de alta afinidad por los canales BK_{Ca} , aunque

su efecto no es muy específico, ya que bloquea también diversos tipos de canales Kv1. En cambio, iberitoxina (IbTx), es muy selectiva como inhibidor de canales BK_{Ca}. Se piensa que el bloqueo de los canales BK_{Ca} vía ChTx o IbTx depende de la presencia de subunidades β y de la isoforma involucrada (Nimigean y Magleby, 1999; Wallner y cols, 1999; Meera y cols 2000; Ramanathan y cols, 2000; Weiger y cols, 2000).

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar las propiedades biofísicas y farmacológicas de los canales K_{Ca} presentes en preparaciones de membranas de cilios olfatorios con el propósito de demostrar su presencia en estos organelos y complementar los estudios realizados mediante la técnica de patch-clamp. Este estudio permitió avanzar en el conocimiento de los componentes moleculares involucrados en la transducción olfatoria y en su sensibilidad farmacológica, lo que en el futuro permitirá obtener un entendimiento más completo del fenómeno olfativo, en particular, de la respuesta inhibitoria. Eventualmente, abrirá las puertas a la caracterización molecular de los canales K_{Ca} ciliares y a la contribución que cada uno de estos canales hace a la corriente macroscópica en el proceso de inhibición.

La caracterización de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ incluyó el estudio de características tales como: conductancia, dependencia de Ca²⁺ y potencial, y farmacología. Si bien la técnica de patch-clamp permite determinar con certeza el origen de los canales K_{Ca} estudiados, no permite caracterizar las propiedades farmacológicas de los canales ya que la configuración utilizada (parche escindido) sólo permite acceso a la cara intracelular del canal. Dado que las toxinas y compuestos que inhiben estos canales actúan sobre la cara extracelular de los canales, la técnica de bicapas es adecuada para el estudio farmacológico ya que posibilita el acceso simultáneo a ambas caras (intra y extracelular) de un canal bajo estudio. Otra ventaja

que ofrece la técnica de bicapas es la relativa facilidad para realizar cambios en la composición de las soluciones que bañan el canal.

Las metas propuestas en esta tesis se detallan a continuación.

Objetivo General:

- Identificar y caracterizar los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} presentes en una fracción de membranas purificada de cilios de neuronas olfatorias de rata.

Objetivos Específicos:

- Optimizar la purificación de la fracción de membrana ciliar a fin de obtener la menor contaminación posible con otras membranas de la neurona olfatoria (soma o dendrita).
- Caracterizar las propiedades biofísicas de los canales K_{Ca} presentes en la fracción de membrana ciliar (conductancia, activación por Ca^{2+} y potencial).
- Caracterizar farmacológicamente los canales detectados.
- Identificar mediante el uso de anticuerpos, la presencia de proteínas de transducción olfatoria y de canales K_{Ca} en la fracción purificada de membranas de cilios olfatorios
- Comparar y relacionar los canales K_{Ca} de cilios identificados en bicapas con los registrados mediante la técnica de patch-clamp.

Hipótesis:

Los cilios de las neuronas olfatorias contienen varios tipos de canales K_{Ca} que difieren en sus propiedades biofísicas y farmacológicas, y que estarían involucrados en la generación de la corriente inhibitoria de las neuronas olfatorias.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Obtención de membranas enriquecidas en cilios de neuronas olfatorias de rata.**

Para la preparación de membranas ciliares se utilizó una modificación del método de agitación mecánica descrito por Washburn et al, 2002, que se describe a continuación.

Ratas macho de entre 35 y 40 días, previamente anestesiados con pentobarbitona (60 mg/Kg), se sacrificaron por decapitación y se les extrajeron los epitelios nasales desde la zona de las turbinas y el septum. Los tejidos extraídos se colocaron en tampón salino HEPES (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, K_2HPO_4 1,6 mM, $MgSO_4$ 2 mM, HEPES 20 mM, D-Glucosa 7,5 mM, pH 7,4). Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. A la suspensión de epitelio en tampón salino HEPES pH 7,4 se agregó EDTA a concentración final de 1 mM. Se agitó suavemente por 20 minutos (Compact rocker Labnet, speed 3). Luego se centrifugó 10 minutos a 1.500xg. Se recuperó el sobrenadante (S1). El pellet se resuspendió en tampón salino HEPES pH 7,4 suplementado con EDTA 1 mM y se sonicó a baja potencia durante 10 segundos. El tejido se dejó decantar y se recuperó el sobrenadante (S2). El pellet remanente se resuspendió en tampón salino HEPES pH 7,4 suplementado con EDTA 1 mM. Se sonicó nuevamente a baja potencia durante 30 segundos y se recuperó el sobrenadante (S3). Los sobrenadantes obtenidos en las sonicaciones (S2 y S3) se juntaron y se centrifugaron por 10 minutos a 1500xg. Se recuperó el sobrenadante (S4). Los sobrenadantes S1 y S4 se juntaron y fueron colocados delicadamente sobre un gradiente discontinuo de sacarosa entre 43% y 20% (p/v). El gradiente se centrifugó por una hora a 100.000xg. La interfase del gradiente se extrajo cuidadosamente con

una pipeta Pasteur bañada con SIGMACOTE® (Sigma Chemicals Co.). Se diluyó unas diez veces con tampón salino HEPES y luego se volvió a centrifugar por una hora a 100.000xg. El pellet (cilios) se resuspendió y homogenizó en un volumen mínimo (~200 µL) de solución salina (HEPES 2 mM, NaCl 112 mM, K₂HPO₄ 2,4 mM, KCl 3,4 mM, pH 7,0) suplementado con EGTA 2 mM y sacarosa 0,5 mM. Las fracciones de membrana ciliar obtenidas se alicuotaron en tubos Eppendorf y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Adicionalmente se obtuvieron preparaciones de membranas de epitelio desciliado, para lo cual se homogenizaron en tampón salino HEPES pH 7.4, los tejidos de epitelio olfatorio de los decantados finales, producto de las diferentes etapas de la obtención de membranas ciliares, y se centrifugaron a 1.500xg. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 43.000xg por 25 minutos. El pellet (fracción desciliada) se resuspendió en un volumen mínimo (~400 µL) de solución salina suplementada con EGTA y sacarosa, se alicuotó en tubos Eppendorf y se almacenó en nitrógeno líquido.

Se obtuvieron también preparaciones de membrana de bulbo olfatorio, cerebro y epitelio completo, para lo cual se extrajeron los tejidos desde las zonas adecuadas, se centrifugaron a 15.000xg por 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes que luego se centrifugaron una hora a 100.000xg. Los pellets se resuspendieron en solución salina suplementada con EGTA y sacarosa y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Todas las soluciones utilizadas en las preparaciones de las fracciones de membranas mencionadas, contenían (concentración final) los siguientes inhibidores de proteasas (SIGMA®): aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina 10 µg/mL, benzamidina 500 µM y PMSF 100 µM.

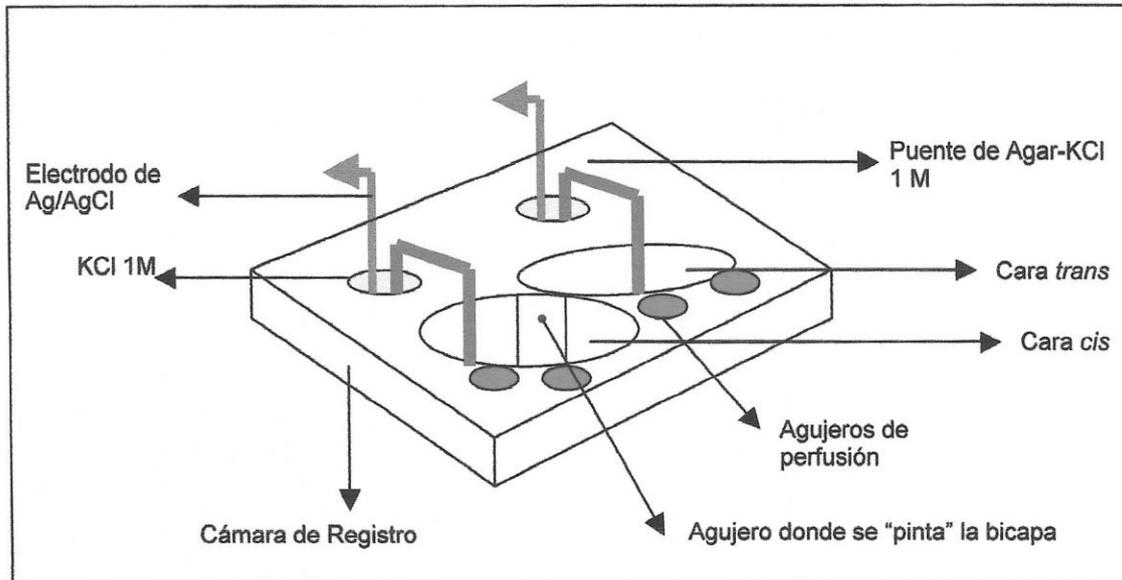
- **Determinación de proteínas totales en la preparación.**

Para cuantificar las proteínas obtenidas en la preparación de las fracciones de membranas de rata mencionadas anteriormente, se midieron las proteínas totales mediante el método modificado de Hartree: en una placa de ELISA se colocaron, por triplicado, un estándar de la proteína seroalbúmina de bovino (BSA, SIGMA®) de stock 1 mg/mL a distintas concentraciones para hacer una curva de calibración. Se colocaron también por triplicado 1 μ L de las muestras de membranas cuya concentración debía determinarse. Las muestras se incubaron 10 minutos a 50°C con la solución A (tartrato de Na-K, Na₂CO₃, NaOH 1 N); luego 10 minutos a temperatura ambiente con la solución B (tartrato de Na-K, CuSO₄•5H₂O, NaOH 1 N); y finalmente se incubaron 10 minutos a 50 °C con FOLIN (MERCK) 1:15. La detección colorimétrica se realizó en un lector de ELISA (Sunrisf) a una longitud de onda de 650 nm. Los datos luego fueron graficados y ajustados a una recta por regresión lineal para interpolar los datos de concentración de proteínas totales obtenidas.

- **Estudio electrofisiológico de los canales iónicos ciliares incorporados en bicapas planas de fosfolípidos.**

El método consiste en la formación de una bicapa artificial de fosfolípidos en un agujero de 150 a 300 μ m de diámetro que separa dos compartimentos salinos (*cis* y *trans*), como se ilustra en el Esquema 1, lo que permite tener acceso a las caras intra y extracelular de un canal. Para los registros se utilizó una cámara de teflón con compartimentos 1.5 mL volumen cada uno. La orientación en que se incorporaron los canales fue determinada por su actividad a potenciales de distinta polaridad, y en el caso de que el canal no exhibiera dependencia de potencial se usó la activación por

calcio para determinar que lado de la cámara enfrentaban las caras intra y extracelular del canal incorporado.



Esquema 1.- Cámara de registro de canales iónicos. Una gota de lípidos se "pinta" en el pequeño agujero que separa los compartimentos con un capilar de vidrio embebido en una mezcla de fosfolípidos. Una vez que se ha formado la bicapa y ésta ha alcanzado una capacitancia óptima, es decir, unos 250 pF, se hace pasar suavemente sobre el mismo punto un capilar de vidrio embebido en la preparación de cilios olfatorios de rata.

En este estudio las bicapas se formaron utilizando el fosfolípido POPE (palmitoil oleil fosfatidiletanolamina) o una mezcla de éste en proporción 4:1 con el fosfolípido POPC (palmitoil oleil fosfatidilcolina) disueltos en decano a una concentración final de 20 mg/mL. Los canales de K^+ dependientes de Ca^{+2} se registraron en soluciones simétricas o asimétricas de KCl o KAc 100 mM, y su activación por Ca^{+2} se estudió a distintas concentraciones de este ión, en soluciones tamponadas con EGTA. Para calcular la concentración de Ca^{2+} libre luego de tamponar la solución, se utilizó el programa WINMAXC v2.05.

La incorporación de los canales se detectó por la aparición de fluctuaciones discretas de la corriente, las que fueron visualizadas en un osciloscopio. Cabe destacar que la incorporación de los canales ocurre de manera estocástica. El equipo para medir corriente a través de la bicapa consistió en un amplificador medidor de corriente (DAGAN 8900 PATCH CLAMP/WHOLE CELL CLAMP) en la configuración voltage clamp. Los pulsos de voltaje se aplicaron en el compartimento *cis* y la corriente se registró en el lado *trans* de la cámara, mediante electrodos de Ag/AgCl comunicados con la solución salina con puentes de agar-KCl 1 M.

Para determinar la conductancia del canal, se hicieron registros de corriente a distintos potenciales para realizar una curva corriente versus voltaje, cuya pendiente otorga el valor de la conductancia del poro. Luego se procedió a estudiar la activación de los canales por calcio y el efecto de toxinas.

Una vez que se determinó cuál es el lado interno del canal, se agregó la toxina en el lado opuesto de la cámara. En el caso de canales sensibles a voltaje al aplicar una diferencia de potencial se puede saber cuál es la orientación del canal en la cámara de registro, ya que el canal tiene un "sensor" de voltaje el que "siente" la diferencia de potencial transmembrana. Ya que el canal es sensible al voltaje, habrá voltajes que aumenten o disminuyan la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto, y como se conoce cuál es el lado en que se está aplicando el potencial, se puede determinar con facilidad cuál es el lado intracelular y cuál el extracelular del canal en cuestión.

En este estudio se utilizaron cuatro agentes farmacológicos para caracterizar los canales iónicos presentes, estos son: apamina (SK_{Ca}), caribdotoxina (IK_{Ca} y BK_{Ca}), iberiotoxina (BK_{Ca}) y clotrimazol (IK_{Ca}). Las concentraciones efectivas a las que actúan estos compuestos varían entre especies y entre tejidos en donde están presentes

canales K_{Ca} , y su efecto, en general, es específico en los canales en los cuales actúan. A continuación se presenta una tabla que muestra el rango de concentraciones efectivas que tienen las toxinas usadas en este estudio:

Tabla 1. Concentraciones efectivas de acción de los agentes farmacológicos usados en este estudio.

Compuesto	Pureza	Canal K_{Ca} bloqueado y concentración efectiva
^a rCharybdotoxin. ^b <i>Leiurus q. hebraeus</i> (^c Alomone)	> 99%	BK _{Ca} e IK _{Ca} 10-100 nM
rlberlyotoxin <i>Buthus tamulus</i> (Alomone)	> 99%	BK _{Ca} 1-100 nM
Apamina <i>Apis mellifera</i> (Alomone)	> 98%	SK _{Ca} 1 nM-1 μ M
Clotrimazol (Sigma)		IK _{Ca} 0.5-50 μ M

a r= recombinante
b = especie de la que se aisló
c = proveedor

- **Análisis de datos.**

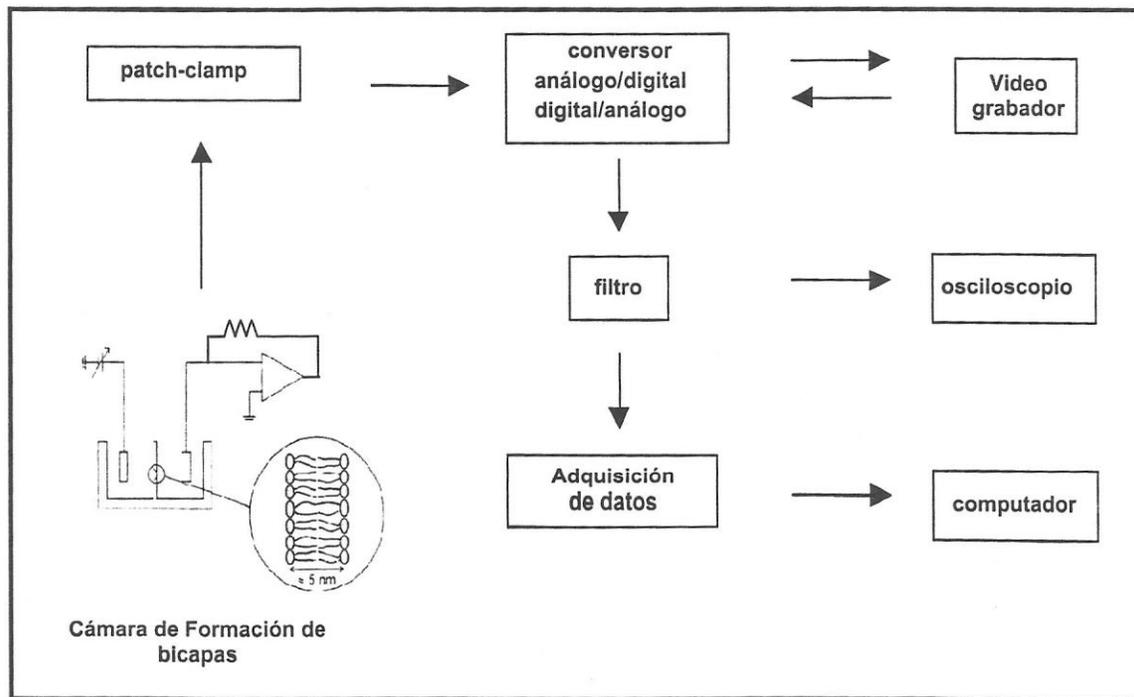
Los registros de corriente se amplificaron y se monitorearon en un osciloscopio, y se grabaron en cintas de video. Para su posterior análisis estos registros fueron debidamente filtrados y transferidos a un computador a través de una interfase de adquisición de datos (Lab Master DMA). El esquema 2 muestra un diagrama de flujo de los registros eléctricos desde que se detecta un canal, hasta su digitalización.

Para la adquisición y el análisis de los datos se utilizó el programa pClamp 6.0 (Axon Instruments). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

Los ajustes de las curvas de la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto (P_0) vs $[Ca^{2+}]$ se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de Hill de la forma:

$$P_0 = \frac{P_{0\text{máx}}}{\left(1 + \frac{K_{0.5}}{[Ca^{2+}]}\right)^n}$$

donde $P_{0\text{máx}}$ es la probabilidad máxima de encontrar el canal en estado abierto dadas las condiciones experimentales, $K_{0.5}$ es el valor de la concentración de calcio a la que la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto es la mitad de la probabilidad máxima, y n es el numero de putativos sitios de unión a Ca^{2+} en dicho canal (numero de Hill). Los gráficos se realizaron utilizando el programa SIGMAplot 8.0 y Microsoft Excel.



Esquema 2.- Diagrama de flujo del sistema de registro de canales iónicos en bicapas planas de fosfolípidos desde que la señal sale de la cámara de registro hasta el computador donde es analizada.

- **Identificación de los canales iónicos presentes en las membranas de los cilios mediante inmunotransferencia.**

Para complementar los estudios electrofisiológicos y evaluar la pureza de las membranas ciliares, los canales iónicos de los cilios se identificaron mediante la técnica de Western blot. Con este propósito se determinó la presencia de canales de K^+ dependientes de Ca^{+2} de alta conductancia, BK_{Ca} , y de baja conductancia, SK_{Ca} , el canal de transducción CNG, la proteína adenilil ciclasa III (ACIII) y la proteína G_{olf} , utilizando los respectivos anticuerpos disponibles para cada especie de canal iónico (Alomone Labs Ltda, SIGMA® y Santa Cruz Biotechnology Inc). Los canales IK_{Ca} no pudieron ser detectados por este método ya que se carece de anticuerpos comercialmente disponibles para este fin.

Para determinar la pureza de la preparación de membranas ciliares, se usó un anticuerpo contra el canal de sodio dependiente de voltaje, ya que este canal no debería estar presente en los cilios olfatorios, pero sí en el resto de la membrana plasmática; y sirvió como criterio de ausencia de contaminación en la preparación de cilios.

La técnica de inmunodetección de proteínas conocida como Western blot consta de varias etapas, que se describen a continuación: las preparaciones de proteínas de membrana de cilios, epitelio desciliado, epitelio entero, bulbo olfatorio y cerebro se sonicaron (en el caso de detección de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca}) 3 veces, 10 segundos cada vez; o se calentaron (detección del canal de sodio, ACIII, CNG, G_{olf}) 3 minutos a $37^{\circ}C$ o por 1 minuto a $100^{\circ}C$. Se cargaron entre 50 y 90 μg de muestra de proteínas totales por carril y se procedió con la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, a 65 V el gel concentrador y 85 V el gel separador.

Para visualizar proteínas totales, un gel se tiñó con azul de Coomasie, y un segundo gel se sometió a una electrotransferencia a papel de nitrocelulosa para la detección con el anticuerpo para la proteína correspondiente. La transferencia se realizó en agitación a 4°C y 100 V por hora y media o por toda la noche a 15 V. Luego de transferido, el gel se tiñó con azul de Coomasie para verificar la transferencia de proteínas, y el papel de nitrocelulosa se tiñó con rojo Ponceau "S", para visualizar las bandas de proteínas transferidas. Luego la membrana se trató con leche descremada al 5% o BSA al 3% (en TTBS o PBS-T) para bloquear sitios inespecíficos que podrían proporcionar una falsa señal. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4°C o dos horas a temperatura ambiente en agitación, con el anticuerpo específico respectivo. Luego se lavaron tres veces, diez minutos cada vez con una solución de PBS-Tween (PBS-T) o TBS-Tween (TTBS) al 0.05% y se incubaron con el anticuerpo secundario, marcado con peroxidasa de rábano, una hora a temperatura ambiente con agitación en la misma solución de bloqueo. Luego las membranas se lavaron tres veces, diez minutos cada vez con PBS-T o TTBS. Para los controles se utilizó anticuerpo preadsorbido con el antígeno para el que fue hecho, si era posible; o bien realizar todo el proceso, pero sin agregar el anticuerpo primario. La detección se efectuó usando un kit de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences) y films Fuji.

- **Expresión de resultados**

Los resultados donde se muestran valores numéricos se muestran como promedio de datos para ese resultado determinado, con el número de datos entre paréntesis precedido por la letra "n", y a continuación va el error estándar de la media para cada dato que se muestra. Los valores calculados a partir de los datos de las curvas I/V y de

$K_{0.5}$ se obtuvieron tomando el conjunto de resultados para cada situación experimental mostrada, y los valores promedio y de dispersión se calcularon utilizando el programa GraphPad Prism 4. Cuando se indica que un resultado es representativo, se muestra el resultado de un experimento, cuya tendencia refleja el comportamiento de todos los experimentos que se indican en el "n" (numero de experimentos). En las curvas de probabilidad de encontrar el canal en estado abierto versus la concentración de calcio, los números entre paréntesis junto a cada punto indican la cantidad de experimentos para dicho valor, y las barras la dispersión del valor. Los resultados se muestran como promedio \pm el error estándar de la media (s.e.m).

RESULTADOS

I.- Optimización del método de obtención de una preparación altamente purificada de membrana de cilios de neuronas olfatorias.

Para el estudio electrofisiológico, en bicapas, de los canales presentes en los cilios de las neuronas olfatorias de rata era de fundamental importancia contar con una fracción de membranas ciliares, lo más pura y enriquecida posible, de modo de asegurar que los canales iónicos registrados provienen de membranas de los cilios de las neuronas y no de otras membranas de la célula como la dendrita o el soma. Por lo tanto, uno de los objetivos centrales de esta tesis fue optimizar un método de preparación de cilios que cumpliera con las dos condiciones recién mencionadas.

Se han descrito fundamentalmente dos técnicas para la obtención de las membranas de cilios olfatorios: una consiste en someter las células a un shock de alta concentración de Ca^{2+} (10 mM), proceso en el cual se descilian las neuronas. El otro método, que se describe en detalle la sección Materiales y Métodos, consiste en desciliar las células utilizando un protocolo de agitación mecánica. Aunque ambos métodos pueden ser utilizados eficientemente, permitiendo un alto grado de enriquecimiento en membranas ciliares, en nuestro estudio optamos por este último dado que un shock de alta concentración de Ca^{2+} podría activar proteasas y mecanismos de asociación de proteínas mediadas por Ca^{2+} (actividad quinasa y/o fosfatasa, entre otras). Durante el desarrollo de esta etapa de la tesis se ensayaron algunos cambios en las condiciones de ruptura mecánica por agitación, de sonicación, así como en las soluciones iónicas, a fin de lograr el mejor rendimiento y la mayor pureza posible. Las condiciones óptimas logradas están descritas en la sección Materiales y Métodos.

El grado enriquecimiento y pureza de la fracción de membranas de cilios se analizó por el método de inmunodetección conocido como Western blot (ver Materiales y Métodos).

Para determinar si la preparación de membranas obtenidas mediante el método de agitación mecánica estaba efectivamente enriquecida en membranas de cilios olfatorios se investigó la presencia en ella de proteínas de membrana específicos de estos organelos. Primero se estudió la presencia de la adenilil ciclasa III (ACIII), una proteína específica de cilios olfatorios involucrada en la cascada de señalización gatillada por olor (convierte ATP en AMPc). Con este objetivo se realizó un análisis por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce el carboxilo terminal de esta enzima (Figura 3).

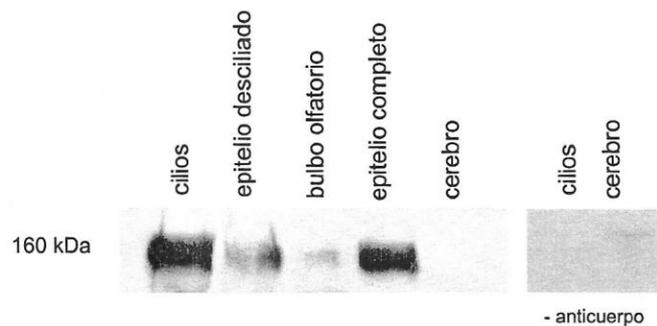


Figura 3.- Análisis mediante inmunotransferencia de fracciones de membrana de cilios olfatorios, epitelio desciliado, bulbo olfatorio, epitelio olfatorio (control positivo) y cerebro (control negativo) usando un anticuerpo policlonal anti ACIII (1:1000). A la derecha se observa el control sin anticuerpo primario. La marca observada corresponde a un tamaño estimado de 160 kDa.

Como se muestra en la Figura 3, aparece una intensa banda en el carril de la fracción ciliar. Esta banda también se observa en el epitelio completo. La marca observada en la fracción de epitelio desciliado se debe probablemente a que los

epitelios no fueron completamente desciliados durante la agitación mecánica. Como era de esperar, no se observa marca en la preparación de cerebro y en la inmunodetección sin anticuerpo primario realizada en fracciones de membrana ciliar y cerebro (control negativo). Por lo tanto, la inmunodetección de ACIII mostró un alto grado de enriquecimiento en cilios de la preparación de membrana obtenida mediante el método de agitación.

Adicionalmente y para verificar el enriquecimiento, en cilios olfatorios, de la preparación de membranas, se probó un anticuerpo contra otra proteína que forma parte de la maquinaria de señalización de estos organelos, como el canal de transducción CNGC. En la Figura 4 se muestra la detección de esta proteína en la preparación de cilios mediante análisis por inmunotransferencia.

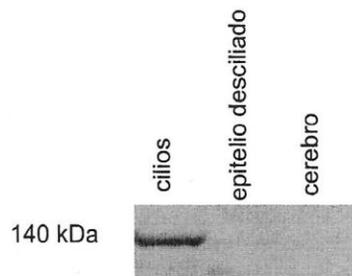


Figura 4.- Inmunodetección del canal CNG utilizando un anticuerpo policlonal anti-CNG 1:600. La fracción de cerebro se utilizó como control negativo. La fracción cilios es por sí misma el control positivo. Se cargaron 70 μ g de proteínas totales por carril. La marca observada corresponde a un tamaño estimado de 140 kDa.

Puede apreciarse una intensa marca en el carril correspondiente a la fracción ciliar corroborando su enriquecimiento en otro de los componentes moleculares de la maquinaria de transducción olfatoria. En el carril con la fracción de membrana de cerebro (control negativo), no aparece marca. En la fracción de epitelio desciliado no

se observa marca, indicando la eficiencia de la desciliación lograda con el método utilizado en esta preparación.

Para determinar el grado de contaminación de la preparación de membranas obtenidas mediante el método de agitación mecánica utilizamos un anticuerpo policlonal anti-canal de Na^+ activado por voltaje, $\text{Na}_v1.3$, que reconoce un lazo intracelular entre los dominios I y II de la proteína (Figura 5). De acuerdo a los antecedentes de la literatura esta proteína está ausente en la fracción de membranas de cilios. Hasta ahora no se ha demostrado su presencia en estos organelos y no existen evidencias de que canales de Na^+ de este tipo formen parte de la maquinaria de transducción de señales, función fundamental de los cilios olfatorios.

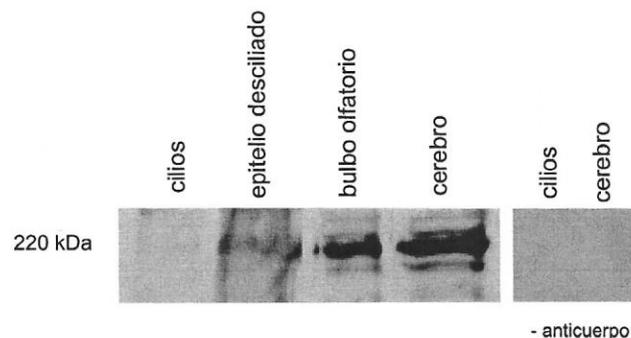


Figura 5.- Análisis por inmunotransferencia de fracciones de membrana de los cilios olfatorios, epitelio desciliado, bulbo olfatorio y cerebro (control positivo) usando un anticuerpo anticanal de sodio dependiente de voltaje (1:300). A la derecha se muestra el control sin anticuerpo primario. La proteína migra a un tamaño estimado correspondiente a 220 kDa.

En la Figura 5 se aprecia que en el carril correspondiente a la fracción de membranas de cilios no se observa marca. En cambio, en los carriles que contienen las fracciones de epitelio desciliado, bulbo olfatorio y cerebro sí se detectó la presencia

de dicha proteína. Se utilizó como control negativo, inmunotransferencia de fracciones de membranas ciliar y de cerebro, sin anticuerpo primario.

Este resultado indica que la fracción de membrana ciliar obtenida por este método está libre de contaminación, dentro del límite de detección de la técnica, con otros tipos de membrana, incluyendo membrana plasmática de la parte desciliada de la neurona olfatoria, o sea del soma y/o la dendrita.

Estos tres ensayos de inmunotransferencia permitieron comprobar que la fracción de membranas de cilios de neuronas olfatorias de rata obtenida con el método de agitación mecánica está altamente enriquecida en componentes moleculares del sistema de transducción olfatoria, tales como la adenilil ciclase III y el canal de transducción CNGC. Además la fracción ciliar muestra un alto grado de pureza, sin presentar una contaminación apreciable por otras membranas del epitelio, ya que no se detectó en ella la presencia del canal de sodio activado por voltaje.

Como conclusión se puede decir que el método utilizado para la obtención de fracciones de membranas de cilios olfatorios de rata permitió obtener una fracción altamente enriquecida en cilios olfatorios y con una contaminación indetectable con otras membranas. Esto valida el uso de dichas fracciones de membranas en los experimentos de incorporación en bicapas planas de fosfolípidos, para caracterizar los canales iónicos de los cilios olfatorios.

II.- Registro de canales de K^+ procedentes de una fracción de membrana ciliar, incorporados en bicapas planas de fosfolípidos.

Utilizando la técnica de reconstitución de canales en bicapas se identificaron, según su conductancia, tres tipos de canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca})

en las membranas de los cilios olfatorios de rata, los que se agruparon: en canales de baja, intermedia y alta conductancia. Cada uno de estos canales se caracterizó biofísica y farmacológicamente.

II.1 Canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de baja conductancia, SK_{Ca} :

- **Identificación electrofisiológica de canales SK_{Ca}**

Los canales SK_{Ca} se registraron en soluciones simétricas de K^+ 100 mM y su conductancia unitaria se estimó a partir de la curva corriente versus voltaje, obteniéndose un valor de 16.3 ± 0.7 pS ($n = 6$).

En la Figura 6 se muestran registros de corrientes de canal único de un canal SK_{Ca} representativo, presente en la fracción purificada de membrana de cilios olfatorios de rata, a un potencial de 60 mV y a 3 concentraciones distintas de calcio. A una concentración de Ca^{2+} 5 μ M se observan escasas fluctuaciones de corriente, que indican la presencia del canal. Al aumentar el calcio libre por sobre los 20 μ M incrementan las fluctuaciones de corriente hacia el estado abierto y la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto (P_0). A una concentración de 60 μ M Ca^{2+} el canal presenta alta actividad.

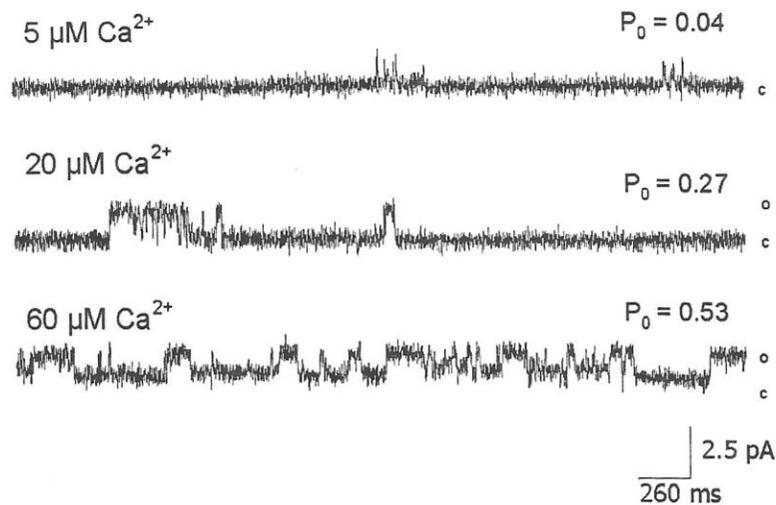


Figura 6.- Registro de corrientes unitarias de un canal de SK_{Ca} a distintas concentraciones de calcio. El voltaje aplicado fue de 60mV. Los registros fueron obtenidos en soluciones simétricas de KAc 100 mM.

Se determinó la variación de la fracción del tiempo que el canal permanece en estado abierto (P_0) en función de la concentración de Ca^{2+} . En la Figura 7 se grafican los valores de P_0 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} , a un voltaje aplicado de 60 mV. Del ajuste de los puntos experimentales a la ecuación de Hill se obtuvo un valor para $K_{0.5}$ de 40 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ y $n = 2.84$ ($r^2 = 0.997$; $p < 0.05$).

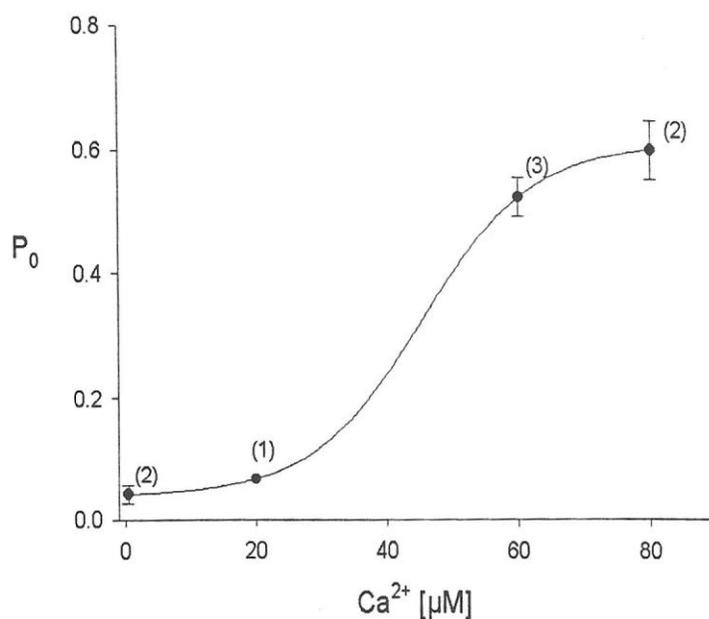


Figura 7.- Efecto del Ca²⁺ sobre P₀ para el canal SK_{Ca}. Los puntos experimentales fueron ajustados a una ecuación de Hill. Se obtuvo un valor de K_{0.5} = 40 µM Ca²⁺ y n = 2.84. El experimento fue realizado en condiciones simétricas de KAc 100 mM a un voltaje de 60 mV.

El valor de K_{0.5} obtenido para este canal es alto comparado con los valores reportados en la literatura para canales SK_{Ca} en otras células que lo sitúan en el orden submicromolar, aunque está de acuerdo con los valores obtenidos por Delgado y cols 2003, en cilios olfatorios, mediante patch clamp.

En la Figura 8 se muestra la relación corriente-voltaje representativa, para este canal. De la pendiente de la curva I vs V se obtuvo un valor de conductancia de 16 pS, valor que está en el rango de los canales de potasio de baja conductancia.

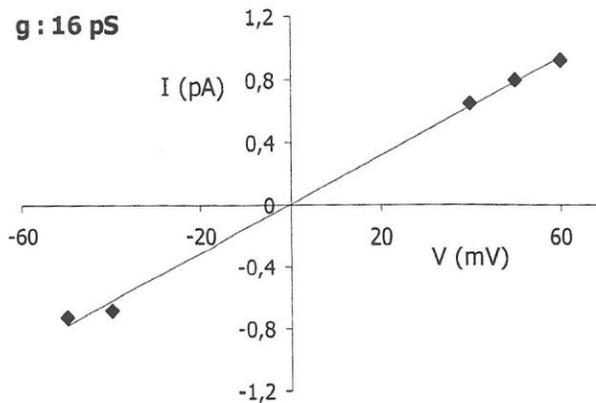


Figura 8. – Curva corriente-voltaje representativa de un total de 6 experimentos, para el canal SK_{Ca} que se muestra en la Figura 6. Los puntos experimentales fueron ajustados a una recta por regresión lineal. La pendiente de la curva proporciona una conductancia de 16 pS.

Respecto a la sensibilidad farmacológica, se ha descrito que en las células excitables (principalmente en el sistema nervioso central) existen canales SK_{Ca} sensibles e insensibles a la toxina apamina. El canal SK_{Ca} de los cilios olfatorios es sensible a apamina, como queda en evidencia en los registros de la Figura 9. La adición de apamina 22 nM bloqueó casi completamente el paso de corriente a través del canal.

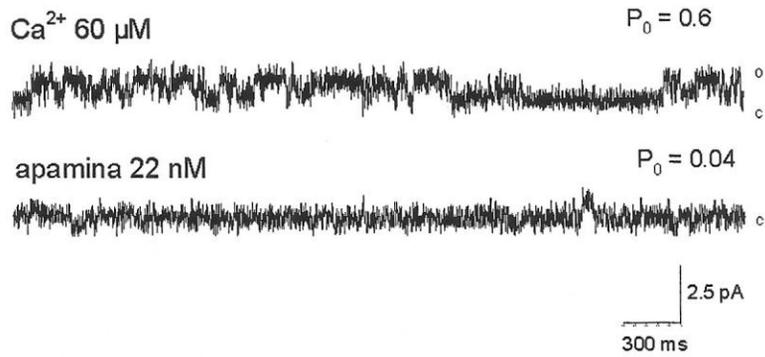


Figura 9.- Efecto de apamina, sobre la actividad del canal SK_{Ca} registrado en bicapas planas de fosfolípidos. El experimento fue realizado en condiciones simétricas de KAc 100 mM. El voltaje aplicado fue de 60 mV y la concentración de Ca²⁺ era 60 μM.

En la Figura 10 se muestra un gráfico de barras que ilustra el valor de P_o del canal antes (~0.6) y después (~0) de ser expuesto a apamina.

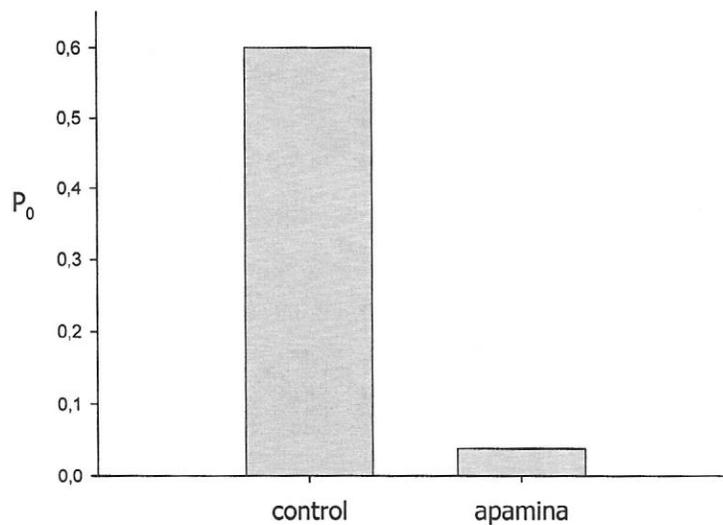


Figura 10.- Disminución de la fracción de tiempo abierto del canal SK_{Ca} de la Figura 9. Los valores se obtuvieron a un potencial aplicado de 60 mV y Ca²⁺ 60 μM. El P_o disminuye notablemente cuando el canal es expuesto a apamina 22 nM.

- **Detección de los canales SK_{Ca} mediante inmunotransferencia.**

Además de los registros electrofisiológicos para la identificación de canales SK_{Ca}, se utilizó inmunotransferencia para determinar si el canal está en las fracciones de membrana ciliar y otras membranas de células excitables. La Figura 11 muestra el resultado de un experimento de inmunodetección del canal SK3, uno de los subtipos de canales SK_{Ca}, utilizando un anticuerpo policlonal anti-SK3, que reconoce el amino terminal de la proteína. Se observa una marca en los carriles correspondientes a la fracción de cilios olfatorios, epitelio desciliado, bulbo olfatorio y cerebro, indicando la presencia del canal SK3 en todas estas membranas. De acuerdo a lo esperado, se observó marca en la fracción de músculo esquelético denervado pero no en la fracción de músculo innervado. Esta determinación se realizó con un anticuerpo policlonal anti-SK3 que reconoce el extremo amino terminal de este canal. Este resultado indica que en la fracción de preparación de membrana de cilios olfatorios está presente el canal SK3.

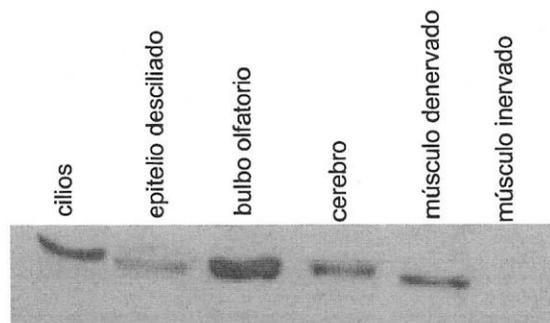


Figura 11.- Detección por inmunotransferencia del canal SK3 en membranas de cilios olfatorios de rata. La presencia del canal se visualiza también en el carril de la fracción desciliada, bulbo olfatorio y cerebro. Se usaron preparaciones de membrana de músculo esquelético denervado (control positivo) y músculo esquelético innervado (control negativo). El anticuerpo se usó a una dilución de 1:600.

Se concluye que hay canales SK_{Ca} presentes en los cilios de las neuronas olfatorias de rata, con una conductancia de ~ 16 pS, sensibles a Ca^{2+} , bloqueados por apamina y que son independientes del voltaje aplicado (no mostrado). Adicionalmente se concluye que al menos el subtipo SK3 de los canales SK_{Ca} , está en los cilios olfatorios.

II.2 Canales de potasio dependiente de calcio de conductancia intermedia IK_{Ca} :

Los canales IK_{Ca} han sido identificados en varios tipos celulares. Existe una amplia distribución de ellos y altos niveles de expresión en tejidos ricos en epitelio y endotelio. Están involucrados en procesos de regulación de volumen celular, regulación osmótica, proliferación celular y respuesta inmune, entre otros (Vergara y cols, 1998; Jensen y cols, 2001). En esta categoría se han incluido canales que presentan conductancias entre 25 y 100 pS. En relación con sus propiedades farmacológicas, estos canales se caracterizan por ser insensibles a apamina e iberiotoxina (IbTx) y pueden ser bloqueados por caribdotoxina (ChTx) o clotrimazol (CLT).

En los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se identificaron de manera reproducible cuatro diferentes canales IK_{Ca} , que presentaban conductancias en un rango desde 30 a 80 pS y que exhibían diferentes propiedades farmacológicas y de dependencia de calcio.

En esta presentación de resultados se subdividen de manera arbitraria los cuatro canales IK_{Ca} , como canal IK_{Ca-1} a IK_{Ca-4} .

II.2A.- Canal $I_{K_{Ca-1}}$

Se denominó $I_{K_{Ca-1}}$ a un canal que se caracteriza por tener dos estados de conductancias, de 30.3 ± 1.4 y de 50.5 ± 1.9 pS ($n = 7$), los que son dependientes de calcio y bloqueados por CLT, pero no por ChTx.

En la Figura 12 se muestran registros de corriente unitaria del canal $I_{K_{Ca-1}}$ en condiciones simétricas de KAc y distintas concentraciones de Ca^{2+} . Como se observa los tiempos que el canal $I_{K_{Ca-1}}$ permanece en estado abierto dependen de la concentración de Ca^{2+} .

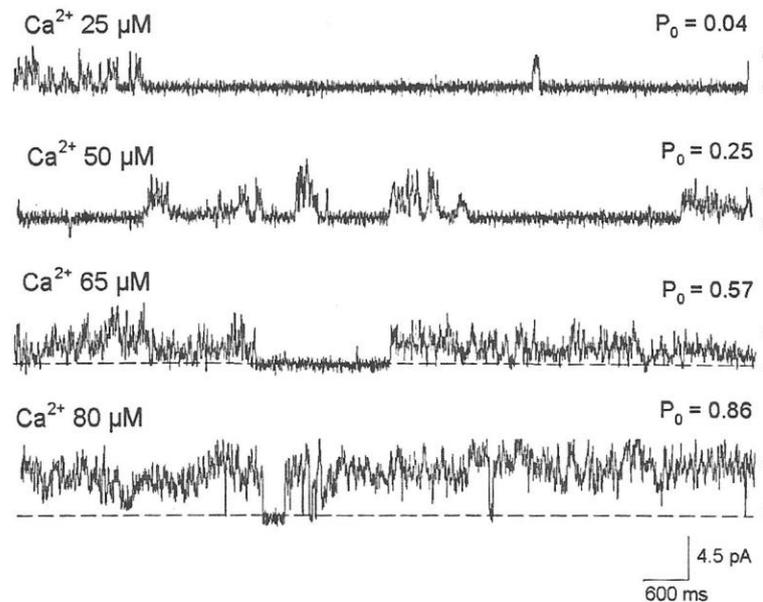


Figura 12.- Registros de corriente del canal $I_{K_{Ca-1}}$ a distintas concentraciones de Ca^{2+} . Los registros se realizaron a un potencial de 50 mV en soluciones simétricas de KAc 100 mM. La línea punteada indica el estado cerrado del canal.

El canal $I_{K_{Ca-1}}$ presenta dos estados de conductancia, lo que implica que existen dos conformaciones de la proteína en los que el canal está abierto al paso de los iones K^+ . En la Figura 13 se muestra un registro del canal $I_{K_{Ca-1}}$ a dos escalas

temporales distintas. Las líneas punteadas O_1 y O_2 indican los dos estados abiertos que presenta este canal.

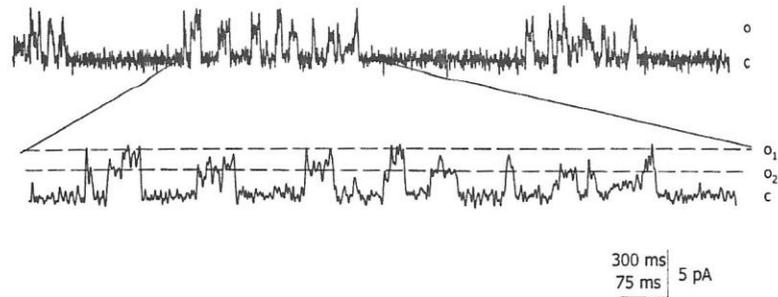


Figura 13.- Registros de corrientes unitarias para el canal IK_{Ca-1} observado en la figura 12 mostrando dos niveles de conductancia. Parte del registro superior ha sido expandido para visualizar los dos niveles de estado abiertos. El registro se realizó a un potencial de 50 mV y Ca^{2+} 50 μ M, en soluciones simétricas de KAc 100 mM.

Como queda de manifiesto en la Figura 13, el canal IK_{Ca-1} presenta dos estados de conductancia claramente distinguibles entre sí. La relación corriente-voltaje representativa, para ambas conductancias se muestra en la Figura 14. Los puntos experimentales se ajustaron a una recta y de las pendientes se determinaron conductancias de ~ 30 y ~ 50 pS para los estados O_1 y O_2 respectivamente ($r^2 = 0.985$ y $p < 0.05$), conductancias que están en el rango de un canal de conductancia intermedia.

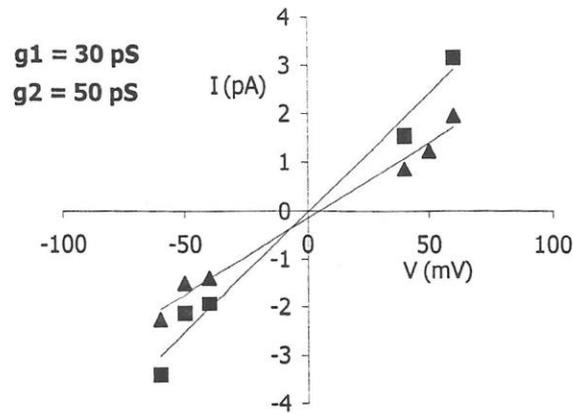


Figura 14.- Relación corriente-voltaje representativa de un total de 7 experimentos, para los estados de conductancia del canal IK_{Ca} 1. Los puntos experimentales que fueron ajustados a una recta por regresión lineal proporcionan valores de conductancia de 30 y 50 pS para los estados O_1 y O_2 , respectivamente. La curva se determinó en condiciones simétricas de KAc 100 mM y Ca^{2+} 50 μ M.

Como se aprecia en los registros de la Figura 13, la fracción de tiempo abierto del canal IK_{Ca} -1 es dependiente de la concentración de Ca^{2+} . La Figura 15 muestra la relación entre P_0 y Ca^{2+} para el canal. El ajuste de la curva a una ecuación de Hill un valor de $K_{0.5} = 60 \mu$ M Ca^{2+} y $n = 6.56$ ($r^2 = 0.988$; $p < 0.05$).

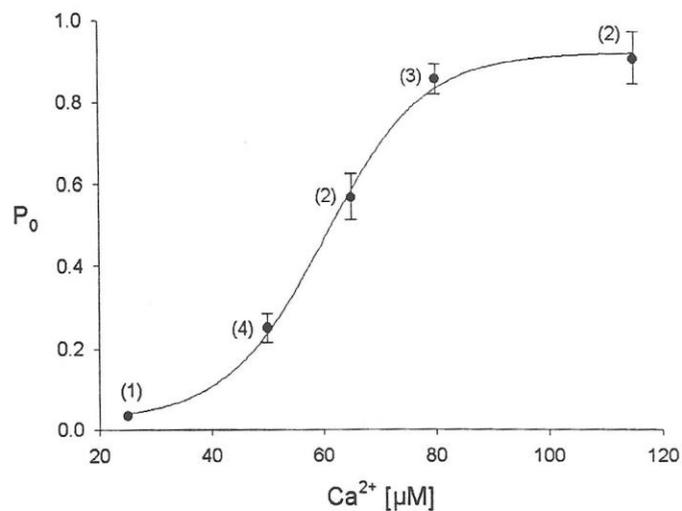


Figura 15.- Fracción del tiempo que el canal IK_{Ca-1} permanece abierto (P_0) en función de la concentración de Ca^{2+} , para el estado de apertura O_2 , a un potencial aplicado de 50 mV. Los puntos experimentales se ajustaron a una ecuación de Hill.

Al igual que los canales SK_{Ca} , el valor de 60 μM para la $K_{0.5}$ obtenido es ostensiblemente más alto que el descrito en la literatura para canales IK_{Ca} de otros tejidos, sin embargo, está en el rango encontrado por Delgado y cols. 2003, en parches escindidos de cilios olfatorios.

Respecto a la sensibilidad farmacológica el canal IK_{Ca-1} es insensible a ChTx 25 nM (no mostrado), sin embargo es sensible a CLT como se aprecia en la Figura 16.

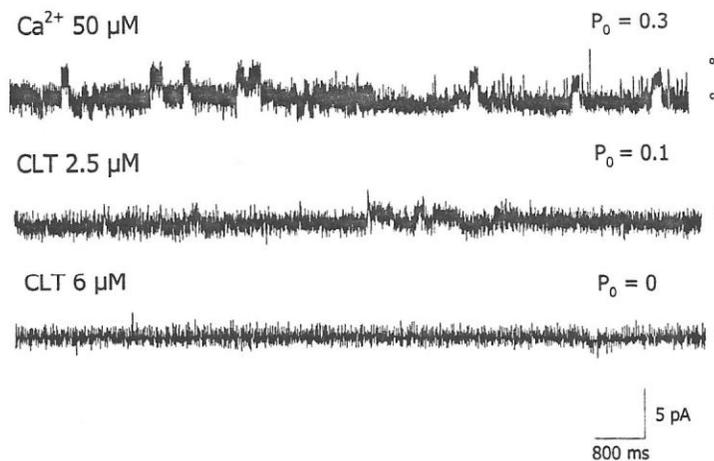


Figura 16.- Registros de corriente unitaria del canal $I_{K_{Ca-1}}$ en presencia de CLT 2.5 y 6 μM . El experimento se realizó en soluciones simétricas de KAc 100 mM y Ca^{2+} 50 μM a un potencial de 40 mV.

La variación del valor de P_0 por efecto del antimicótico, se ilustra en la Figura 17 donde se observa que los tiempos de permanencia en estado abierto para este canal son sensibles a CLT, ya que la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto, disminuye ostensiblemente en presencia del compuesto en cuestión. Esta determinación se logró realizar en dos ocasiones, obteniéndose resultados similares.

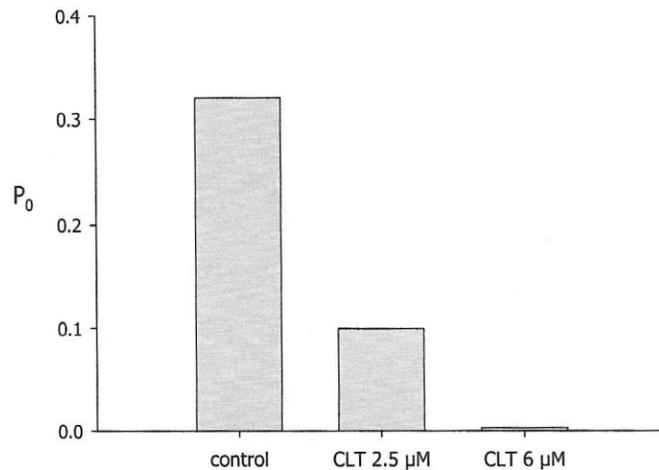


Figura 17.- Variación de P_0 al exponer al canal IK_{Ca-1} a concentraciones de 2.5 y 6 μM de CLT. Se observa una drástica disminución en la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto al ser expuesto al antimicótico. Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 16.

Se concluye que el canal IK_{Ca-1} es un canal de conductancia intermedia, con dos estados abiertos al paso de iones, los que son dependientes de Ca^{2+} , los valores de P_0 no cambian en un rango de potencial que va entre -60 y 60 mV (no mostrado), son sensibles a CLT e insensibles a ChTx.

II.2B.- Canal IK_{Ca-2}

Se denominó IK_{Ca-2} a un canal que se caracterizó por tener una conductancia de 59.6 ± 1.4 pS ($n=5$) y ser sensible al antimicótico clotrimazol, bloqueador específico de los canales IK_{Ca} , e insensible a ChTx, presentando además una cinética cualitativamente lenta.

En la Figura 18 se muestran registros de corriente unitaria para el canal IK_{Ca-2} en condiciones asimétricas de KCl 20/200 mM. Se observa que la actividad de este

canal es independiente de potencial eléctrico, su P_0 prácticamente no cambia en el rango entre 0 y 40 mV. Los registros se realizaron en presencia de $20 \mu\text{M Ca}^{2+}$, donde el canal permanece la mayor parte del tiempo en el estado conductor, es decir, abierto al paso de iones.

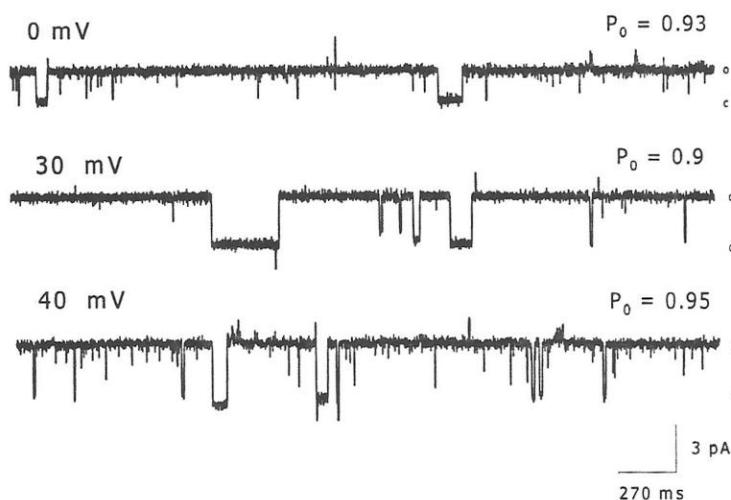


Figura 18.- Registros de corrientes unitarias del canal $\text{IK}_{\text{Ca-2}}$ a distintos potenciales. Se observa que el canal permanece la mayor parte del tiempo en estado abierto. El registro se realizó en condiciones asimétricas de KCl 20/200 mM y Ca^{2+} de $20 \mu\text{M}$.

El canal $\text{IK}_{\text{Ca-2}}$ no es dependiente de potencial en las condiciones descritas. No se determinó la $K_{0.5}$ para $\text{IK}_{\text{Ca-2}}$ ya que no fue posible obtener registros de este canal a valores de concentración de Ca^{2+} que permitan realizar una curva P_0 versus Ca^{2+} .

La Figura 19 muestra la relación corriente versus voltaje representativa para el canal $\text{IK}_{\text{Ca-2}}$. La pendiente de la recta indica que el canal tiene un valor de conductancia de $\sim 60 \text{ pS}$, es por tanto un canal de conductancia intermedia.

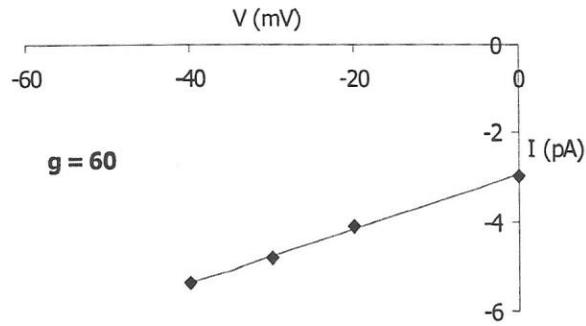


Figura 19.- Relación corriente-voltaje representativa de un total de 5 experimentos, para el canal $I_{K_{Ca-2}}$. Los puntos experimentales fueron ajustados a una recta por regresión lineal. La pendiente proporciona un valor de conductancia de 60 pS. Los datos se obtuvieron en soluciones de KCl 200/20 y Ca^{2+} 20 μ M.

El canal $I_{K_{Ca-2}}$ es sensible a CLT como se muestra en la Figura 20. Como puede apreciarse, la actividad del canal es nula a CLT 1 μ M.

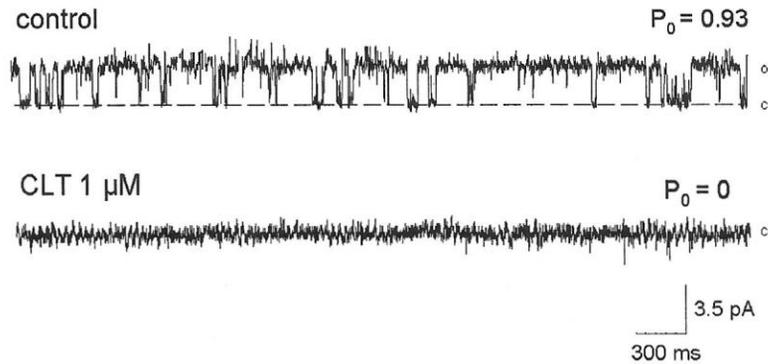


Figura 20.- El canal $I_{K_{Ca-2}}$ es sensible a CLT. El registro superior ilustra la situación control y el registro inferior muestra el comportamiento del canal luego de agregar CLT 1 μM . Los registros se obtuvieron en condiciones simétricas de KAc 100 mM y Ca^{2+} 50 μM , a un potencial de 40 mV.

Como se observa el valor de P_0 del canal disminuye dramáticamente luego de aplicar el antimicótico, situación que se ilustra en la Figura 21. Esta determinación se logró realizar en dos ocasiones, obteniéndose resultados similares.

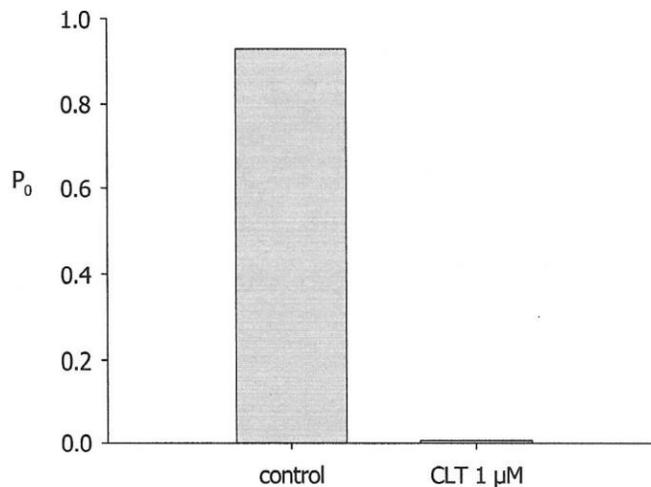


Figura 21.- Disminución de P_0 para el canal $I_{K_{Ca-2}}$ en presencia de clotrimazol. El valor cambia desde ~ 0.9 a ~ 0 .

A su vez este canal es insensible a ChTx 2 y 6 nM, como se ilustra en la Figura 22. Sin embargo, no hay que descartar que este canal pueda ser sensible a la toxina en concentraciones más altas.

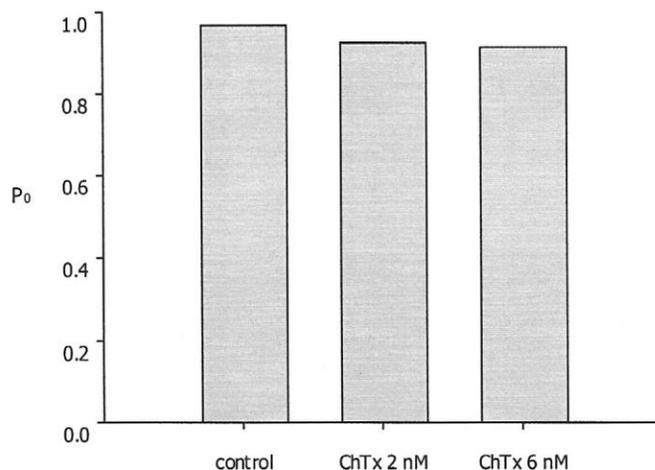


Figura 22.- Variación de la fracción de tiempo que el canal IK_{Ca-2} permanece en estado abierto luego de ser sometido a dos concentraciones de ChTx. La toxina casi no afecta el P_0 para este canal a concentraciones de 2 y 6 nM. El experimento se realizó en Ca^{2+} 50 μ M y soluciones simétricas de KAc 100 mM.

Los experimentos con toxinas se hicieron en soluciones con Ca^{2+} 50 μ M, en estas condiciones el canal presentaba un valor de P_0 alto (superior a 0.9) al igual que con Ca^{2+} 20 μ M. Al no contar con valores menores de Ca^{2+} no se realizó una curva P_0 vs Ca^{2+} , y dada la alta fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto, los datos mostrados hacen suponer que este canal es insensible a Ca^{2+} ya que el valor de P_0 no se modifica por dicho ion. Sin embargo, considerando que este canal es sensible a clotrimazol, una característica de los canales IK_{Ca} , se puede especular que su activación por calcio presenta una sensibilidad tal que a 20 μ M se encuentra saturado, pudiendo tratarse de un canal con mayor sensibilidad a Ca^{2+} que los

descritos previamente. En el trabajo de Delgado y cols., tampoco fue posible realizar una curva de dependencia de calcio para este canal, sin embargo, los valores de conductancia y aspecto cinético del canal encontrados en esta tesis, están en concordancia con los encontrados en dicho trabajo.

De los antecedentes expuestos, se concluye que IK_{Ca-2} es un canal de potasio dependiente de calcio de conductancia intermedia, sensible a clotrimazol, e insensible a ChTx hasta una concentración de 6 nM.

II.2C.-Canal IK_{Ca-3}

Un tercer tipo de canales IK_{Ca} , denominados IK_{Ca-3} , presentaron una conductancia de 80.2 ± 1.2 pS ($n=5$) y dependencia de Ca^{2+} . En este tipo de canales no fue posible determinar la sensibilidad a toxinas. Los registros se hicieron, en general, en condiciones simétricas de KAc 100 mM.

En la Figura 23 se muestra registros de corriente unitaria para el canal IK_{Ca-3} a distintos potenciales. El tiempo de permanencia en los estados abiertos aumenta a medida que el potencial se hace más positivo. La cinética de este canal es bastante parecida a la del IK_{Ca-2} , sin embargo, este canal tiene una conductancia de mayor valor, como se desprende de la pendiente de la gráfica de la Figura 24. La conductancia del canal es de ~ 80 pS, por ende corresponde a un canal de conductancia intermedia.

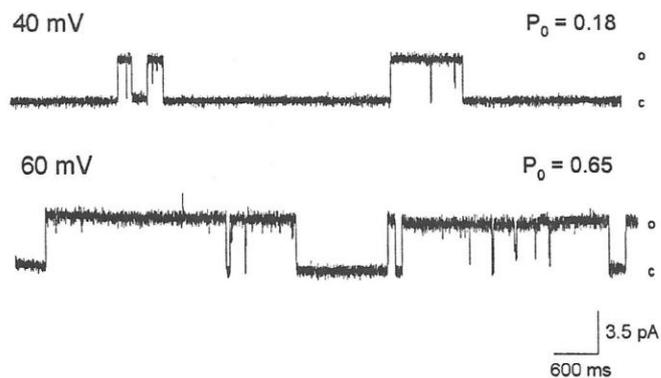


Figura 23.- Registros de corrientes unitarias del canal I_{KCa-3} a dos distintos potenciales. A medida que el voltaje se hace más positivo el canal permanece mayor tiempo en el estado abierto (o). El experimento se realizó en Ca^{2+} 20 μ M y condiciones simétricas de KAc 100 mM.

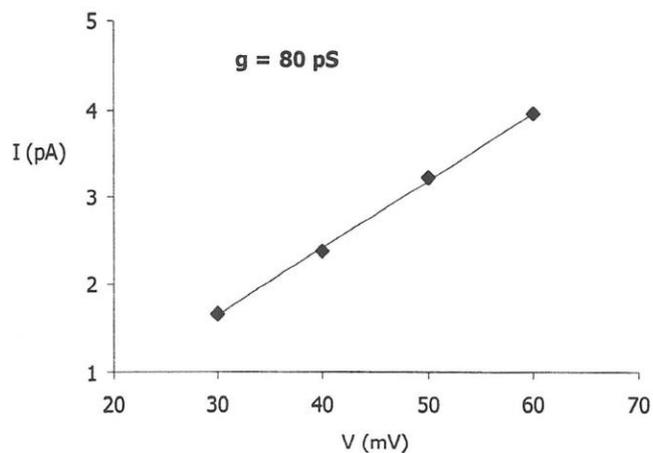


Figura 24.- Relación corriente-voltaje representativa de un total de 5 experimentos, para el canal I_{KCa-3} . Los puntos experimentales fueron ajustados a una recta por regresión lineal. La pendiente de la curva revela que el canal tiene una conductancia de 80 pS. Los datos se obtuvieron en condiciones asimétricas de K^+ 200/20 mM.

El canal $I_{K_{Ca-3}}$ es dependiente de la concentración de Ca^{2+} como se observa en los registros de corriente de canal único en la Figura 25.

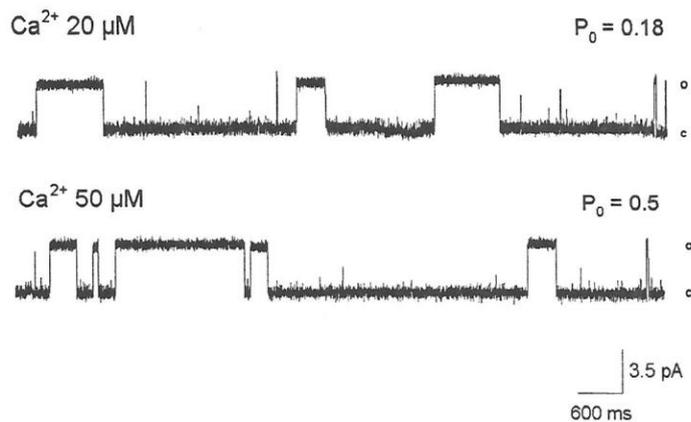


Figura 25.- Registros de corriente unitaria del canal $I_{K_{Ca-3}}$ mostrando la dependencia de Ca^{2+} . Los registros se hicieron en condiciones simétricas de KAc 100 mM a 60 mV.

La fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto respecto a la concentración de Ca^{2+} se grafica en la Figura 26. Del ajuste de la curva a una ecuación de Hill se obtuvo un valor de $K_{0.5}$ de 36 μ M Ca^{2+} y $n = 1$ ($r^2 = 0.988$ y $p < 0.05$).

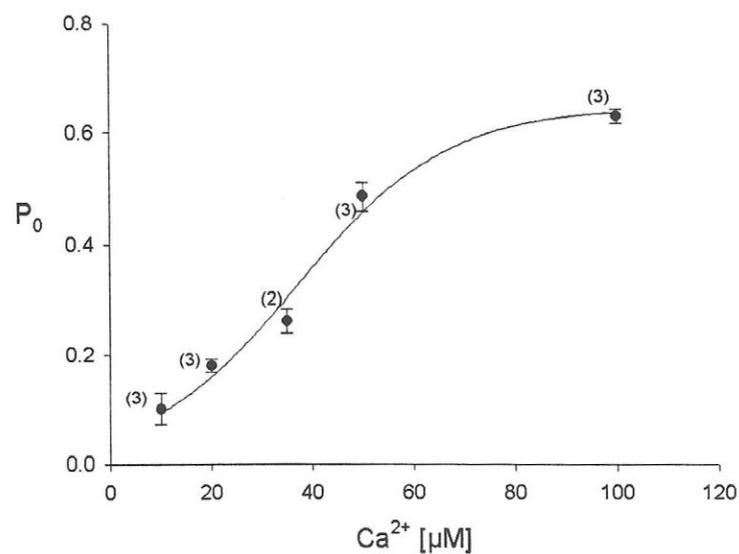


Figura 26.- Dependencia de la fracción de tiempo abierto respecto a la concentración de calcio para el canal IK_{Ca-3} . Los puntos experimentales fueron ajustados a una ecuación de Hill. El valor de $K_{0.5}$ obtenido es $36 \mu M Ca^{2+}$ y $n = 1$

Se concluye que el canal IK_{Ca-3} , es una canal de conductancia intermedia, dependiente del potencial y de Ca^{2+} .

II.2D.-Canal IK_{Ca-4}

Otro tipo de canal IK_{Ca} registrado en la preparación de membranas ciliares, es aquel al que se denominó canal IK_{Ca-4} . Éste presentaba una conductancia de $50.4 \pm 2.1 pS$ ($n = 8$), dependencia de calcio y sensibilidad a ChTx.

En la Figura 27 se muestran registros de corriente unitaria para el canal IK_{Ca-4} , en soluciones con $Ca^{2+} 50 \mu M$. Se puede observar que su cinética es dependiente del

potencial, ya que los tiempos promedios que el canal permanece en los estados abierto o cerrado, son de mayor duración, al aplicar potenciales más negativos.

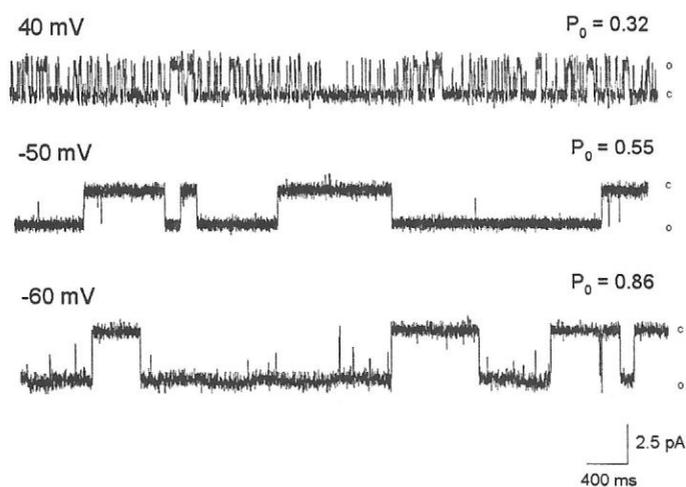


Figura 27.- Registros de corriente unitaria para el canal IK_{Ca-4} a distintos potenciales. Se observa que a medida que la diferencia de potencial se hace más negativa, el canal permanece más tiempo en estado abierto (o). El registro se realizó en soluciones simétricas de KAc 100 mM y Ca^{2+} de 50 μ M.

La conductancia del canal IK_{Ca-4} fue determinada de la relación corriente versus voltaje, en la Figura 28 se muestra una gráfica representativa desde cuya pendiente se desprende que el canal IK_{Ca-4} tiene una conductancia de ~ 50 pS, es decir es un canal de conductancia intermedia.

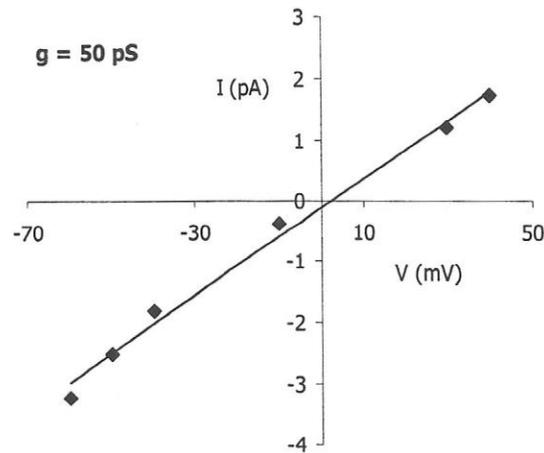


Figura 28.- Relación corriente-voltaje representativa de un total de 8 experimentos, para el canal $I_{K_{Ca-4}}$. Los puntos experimentales se ajustaron a una recta por regresión lineal. La pendiente de la recta arrojó un valor de 50 pS para la conductancia del canal.

La apertura del canal $I_{K_{Ca-4}}$ es dependiente de Ca^{2+} como se observa en la Figura 29, ya que al aumentar la concentración de Ca^{2+} los tiempos de permanencia en el estado abierto aumentan.

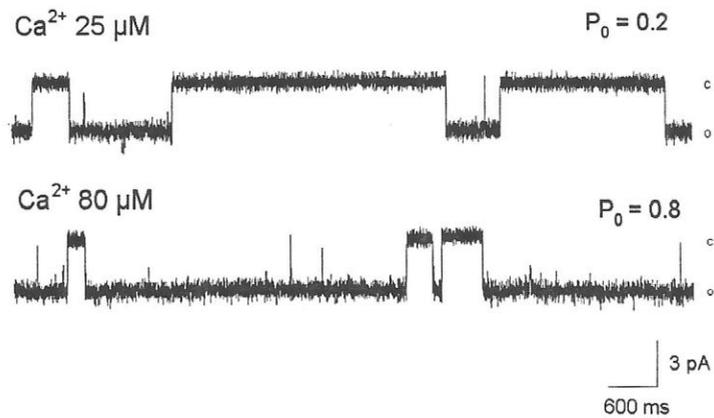


Figura 29.- Registros del canal $I_{K_{Ca-4}}$ mostrando su dependencia de Ca^{2+} . El experimento se realizó en condiciones simétricas de KAc 100 mM a un potencial de -60 mV.

En la Figura 30 se grafica la probabilidad de encontrar el canal abierto respecto a la concentración Ca^{2+} . La $K_{0.5}$ calculada para este para este canal fue de $43 \mu\text{M Ca}^{2+}$ y $n = 2$ ($r^2 = 0.993$; $p < 0.05$).

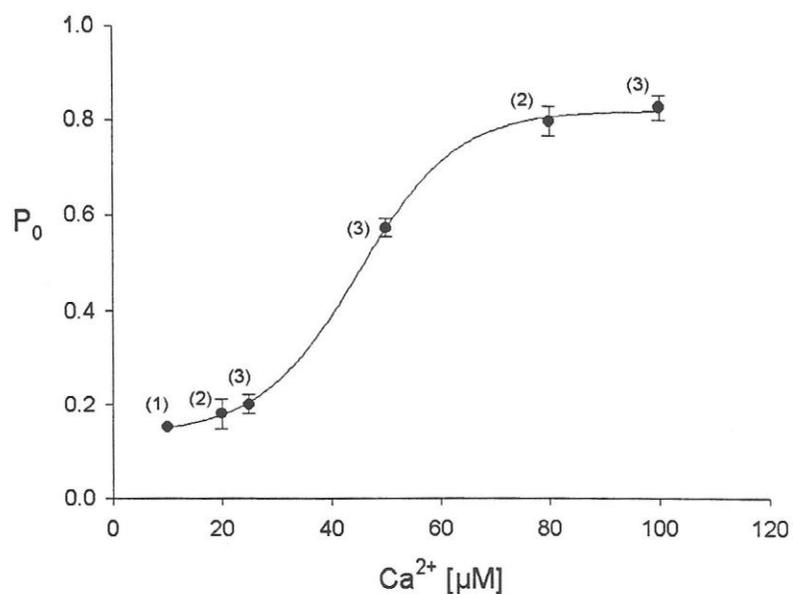


Figura 30.- Curva de dependencia de P_0 respecto a la concentración de calcio para el canal $\text{IK}_{\text{Ca}-4}$. Los puntos experimentales fueron ajustados a una ecuación Hill. La $K_{0.5}$ para este canal fue de $43 \mu\text{M Ca}^{2+}$ y $n = 2$.

El estudio farmacológico indicó que el canal $\text{IK}_{\text{Ca}-2}$ es sensible a ChTx, como se ilustra en los registros de la Figura 31.

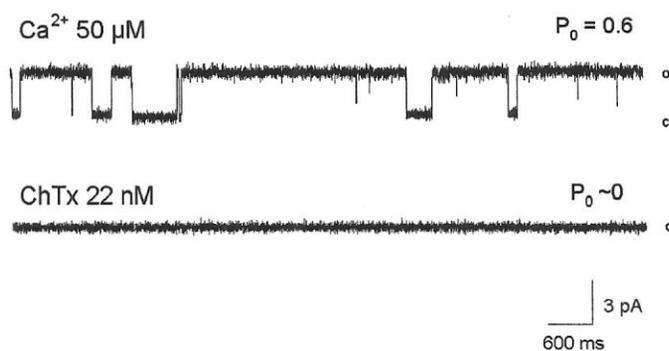


Figura 31.- Registros de corrientes unitarias del canal IK_{Ca-4} antes y después de agregar ChTx 22 nM. El registro se realizó en soluciones simétricas de KAc 100 mM y Ca^{2+} 50 μ M a -60 mV.

De la figura 31 se desprende que el canal IK_{Ca-4} es sensible a la toxina de escorpión ChTx. A una concentración 22 nM de la toxina la actividad del canal cesa completamente. En la Figura 32 se ilustra la disminución de P_0 de este canal, en presencia de la toxina. El valor de P_0 cae dramáticamente desde un valor de 0.8 a uno cercano a 0.

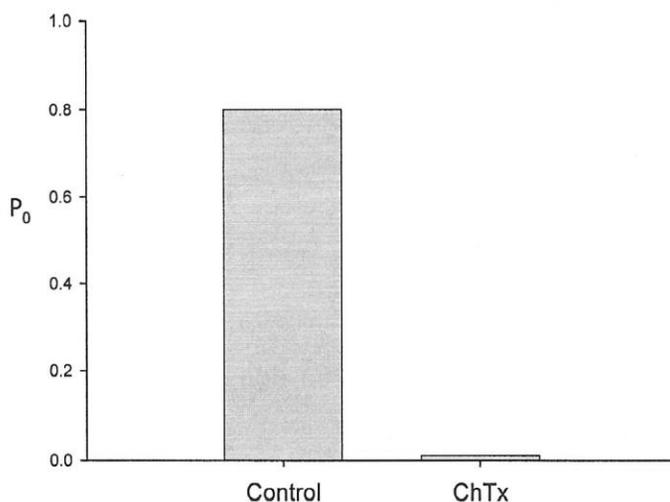


Figura 32.- P_0 para el canal IK_{Ca-4} previo y a continuación de agregar ChTx. El P_0 disminuye notablemente desde un valor ~ 0.8 a ~ 0 .

Finalmente se concluye que el canal IK_{Ca-4} es un canal de potasio de conductancia intermedia, dependiente de Ca^{2+} y voltaje, y es sensible a la toxina de escorpión, ChTx.

Se ha presentado cuatro tipos de canales IK_{Ca} , registrados en bicapas planas de fosfolípidos, a partir de una preparación de membranas de cilios olfatorios de rata. Sus conductancias fluctúan entre ~30 a ~80 pS y presentan distintas cinéticas y sensibilidades por calcio o agentes farmacológicos, como se ha descrito.

II.3.-Canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de alta conductancia, BK_{Ca}

Los canales BK_{Ca} observados en este estudio tenían una conductancia de 210 ± 6 pS ($n = 12$) pS, exhibían dependencia de Ca^{2+} y sensibilidad a IbTx y ChTx.

En la Figura 33 se muestran registros de corriente unitaria para el canal BK_{Ca} a distintos potenciales en condiciones simétricas de KAc 100mM. El canal BK_{Ca} es sensible a la diferencia de potencial, como se desprende de la figura, donde se observa que a potenciales más positivos las fluctuaciones hacia el estado abierto son más frecuentes, es decir, aumenta el valor de P_0 del canal, lo que está de acuerdo con lo observado para canales BK_{Ca} en otros tejidos.

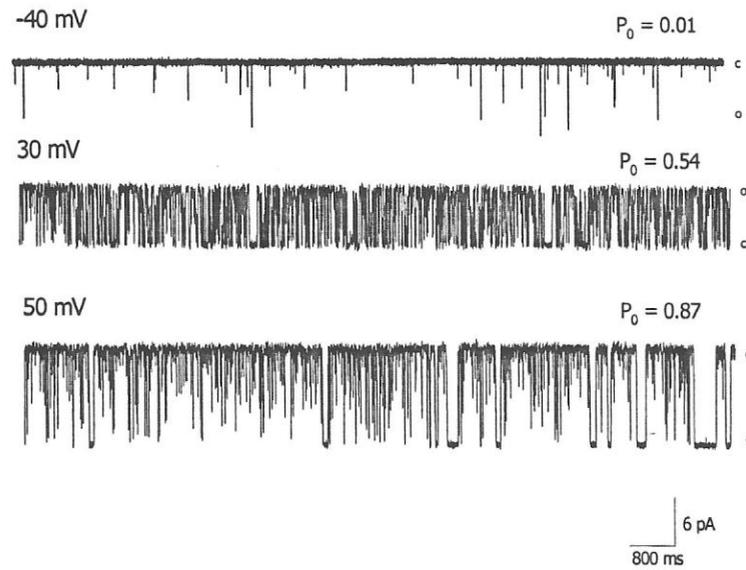


Figura 33.- Registros representativos de corrientes unitarias del canal BK_{Ca} a distintos potenciales. El experimento se realizó en soluciones simétricas de KAc 100 mM y Ca²⁺ 50 μM.

En la Figura 34 se observa la relación corriente versus voltaje representativa para el canal BK_{Ca}, la pendiente de la gráfica reveló que el canal BK_{Ca} de los cilios olfatorios tiene una conductancia de ~210 pS, lo que indica que corresponde a un canal de alta conductancia.

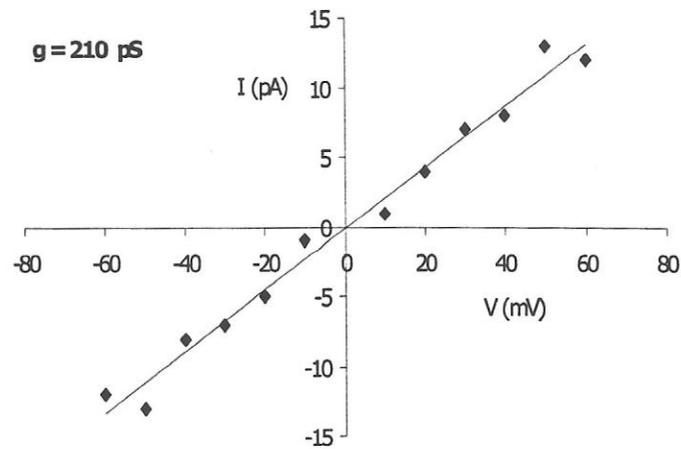


Figura 34.- Gráfica corriente-voltaje representativa de un total de 12 experimentos, para el canal BK_{Ca} . Los puntos experimentales fueron ajustados a una recta por regresión lineal. La pendiente de la curva indica que el canal tiene una conductancia de 210 pS.

El canal BK_{Ca} identificado en la fracción de membranas de cilios olfatorios, es sensible a Ca^{2+} . La dependencia de la fracción de tiempo abierto respecto a la concentración de Ca^{2+} se muestra en la Figura 35. La fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto es dependiente de Ca^{2+} , ya que las fluctuaciones de corriente hacia el estado abierto son mas frecuentes al aumentar la concentración de Ca^{2+} .

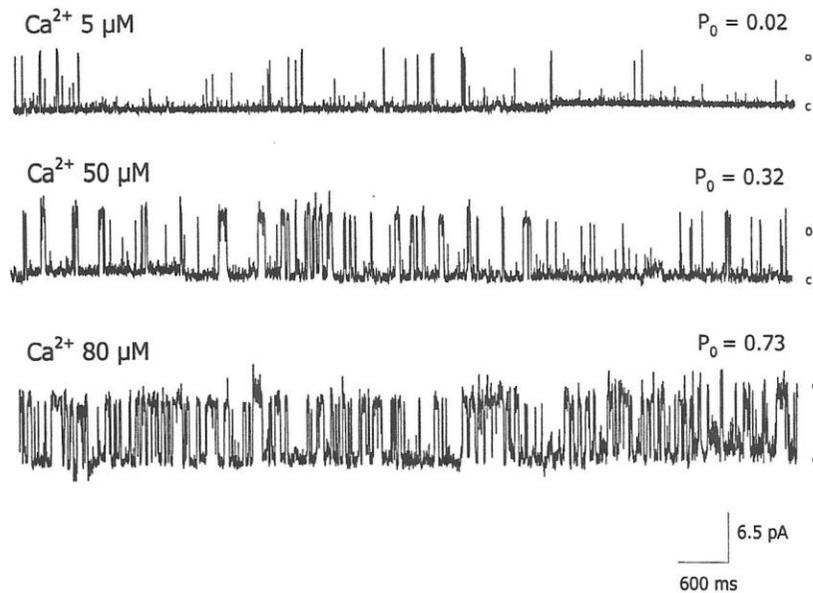


Figura 35.- Registros de corrientes unitarias de un canal BK_{Ca} de la fracción ciliar a distintas concentraciones de Ca²⁺. El experimento se realizó en condiciones simétricas de KAc 100 mM a un potencial de 40 mV.

La gráfica de la dependencia de la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto, respecto a la concentración Ca²⁺ se muestra en la Figura 36. La curva se ajustó a una ecuación de Hill, que arrojó un valor de 63 μM Ca²⁺ y n = 2.84 (r²= 0.991; p <0.05).

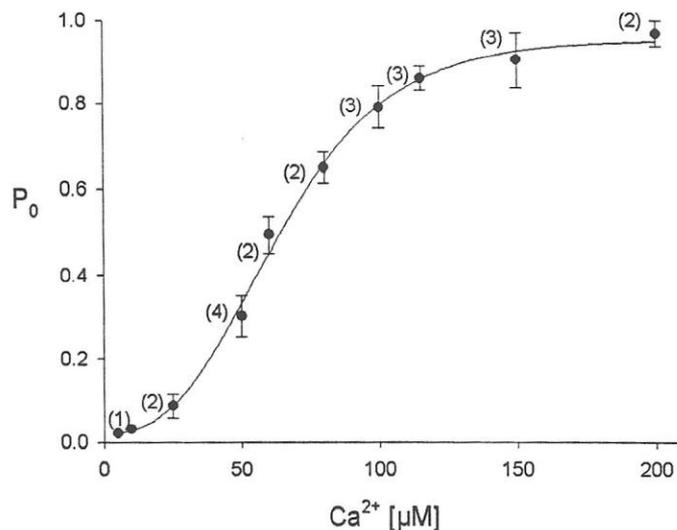


Figura 36.- Dependencia de la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto respecto a la concentración de Ca²⁺ para el canal BK_{Ca} de cilios olfatorios. Los puntos experimentales fueron ajustados a una ecuación de Hill. El valor de K_{0.5} obtenido para este canal fue de 63 μM y n = 2.84

Los canales tipo BK_{Ca} identificados en bicapas mostraron sensibilidades variables a las toxinas de escorpión IbTx y ChTx. En algunos casos, a una concentración baja de la toxina (IbTx) fue posible ver un efecto de bloqueo y en otros casos era necesario una mayor concentración de toxina para observar un claro bloqueo de la corriente. A pesar de ello, las concentraciones necesarias para bloquear al canal se mantuvieron siempre en el rango nanomolar.

En la Figura 37 se muestran registros de corriente del canal BK_{Ca} antes y después de ser expuesto a IbTx. Se observa que la toxina induce estados cerrados de considerable duración (ausentes en el caso control), los que incrementaron en duración a medida que se aumentó la concentración de toxina.

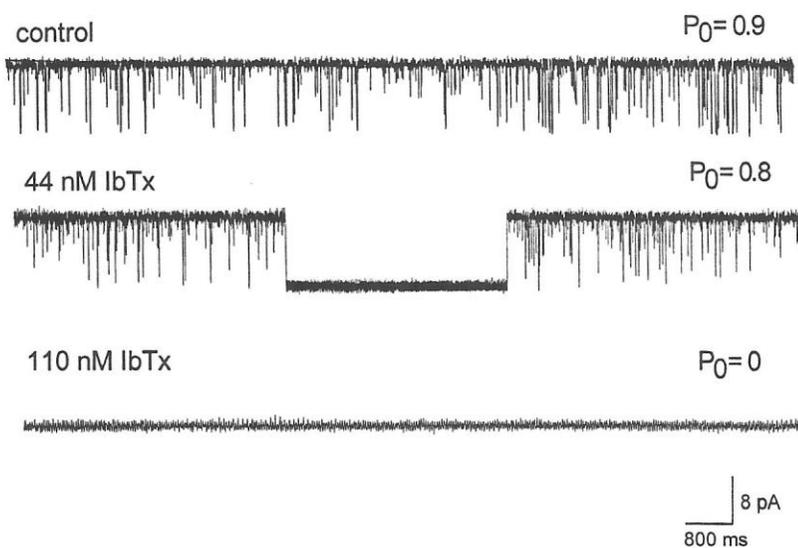


Figura 37.- Registros de corrientes unitarias del canal BK_{Ca} de la fracción ciliar a distintas concentraciones de IbTx. El primer registro muestra la situación control, en Ca^{2+} 50 μ M y un potencial aplicado de 40 mV. El experimento se realizó en soluciones simétricas de KAc 100 mM.

En la Figura 37 se observa que IbTx 44 nM indujo eventos de estado cerrado de larga duración que están ausentes en la situación control (primer trazo). Al aumentar la concentración de IbTx a 110 nM de IbTx el canal se bloqueó completamente luego de algunos segundos. La variación de P_0 en presencia de IbTx se ilustra en la Figura 38.

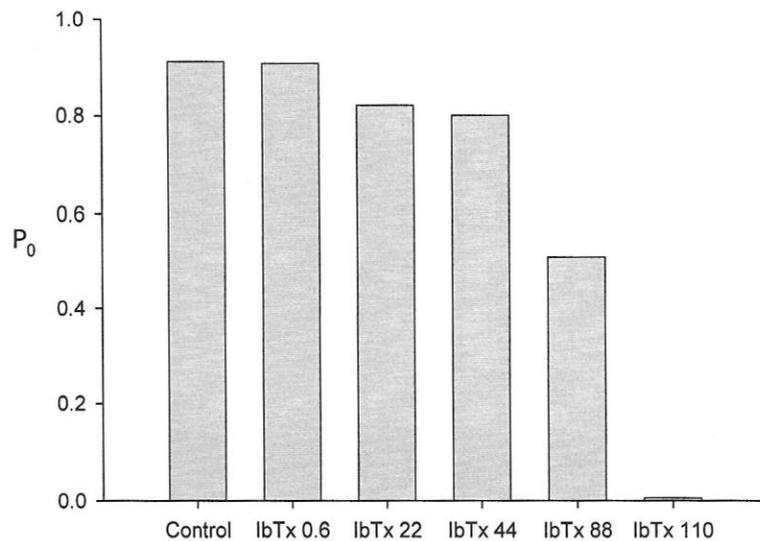


Figura 38.- Variación de P_0 en función de la concentración de IbTx para el canal BK_{Ca} . El ajuste a una curva de bloqueo proporciona un valor de EC_{50} de 89 nM IbTx. Los valores indicados corresponden a concentraciones del orden nM.

En este caso hay datos suficientes para ajustar los puntos a una curva de bloqueo desde donde se obtuvo un valor para EC_{50} de 89.4 nM IbTx. Como es posible observar en las dos figuras previas, la actividad del canal es afectada por IbTx, llegando a un bloqueo completo a una concentración de 110 nM de la toxina. A concentraciones bajas, como 0.6 nM, no hubo un efecto significativo de bloqueo de la toxina sobre la actividad del canal.

Como se comentó anteriormente, el canal BK_{Ca} presentó sensibilidad variable frente a IbTx, este efecto se muestra en la Figura 39. Se observa que el canal BK_{Ca} es bloqueado por IbTx a una concentración de 2 nM, silenciándose casi por completo la actividad del canal.

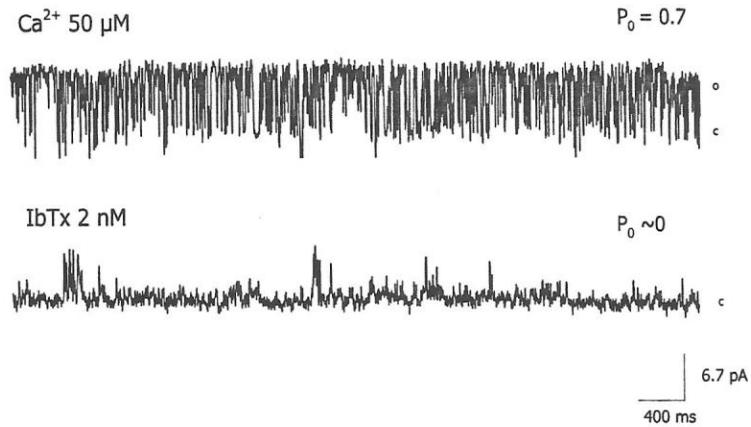


Figura 39.- Registros de corriente unitarias de un canal BK_{Ca} de cilios olfatorios sensible a baja concentración de IbTx. El registro se obtuvo en condiciones simétricas de KAc 100mM y Ca²⁺ 50 μM, a un potencial aplicado de 40 mV.

En la Figura 40 se ilustra la caída de P₀ para el canal mostrado en la Figura 39. Este canal es notablemente más sensible a IbTx que el mostrado anteriormente, ya que se bloquea a una concentración de IbTx de 2 nM, en contraste con 110 nM necesaria para silenciar el canal BK_{Ca} de la Figura 37.

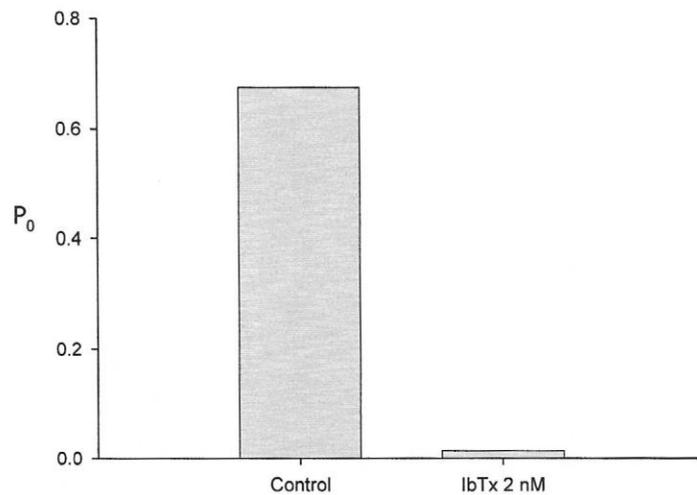


Figura 40.- Variación de la fracción de tiempo abierto para el canal BK_{Ca} cuyos registros se muestran en la Figura 39. La probabilidad de apertura disminuye dramáticamente desde un valor cercano a 0.7 a un valor cercano a cero en presencia de IbTx 2.

Una distinta sensibilidad a IbTx se observó en el registro de otro canal BK_{Ca} que se muestra en el gráfico de barras de la Figura 41. En este caso el P_0 disminuyó desde un valor control de ~ 0.5 a ~ 0.4 en IbTx 4 nM y a ~ 0.3 en IbTx 8 nM.

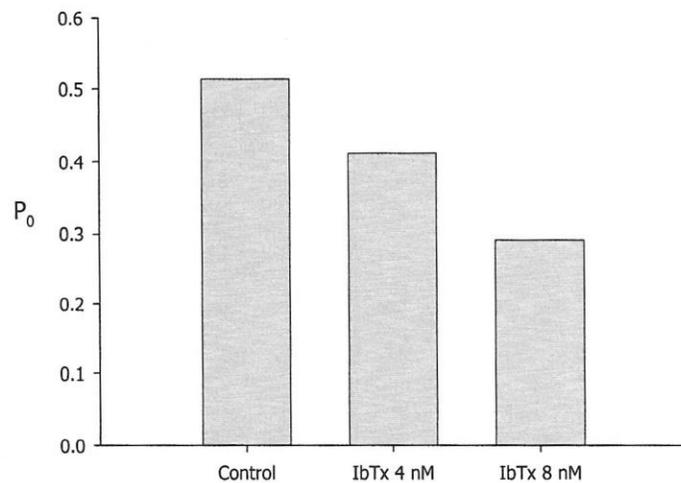


Figura 41.- Dependencia de P_0 para el canal BK_{Ca} a dos concentraciones de IbTx, 4 y 8 nM. El experimento se realizó en soluciones simétricas de KAc 100 mM y Ca^{2+} 50 μ M, a un potencial de 40 mV.

Como se muestra en la Figura 42, el canal BK_{Ca} de los cilios olfatorios es también sensible a la toxina ChTx. En presencia de ChTx 11 nM aparecen estados cerrados de apreciable duración, que están ausentes en el caso control (sin toxina). Esta caída en el P_0 se ilustra en la Figura 43.

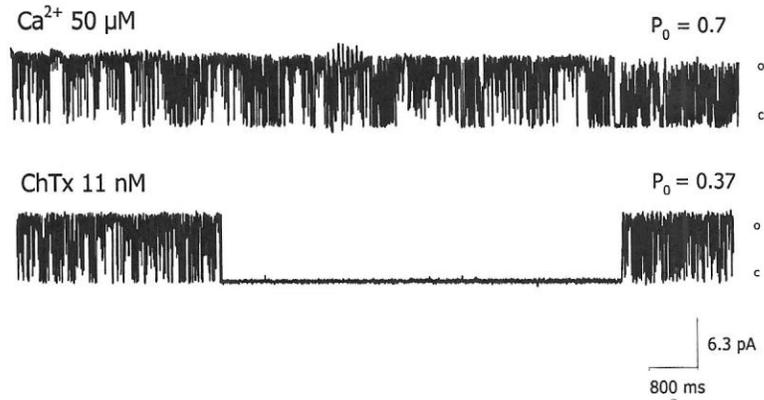


Figura 42.- Registros de corrientes unitarias de un canal BK_{Ca} mostrando su sensibilidad a ChTx. Se observa que después de agregar la toxina a una concentración de 11 nM aparecen largos periodos de silencio de la actividad del canal. El registro se llevó a cabo en condiciones simétricas de KAc 100 mM y Ca²⁺ 50 μM, el potencial aplicado fue 40 mV.

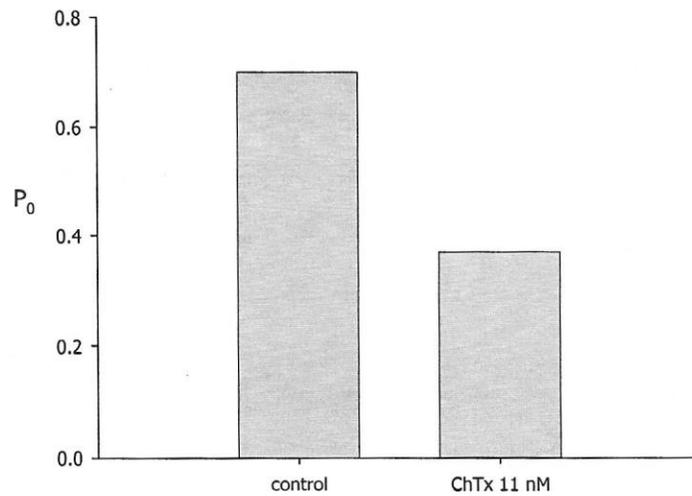


Figura 43.- Variación de P₀ por efecto de ChTx 11 nM. En presencia de ChTx, el P₀ cae desde un valor de aproximadamente 0.7 hasta menos de 0.4. Las condiciones son las descritas en la Figura 42.

La observación de que los canales BK_{Ca} encontrados son sensibles a IbTx y ChTx confirman que estamos en presencia de canales BK_{Ca}. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Jorquera *et al* 1995, quienes describieron un canal BK_{Ca} en cilios olfatorios de *C. caudiverbera* sensible a ChTx.

Detección de canales BK_{Ca} mediante inmunotransferencia.

La presencia de canales BK_{Ca} en la fracción de membrana de cilios olfatorios de rata fue también demostrada mediante la técnica de inmunotransferencia. Esta determinación se realizó utilizando un anticuerpo policlonal anti-BK_{Ca} (ver Materiales y Métodos). En la Figura 44 se observa que el canal BK_{Ca} está presente en la fracción de membranas ciliares olfatorias.

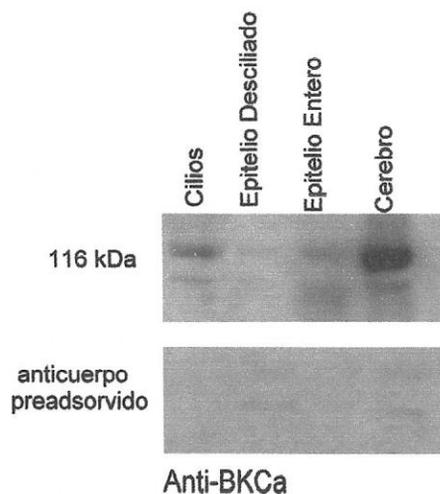


Figura 44.- Canal BK_{Ca} de los cilios olfatorios de rata detectado mediante inmunotransferencia. El canal está presente en las fracciones de cilios, epitelio desciliado, epitelio olfatorio completo y cerebro (control positivo). En la parte inferior se muestra el experimento con el anticuerpo previamente adsorbido con el antígeno. La marca observada corresponde a un tamaño estimado de 116 kDa.

La detección de la presencia del canal BK_{Ca} en la fracción ciliar por inmunodetección confirma la identificación realizada mediante la técnica de bicapas. Las marcas en doblete que aparecen en la inmunodetección podrían deberse a productos de degradación o variantes de splicing para este canal. Dado que los canales BK_{Ca} están ampliamente distribuidos, no es raro notar que estén presente en todas las fracciones de membrana presentadas, tales como epitelio desciliado, epitelio entero y cerebro, que se usó como control positivo. Como control negativo se utilizó el anticuerpo preadsorbido con el antígeno contra el cual se hizo el anticuerpo, Figura 46 inferior. El tamaño al que migra la proteína es el esperado para canales BK_{Ca}. Este resultado es plenamente consistente con experimentos previos realizados en nuestro laboratorio donde se demostró la presencia de este canal en los cilios olfatorios, mediante la técnica de inmunocitoquímica y Western blot (Delgado y cols, 2003).

De estos resultados se desprende que la fracción purificada de membranas de cilios olfatorios contiene canales BK_{Ca}, dependientes de voltaje y de Ca²⁺, sensibles a IbTx y a ChTx.

DISCUSIÓN

I. *Análisis de pureza y enriquecimiento.* Los resultados obtenidos mediante western blot de membranas de cilios olfatorios, demostraron que el método de obtención de las membranas ciliares es efectivo, ya que permite obtener una fracción de membrana pura dentro de los límites de detección de la técnica. A pesar de esto, los resultados no son confiables de manera absoluta porque la técnica en cuestión no permite asegurar con un 100% de certeza la procedencia de los canales registrados. El único método con el cual no hay lugar a dudas respecto a la procedencia de los canales es el patch clamp. Previamente, Delgado *et al* (2003) registraron *in situ* canales K_{Ca} de los cilios olfatorios de la rana chilena *Caudibervera caudibervera*. Las características generales de los canales observados en dicho estudio son muy similares a las encontradas en esta tesis, en lo que respecta a valores de conductancia, dependencia de calcio y apariencia cinética. En el mismo estudio, se observaron por inmunocitoquímica canales K_{Ca} ciliares de rata y de rana. Estos hallazgos reafirman la presencia de canales K_{Ca} en los cilios olfatorios.

A continuación se discute los resultados obtenidos para cada canal K_{Ca} registrado en bicapas. Cabe destacar que los canales K_{Ca} registrados patch-clamp mantienen sus características generales de conductancia, dependencia de Ca^{2+} y aspecto cinético, cuando son registrados en bicapas. Este punto es muy importante ya que indica que las características generales de los canales se mantienen al ser reconstituidos en bicapas, y además refuerza el criterio de pureza que se ha utilizado y valida una vez más la utilización del método de bicapas en la caracterización de canales iónicos.

II. *Canal SK_{Ca}*. El canal de K⁺ de baja conductancia registrado en bicapas es similar al observado mediante patch clamp en cuanto a su cinética, conductancia y dependencia de Ca²⁺. Se mencionó anteriormente (sección resultados) que el valor de K_{0.5} para este canal encontrado en esta tesis es mayor al valor observado en otros tipos celulares, sin embargo está en el orden de magnitud y tiene un valor cercano al encontrado mediante patch clamp, donde se determinó que K_{0.5} para el canal SK_{Ca} es 53 μM. En esta tesis se determinó que K_{0.5} para este canal es 40 μM. Como se advierte no hay una diferencia ostensible entre los valores de K_{0.5} determinados por ambos métodos. Se demostró además, que el canal SK_{Ca} ciliar es sensible a apamina y tiene una conductancia de 16 pS versus 14 pS obtenidos mediante patch-clamp. Esta tesis además muestra por primera vez mediante western blot que el canal un canal tipo SK_{Ca}, el SK3, se encuentra en membranas de cilios olfatorios de rata. La inmunotransferencia así como su bloqueo por apamina en el rango nM refuerzan la idea que este canal es del subtipo SK3. Estos datos sitúan a este canal entre los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia, sensibles a apamina.

III. *Canales IK_{Ca}*. En esta tesis se encontró cuatro canales de K⁺ de conductancia intermedia. Dos de ellos, el canal IK_{Ca}-1 y el canal IK_{Ca}-2, son similares a los observados por Delgado *et al* 2003. Respecto al canal IK_{Ca}-1 observado, los valores de conductancia y dependencia de calcio, así como los dos subestados de conducción, son prácticamente los mismos. Respecto al canal IK_{Ca}-2 registrado en esta tesis, la conductancia es la misma encontrada por Delgado *et al* 2003, sin embargo, aquí no se pudo determinar un valor para K_{0.5} debido a que cuando el canal fue registrado no se mantuvo durante el tiempo suficiente en la bicapa como para obtener una cantidad de datos adecuada para ajustar la curva a una ecuación de Hill. Se observó que el canal tiene un valor alto de P₀ en Ca²⁺ 20 y

50 μM (alrededor de 0.9). Sin embargo en el trabajo de Delgado *et al* 2003, se determinó que el canal $\text{IK}_{\text{Ca-2}}$ es dependiente de calcio, ya que a concentraciones de Ca^{2+} de 0.1, 5 y 50 μM y los valores de P_0 encontrados son ~ 0 , 0.05 y 0.97, o sea la fracción de tiempo que el canal permanece en estado abierto aumenta al incrementar el Ca^{2+} . Estos datos indican que el canal es dependiente de Ca^{2+} y que a concentraciones de Ca^{2+} 20 μM y superiores el canal está la mayor parte del tiempo en estado abierto. Adicionalmente, en esta tesis se determinó que el canal $\text{IK}_{\text{Ca-2}}$ es sensible a clotrimazol, agente que bloquea de manera específica canales del tipo IK_{Ca} . Sumando ambos estudios se valida que este es un canal tipo K_{Ca} y que está en los cilios olfatorios. Respecto a los otros dos canales IK_{Ca} encontrados en esta tesis, estos no fueron observados mediante patch-clamp, lo que no implica que los canales no estén en los cilios olfatorios, sino que simplemente no fueron registrados en dicho estudio. Al respecto hay que tener en cuenta la dificultad de hacer patch clamp en un volumen tan pequeño como lo es el cilio olfatorio (0.2 μm de diámetro), que podría influir en que en las ocasiones en que se logró hacer los parches no se registraron dichos canales. Adicionalmente los canales IKCa-1 y 2 son sensibles al antimicótico clotrimazol, lo que confirma sus identidades como canales de conductancia intermedia dependientes de calcio. En el canal $\text{IK}_{\text{Ca-3}}$ no fue posible estimar la sensibilidad a toxinas. El $\text{IK}_{\text{Ca-4}}$ es sensible a ChTx una toxina que reconoce varios tipos de canales de potasio entre ellos los dependientes de calcio de conductancia intermedia. No fue posible realizar un ensayo de inmunotransferencia para este tipo de canales de potasio, ya que no contábamos con anticuerpos comercialmente disponibles para este propósito.

IV. *Canal BK_{Ca}* . El canal BK_{Ca} fue uno de los que se observó con mayor frecuencia en esta tesis. Este canal también es similar al observado por Delgado *et al* 2003, respecto a su valor de conductancia, dependencia de Ca^{2+} y potencial. El

valor de $K_{0.5}$ determinado para este canal mediante patch clamp fue de $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$, en tanto que el valor obtenido en bicapas fue $63 \mu\text{M Ca}^{2+}$. La conductancia obtenida es del mismo valor en ambos estudios. Adicionalmente Delgado *et al* observaron el canal BK_{Ca} mediante inmunocitoquímica, lo que constituye una evidencia adicional de la presencia de estos canales en los cilios olfatorios. el canal BK_{Ca} de los cilios es sensible a la toxina ChTx y también a IbTx, lo que confirma la naturaleza molecular de este canal. El análisis por inmunotransferencia confirmó la presencia de este canal en los cilios olfatorios de rata. Las bandas en doblete observadas en el análisis por western blot podrían deberse a productos de degradación de la proteína o bien a variantes de splicing de los canales BK_{Ca} , esto último resulta más probable dado que siempre se utilizó inhibidores de proteasa en las preparaciones y los geles se corrieron al día siguiente de obtener la preparación de membranas ciliares, siendo poco probable encontrar degradación detectable. En algunos casos para este canal se observa también variabilidad en el aspecto de los registros mostrados para este canal, tanto en los trazos control como en los experimentos farmacológicos, lo que también podría deberse a la presencia de variantes de splicing para el canal, o a la presencia de subunidades reguladoras que modifican la sensibilidad por calcio o toxinas. Estas subunidades reguladoras podrían estar presentes en algunos canales registrados y en otros no, dadas las condiciones de obtención de la preparación de membranas (agitación mecánica), o bien las mismas subunidades regulatorias podrían presentar variantes de splicing.

Estos antecedentes apoyan fuertemente la presencia de canales BK_{Ca} en el organelo de transducción olfatoria.

Respecto al bloqueo de los canales por agentes farmacológicos, no fue posible revertir el efecto en ninguno de los canales estudiados, ya que todos los intentos realizados resultaron en el rompimiento de la membrana lipídica artificial. A

su vez la mayoría de los experimentos con toxinas, no permiten obtener promedios de datos, ya que no siempre se probaron las mismas concentraciones de bloqueadores y no todas mostraban un efecto evidente.

Se han descrito canales que producen corrientes portadas por K^+ , activadas por Ca^{2+} . En esta tesis se identificaron molecularmente varios canales de este tipo y se caracterizaron según su conductancia, dependencia de Ca^{2+} y bloqueo por agentes farmacológicos. Los resultados obtenidos están fuertemente respaldados por los estudios previos realizados por Delgado *et al*, 2003. Estas evidencias apoyan la existencia de canales K_{Ca} en los cilios olfatorios y respaldan ampliamente los experimentos electrofisiológicos de bicapas. Al comparar los registros hechos con las dos técnicas electrofisiológicas se observa leves variaciones en los valores de conductancia y $K_{0.5}$, lo que en gran medida puede deberse a las condiciones en que se hacen ambos tipos de registros. Por un lado con patch-clamp se conservan los componentes de la célula, y por otro con bicapas se ha fraccionado la membrana celular y ha sido sometida a procesos físicos que por cierto afectan la estabilidad de los componentes presentes ahí. Sin embargo, los registros y los valores obtenidos para P_0 , $K_{0.5}$ y conductancias son bastante similares en ambos casos. Cabe destacar respecto a la dependencia de Ca^{2+} , que para los tres tipos de canales K_{Ca} que se han reportado en la literatura, en otros tipos celulares, la sensibilidad a Ca^{2+} es bastante mayor, encontrándose en el rango nM, sin embargo los valores obtenidos de $K_{0.5}$ tanto en patch clamp como en bicapas son bastante parecidos entre ellos (orden μM) lo que proporciona un indicio de que posiblemente estos sean los rangos de activación de dichos canales en los organelos ciliares. No es raro pensar que estas cantidades de Ca^{2+} se alcancen durante la respuesta frente a un olor o mezcla de olores dado el pequeño tamaño del organelo ciliar, donde la entrada de Ca^{2+} puede permitir, obtener fácilmente estas concentraciones

del Ca^{2+} una vez que se han activado las rutas de entrada de Ca^{2+} a la célula vía el canal CNG.

Los antecedentes presentados aquí permiten afirmar que la mayoría de los canales observados en esta tesis mediante la técnica de bicapas, corresponden a los mismos canales observados con la técnica de patch clamp, es decir, corresponden a las mismas entidades moleculares. El rol que cada una de las corrientes portadas por cada tipo de canal tienen en la transducción olfatoria debe ser determinado en el futuro, para esto los datos aportados por esta tesis son de especial importancia ya que con el conocimiento de las toxinas bloqueadoras de cada tipo de canal es posible realizar experimentos bloqueando específicamente cada corriente para saber en q etapa de la respuesta olfatoria inhibitoria participa cada tipo de canal y su contribución relativa a la corriente macroscópica.

CONCLUSIONES

Los resultados de experimentos electrofisiológicos, farmacológicos así como de inmunotransferencia permiten concluir que en la membrana de los cilios de las neuronas olfatorias de rata se encuentran presentes diferentes canales K_{Ca} .

Los canales tipo SK_{Ca} observados tenían una conductancia de 16 pS, eran dependientes de Ca^{2+} con una $K_{0.5} = 63 \mu M$ y sensibles a la toxina apamina. Se observaron cuatro tipos diferentes de canales de conductancia intermedia IK_{Ca} , éstos exhibían distintas dependencias de Ca^{2+} y eran afectados por ChTx y CLT, y sus conductancias estaban en el rango de 30 a 80 pS. Los canales BK_{Ca} fueron los observados con mayor frecuencia, tenían conductancias sobre los 200 pS y eran dependientes de Ca^{2+} y potencial, con una $K_{0.5}$ de 63 μM y sensibles a ChTx e IbTx.

Estos resultados son coherentes con los hallazgos electrofisiológicos realizados previamente en nuestro laboratorio con la técnica de patch-clamp y apoyan lo planteado en nuestra Hipótesis respecto de la presencia de este tipo de canales en la membrana ciliar.

Por otra parte, apoyan fuertemente el modelo planteado en nuestro laboratorio acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta olfatoria inhibitoria en vertebrados, en que canales K_{Ca} estarían involucrados en el desarrollo de un potencial de membrana hiperpolarizante en las NSOs durante la respuesta a olores.

En esta tesis se ha complementado y aportado en la caracterización de los canales responsables de la generación de la respuesta inhibitoria que se produce en los cilios olfatorios al ser expuesto a ciertos odorantes. Estudios futuros deberían aportar más aún en el conocimiento de la participación que podrían tener cada uno de los canales K_{Ca} en la respuesta inhibitoria, en cuanto a su participación temporal, y

además en la distribución espacial de éstos canales en los organelos ciliares, contribuyendo a completar el rompecabezas de la transducción olfatoria.

BIBLIOGRAFÍA

- Ache, B. 1994. Towards a common strategy for transducing olfactory information. *Cell Biology* **5**: 55-63.
- Anderson, D., Zygmunt, P., Movahed, P., Anderson, T., y Högestätt E. 2002. Effects of inhibitors of small-and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na⁺/K⁺ ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery *British Journal of Pharmacology* **129**: 1490-1496.
- Brunet, L.J., Gold, G.H., y Ngai, J. 1996. General Anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotid-gated cation channel. *Neuron* **7**(4): 681-93.
- Buck, L.B. 1992. The olfactory multigene family. *Curr Op Neurobiol* **2**(3): 282-8.
- Buck, L.B., y Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**(1): 175-87.
- Delay, R., y Restrepo, D. 2004. Odorant responses of dual polarity are mediated by cAMP in mouse olfactory sensory neurons. *J Neurophysiol* **92**: 1312-1319.
- Delgado, R., y Bacigalupo, J. 2004. Cilium-attached and excised patch-clamp recordings of odorant-activated Ca-dependent K channels from chemosensory cilia of olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci* **20**(11): 2975-80.
- Delgado, R., y Labarca, P. 1993. Properties of whole-cell currents in isolated olfactory neurons from the Chilean toad *Caudiverbera caudiverbera*. *Am J physiol* **264**: C1418-1427.
- Delgado, R., Saavedra, M.V., Schmachtenberg, O., Sierralta, J., y Bacigalupo, J. 2003. Presence of a Ca²⁺-dependent K⁺ channels in chemosensory cilia support a role in odor transduction. *J Neurophysiol* **90** (3): 2022-8.
- Dionne, V.E. 1992. Chemosensory responses in isolated olfactory receptor neurons from *Necturus maculosus*. *J Gen Physiol* **99**: 415-433.
- Fanger, C.M., Ghanshani, S., Logsdon, N.J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, KG., Cahalan, MD., y Aiyar, J. 1999. Calmodulin mediates calcium-dependet actiavtion of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* **274**(9): 5746-54.
- Firestein, S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents?. *Nature* **413**: 211-218.
- Firestein, S., y Zufall, F. 1994. The cyclic nucleotide gated channel of olfactory receptors neurons. *Semin Cell Biol* **5**(1): 39-46.
- Gesteland, R.C., Lettvin, J.Y., y Pitts, W.H. 1965. Chemical transmission in the nose of the frog. *J Physiol* **181**(3): 525-59.
- Guengerich, F.P. 1993. Cytochrome P450 enzymes. *Am Sci* **81**: 440-447.
- Ishii, T.M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C.T., Adelman, J., y Maylie, J. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci* **94**(21): 11654-6.
- Jensen, B.S., Strøbaeck, D., Olesen, S.P., y Christophersen, P. 2001. The Ca²⁺-Activated K⁺ Channel of Intermediate Conductance: A Molecular Target for Novel Treatments? *Current Drug Targets* **2**: 401-422.
- Jensen, B.S., Strøbaeck, D., Christophersen, P., Jorgensen, T.D., Hansen, C., Silaharoglu, A., Olesen, S.P., y Ahring, P.K. 1998. Characterization of the

- cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Am J Physiol* **275**(3Pt 1): C848-56.
- Joiner, W.J., Wang, L.Y., Tang, M.D., y Kaczmarek, L.K. 1997. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci* **94**(20):11013-8
 - Jorquera, O., Latorre, R., y Labarca, P. 1995. Ion channel classes in purified olfactory cilia membranes: planar lipid bilayer studies. *Am J Physiol* **269**(5 Pt 1): C1235-44.
 - Kaupp, U.B. 1991. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci* **14**(4): 150-7.
 - Khanna, R., Chang, M.C., Joiner, W.J., Kaczmarek, L.K., y Schlichter, L.C. 1999. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem* **274**(21): 14838-49.
 - Kleene, S.J., y Gesteland, R.C. 1991. Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J Neurosci* **11**(11): 3624-9.
 - Kurahashi, T., y Yau, K.W. 1993. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* **363**(6424): 71-74.
 - Leffingwell, J. C. 2001. Olfaction. (URL: <http://www.leffingwell.com/olfaction.htm>)
 - Leinders-Zufall, T., Shepherd, G.M., y Zufall, F. 1995. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels and membrane excitability in olfactory receptor cells by carbon monoxide. *J Neurophysiol* **74**(4):1498-508.
 - Logsdon, N.J., Kang, J., Togo, J.A., Christian, E.P., y Aiyar, J. 1997. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **272**(52): 32723-6.
 - Lopatin, A., y Nichols, C. 2001. Ion Channel Localization: methods and protocols in pharmacology and toxicology. pp 145-165. Editorial Humana Press. Totowa, New Jersey.
 - Lowe, G., y Gold, G.H. 1993. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* **366**: 283-286.
 - Madrid, R. 2001. Tesis doctoral: "Mecanismos de la respuesta inhibitoria a odorantes en neuronas olfatorias de *Caudiverbera caudiverbera*". Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
 - Malik-Hall, M., Ganellin, C.R., Galanakis, D., y Jenkinson, D.H. 2000. Compounds that block both intermediate-conductance (IK(Ca)) and small-conductance (SK(Ca)) calcium-activated potassium channels. *Br J Pharmacol* **129**(7): 1431-8.
 - Meera, P., Wallner, M., y Toro, L. 2000. A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage-and Ca^{2+} -activated K^{+} channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *PNAS* **97** (10): 5562-5567.
 - Michel, W., y Ache, B. 1992. Cyclic nucleotids mediate an odor-evoked potassium conductance in lobster olfactory receptors cells. *J Neurosci* **12**: 3979-3984.
 - Mombaerts, P. 1999a. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* **286**(5440): 707-11.
 - Mombaerts, P. 1999b Molecular Biology of receptors neurons in vertebrates. *Ann Rev Neuros* **22**: 487: 509.

- Weiger, T.M., Holmqvist, M.H., Levitan, I.B., Clark, F.T., Sprague, S., Huang, W.J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M.E., Glucksmann, M.A., Silos-Santiago, I., DiStefano, P.S., y Curtis, R. 2000. A novel nervous system beta subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J Neurosci* **20**(10): 3563-70.
- Wolff, D., Cecchi, X., Spalvins, A., y Canessa, M. 1988. Charybdotoxin blocks with high affinity the Ca-activated K⁺ channel of Hb A and Hb S red cells: individual differences in the number of channels. *J membr Biol* **106**(3): 243-52.
- Zhang, X., y Firestein, S. 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* **5**(2): 124-33.
- Zufall, F., Firestein, S., y Shepherd, M. 1994. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 577-607.