

**CANALES IONICOS EN MUSCULOS DE LA LARVA DE *DROSOPHILA*:
MODULACION POR NEUROTRANSMISORES Y AMPc.**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile,
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología**

**Facultad de Ciencias
Universidad de Chile**

Ricardo Delgado Arriagada

Santiago, Diciembre de 1989.



Profesor Guía: Dr. Pedro Labarca P.

Profesor patrocinante: Dr. Ramón R. Latorre de la Cruz.

FACULTAD DE CIENCIAS UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Ricardo Alfonso Delgado Arriagada

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para optar al grado de **Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología**, en el examen de defensa de tesis rendido el 21 de Diciembre de 1989.

Profesor guía: Dr. Pedro Labarca Prado

Pedro Labarca Prado

Profesor patrocinante: Dr. Ramón R. Latorre

Ramón R. Latorre

Comisión Informante de tesis:

Dr. Osvaldo Alvarez

Osvaldo Alvarez

Dr. Enrique Jaimovich

Enrique Jaimovich

Dr. Humberto Maturana R.

Humberto Maturana R.

Dr. Benjamin Suarez-Isla

Benjamin Suarez-Isla



A mi Esposa Maria Teresa,
mis Hijos y mi Familia



AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos al Dr. Pedro Labarca por su incondicional apoyo y confianza sin los cuales no habría podido finalizar mis estudios de post-grado.

Al Dr. Ramón Latorre por su amistad y su valorable discusión e interés en mi trabajo.

Al Centro de Estudios Científicos de Santiago que me brindó apoyo económico para concretar mi dedicación al desarrollo de esta tesis.

Al FONDECYT que en mi calidad de coautor del proyecto " Estudio de canales iónicos en membranas excitables de *Drosophila*: Regulación por neurotransmisores y segundos mensajeros en la cepa normal y en mutantes neurológicos" Proyecto 1167-88, me proveyó financiamiento parcial para el desarrollo de esta tesis.

También quiero agradecer:

Al Dr. Osvaldo Alvarez por su amistad, dedicación y buena disposición en busca de la solución a los problemas cotidianos que surgen día a día en el trabajo de laboratorio.

A los Drs. Daniel Wolff y Mario Luxoro quienes me introdujeron en los principios físicoquímicos que subyacen a los fenómenos eléctricos de las células excitabilidad.

A los Drs. Juan Bacigalupo y Cecilia Vergara, por compartir mis primeras experiencias en este laboratorio.



laboratorio. ...

A Ximena Cecchi y María Isabel Behrens por su amistad.

A David Naranjo, Andrés Oberhauser, Alfredo Villarroel, Carmen Alcayaga, Nataniel Malebran y Marco Antonio Díaz que compartieron una época de mi vida.

A Juan Espinoza, Juan Valencia y Ana Godoy cuya amistad surge de un diario encuentro y a los sinsabores del trabajo de laboratorio.

A los estudiantes Patricia Hidalgo, Felipe Díaz y Bernardo Morales, que vinieron mas recientemente al laboratorio cuya presencia obliga a reafirmar las convicciones de modo de aportar un grano de arena en su formación como científicos.

INDICE DE MATERIAS

| | |
|--|------|
| INDICE DE FIGURAS | ix |
| ABREVIATURAS Y GLOSARIO | xi |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVOS | 6 |
| METODOS | 7 |
| 1. Mantención de los cultivos de moscas | 7 |
| 2. Reconocimiento de las mutantes | 7 |
| 3. Disección de la larva | 8 |
| 4. Soluciones | 8 |
| 5. Registro intracelular de potencial eléctrico | 9 |
| 6. Registro de corrientes | 9 |
| 6.1. Fabricación de las pipetas | 11 |
| 6.2. Sistema electrónico de registro | 11 |
| 7. Equipamiento | 14 |
| 8. Establecimiento de los sellos de alta resistencia eléctrica | 15 |
| 9. Análisis de los resultados | 17 |
| 9.1 Análisis condicional | 18 |
| 10. Protocolos experimentales | 18 |
| 10.1 Canales activados por L-glutamato | 18 |
| 10.2 Canal de potasio activado por AMPc | 19 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 20 |
| 1. Receptores de L-glutamato: | 20 |
| 1.1 Estudios de potencial de membrana | 20 |
| 1.1.1 Efecto del L-glutamato sobre el potencial de membrana | 20 |
| 1.1.2 Efecto inhibitorio en relación con los iones Cl ⁻ | 22 |
| 1.1.3 Farmacología básica de los receptores de L-glutamato | 22 |
| 1.1.4 Actividad eléctrica espontánea. | 25 |
| 1.2 Estudio de canales iónicos activados por L-glutamato | 28 |
| 1.2.1 Condiciones de registro | 28 |
| 1.2.2 Canales excitatorios activados por L-glutamato | 30 |
| 1.2.3 Canales inhibitorios activados por L-glutamato | 33 |
| 2. Estudio del canal de potasio activado por AMPc: | 43 |
| 2.1 Características generales del canal de K ⁺ activado por AMPc | 43 |
| 2.2 Activación por AMPc | 45 |
| 2.3 Estudios con 8-Br AMPc en la cepa silvestre | 47 |
| 2.4 Canal de K ⁺ en la cepa <i>dunce</i> ^{M14} | 49 |
| 2.5 Cinética | 52 |
| DISCUSION | 60 |
| I. Receptores de L-glutamato | 60 |
| II. Canales activados por AMPc | 63 |
| III. Estudios cinéticos del canal de K ⁺ activado por AMPc | 65 |
| CONCLUSIONES | 67 |
| REFERENCIAS | 68 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1. | Amplificador de voltaje de alta impedancia de entrada. | 10 |
| Figura 2. | Sistema electrónico de registro | 12 |
| Figura 3. | Esquema del equipamiento | 16 |
| Figura 4-A. | Potencial de membrana en función de la [L-glutamato] | 21 |
| Figura 4-B. | Potencial de membrana en función de la [L-glutamato] en ausencia de iones Cl ⁻ | 23 |
| Figura 5. | Potencial de membrana en función de la [quisqualato] | 24 |
| Figura 6. | Potencial de membrana en función de la [kainato] | 26 |
| Figura 7. | Actividad eléctrica, inducida por la liberación espontánea de neurotransmisor | 27 |
| Figura 8. | Potencial de membrana en función del tiempo de incubación del músculo en colagenasa | 29 |
| Figura 9. | Canales excitatorios activados por L-glutamato | 31 |
| Figura 10. | Curva corriente-voltaje de los canales excitatorios | 32 |
| Figura 11. | Histograma de los tiempos de permanencia de los canales excitatorios | 34 |
| Figura 12. | Canales inhibitorios activados por L-glutamato | 35 |
| Figura 13. | Curva corriente voltaje de los canales inhibitorios | 36 |
| Figura 14. | Histograma de los tiempos de permanencia de los canales inhibitorios | 38 |
| Figura 15. | Canales inhibitorios activados por L-glutamato, registrados en un área de membrana aislada e invertida en la punta de la pipeta de registro | 39 |
| Figura 16. | Canales inhibitorios activados por GABA, registrados en un área de membrana aislada e invertida en la punta de la pipeta de registro | 41 |
| Figura 17. | Canales de K ⁺ activados por AMPc en larvas de la cepa silvestre | 44 |

| | | |
|--------------|--|----|
| Figura 18. | Curva corriente voltaje del canal de K^+ activado por AMPc | 46 |
| Figura 19. | fo del canal de K^+ activado por AMPc en función de la [AMPc] | 48 |
| Figura 20. | Canales de K^+ activados por AMPc en larvas de la cepa silvestre incubadas en 8-Br AMPc | 50 |
| Figura 21. | Canales de K^+ en la cepa <i>dunce</i> ^{M14} . | 51 |
| Figura 22. | Histograma de los tiempos de permanencia del canal de K^+ activado por AMPc | 53 |
| Figura 23-A. | Constantes de tiempo del estado abierto en función de la [AMPc] | 56 |
| Figura 23-B. | Constantes de tiempo del estado cerrado en función de la [AMPc] | 57 |
| Figura 24. | Correlación entre los estados abiertos y cerrados | 59 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|---|
| AMPc | adenosina 3'5'- monofosfato cíclico |
| ATP | adenosintrifosfato |
| fo | fracción de tiempo abierto de un canal iónico. |
| GMPc | guanosina 3'5'- monofosfato cíclico |
| GABA | ácido gama-aminobutírico |
| Gohm | giga ohm= 10^9 ohm |
| HEPES | Acido N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'2-etanosulfónico |
| kohm | Kilo ohm= 10^3 ohm |
| μm | micrometros= 10^{-6} metros |
| M | molar (moles/litro de solución) |
| μM | micromolar= 10^{-6} Molar |
| mV | millivolts= 10^{-3} Volts |
| Mohm | mega ohm= 10^6 ohm |
| pA | pico Amper= 10^{-12} Ampere |
| pF | pico Farad= 10^{-12} Farad |
| TEA | Tetraetilamonio. |

GLOSARIO

- "patch-clamp":** técnica electrofisiológica que permite registrar la corriente que pasa a través de un canal iónico en la membrana de la célula o en membranas aisladas.
- "cell attached":** modalidad de la técnica de "patch-clamp" en la cual se efectúa el registro de corriente con la pipeta adosada a la membrana de la célula.
- "inside-out":** modalidad de la técnica de "patch-clamp" en la cual se efectúa el registro

de corriente con la membrana aislada en la punta de la pipeta de registro. En esta modalidad el lado intracelular de la membrana queda expuesto a la solución que contiene la cámara experimental.

"outside-out": modalidad de la técnica de "patch-clamp" en la cual se efectúa el registro de corriente con la membrana aislada e invertida en la punta de la pipeta de registro. En esta modalidad el lado extracelular de la membrana queda expuesto a la solución que contiene la cámara experimental.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis ha sido investigar la modulación de canales iónicos por neurotransmisores y por transmisores secundarios, utilizando la técnica de "patch clamp", que permite registrar corrientes de canales iónicos individuales directamente de la membrana plasmática. Para tales estudios se eligieron los músculos de la larva de *Drosophila melanogaster*, cuyas propiedades electrofisiológicas no han sido descritas en detalle hasta ahora.

El trabajo realizado por Jan y Jan (1976) permitió postular que el L-glutamato es el transmisor o un transmisor excitatorio en la juntura neuromuscular de este insecto. Sin embargo no se había realizado hasta ahora una caracterización de los receptores de L-glutamato presentes en estos músculos a nivel de canal único. Nuestros estudios preliminares efectuados con microelectrodos intracelulares que dieron curso a esta tesis, sugirieron que las fibras musculares de la larva de *Drosophila* poseen tanto receptores excitatorios e inhibitorios activados por L-glutamato. De acuerdo con tales estudios la adición de L-glutamato a la solución que baña los músculos, en el intervalo de concentraciones 0.5-20 μM , despolariza la membrana en tanto que concentraciones más altas tienen un efecto repolarizante. El efecto repolarizante del L-glutamato desaparece si el Cl^- de la solución es reemplazado por iones $\text{SO}_4^{=}$. Un estudio farmacológico de los receptores de L-glutamato, utilizando varios agonistas que incluyen el quisqualato y el kainato, indican que el quisqualato, activaría receptores excitatorios e inhibitorios, de manera similar que el L-glutamato, mientras que el kainato solo activaría receptores inhibitorios. La presencia de receptores excitatorios e inhibitorios fue sugerida también por el registro, mediante electrodos intracelulares, de potenciales de miniatura despolarizantes e hiperpolarizantes que demostraron por primera vez la presencia de sinápsis excitatorias e inhibitorias en estos músculos.

La presencia de dos poblaciones de canales iónicos activados por el L-glutamato sugerida en los estudios con electrodos intracelulares fue documentada usando la técnica del "patch-clamp". Una población se activa a concentraciones menores que 50 μM y es selectiva a cationes, lo que los identifica como receptores excitatorios. Una segunda población que es activada por concentraciones de agonista mayores que 50 μM es selectiva a Cl^- , lo que les asignaría un rol inhibitorio. La presencia de dos poblaciones de receptores de L-glutamato en la larva de *Drosophila* con diferentes afinidades por este agonista y con diferente selectividad iónica permite explicar los resultados obtenidos al estudiar el efecto del L-glutamato sobre el potencial de membrana.

En otra serie de estudios realizados en músculos de la larva de *Drosophila*, dirigidos a investigar la modulación de canales iónicos por transmisores secundarios, se identificó y caracterizó un canal selectivo a iones K^+ que es activado directa y reversiblemente por el AMPc. La activación es dosis dependiente y específica para el AMPc y no se observa en presencia de una serie de agentes que incluyen GMPc, AMP, ATP, IP_3 y Ca^{2+} . En la mutante *dunce*^{M14}, una cepa mutante que carece de una forma de fosfodiesterasa y posee niveles intracelulares de AMPc anormalmente altos, este canal está persistentemente activado.

ABSTRACT

The aims of this work have been to start a research line directed to investigate ion channel modulation by neurotransmitters and second messengers in excitable cells, using the patch clamp technique. *Drosophila* larval muscle was chosen as the experimental model since its electrophysiological properties have not been characterized in details and fly cultures are relatively easy and inexpensive to keep.

Studies by others led to postulate that L-glutamate is the or an agonist of the excitatory neuromuscular junction in this insect's muscle and that *Drosophila* larval muscle lacks inhibitory synapses. However, previous to this thesis, a characterization of the ion channels activated by L-glutamate in *Drosophila* muscle had not been performed.

Preliminary work, using intracellular recording, suggested that *Drosophila* larval muscle actually possesses two types of L-glutamate receptors: excitatory ones and inhibitory ones. Thus, it was found that bath-applied L-glutamate depolarizes the muscle membrane up to a concentration of 20 μM . Higher concentrations of the agonist lead to a gradual repolarization, effect that is abolished when Cl^- is replaced by $\text{SO}_4^{=}$ from the Ringer bathing the muscle, suggesting that L-glutamate activates a Cl^- -selective conductance. Pharmacological studies using different agonists of L-glutamate receptors support this idea and reveal that the two populations of receptors are distinguishable pharmacologically. Furthermore, the direct recording of miniature end-plate potentials demonstrated for the first time the presence of excitatory and inhibitory synapses in *Drosophila* larval muscle.

The presence of excitatory and inhibitory receptors was documented by recording directly single ion channel currents activated by L-glutamate from the larval muscle using the patch-clamp technique. It was demonstrated that L-glutamate can activate excitatory, cation-selective channels having a conductance of 104 pS and inhibitory, Cl^- -selective channels having a

conductance of 38 pS. The inhibitory channels can also be activated by GABA.

In other experiments, directed to investigate the modulation of ion channels by second messengers, a K^+ -selective channel that is directly and reversibly activated by cAMP was identified and characterized in wild-type larval muscle. The channel has a conductance of 47 pS, is blocked by submillimolar concentrations of TEA and is specifically activated by cAMP. Channel activation cannot be mimicked by a series of agents that include AMP, cGMP, IP_3 , ATP and Ca^{2+} . Activation by cAMP is dose-dependent, has a K_d of 50 μ M and a Hill coefficient of 2.9. The cAMP-activated channel was also investigated in *dunce*^{M14}, a mutant lacking a form of phosphodiesterase and exhibiting abnormally high levels of cAMP. It was found that in the mutant the channel is persistently activated exhibiting a much higher probability of opening than in wild-type muscle.

INTRODUCCION

La acumulación de conocimiento en las diferentes áreas en que la *Drosophila* ha sido utilizada como sistema experimental, hacen de este insecto un interesante sistema en cual efectuar estudios neurobiológicos. La posibilidad de contar con mutantes que presentan alteraciones neurológicas que afecten un solo gen, permiten atacar problemas básicos del desarrollo, comportamiento, excitabilidad, transmisión sináptica y neuroquímica.

Mediante el uso de la técnica de potencial controlado se han definido las corrientes iónicas que componen el potencial de acción de los músculos de larvas y adultos de esta especie. En la larva, la corriente de entrada responsable de la fase despolarizante del potencial de acción esta asociada a la entrada de iones calcio y muestra una inactivación rápida. La repolarización de la membrana ocurre como consecuencia de la activación de cuatro conductancias de potasio que dan cuenta de la corriente de salida (Wu y Haugland, 1985; Gho y Mallart, 1986). Dos de estas conductancias denominadas I_A' e I_{Accd}' se inactivan rápidamente en tiempos de milisegundos. Mientras I_A' depende sólo del potencial de membrana V_m , I_{Accd}' es también modulada por la concentración de iones calcio en el mioplasma. Las dos corrientes restantes han sido denominadas I_K e I_C . Estas corrientes no muestran inactivación pero I_C es modulada por iones calcio, y representa casi el total de la corriente de salida de activación tardía (Gho y Mallart., 1986). Por su parte, I_K muestra las características típicas del rectificador tardío (Wu y Haugland, 1985) descrito por Hodgkin y Huxley (1952). En el músculo adulto se ha demostrado la presencia de cinco tipos de conductancias que participan en el potencial de acción (Salkof y Wyman, 1983 a y b). Dos de ellas dan cuenta de las corrientes de entrada y son denominadas I_{Ca} e I_p . I_{Ca} es una corriente de calcio que se inactiva e I_p es una corriente de sodio que no muestra inactivación. Por su parte las corrientes de salida en el músculo del adulto están formadas por los componentes I_A , I_{Accd} e I_K que tienen propiedades similares a las corrientes del

mismo nombre presentes en el músculo de la larva (Salkoff y Wyman, 1983; Salkoff, 1983). Sin embargo en el adulto no se ha observado el componente llamado I_C .

Además de los trabajos electrofisiológicos que permitieron establecer las conductancias responsables del potencial de acción en músculo de *Drosophila*, debemos también mencionar el trabajo realizado por Jan y Jan (1976) que permitió postular al L-Glutamato como el agonista excitatorio en la juntura neuromuscular de la larva de *Drosophila*. La presencia de estos receptores en *Drosophila* reviste un gran interés ya que abre la posibilidad de atacar problemas básicos de la neurobiología mediante el estudio de perturbaciones en la función de receptores sinápticos causadas por mutaciones que efecten un solo gen. A pesar de esto, llama la atención que hasta ahora los estudios iniciados por Jan y Jan no hayan sido continuados. Debido a esto, carecemos en la actualidad de información detallada concerniente a las propiedades farmacológicas de estos receptores. Mas aún, el trabajo de Jan y Jan no aportó información que indicara la presencia de sinapsis inhibitorias en músculo de *Drosophila*, a pesar de las observaciones efectuadas en otros artrópodos (Cull-Candy, 1976).

En relación a la regulación de la actividad eléctrica en células excitables, este sistema experimental permite contar con mutantes que presentan alteraciones en la conductancia eléctrica de la membrana plasmática. En la actualidad se cuenta con numerosas cepas mutantes de éste tipo. Entre ellas se pueden mencionar las cepas *Paralytic (par)*, *No action potential (nap)*, *Seizure (sei)* y *Temperature-induced paralytic (Tip-E)*, que presentan una disminución de la excitabilidad a determinadas temperaturas (Grigliatti et al., 1973; Sidggi y Benzer, 1976; Suzuki et al., 1971; Wu y Ganetzky 1980). Mas aún, neuronas en cultivo provenientes de la cepa *nap* no sólo muestran una disminución de la excitabilidad a determinadas temperaturas sino que aún a temperaturas no perniciosas se observa un aumento en el periodo refractario del potencial de acción (Wu et al., 1978) y una disminución en la sensibilidad a tetrodotoxina (TTX) (Kauvar 1982). Esta toxina afecta específicamente los

canales de Na^+ , responsables de la fase temprana de despolarización del potencial de acción. Las mutantes *Sei*, *TipE*, al igual que la mutación *nap*, presentan alteraciones en la propagación del potencial de acción, también tienen afectados los canales de Na^+ , ya que en estas mutantes la amplitud de las corriente de Na^+ se encuentra reducida al 70 % de la amplitud de la corriente observada en la cepa silvestre (O'Dowd y Aldrich, 1988).

Otro grupo de mutaciones que confieren alteraciones neurológicas son las que poseen las cepas *Shaker*, *Hieperkinetic*, *Slowpoke*, *Ether-a-go-go* (Kaplan y Trout, 1969; Trout y Kaplan 1973). Estas mutantes muestran temblor en sus extremidades al ser anestesiadas con éter. Hasta ahora la mutante *Shaker* es la única de entre estas mutantes que ha sido objeto de estudios electrofisiológicos detallados. Tales estudios demostraron que las mutantes *Shaker* exhiben, tanto en músculo como en nervio, potenciales de acción anormalmente prolongados (Tanouye et al., 1981) y muestran además un aumento en la frecuencia de descarga de neurotransmisor en el terminal presináptico (Jan, et al., 1977). Trabajos posteriores muestran que los músculos de larvas y adultos de esta cepa carecen de una de las conductancia al potasio (Salkoff y Wyman, 1981 a y b; Salkoff y Wyman 1983 a y b; Wu y Haugland 1985). A pesar de que en la actualidad no se sabe si la misma deficiencia ocurre en el axón y en los terminales sinápticos, esta explicación podría dar cuenta al mismo tiempo de los potenciales de acción prolongados y el aumento en la descarga de neurotransmisor. Por otro lado, Cowan y Siegel (1986) demostraron que los individuos afectados por esta mutación poseen un bajo nivel de aprendizaje asociativo y presentan además una rápida pérdida de la memoria de corta duración. Al integrar la información derivada de los estudios de comportamiento en *Shaker* con los estudios electrofisiológicos efectuados en mutantes de esta cepa, pareciera que es posible postular que las mutaciones que afecten la actividad eléctrica en el sistema nervioso podrán también afectar procesos mas complejos como el aprendizaje asociativo y la formación de memoria.

Otro grupo de mutantes de *Drosophila* que presentan alteraciones neurológicas, han sido identificados a través de estudios de comportamiento. Entre ellas se pueden citar las cepas *dunce (dnc)*, *rutabaga (rut)* y *turnip (tur)*, que presentan bajos niveles de aprendizaje asociativo y de retención de memoria (Dudai et al., 1976; Tully 1985). Se ha demostrado que las mutaciones *dnc* y *rut* afectan componentes del sistema adenilato-ciclasa. Las mutantes *dnc* poseen baja actividad de un tipo de fosfodiesterasa (PDE II) o carecen totalmente de ella (Davis y Kiger, 1981). Como consecuencia de esta deficiencia los individuos de esta cepa presentan niveles elevados de AMPc (Davis y Kiger 1978; Byres et al., 1981). La mutación *rut*, por su parte, parece afectar la adenilato-ciclasa, ya que *in vitro* la síntesis de AMPc no es estimulada por Ca^{2+} /calmodulina (Livingstone, Sziber y Quinn, 1984) y muestra un reducida estimulación por Mg^{2+} y forskolina (Dudai et al., 1985). La mutación *tur* por su parte afectaría una proteína quinasa C, ya que homocigotos para esta mutación muestran poca o ninguna actividad de esta enzima (Smith et al., 1985).

Dado que las mutaciones *dnc*, y *rut*, parecen converger en el sistema adenilato ciclasa, se ha especulado que las alteraciones exhibidas en el aprendizaje asociativo y en la retención podrían ser explicadas sobre la base del modelo de Kandel (1982), propuesto para dar cuenta de los eventos básicos que acompañan la potenciación sináptica en *Aplysia*. El modelo de Kandel postula que la estimulación repetitiva de una neurona presináptica por una neurona moduladora gatilla una cascada enzimática cuyo producto final es la fosforilación de un canal de potasio. En esta cascada enzimática estaría involucrada una adenilato ciclasa, modulada por una proteína G, y la subunidad regulatoria y catalítica de una proteína quinasa dependiente de AMPc. Como resultado de la fosforilación, estos canales de potasio no se abrirán y en consecuencia los potenciales de acción en los terminales serán mas prolongados y en cada período de actividad habrá un aumento en la entrada de calcio y por lo tanto mas liberación de neurotransmisor.

Tomando en cuenta estos resultados no es obvio que el modelo de Kandel explique las deficiencias en el aprendizaje y la retención encontrados en las mutantes *dunce*, *rutabaga* y *turnip*, ya que la mutante *turnip*, que es deficiente tanto en el aprendizaje asociativo como en la retención, carece de una proteína quinasa C la cual no es parte de la cascada enzimática postulada por aquel modelo.

Es importante señalar que en la actualidad carecemos de estudios electrofisiológicos en membranas excitables de las mutantes *dnc*, *rut* y *tur*. Tales estudios son imprescindibles para completar una hipótesis respecto de las bases de las alteraciones que darán cuenta de las deficiencias neurológicas en éstos individuos. Por ejemplo, no se ha demostrado hasta ahora que las membranas excitables de la *Drosophila* posean conductancias que están bajo la regulación directa o indirecta del AMP cíclico. Mas aún, no hay estudios electrofisiológicos que aporten evidencia en favor de la idea que las mutantes *dunce* y *rutabaga* presentan en realidad deficiencias en la regulación de la actividad eléctrica en el sistema nervioso. Una comprensión a nivel molecular de las bases de las alteraciones que tales mutantes presentan en la regulación de la actividad eléctrica en el sistema nervioso requerirá necesariamente de estudios cuidadosos a nivel de canales iónicos individuales, como queda ilustrado por el reciente trabajo de Solc et al. (1987) realizado en células musculares y neuronas en cultivo provenientes de la cepa silvestre y *Shaker*. El llevar a cabo tales estudios permitiría tomar completa ventaja de éste interesante sistema experimental.

OBJETIVOS.

Un paso crucial en la definición de las propiedades de receptores de L-glutamato en músculos de la *Drosophila* requiere la caracterización de los canales asociados a dichos receptores mediante el registro de las corrientes de canales individuales, unida a una mínima definición de su perfil farmacológico. Este hecho permitirá, relacionar deficiencias a nivel neurológico con corrientes iónicas, como se ha logrado en el caso de la mutante *Shaker*. Así mismo, la detección de una conductancia que sea modulada por la concentración de AMPc, permitirá establecer una relación a nivel molecular entre las deficiencias enzimáticas que presentan las mutantes *dunce* y *rutabaga* y las propiedades de excitabilidad de la membrana.

Los objetivos de esta tesis se pueden resumir como sigue:

1. Desarrollar los métodos necesarios para llevar a cabo estudios electrofisiológicos en músculos de la larva de *Drosophila*.
2. Llevar a cabo una caracterización de los receptores de L-glutamato y de los canales iónicos asociados a dichos receptores.
3. Caracterizar un canal de potasio, que es modulado por la concentración de AMP cíclico intracelular.

MÉTODOS:

1. Cultivo de las moscas:

Las moscas fueron mantenidas en frascos de vidrio con alimento en un incubador a 20 °C. El alimento contenía por 100 ml de agua: 1.6 g de agar, 6 g de sémola, 1 g de levadura, 4.3 g de sacarosa suplementado con 0.42 g de NaNO_3 , 0.12 g de K_2HPO_4 , 0.07 g de KCl , 0.07 g de MgSO_4 y 1.25 mg de FeSO_4 mas 125 mg de Nipagin. Las moscas silvestres fueron obtenidas de cultivos mantenidos en la U. Católica de Chile, mientras que las mutantes fueron donadas por la Dra. Linda Hall del Albert Einstein Institute (USA) y por el Dr. Timm Tully de Brandeis University (USA).

2. Reconocimiento de las mutantes:

El reconocimiento de los mutantes que expresan el fenotipo *dunce* fue posible debido a las características recesivas de la mutación *dnc*, el cromosoma en que reside (X^*) y a las características de nuestros cultivos. Los cultivos se mantuvieron heterocigotos con un alelo que posee marcadores de forma (*B*), color de ojos (*w*) y color de cuerpo (*y*) ligados al cromosoma sexual, contenidos en el balancín FM7. De manera que la expresión del fenotipo *dunce* está sujeta a la condición homocigota w^+ , B^+ , y^+ , dnc^- . Lo que significa que las moscas adultas que poseen características normales para estos marcadores expresarán la mutación *dunce*. Sin embargo en las larvas no es posible este reconocimiento, por lo tanto, dado que el 50 % de los machos y un porcentaje menor de las hembras expresan la mutación *dnc*, los registros de canales iónicos fueron efectuados sólo en larvas machos.

3. Disección de la larva:

Las larvas de tercer estadio de desarrollo fueron obtenidas de cultivos de aproximadamente ocho días. Para exponer los músculos ventrales longitudinales, se fija la larva al fondo de la cámara experimental utilizando alfileres de fibra de vidrio. El fondo de la cámara esta recubierto con un polimero sintético (Sylgard 148, Dow Corning Co., Michigan) La disección se realiza con la larva sumergida en "solución normal" (ver seccion 4. soluciones) y la exposición de los músculos se logra luego de efectuar bajo lupa, un corte longitudinal por el dorso de la larva, seguido de la remoción de las vísceras.

4. Soluciones:

| | :Na ⁺ | K ⁺ | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ | Cl ⁻ | COOCH ₃ ⁻ | SO ₄ ⁼ | HEPES | Sacarosa |
|-----------------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|-------|----------|
| solución normal | :128 | 2 | 4 | 1.8 | 140 | | | 5 | 36 |
| solución 0 Cl ⁻ | :128 | 2 | 4 | 1.8 | | | 70 | 5 | 36 |
| solución 10 Cl ⁻ | :128 | 2 | 4 | 0.1 | 10 | 128 | | 5 | 36 |
| solución 50 Cl ⁻ | :128 | 2 | 4 | 0.1 | 50 | 88 | | 5 | 36 |
| solución citoplasmática | : 5 | 150 | 4 | | 9 | 150 | | 5 | |

El pH de las soluciones fue llevado a 7.0 con NaOH 1M excepto en el caso de la "solución citoplasmática" en el cuál el pH fue llevado a 7.0 con KOH 1M. Las concentraciones se expresan en mM y corresponden a las concentraciones nominales antes de ajustar el pH

5. Registro intracelular de potencial eléctrico:

Las medidas de potencial de membrana fueron efectuadas utilizando un amplificador de voltaje de alta impedancia de entrada construido en nuestro laboratorio. Consta de un amplificador operacional (AD 545, Analog Devices, Norwood, Massachusetts) con una resistencia de reatrolimentación variable conectada entre la entrada inversora del amplificador y la salida, que permite ajustar la ganancia a un valor de 10 veces (Figura 1). El electrodo de registro se conecta directamente a la entrada no inversora del amplificador a través de un electrodo de Ag-AgCl. En las determinaciones del potencial se utilizaron microelectrodos intracelulares con resistencias de 30 a 40 Mohm, llenos con una solución KCl 3M. Las mediciones se hicieron con referencia a un electrodo Ag-AgCl inmerso en la solución que baña los músculos. En los experimentos realizados en ausencia de iones Cl^- , el electrodo de referencia se conectó a la solución a través de un puente de agar KCl 3M.

6. Registro de corrientes:

Para medir corrientes de canal único en la membrana de los músculos longitudinales ventrolaterales de estas larvas, se usó la técnica de "patch clamp" (Hamill, et al 1981). Esta técnica consiste en aislar eléctricamente el área de membrana delimitada por la punta de una pipeta de vidrio, cuyo diámetro interno es cercano a $1 \mu m$. La pipeta se acerca a la célula hasta establecer un sello de alta resistencia eléctrica (mayor que $1 Gohm$), entre la pipeta y la membrana celular, de manera que las fluctuaciones de corriente que sean registradas correspondan a la corriente que pasa por los canales contenidos en el área encerrada por la punta de la pipeta de registro. Esta técnica permite además controlar el potencial eléctrico a través de la membrana encerrada por la pipeta.

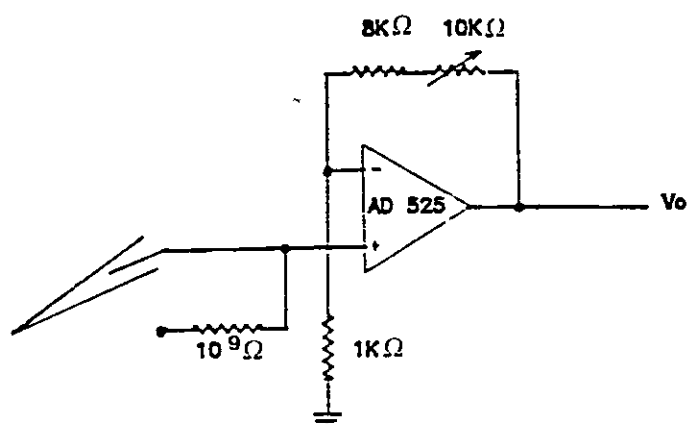


FIGURA 1

Amplificador de voltaje de alta impedancia de entrada utilizado en las determinaciones de potencial de membrana. El circuito fue construido utilizando un amplificador operacional (AD 545, Analog Devices, Norwood, Massachusetts) en una configuración no inversora de ganancia variable. La resistencia de 1×10^9 ohm conectada a la entrada del amplificador permite determinar por comparación con resistencias de valor conocido la resistencia del microelectrodo. La ganancia del amplificador de voltaje fue ajustada a un factor de 10 veces.

6.1. Fabricación de las pipetas:

Las pipetas de registro se fabrican estirando micropipetas volumétricas desechables de 100 μ l (Boralex, Rochester Scientific Co., Rochester, New York) o capilares de vidrio (7052, Garner Glass Co., Claremont, California). El estiramiento de las pipetas se realiza en dos etapas en un estirador vertical (700 C, David Kopf Instruments, Tujunga, California). En la primera etapa se estira la pipeta en aproximadamente 1 cm haciendo pasar por el filamento una corriente eléctrica de 20 A. En la segunda etapa el filamento se calienta con 16 A hasta que la pipeta se corta. Luego del estiramiento las pipetas, son pulidas con calor acercandolas al filamento de una microforja y por último la punta de la pipeta es recubierta con un polímero hidrofóbico (Sylgard 184, Dow Corning Co. Midland, Michigan), de modo de disminuir su capacidad eléctrica. Las pipetas construidas de esta manera, tienen resistencias entre 5 - 6 Mohm.

6.2. Sistema electrónico de registro:

El sistema de registro fue construido como parte de este trabajo de tesis. Consta de un circuito conversor de corriente en voltaje, figura 2-A, un circuito de estimulación, Figura 2-B y un circuito que permite optimizar el registro de corriente, Figura 2-C.

El conversor corriente-voltaje permite amplificar las corrientes registradas y utilizar un osciloscopio para medirlas (Figura 2-A). Este circuito consta de un amplificador operacional, (OPA 101, Burr-Brown, Tucson-Arizona) alambrado con una resistencia de retroalimentación $R_f = 10^{10}$ ohm. En esta configuración el potencial a la salida V_{out} es proporcional a la corriente que entra I_{in} , de acuerdo a la relación $V_{out} = -I_{in} \times R_f$. Por cada 10^{-12} A de corriente que este circuito recibe, el conversor entrega a la salida -0.01 V. Esta parte del circuito electrónico de registro se encuentra instalada en un gabinete metálico (cabezal) colocado a muy corta

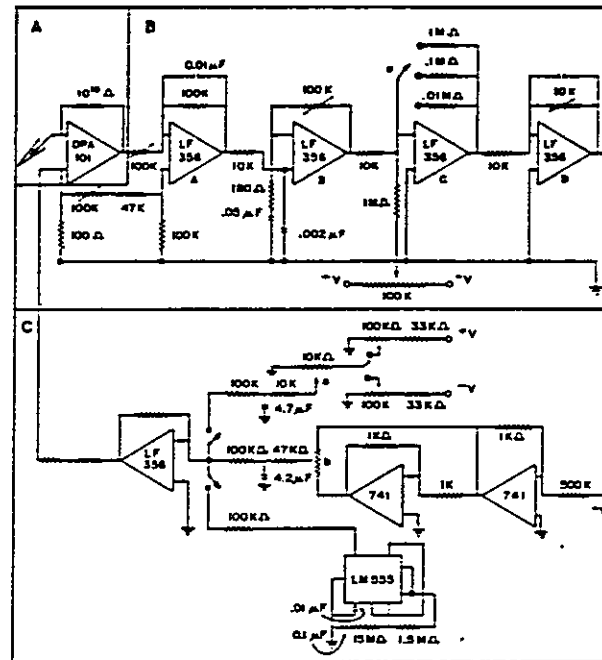


FIGURA 2

Esquema del circuito de patch clamp:

A. Conversor corriente-voltaje. Esta parte del circuito convierte la señal de corriente en voltaje y amplifica la señal de modo que convierte señales de corriente de 1 pA en -0.01 V.

B: Parte del circuito diseñada para recuperar la señal de corriente proveniente del conversor, libre de los pedestales de potencial que recibe desde el circuito de estimulación, corregida por la lentitud del conversor, amplificada y corregida de cualquier pedestal de potencial adquirido por imperfecciones en los componentes de esta parte del sistema de registro.

C: Circuito de estimulación. Esta parte del circuito está destinada al control del potencial a través de la membrana, compensar la diferencia de potencial entre los electrodos y a la generación de trenes de pulsos de potencial para la determinación de la resistencia del sello pipeta-membrana.

distancia de la preparación, de manera que la conexión del electrodo de registro se efectúe directamente a la entrada inversora del amplificador. La conexión eléctrica entre el conversor corriente-voltaje y la solución de la pipeta, se establece a través de un electrodo de Ag-AgCl.

El circuito de estimulación permite controlar el potencial eléctrico en el área encerrada por la punta de la pipeta e inyectar pulsos de voltaje para medir la magnitud de la resistencia eléctrica del sello pipeta-membrana. Este circuito se encuentra conformado por un amplificador operacional (LF 356N, National Semiconductor, Santa Clara, California) alambrado en configuración de sumador, Figura 2-C. A la entrada inversora del sumador convergen tres sub-circuitos, dos de los cuales pueden ser conectados independientemente por un interruptor, mientras que el tercero permanece siempre conectado. El sub-circuito destinado para compensar la diferencia de potencial entre los electrodos, así como el sub-circuito que permite estimular la membrana, toman potencial de la fuente y lo limitan a un intervalo de ± 150 mV. El alambrado de estos sub-circuitos permiten además entregarle al sumador fracciones de este intervalo de potencial, manipulando los potenciómetros marcados (a) y (b). El tercero de los sub-circuitos conectados al sumador, está conformado por un generador de pulsos cuadrados de potencial, construido con un circuito integrado (LM 555, National Semiconductor Corporation, Santa Clara, California). Estos pulsos de potencial son requeridos para visualizar los cambios de la resistencia del sello.

El circuito que permite optimizar la señal de corriente consta de 4 amplificadores operacionales (LF 356N, National Semiconductor, Santa Clara, California) El primero de ellos (marcado "A") corresponde a un amplificador diferencial, que recibe la señal proveniente del conversor corriente-voltaje y los potenciales inyectados por el circuito estimulador. Este amplificador asegura que el V_{out} no contenga los pedestales de potencial inyectados por el circuito de estimulación. El siguiente amplificador (marcado "B") corrige la señal por la lentitud de la respuesta de frecuencia del conversor corriente voltaje. Para esto el amplificador,

alambrado como se muestra en la Figura 2-B, produce a la salida un potencial que al pasar a través de la resistencia de retroalimentación ajustable y la resistencia y el condensador conectados a la entrada inversora del amplificador, tenga la forma y magnitud del pulso proveniente del amplificador diferencial. Esto quiere decir que un pulso de potencial cuadrado, que es "filtrado" por el conversor corriente-voltaje se reflejará a la salida del circuito que corrige por la frecuencia de respuesta como un pulso cuadrado sin "filtrar", con una amplitud y duración proporcional a la señal de corriente original. El tercer amplificador en esta parte del circuito, permite amplificar la señal proveniente de las etapas anteriores con el propósito de mejorar la razón señal/ruido. Para esto en la retroalimentación del amplificador se han conectado tres resistencias de 1, 2 y 3 órdenes de magnitud mayores que la resistencia de la entrada, de manera que la ganancia puede ser 10, 100 y 1000 veces de acuerdo a la resistencia que se seleccione con el interruptor marcado "c" en el circuito. Este amplificador permite además corregir la señal de cualquier pedestal de potencial adquirido por imperfecciones en los componentes utilizados en las fases anteriores. Para ello le puede sumar a la señal un potencial proveniente de la fuente, que es atenuado convenientemente por un divisor de tensión. Por último, el cuarto amplificador (marcado "D"), es un amplificador inversor de ganancia 1, que permite restablecer el signo de las corrientes registradas, perdido al pasar por las fases anteriores del circuito. De esta manera el potencial a la salida será proporcional a $I_{in} \times R_f$.

7. Equipamiento.

El equipo utilizado en los registros de corriente así como en las determinaciones del potencial de membrana, consta de una superficie metálica de aproximadamente 80 Kg, colocada sobre una mesa antivibratoria. Sobre esta superficie están colocados un microscopio y un micromanipulador de precisión, en cual se instala el conversor corriente voltaje o el

amplificador de voltaje de alta impedancia. Los electrodos de registro se instalan directamente en el cabezal utilizando un porta pipetas cuyo diseño permite aplicar presión positiva sobre la solución que contiene la pipeta, Figura 3. Además el equipo consta de un osciloscopio, un procesador de audio (PC-X11, Sansui, Tokio) modificado para extender la capacidad de muestreo hasta niveles DC, que digitaliza a 44 khz con 14 bits de resolución las señales análogas de voltaje provenientes del conversor. Además el equipo consta de una video-grabadora (HR-7100, JVC, Japon), en la cual se graba la señal digitalizada para su posterior análisis.

8. Establecimiento de los sellos de alta resistencia eléctrica:

Una vez instalada la pipeta en el cabezal, se aplica presión positiva sobre la solución que contiene la pipeta y se efectúa el cercamiento de la pipeta a la membrana midiendo a cada instante la resistencia eléctrica de la pipeta. Para esto se aplica un pulso rectangular de potencial de 1 mV entre el electrodo contenido en la pipeta y el electrodo de tierra, de manera que un aumento de resistencia de la pipeta puede ser constatado por una disminución de la magnitud del pulso de corriente que se mide en el osciloscopio. La pipeta se acerca hasta que se verifique un pequeño aumento de la resistencia del electrodo, que se produce por el contacto entre la pipeta y la membrana. En este momento se libera la presión contenida en la pipeta y se efectúa una presión negativa equivalente a 5 ml de H₂O a través del tubo por el que se aplica la presión. La succión aplicada debe ser ejercida hasta que se establezca el sello de alta resistencia, lo que se verifica por un aumento en la resistencia del electrodo. La resistencia del sello necesaria para medir corrientes a través de canales únicos debe ser mayor que 1 Gohm.

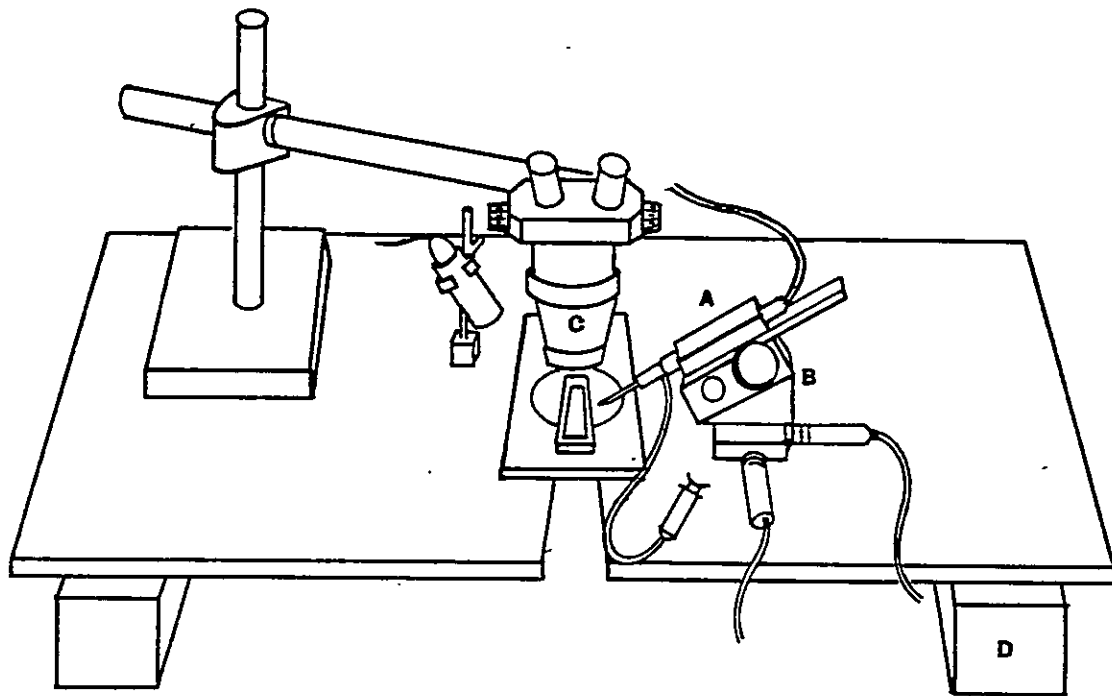


FIGURA 3

Esquema del "set-up" utilizado en los estudios de potencial de membrana y en el registro de corrientes de canal único. A) Cabezal, B) Micromanipulador de precisión, C) Microscópio, D) Mesa antivibratoria.

9. Análisis de los resultados:

Para el análisis cinético de los resultados, los registros fueron filtrados a 1 kHz con un filtro *bessel* de 8 polos (902, Frequency Devices, Haverhill, MA), y muestreados por computador a 10 o 20 KHz, con un computador (PROVEN 286, Computerage, Santiago Chile) a través de un conversor análogo digital (Labmaster TL-1, Axon Instruments, Inc., Burlingame, California). Los registros analizados, corresponden a las fluctuaciones de corriente a través de la membrana en función del tiempo. La corriente en los registros fluctúa entre dos niveles, de acuerdo a las propiedades cinéticas del canal. Uno de los niveles corresponde al estado abierto y el otro nivel al estado cerrado. La determinación de la duración de los tiempos de permanencia fue efectuada utilizando un programa computacional diseñado por el Dr. Francisco Bezanilla (UCLA). El programa genera un registro idealizado sobre la base del registro de corriente. Para ello, el programa construye un histograma de la amplitud de las fluctuaciones de las corrientes sobre el cual se define la amplitud de la corriente correspondiente al estado abierto y cerrado y el programa recorre el registro construyendo un archivo con la duración de los tiempos que la corriente permanece en uno o el otro nivel.

Las distribuciones de los tiempos en el estado abierto y cerrado fueron analizados utilizando el procedimiento descrito por Sigworth y Sine (1987), que contempla el despliegue de la distribución de tiempos de permanencia del canal en intervalos de tiempo en escala logarítmica. Este procedimiento permite abarcar un amplio intervalo de tiempo, lo que evita la pérdida de información y facilita la detección de los tiempos promedios de los diferentes procesos cinéticos que puedan ser observados. La determinación de las constantes de tiempo de los procesos de apertura y cierre, se efectuó ajustando la distribución a una función de densidad de probabilidades, usando el criterio de máxima verosimilitud, usando un programa computacional diseñado por el Dr. Osvaldo Alvarez, que contempla el "tiempo muerto" del

sistema de registro.

9.1. Análisis condicional:

El análisis condicional de los eventos permite establecer correlaciones entre los componentes cinéticos del proceso de apertura y cierre del canal (Blatz y Magleby, 1989). Con este propósito, se clasifican las duraciones de los eventos de uno de los estados (el estado condicionante) en intervalos de tiempo crecientes y cada vez mayores, de manera de considerar todos los componentes cinéticamente distinguibles. Posteriormente se clasifican todos los eventos que preceden a anteceden a los eventos del estado condicionante comprendidos en cada intervalo de duraciones y se determinan los valores de las constantes de tiempo y la representación porcentual de cada una de los componentes que están contiguas al intervalo de duraciones del estado condicionante. La determinación de la duración de los eventos contiguos a un evento del estado condicionante se efectúa analizando los archivos con las duraciones de los tiempos de permanencia del registro idealizado, descrito en el punto 9. Los sub-archivos construidos de esta manera se grafican en escala logarítmica y se determinan las constantes tiempo y las áreas de la distribución, usando el criterio de máxima verosimilitud.

10. Protocolos experimentales:

10.1. Canales Activados por L-glutamato:

El estudio de los canales activados por L-glutamato, fue realizado en la modalidad "cell attached" y en la modalidad "outside-out" de la técnica de "patch clamp". En ambos tipos de experimentos la larva fue mantenida en "solución normal". En los estudios de selectividad la

pipeta contenía "solución 10 mM Cl⁻" o "solución 50 mM Cl⁻", enriquecidas con concentraciones micromolares de L-glutamato. En los experimentos efectuados en la modalidad "outside-out", la pipeta contenía solución normal sin L-glutamato y la cámara se perfundió con solución normal enriquecida con concentraciones micromolares de L-glutamato o GABA. Los registros fueron realizados solamente a potenciales negativos en el intervalo -45, -130 ya que al despolarizar la membrana bajo la pipeta eran activadas conductancias dependientes de potencial que hacían confusa la interpretación de los registros.

10.2. Canales de Potasio activado por AMPc:

El estudio del canal de K⁺ activado por AMPc fue realizado en la modalidad "cell-attached" y en la modalidad "inside-out" de la técnica de "patch clamp". En ambas modalidades la pipeta contenía solución normal y sólo fue cambiada la composición de la solución que contenía la cámara. En los registros en "cell-attached" la larva fue mantenida en solución salina normal, mientras que en los registros en membranas aisladas la solución de la cámara fue reemplazada por "solución citoplasmática" enriquecida con concentraciones micromolares de AMPc.

RESULTADOS:

1. RECEPTORES DE L-GLUTAMATO:

1.1. Estudios de potencial de membrana:

1.1.1. Efectos del L-glutamato sobre el potencial de membrana:

El estudio de canales iónicos activados por L-glutamato requiere como primer paso, la determinación de la sensibilidad de los receptores al agonista. Con este propósito se efectuaron estudios del potencial de membrana en relación con la exposición crónica de los músculos de la larva a diferentes concentraciones de L-glutamato. Los resultados muestran que el L-glutamato a bajas concentraciones es capaz de despolarizar la membrana, mientras que a concentraciones altas tiene un efecto repolarizante. En la Figura 4-A se puede observar que la exposición crónica de los músculos a concentraciones de L-glutamato en el intervalo de concentraciones 0.5-20 μM produce una despolarización de la membrana. La despolarización es gradual y alcanza su efecto máximo cuando la concentración de L-glutamato en la solución que baña los músculos es entre 10 y 20 μM . A concentraciones mas altas, en el intervalo 20 μM -1 mM, el L-glutamato repolariza la membrana. La repolarización es gradual y alcanza valores sólo unos pocos milivolts más positivos que el potencial de membrana medido en ausencia de L-glutamato, cuando la concentración de agonista es igual a 500 μM .

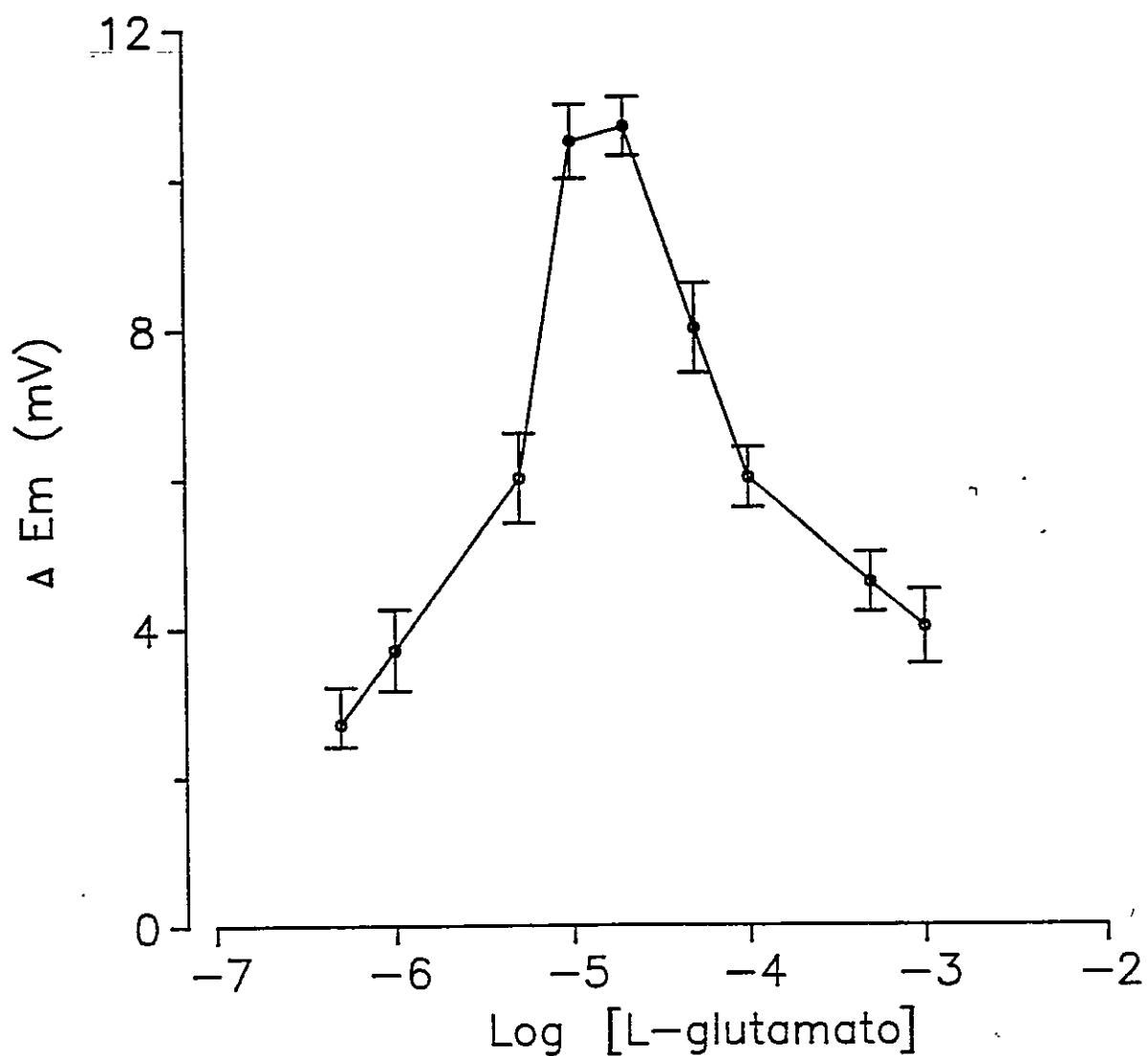


Figura 4-A

Potencial de membrana de los músculos de la larva de *Drosophila* en función del logaritmo de la concentración molar de L-glutamato. Se grafica la diferencia entre el potencial que se obtiene luego de la exposición de los músculos a L-glutamato menos el potencial de membrana medido en solución salina normal. Las barras corresponden al error estándar del promedio ($n=12$). Para estas mediciones se descartaron los músculos con potenciales de membrana menores que -45 mV antes de la exposición a L-glutamato.

1.1.2 Efecto inhibitorio en relación con los iones Cl^- :

Con el propósito de aclarar el origen de la respuesta repolarizante observada a concentraciones de L-glutamato mayores que $20 \mu\text{M}$, se efectuó un estudio de los requerimientos iónicos necesarios para la expresión de la respuesta bifásica del potencial de membrana, observada frente a la exposición crónica de los músculos a diferentes concentraciones de L-glutamato. Con este objeto se efectuaron medidas del potencial de membrana, luego de perfundir la cámara experimental con una solución sin iones Cl^- . En la Figura 4-B se puede observar que el efecto repolarizante de L-glutamato es abolido en ausencia de Cl^- y sólo se observa despolarización. Los resultados indican que la repolarización de la membrana depende de la presencia de iones Cl^- .

1.1.3. Farmacología básica de los receptores de L-glutamato:

Una caracterización farmacológica mínima de los receptores de L-glutamato que generan la respuesta bifásica del potencial de membrana de los músculos de la larva de *Drosophila*, puede obtenerse haciendo un estudio del potencial de membrana en función de la concentración de agonistas que afectan receptores de L-glutamato, tales como kainato y quisqualato (Cotman e Iversen, 1987). Los resultados muestran que quisqualato tiene un efecto sobre el potencial de membrana similar al producido por L-glutamato, mientras que kainato sólo tiene un efecto hiperpolarizante. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos del estudio del potencial de membrana en función de la concentración de quisqualato. A concentraciones menores que $0.3 \mu\text{M}$ quisqualato, este agonista tiene un efecto despolarizante, mientras que concentraciones mayores repolarizan la membrana del músculo de manera similar al L-glutamato. Sin embargo, ambas respuestas son obtenidas con concentración de quisqualato menores que cuando el

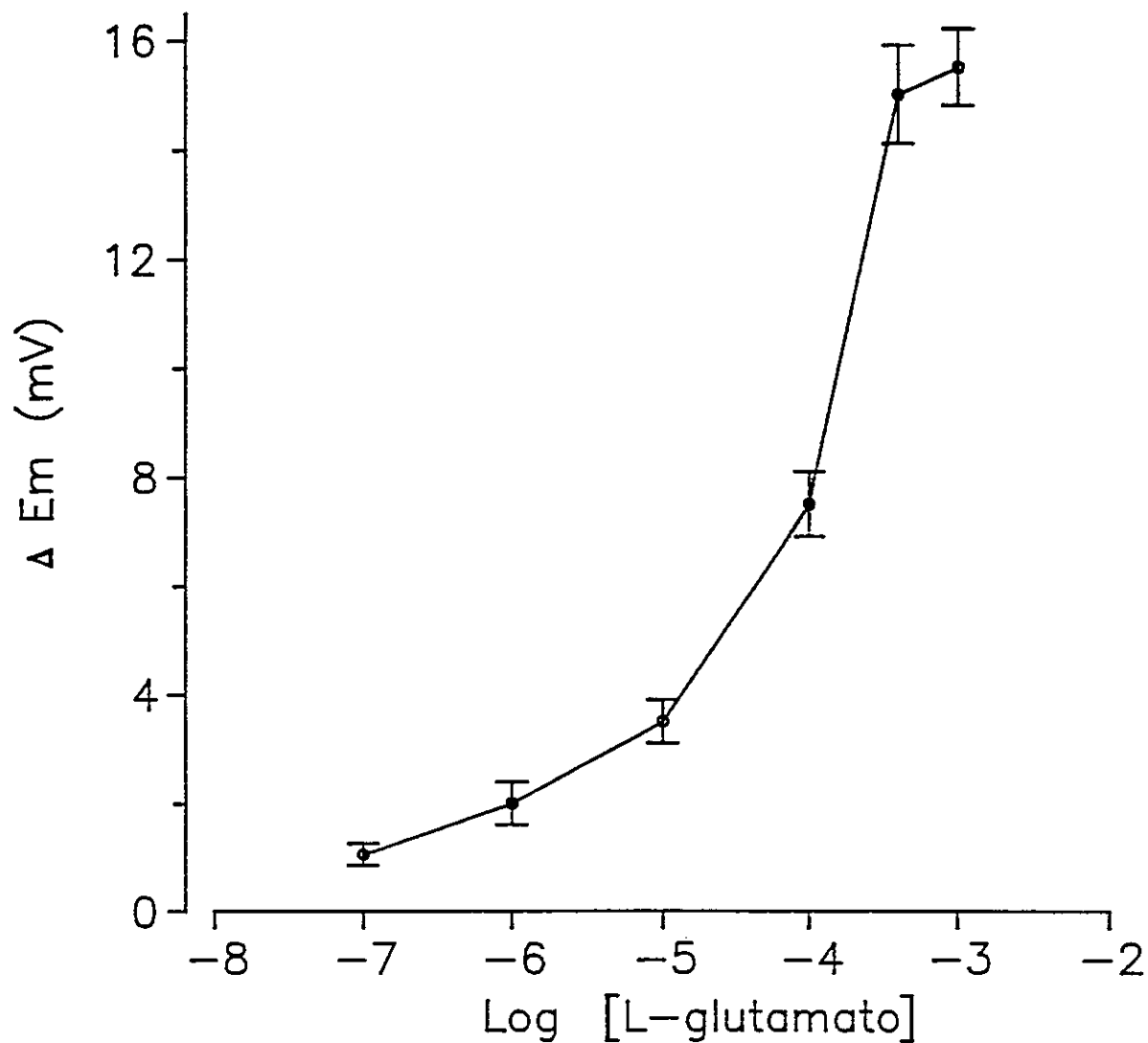


Figura 4-B

Potencial de membrana en función del logaritmo de la concentración molar de L-glutamato en solución salina 0 mM Cl^- . Se grafica la diferencia entre el potencial que se obtiene luego de la exposición de los músculos a L-glutamato menos el potencial de membrana medido en solución salina normal. Las barras corresponden al error estándar del promedio ($n=12$). En estas mediciones la conexión eléctrica entre el baño y el electrodo de referencia se efectuó a través de un puente de agar 3M KCl.

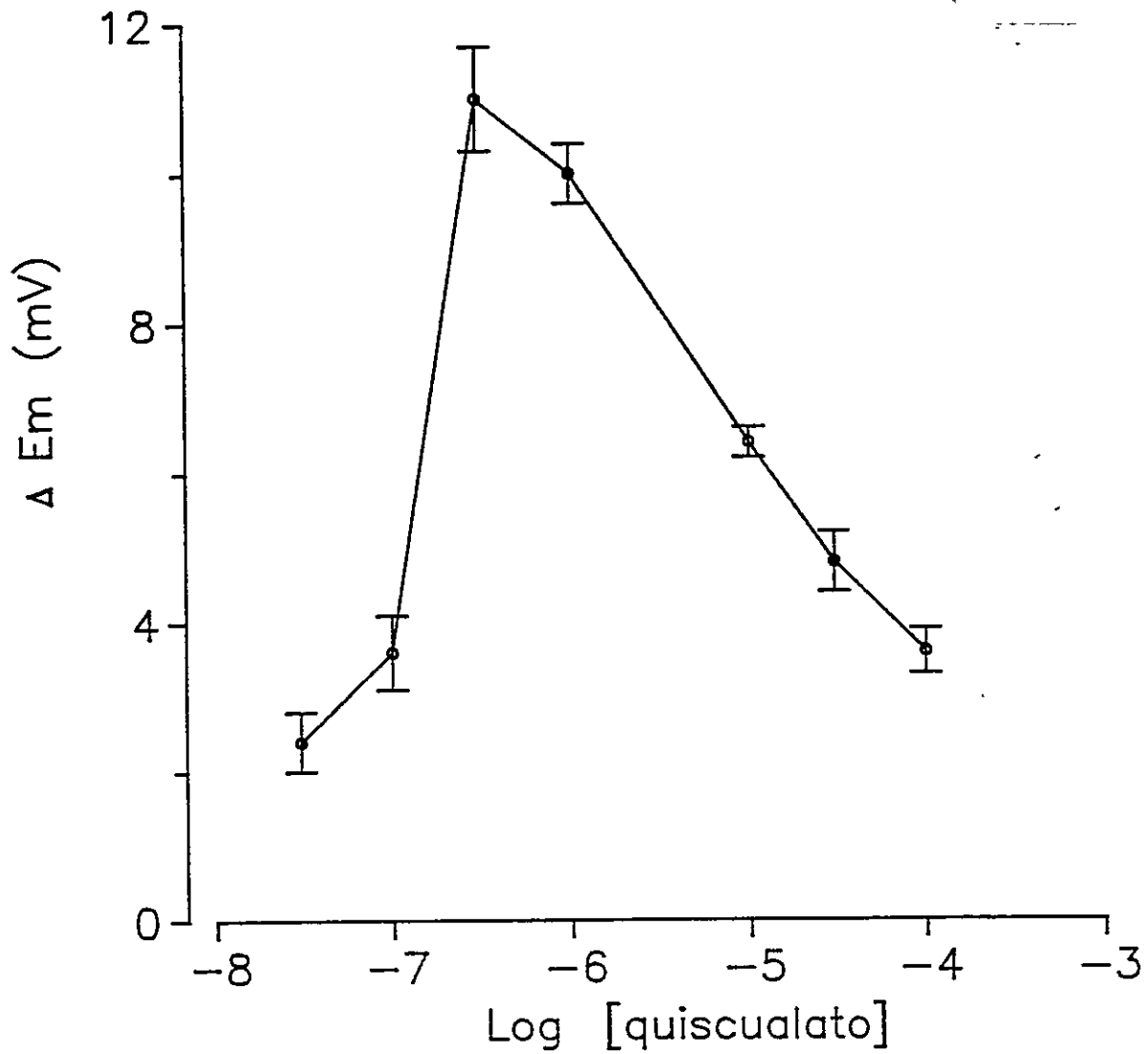


Figura 5

Potencial de membrana en función del logaritmo de la concentración molar de quisqualato. En la ordenada se grafica la diferencia entre el potencial que se obtiene luego de la exposición de los músculos a quisqualato menos el potencial de membrana medido en solución salina normal. Las barras corresponden al error estándar de promedio (n=12)

agonista es L-glutamato. Por otra parte, los estudios de potencial de membrana en función de la concentración de kainato muestran que este agonista sólo tiene un efecto hiperpolarizante, que se observa a concentraciones mayores que $10 \mu\text{M}$, Figura 6. En ausencia de iones Cl^- en la solución extracelular, el kainato no tiene efecto sobre el potencial de membrana. Resultados similares han sido obtenidos en presencia de GABA, (Hidalgo y Labarca, 1989, comunicación personal). En presencia de concentraciones de GABA mayores que $10 \mu\text{M}$ en la solución extracelular el potencial de membrana del músculo se hiperpolariza, alcanzando valores aproximadamente 15 mV más negativo cuando la concentración de GABA es igual a $500 \mu\text{M}$. Estos resultados muestran que L-glutamato y quisqualato a bajas concentraciones despolarizan la membrana mientras que GABA, kainato, L-glutamato y quisqualato a concentraciones altas, tienen efecto repolarizante.

1.1.4. Actividad eléctrica espontánea:

Los resultados obtenidos de los estudios de potencial de membrana, sugieren fuertemente la existencia de dos clases de receptores de L-glutamato en estos músculos. Una clase de estos receptores sería responsable de la despolarización y la otra produciría la repolarización de la membrana. La existencia de receptores excitatorios e inhibitorios en los músculos de la larva, son sugeridos por la ocurrencia de potenciales de miniatura post-sinápticos espontáneos (pmpe). En la Figura 7 se pueden observar deflexiones del potencial de membrana correspondientes a pmpe. Las deflexiones del potencial hacia valores positivos corresponden a pmpe excitatorios, que despolarizan la membrana, mientras que las que ocurren hacia valores de potencial mas negativos corresponden a pmpe inhibitorios. La detección de ambos tipos de pmpe sugieren la existencia de receptores excitatorios e inhibitorios en estos músculos.

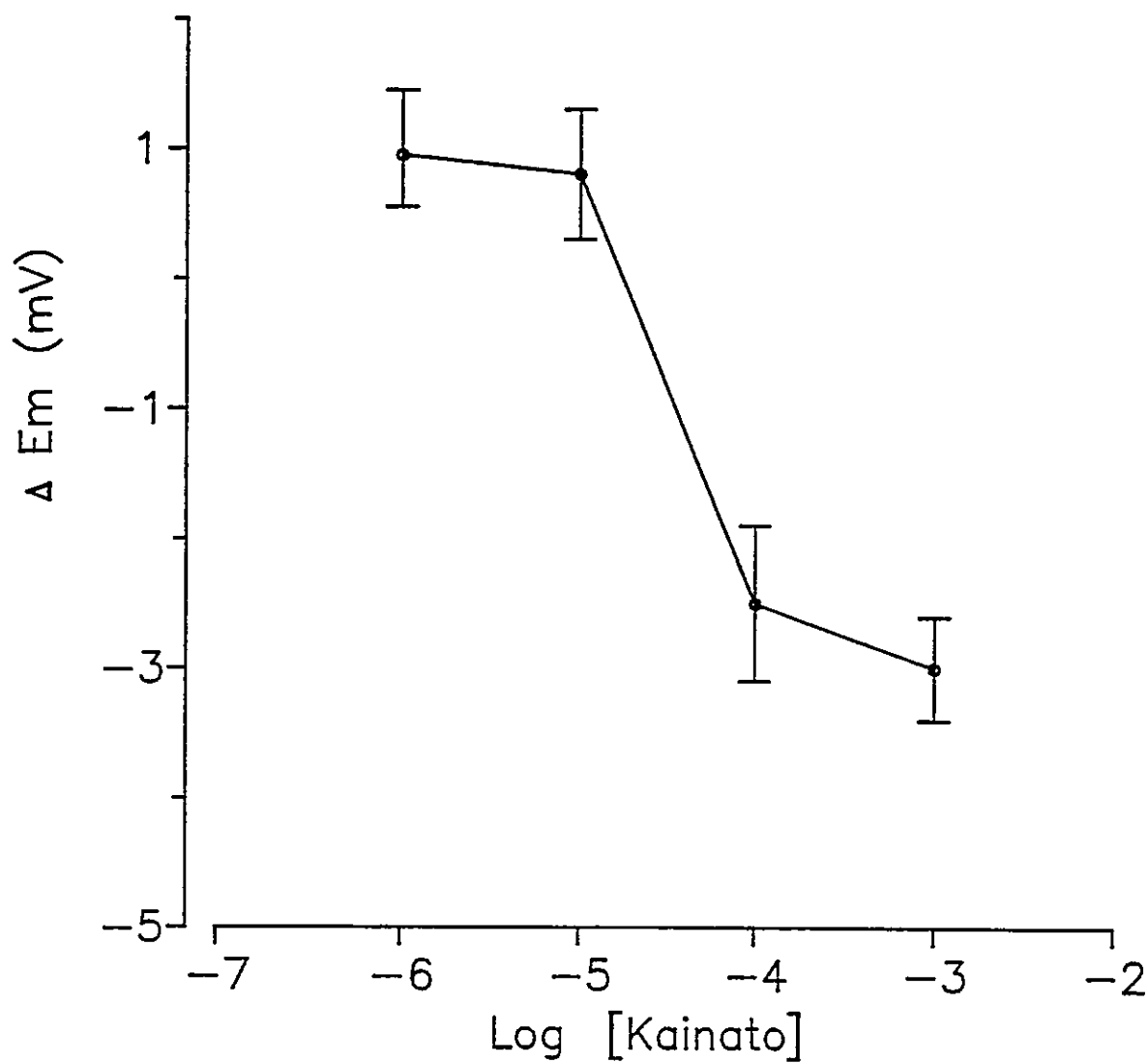


Figura 6

Potencial de membrana en función del logaritmo de la concentración molar de kainato. En la ordenada se grafica la diferencia entre el potencial que se obtiene luego de la exposición de los músculos a kainato menos el potencial de membrana medido en solución salina normal. Las barras corresponden al error estandar del promedio ($n=10$).

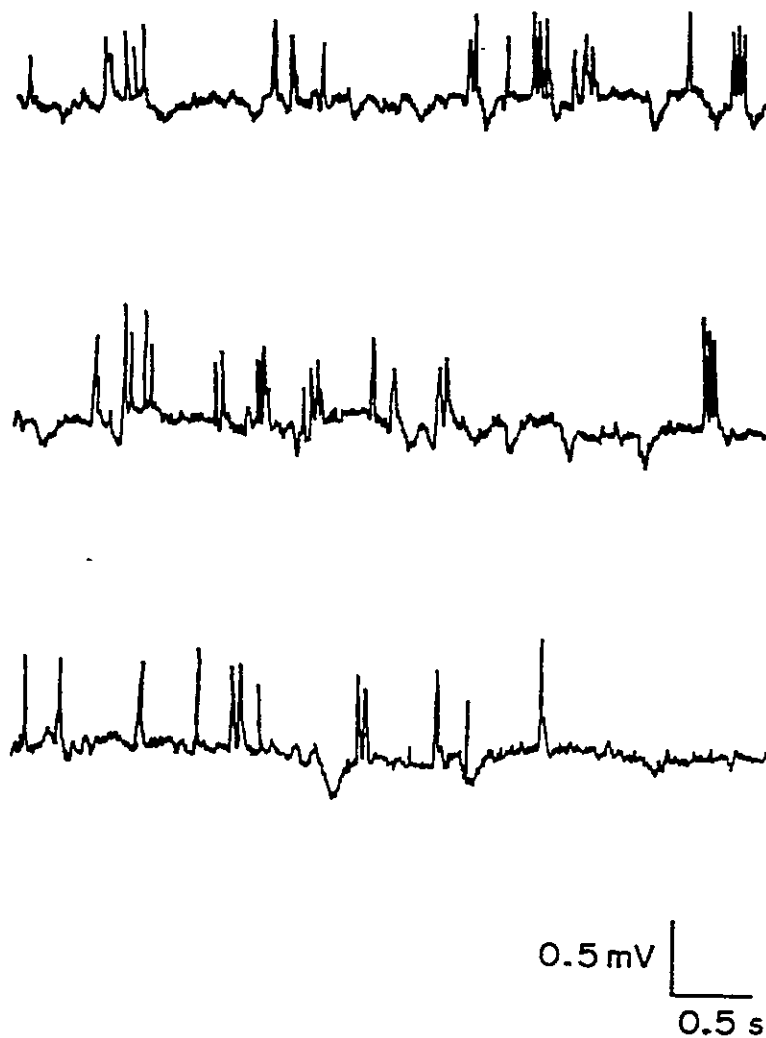


Figura 7

.Registro de actividad eléctrica de la membrana inducida por la liberación espontánea de neurotransmisor desde los terminales sinápticos. Las deflecciones del potencial hacia arriba corresponden a potenciales de miniatura despolarizantes y las fluctuaciones que ocurren en el sentido opuesto corresponden a potenciales de miniatura hiperpolarizantes.

1.2. ESTUDIO DE CANALES IONICOS ACTIVADOS POR L-GLUTAMATO:

1.2.1. Condiciones de Registro:

Con el propósito de efectuar un estudio de los canales iónicos involucradas en la respuesta del potencial de membrana obtenida al variar la concentración de L-glutamato, se establecieron las condiciones para registrar corrientes a través de canales iónicos utilizando la técnica de "patch clamp". La aplicación de esta técnica requiere el establecimiento de sellos de alta resistencia eléctrica entre la pipeta de registro y la membrana del músculo de la larva. Con el propósito de lograr este tipo de interacción, se incubó la preparación en presencia de una variedad de enzimas proteolíticas que incluyen la pronasa y la colagenasa, a diferentes concentraciones y por diferentes tiempos de incubación. La obtención de los sellos de alta resistencia eléctrica se logró luego de incubar los músculos de larvas jóvenes de tercer instar en colagenasa tipo IV o tipo IA (Sigma, St Louis, Mo), a una concentración de 0,5 mg/ml en solución salina normal durante 1 minuto, a 20 °C. Utilizando como criterio el comportamiento del potencial de membrana, se determinó que el tiempo de exposición de los músculos a esta enzima necesario para establecer los sellos de alta resistencia eléctrica, no provoca alteraciones en la membrana de estas células. En la Figura 8, se muestran los resultados obtenidos del estudio del potencial de membrana en función del tiempo de incubación en colagenasa. Se observa que el potencial de membrana se mantiene estable hasta los 60 segundos de incubación, a partir de los cuales el potencial que en promedio tiene un valor de -45 mV, decrece levemente y se mantiene estable aproximadamente durante 120 segundos. Tiempos de incubación mayores que 4 minutos deterioran la membrana. Este deterioro se visualiza en la figura como una rápida caída del potencial de membrana.

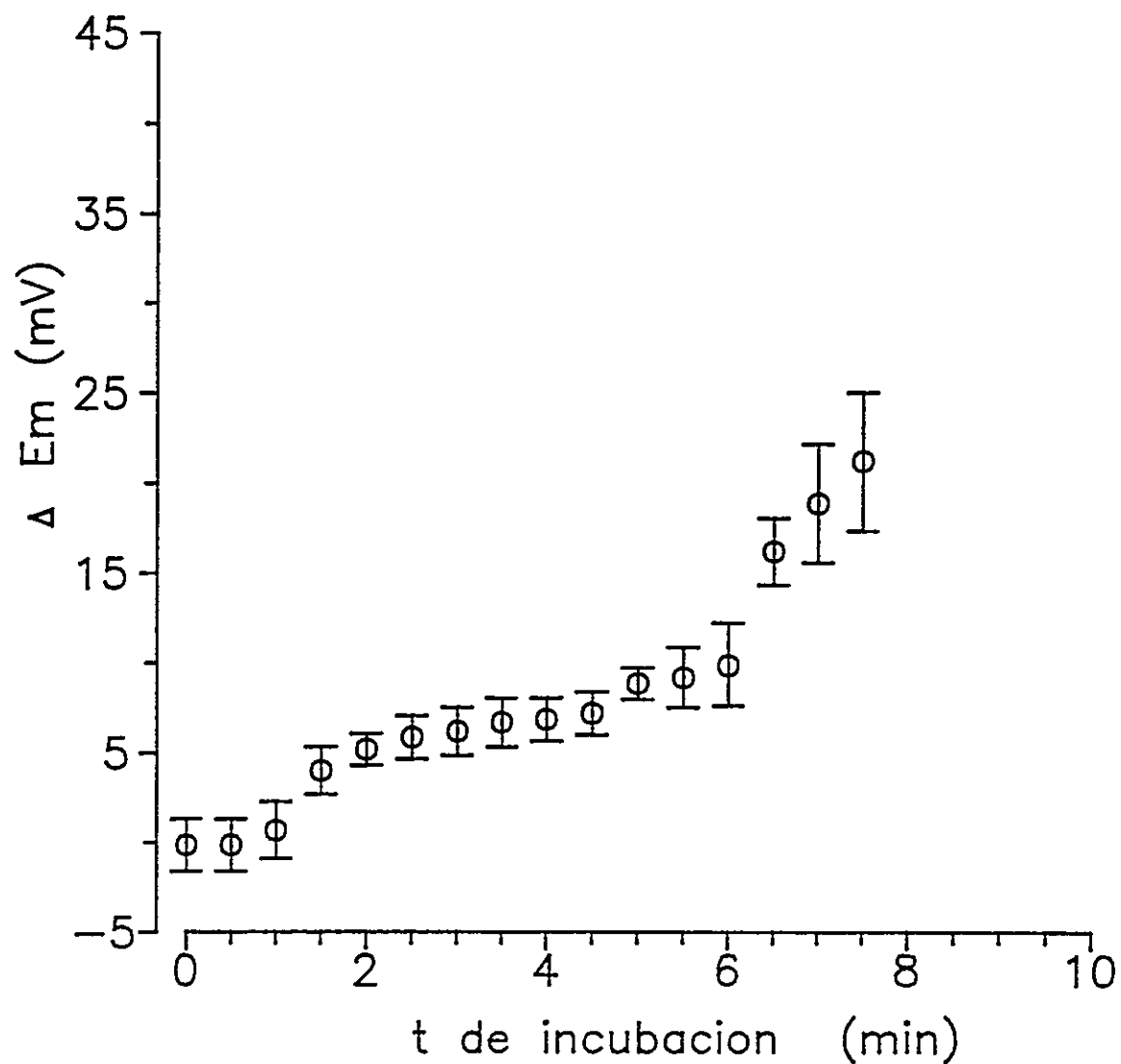


Figura 8

Estudio del comportamiento del potencial de membrana de los músculos de la larva de *Drosophila* en relación con el tiempo de incubación en colagenasa tipo IA a una concentración de 0.5 mg/ml. En la ordenada se grafica la diferencia entre el potencial medido en cada intervalo de tiempo menos el potencial medido al inicio de la incubación en colagenasa.

1.2.2. Canales excitatorios activados por L-glutamato:

Un vez establecidas las condiciones para establecer sellos de alta resistencia eléctrica entre la pipeta de registro y la membrana del músculo, se hicieron registros de corrientes de canal único activados por L-glutamato, en la modalidad "cell-attached". En registros efectuados con la pipeta llena con solución normal con concentraciones de L-glutamato menores que $50 \mu\text{M}$ e hiperpolarizando la membrana bajo la pipeta, fue posible registrar corrientes de entrada a través de canales iónicos activados por L-glutamato. La frecuencia con que se pudo identificar este tipo de canales en los registros fue baja, siendo identificados de acuerdo a su conductancia en sólo 5 de alrededor de 400 ensayos efectuados con la pipeta conteniendo concentraciones micromolares de L-glutamato. En alrededor de 1500 experimentos efectuados en ausencia de L-glutamato en la pipeta, en condiciones control esta conductancia no fue detectada. En la Figura 9, se muestra un registro de corriente a través de este tipo de canales obtenido con la pipeta de registro llena con solución salina normal más $50 \mu\text{M}$ L-glutamato. Se puede apreciar en esta figura que las aperturas del canal son de corta duración y se producen agrupadas en periodos de tiempo breves. En la figura 10 se muestra la curva corriente-voltaje obtenida de los valores de la amplitud de la corriente en relación con el potencial impuesto a través de la membrana. La línea recta ajustada a los valores experimentales tiene una pendiente de 104 pS y cruza el eje del potencial en un valor cercano a 0 mV . El potencial al que se invierte el sentido de la corriente a través de esta conductancia indica que su apertura despolariza la membrana. Esta propiedad caracteriza esta conductancia como un canal excitatorio.

El estudio de la distribución de los tiempos de permanencia en el estado abierto de este canal excitatorio presenta dos componentes. El componente rápido, que es el que predomina, tiene una duración promedio de $1,5 \text{ ms}$ con un 98% del total de los eventos. Mientras que el componente más lento que representa sólo a un 2% del total de los eventos tiene una duración

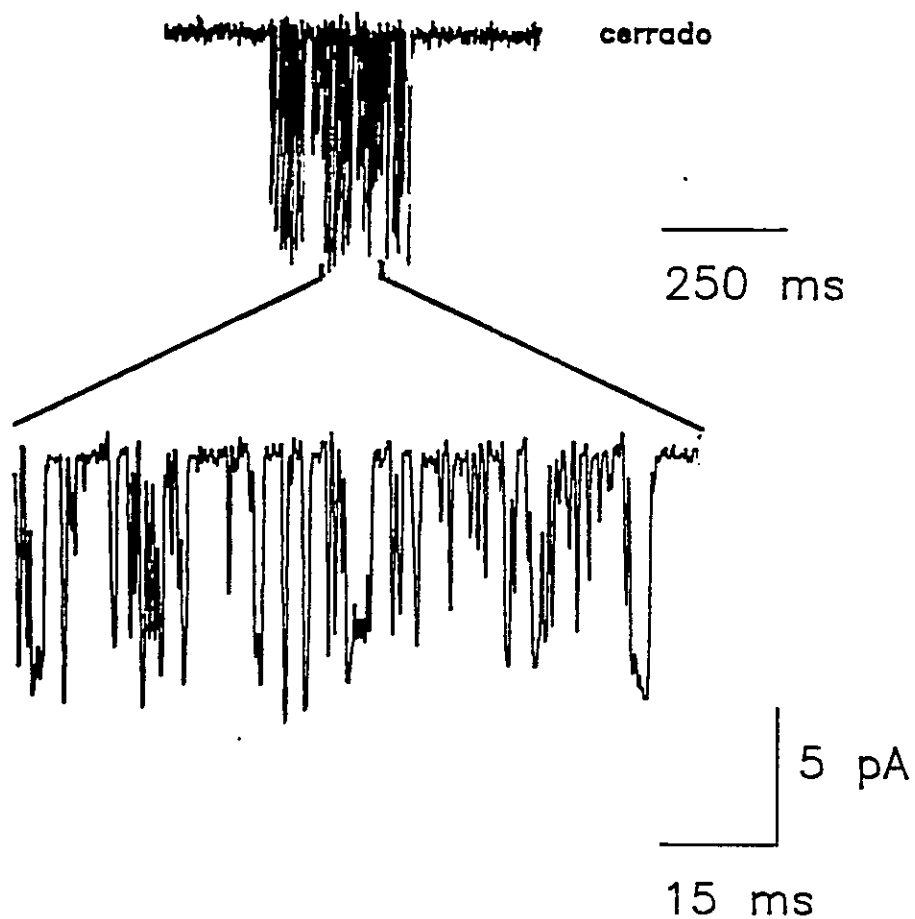


FIGURA 9

Registro de corrientes a través de canales activados por L-glutamato obtenido en "cell attached". La pipeta contenía solución salina normal más $50 \mu\text{M}$ L-glutamato. El trazo superior, muestra un registro a baja resolución temporal, para destacar lo breve de los periodos de actividad. El trazo inferior, muestra un expansión de parte del registro. El registro fué tomado a -90 mV .

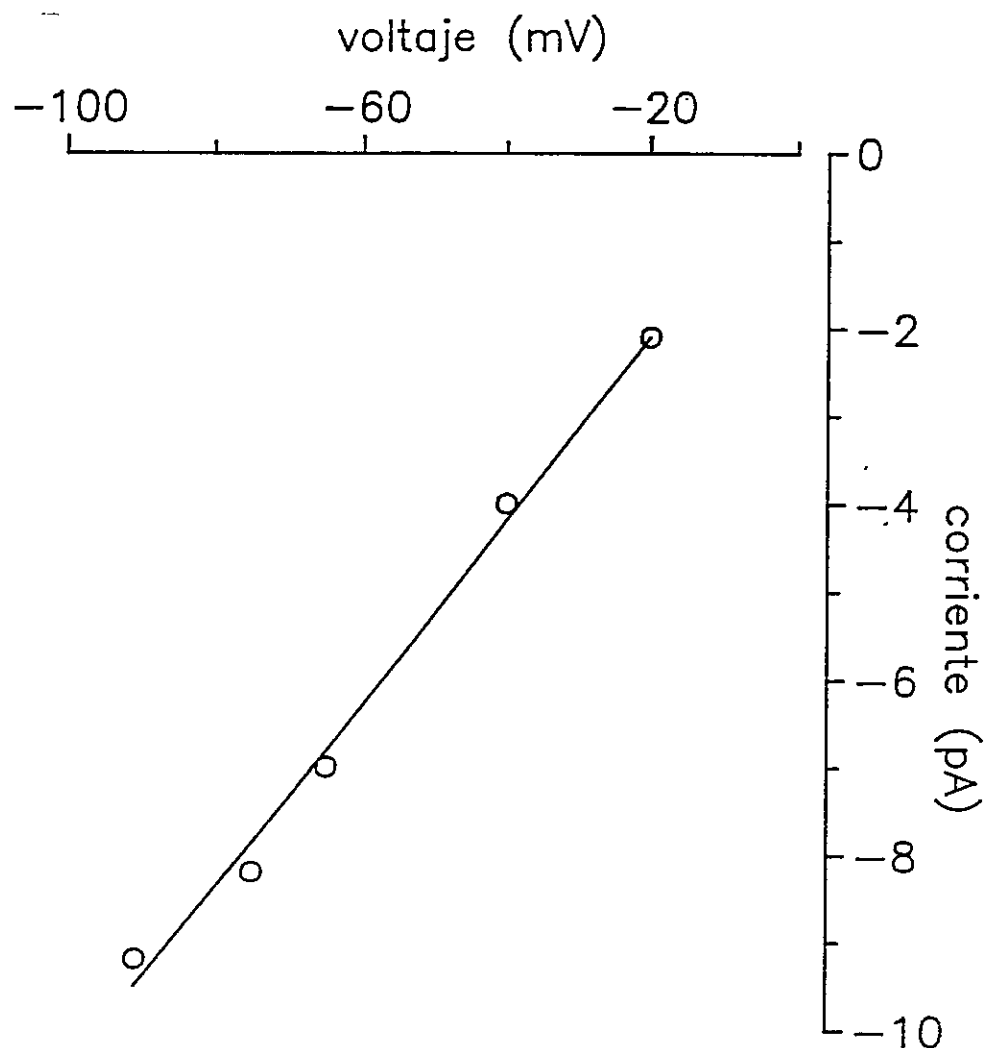


FIGURA 10

Curva corriente-voltaje de las corrientes activadas por $50 \mu\text{M}$ L-glutamato mostradas en la figura 9. Para este gráfico se tomaron los valores máximos de la amplitud de la corriente a cada potencial. La línea a través de los puntos corresponde a la recta de los mínimos cuadrados. La pendiente tiene un valor de 104 pS y cruza el eje del potencial en un valor cercano a 0 mV , que identifica a esta conductancia como un canal excitatorio. Los valores en el eje del potencial corresponden al potencial de membrana más el potencial aplicado en la pipeta

promedio de 16 ms (Figura 11). Los resultado del análisis cinético de los tiempo de permanencia permiten concluir que el canal excitatorio activado por L-glutamato presenta a lo menos dos estados abiertos en presencia de 50 μ M L-glutamato.

1.2.3. Canales inhibitorios activados por L-glutamato.

Utilizando concentraciones mayores que 50 μ M en la solución contenida en la pipeta fue posible registrar una segunda población de canales iónicos activados por L-glutamato. En la Figura 12 se muestra un registro de corriente, obtenido con la pipeta llena con solución 10 mM Cl^- , 200 μ M L-glutamato e hiperpolarizando la membrana. Estas condiciones experimentales facilitan la detección de este tipo de canales ya que en solución normal (140 mM Cl^-), era necesario hiperpolarizar la membrana a potenciales mas negativos, que hacian inestables los sellos. La fracción de tiempo abierto de los canales activados por concentraciones altas de L-glutamato no es dependiente del potencial y su actividad se muestra agrupada en períodos con aperturas y cierres cortos, separados por cierres largos. En la Figura 13, se muestran las curvas corriente-voltaje de registros realizados a dos concentración de iones Cl^- en la pipeta de registro. Los círculos representan los valores de corriente obtenidos cuando la pipeta contenía solución 50 mM Cl^- , mientras que los cuadrados representan la amplitud de las corrientes obtenidas con la pipeta de registro llena con solución salina 10 mM Cl^- . Se puede observar que la curva obtenida del registro realizado con solución 50 mM Cl^- se encuentra desplazada en el eje del potencial aproximadamente en 36 mV hacia potenciales más negativos que la curva obtenida con solución 10 mM Cl^- . El corrimiento del potencial de inversión en 36 mV, cuando se varía la concentración de iones Cl^- en la pipeta de 50 a 10 mM, es ceracano al cambio en el potencial de inversión que se espera para un canal perefectamente selectivo a iones Cl^- , para una concentración de Cl^- intracelular constante. Estos resultados definen esta conductancia

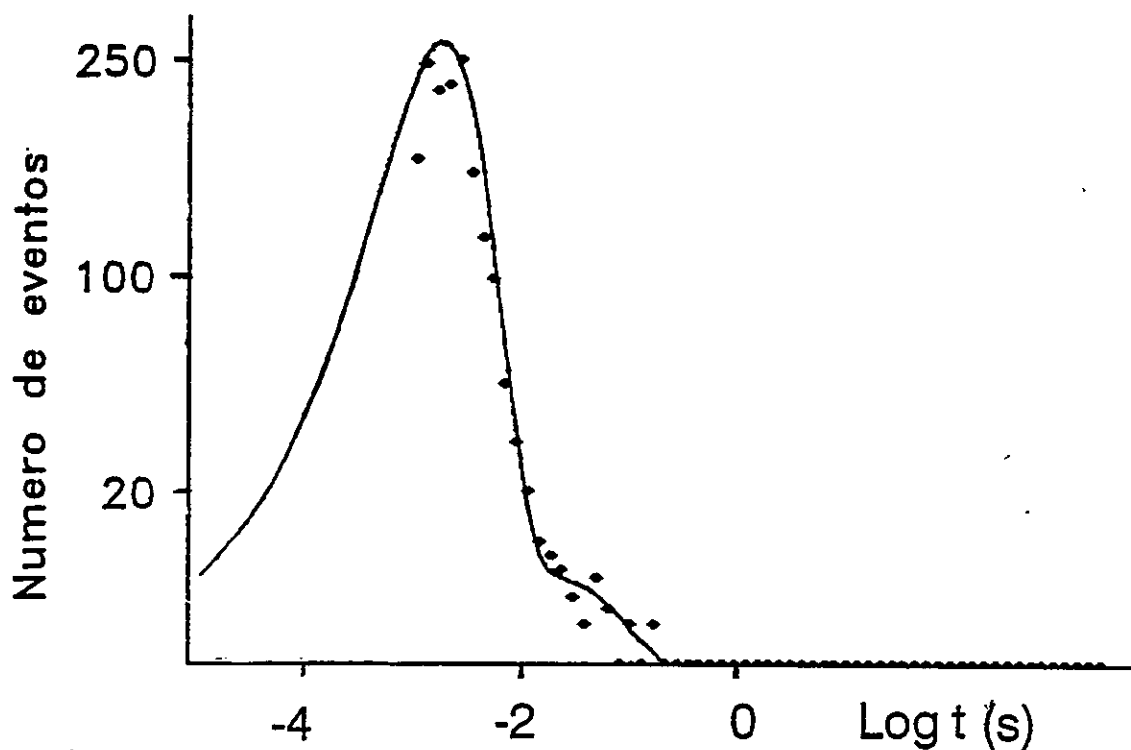


FIGURA 11

Histograma de la distribución de los tiempos abiertos de los canales excitatorios activados por L-glutamato, limitado a transiciones mayores que 1 ms. En la abscisa se grafica la duración de los eventos agrupadas en intervalos de tiempo en escala logarítmica. En la ordenada se grafica la raíz cuadrada del número de eventos. La línea a través de los puntos corresponde al ajuste de los datos afectuado con un algoritmo de máxima verosimilitud. La distribución puede ser ajustada con dos componentes exponenciales con constantes de 1.5 y 16 ms, con una área de 98 y 2 % respectivamente. El registro fué filtrado a 1 kHz y muestreado por computador a 10 kHz.

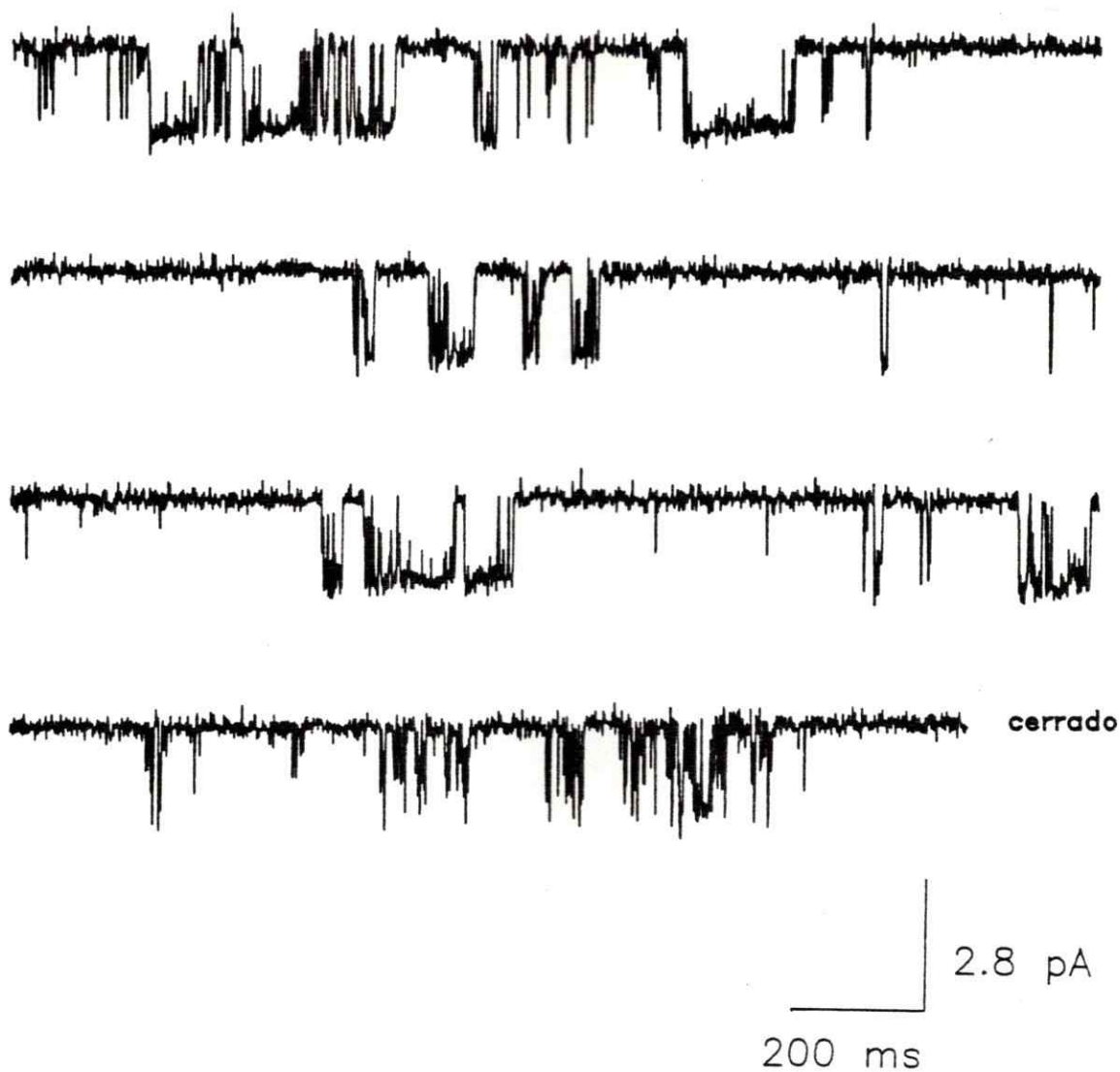


FIGURA 12

Corrientes a través de canales activados por L-glutamato, obtenido con la pipeta adosada a la membrana del músculo. La pipeta contenía solución salina 10 mM Cl^- , 200 μM L-glutamato. El trazo de corriente que se muestra fue obtenido a un potencial de membrana de -105 mV.

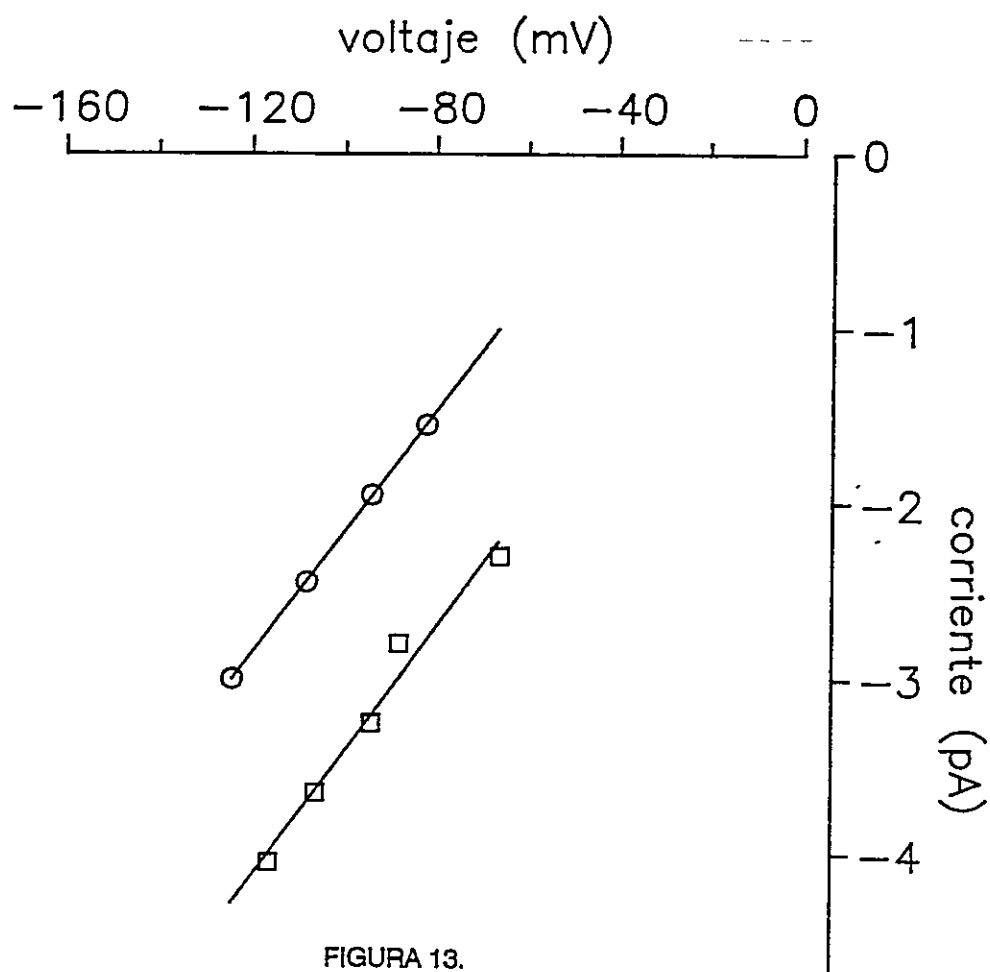


FIGURA 13.

Curvas corriente voltaje obtenida de los registros mostrados en la figura 12, a dos concentraciones de iones Cl^- en la pipeta. La línea definida por los cuadrados corresponde a la recta de los mínimos cuadrados de los valores de las corrientes obtenidas de los registros efectuados con solución 10 mM Cl^- en la pipeta. Tiene una pendiente de 38 pS y extrapola a un potencial cercano a 0 mV. La línea definida por los cuadrados corresponde a la recta de los mínimos cuadrados de los valores de las corrientes obtenidas de los registros efectuados con solución 60 mM Cl^- en la pipeta. Al igual que la recta que ajusta los de las corrientes obtenida con solución 10 mM Cl^- , tiene una pendiente de 38 pS pero extrapola a un potencial cercano a 40 mV.

como un canal inhibitorio, ya que al potencial de reposo su apertura implica movimiento de cargas negativas hacia el interior de la célula, que hiperpolarizan la célula.

La distribución de los tiempos de permanencia en el estado abierto restringida a duraciones mayores que 1 ms del canal aniónico activado por L-glutamato puede ser ajustada por la suma de tres componentes exponenciales, Figura 14. La constantes de tiempo para el proceso mas rápido es de 4 ms y da cuenta del 70 % de las transiciones, mientras que los otros dos procesos tienen constantes de 22 y 150 ms y representan el 19 y 11 % del total de los eventos respectivamente. Estos resultados indican que en presencia de 200 μM L-glutamato el canal de Cl^- activado por L-glutamato tiene mas de un estado abierto.

Los experimentos anteriores mostraban la existencia de una población de canales selectivos a iones Cl^- que podían ser registrados cuando la pipeta de registro contenía concentraciones de L-glutamato mayores que 50 μM . La existencia de este tipo de receptores en los músculos de la larva de *Drosophila* no había sido mostrada anteriormente, por lo tanto se hicieron experimentos en la modalidad "outside-out", para demostrar la activación en un registro continuo. En la Figura 15 se muestra un registro obtenido en la configuración "outside-out" antes y después de perfundir la cámara con solución normal L-glutamato 200 μM . Se puede observar en este registro, que la corriente a través de los canales presentes en la membrana se expresan solo luego de perfundir la cámara con L-glutamato. En estas condiciones iónicas (140 mM Cl^- simétrico), el canal activado por L-glutamato no presenta un nivel único de corriente sino que muestra subestados de conductancia. En la Figura 15-C se muestra un histograma de las conductancias que presenta el registro en el cual se pueden observar dos máximos bien definidos de 40 y 80 pS. Resultados similares fueron obtenidos cuando la cámara experimental fue perfundida con solución salina normal 200 μM GABA, Figura 16. En estos registros, al igual que cuando la activación se logra con L-glutamato se pueden observar diferentes niveles de corriente. En el histograma de conductancias mostrado en la figura 16-C se pueden observar

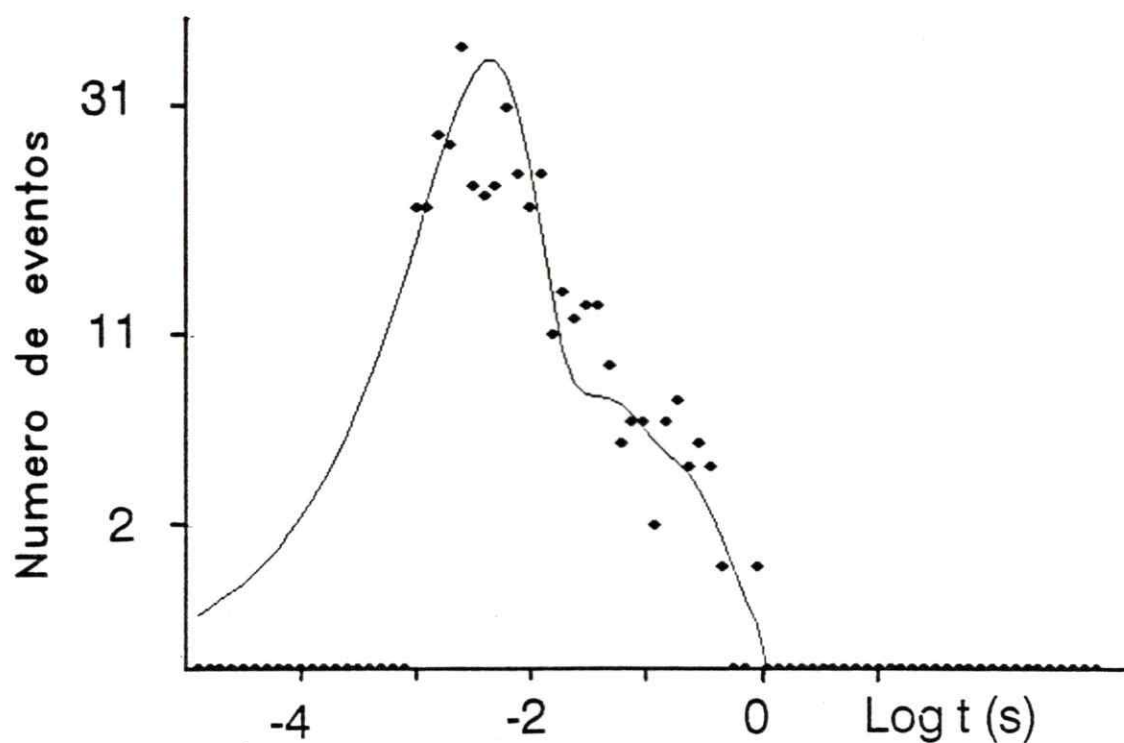


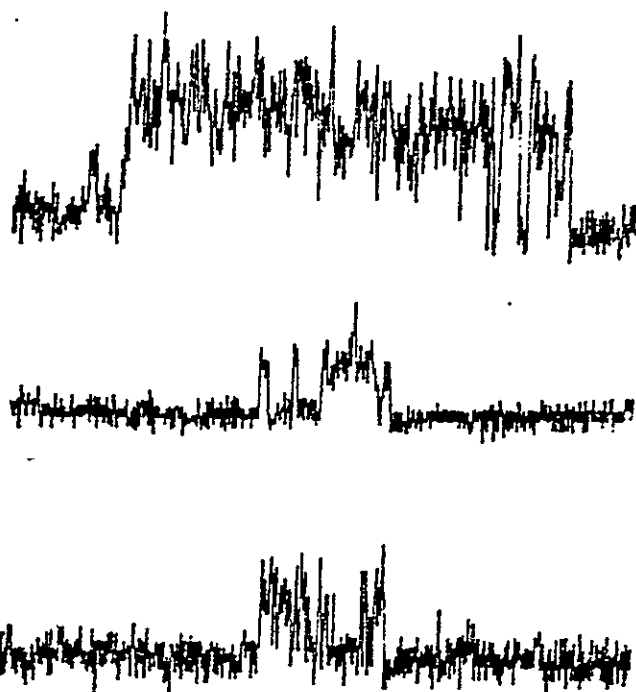
FIGURA 14

Histograma de la distribución de los tiempos abiertos de los canales aniónicos activados por L-glutamato, restringido a transiciones mayores que 1 ms. En la abscisa se grafica la duración de los eventos agrupadas en intervalos de tiempo en escala logarítmica. En la ordenada se grafica la raíz cuadrada del número de eventos. La línea a través de los puntos corresponde al ajuste de los datos afectuado con un algoritmo de máxima verosimilitud. La distribución puede ser ajustada con tres componentes exponenciales con constantes de 4, 22 y 150 ms con un área de 70, 19 y 11 % respectivamente. El registro fué filtrado a 1 kHz y muestreado por computador a 10 kHz.

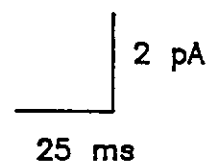
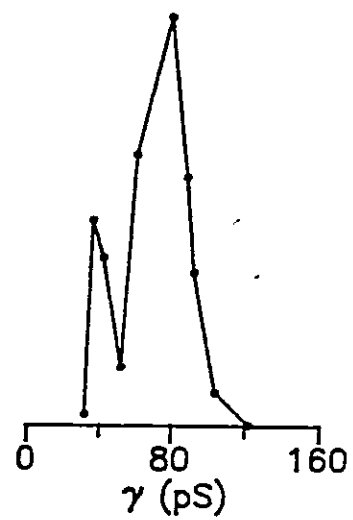
A



B



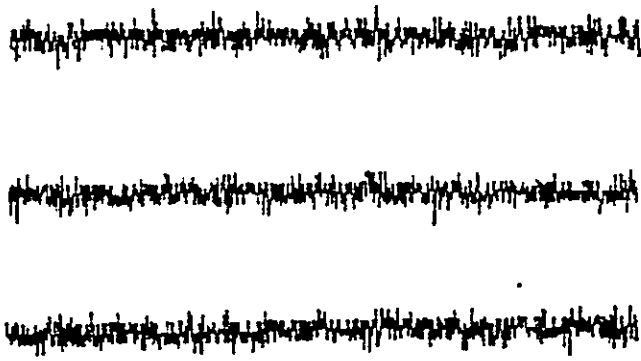
C



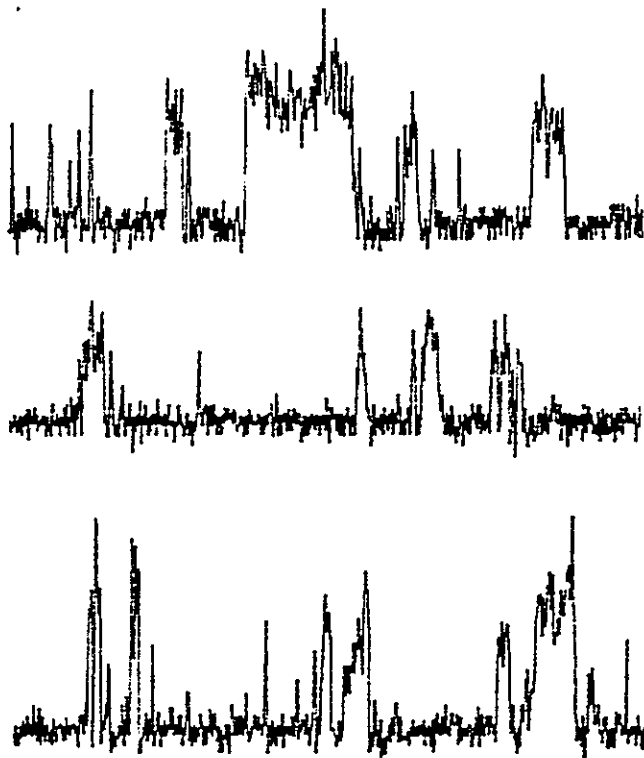
Leyenda Figura 15.

Corrientes de canales iónicos activados por L-glutamato, registradas en "outside-out". Los trazos de corriente mostrados en **A** corresponden a la corriente registrada en situación control. Los trazos de corriente mostrados en **B** corresponden a la corriente registrada a través de la membrana luego de perfundir la cámara con solución salina normal 200 μ M L-glutamato. La pipeta contenía solución salina normal sin agonista. **C** Histograma de conductancias que presentan estos canales en presencia de 200 μ M L-glutamato en condiciones simétricas 140 mM Cl⁻. Se pueden ver dos máximos a 40 y 80 pS.

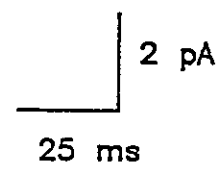
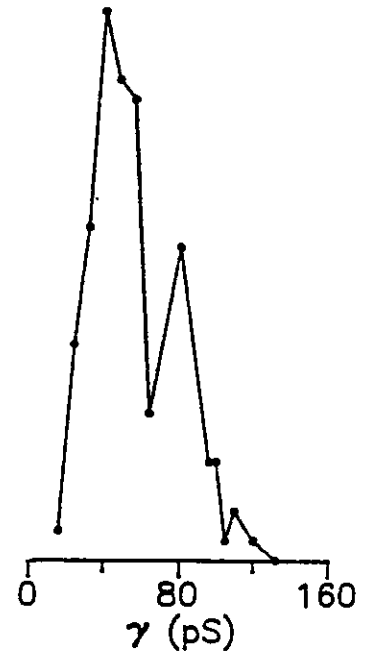
A



B



C



Leyenda FIGURA 16

Corrientes de canales iónicos activados por GABA, registradas en "outside-out". Los trazos de corriente mostrados en **A** corresponden a la corriente registrada en situación control. Los trazos de corriente mostrados en **B** corresponden a la corriente registrada a través de la membrana luego de perfundir la cámara con solución salina normal 200 μM GABA. La pipeta contenía solución salina normal sin agonista. **C** Histograma de conductancias que presentan estos canales en presencia de 200 μM GABA en condiciones simétricas 140 mM Cl^- . Se pueden observar dos máximos bien definidos de 40 y 80 pS y uno menos prominente de 110 pS.

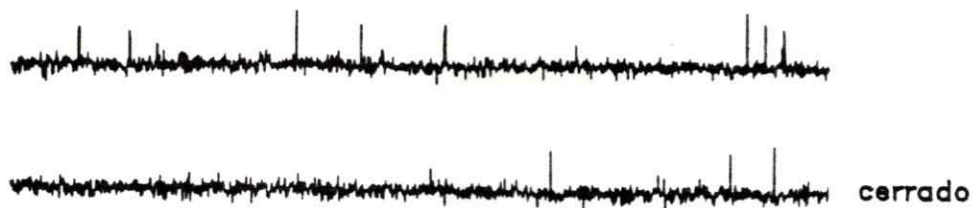
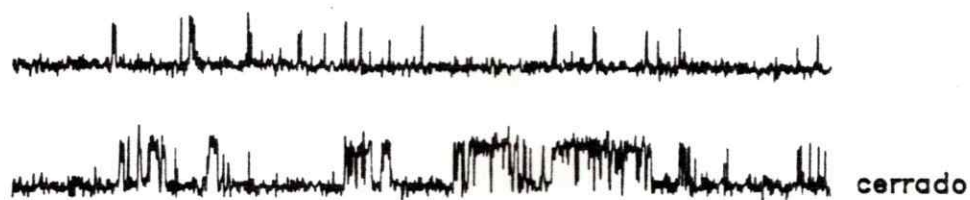
también los máximos de 40 y 80 pS, siendo mayor el número de transiciones al nivel de 40 pS de conductancia. La activación de canales por L-glutamato y GABA observada al perfundir la cámara experimental con solución salina enriquecida con agonista, es completamente revertida al restablecer las condiciones iniciales. La curva corriente voltaje de los registros efectuados en estas condiciones es afectada de igual manera que la obtenida en los registros con la pipeta adosada a la membrana del músculo cuando se cambian las concentraciones de iones Cl^- de la solución que contiene la cámara, demostrando el carácter aniónico de estas conductancias.

2. ESTUDIO DEL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR AMPc:

2.1. Características generales del canal de K^+ activado por AMP cíclico.

En el transcurso del estudio de los canales iónicos activados por L-glutamato fue posible registrar corrientes de canales iónicos de salida selectivos a K^+ . En particular nos interesó un canal cuya cinética es independiente del potencial de membrana, que en los experimentos preliminares parecía activarse cuando el lado intracelular de la membrana era expuesto a concentraciones micromolares de AMP cíclico. Este canal de K^+ puede ser registrado con muy baja frecuencia con la pipeta adosada a la membrana del músculo de larvas de la cepa silvestre, sin embargo la probabilidad de obtener registros en membranas aisladas es mayor. En la figura 17 se muestra un registro de las fluctuaciones de la corriente a través del canal efectuado en la modalidad "inside-out". La figura 17-A corresponde al registro obtenido luego de perfundir la cámara con solución citoplasmática. Como se muestra, en condiciones control el canal permanece la mayor parte del tiempo en el estado cerrado y visita el estado abierto solo por breves períodos de tiempo (las transiciones al estado abierto se presentan como delgadas espigas hacia arriba en el registro). La parte B de la figura 17, corresponde a las fluctuaciones

A control

B AMPc 60 μ M

C recuperación

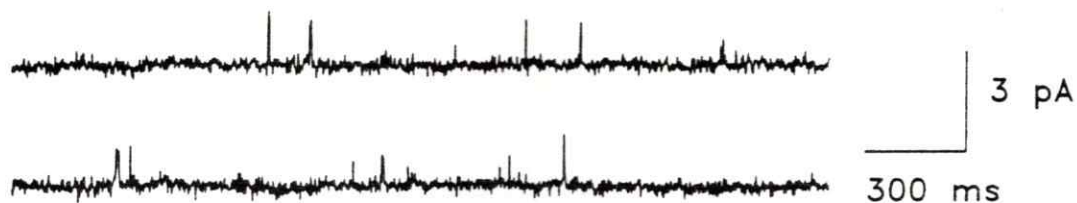


Figura 17

Registro continuo de corrientes de salida registradas en "inside-out" en tres condiciones. A corresponde a la corriente registrada luego de perfundir la cámara experimental con "solución citoplasmática" en situación control. Los trazos en B corresponden a la corriente a través del canal luego de perfundir la cámara con "solución citoplasmática" 60 μ M AMPc. C corriente que se registra luego de lavar el AMPc de la cámara con "solución citoplasmática". Durante el registro el potencial de la membrana fue mantenido a 10 mV y la pipeta contenía "solución salina normal".

de la corriente registradas luego de perfundir la cámara con solución citoplasmática $60 \mu\text{M}$ AMP cíclico. En esta situación se observa un aumento en el número de visitas al estado abierto en el cual permanece por periodos de tiempos mas largos desde donde visita el estado cerrado por periodos de tiempo cortos. La parte C de la figura, corresponde al registro obtenido al reestablecer las condiciones iniciales luego de lavar el AMPc de la cámara. Se puede ver que las aperturas de larga duración observadas en presencia de AMPc ya no ocurren y sólo se observan transiciones breves al estado abierto. Esto demuestra que el AMPc afecta reversiblemente la fracción de tiempo abierto del canal, y que la activación de esta conductancia se produce en ausencia de ATP y del metabolismo celular.

Un estudio de la amplitud de la corriente a través del canal de K^+ activado por AMPc en relación con el potencial eléctrico a través de la membrana muestra que el canal tiene una conductancia máxima de 50 pS en el intervalo $30\text{-}70 \text{ mV}$, Figura 18. La extrapolación de la corriente en el intervalo de potencial $-20\text{-}50 \text{ mV}$ cruza el eje del potencial cerca de -45 mV . De acuerdo a Goldman en estas condiciones iónicas, esta conductancia tiene una razón de permeabilidades $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} \geq 10$. En presencia de TEA $100 \mu\text{M}$ la conductancia del canal disminuye sugiriendo que este ión inorgánico bloquea la vía de conducción, Figura 18, cuadrados.

La fracción de tiempo abierto del canal de K^+ , activado por AMP cíclico, no depende del potencial de membrana en el intervalo $0\text{-}70 \text{ mV}$ y no supera en promedio un valor de $P_o = 0.01$. Este valor de P_o indica que en ausencia de AMPc en la célula el canal de K^+ en estudio permanece en el estado abierto solo un 1% del tiempo.

2.2. Activación por AMP cíclico.

Con el propósito de obtener información acerca de las características del proceso de

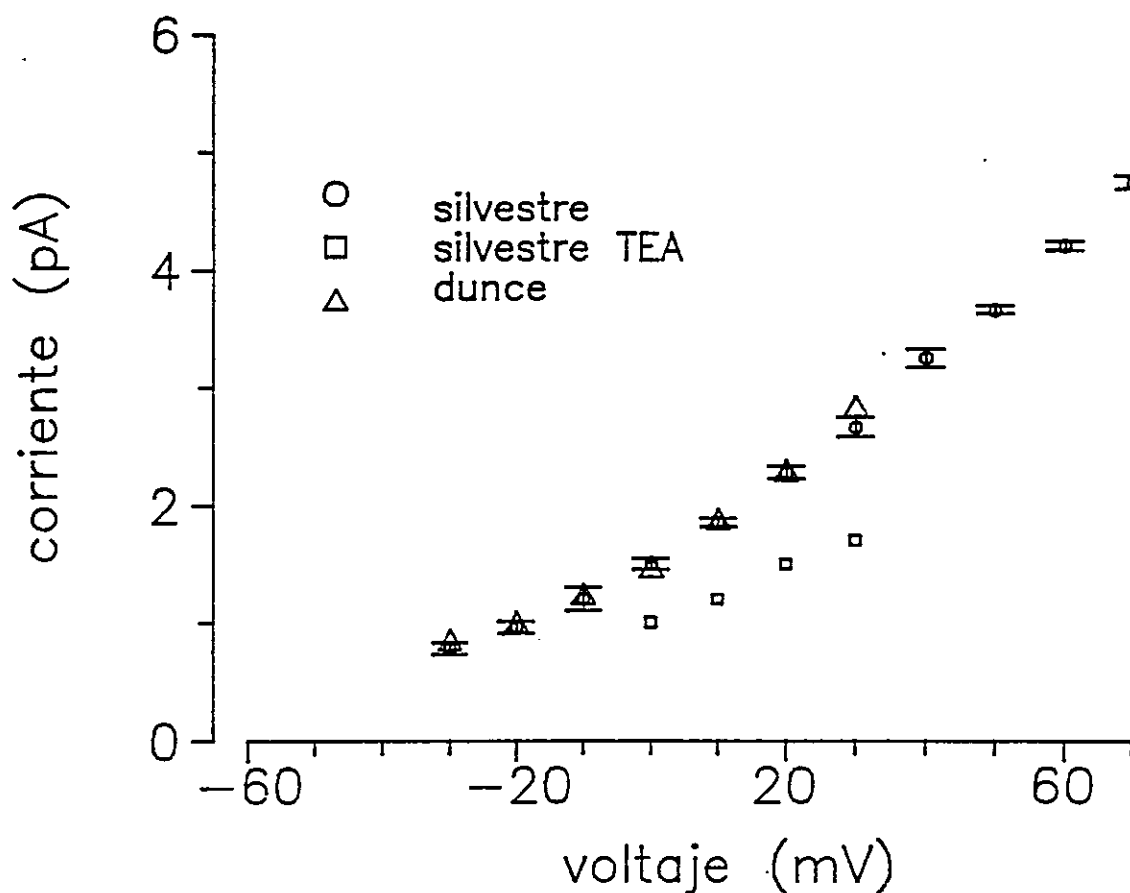


Figura 18

Curvas corriente voltaje del canal activado por AMPc obtenida de los valores de la corriente medida a diferentes potenciales, registradas "inside-out" en condiciones bi-iónicas 128 mM Na⁺ en la pipeta 150 mM K⁺ en el baño. Los círculos corresponden a las corrientes registradas en la membrana de los músculos de la cepa silvestre. Los cuadrados corresponden a las corrientes registradas en los músculos de la cepa silvestre en presencia de TEA 100 μM en la cámara. Los triángulos corresponden al canal de K⁺ de la cepa *dunce*^{M14}. La conductancia máxima del canal medida en el intervalo 30 - 70 mV tiene un valor de 50 pS. La corriente tiene valores positivos aún -30 mV que muestra su selectividad por los iones K⁺.

activación del canal de K^+ activado por AMPc, se efectuó un estudio de la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto (f_o), en función de la concentración de AMPc. En la Figura 19, se muestra un gráfico de la razón entre f_o en presencia de AMPc y f_o control (f_o agonista/ f_o control) en función de la concentración de AMPc obtenida del análisis de registros en estado estacionario. Se puede observar que la razón (f_o agonista/ f_o control) aumenta en forma sigmoidea hasta alcanzar un valor máximo cuando la concentración de AMP cíclico es $\geq 60 \mu M$. Los valores experimentales de la curva f_o agonista/ f_o control en función de la concentración de AMPc pueden ser ajustados a una isoterma de adsorción de la forma $f_o/f_c = 1 + (f_m/f_c)([AMPc]^{nH}/(K + [AMPc]^{nH}))$, donde "nH" es el coeficiente de Hill, "K" es la constante de disociación aparente, "f_m/f_c" es la razón entre la fracción de tiempo abierto máxima en presencia de AMPc dividido por la fracción de tiempo abierto en ausencia del nucleótido en situación control. El mejor ajuste se logra con valores de $f_m/f_c = 9.6$, $K = 51 \mu M$ y un $nH = 2.9$. Este resultado indica que en presencia de AMPc, la fracción de tiempo abierto puede aumentar aproximadamente 10 veces y que es necesario el ligamen de al menos 3 moléculas de AMP cíclico a su receptor para afectar la fracción de tiempo abierto del canal.

Los resultados obtenidos con AMPc, no pudieron ser reproducidos por una serie de agentes que incluyen el Ca^{2+} , el GMPc, el IP_3 o el AMP en el intervalo de concentraciones 0-80 μM o ATP a una concentración de 1 mM.

2.3. Estudios con 8-BrAMPc en la cepa silvestre.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, surge la pregunta si en la célula este canal es funcional y si la variación de la concentración de AMPc intracelular modifica la fracción de tiempo abierto del canal de K^+ activado por AMPc en la célula. Una estrategia para modificar la concentración de AMP cíclico intracelular consiste en incubar la célula con

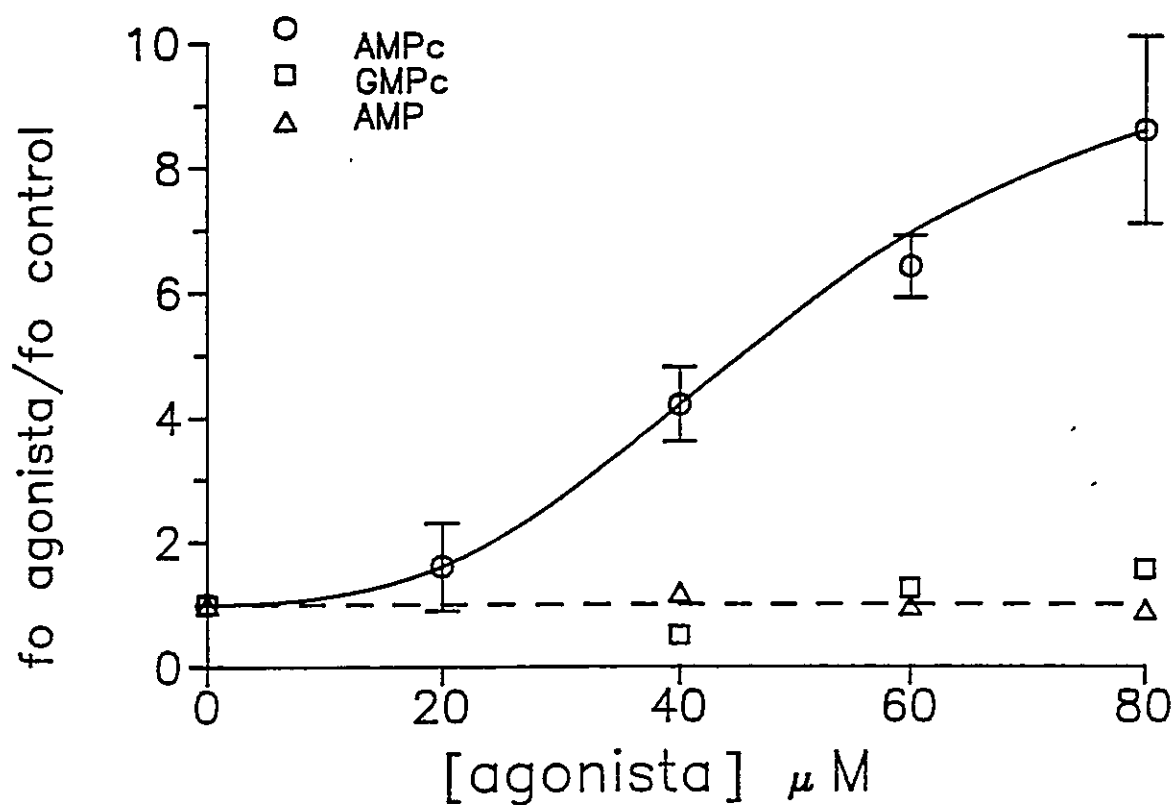


Figura 19

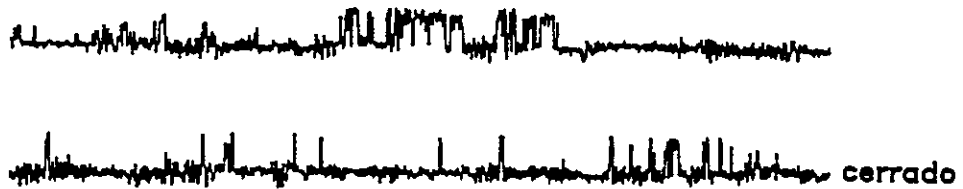
Estudio de la probabilidad de apertura en función de la concentración de AMPc, GMPc y AMP. Se grafica la razón entre la fracción de tiempo abierto en presencia del agonista y la fracción de tiempo abierto en situación control, en relación con la concentración de agonista. La línea sólida representa el ajuste de los datos a la función $(f_o/f_c) = 1 + (f_m/f_c) \frac{[AMPc]^{nH}}{K + [AMPc]^{nH}}$, donde nH es el coeficiente de Hill, K es la constante de disociación aparente, f_o/f_c es la razón entre la fracción de tiempo abierto en presencia de AMPc, dividido por la fracción de tiempo abierto en situación control. El mejor ajuste se obtuvo con $nH = 2.9$, $K = K^{1/nH} = 50.8 \mu\text{M}$ y $f_m/f_c = 9.6$. Los puntos experimentales representan el promedio de tres experimentos efectuados en rango de concentraciones indicado.

derivados del AMPc, tales como 8-BrAMPc, que atraviesa la membrana y es degradado con menor rapidez por el metabolismo celular. En la figura 20 se muestran un registro de corriente obtenido en la membrana de una larva silvestre incubada por 30 minutos en 8-BrAMPc, en "cell attached". Se puede observar en estas condiciones, que la actividad de canales de salida se encuentra aumentada con respecto a la actividad que se registra en larvas sin incubar (Figura 17). En este registro además, se puede ver que la actividad de canales que se registra en la célula decae cuando se aísla la membrana del músculo al retirar la pipeta de registro y exponer la membrana a solución sin AMPc, lo que demuestra que en la célula estos canales son funcionales y pueden ser activados por un aumento de la concentración intracelular de AMPc.

2.4. Canal de Potasio en la cepa *dunce* de *Drosophila*.

En vista de los resultados obtenidos de los estudios del canal de K^+ presente en la membrana de los músculos de la cepa silvestre y los estudios efectuados con 8-BrAMPc, se efectuó un estudio del canal de potasio activado por AMPc en larvas obtenidas de los cultivos de la cepa *dunce*^{M14}, que posee niveles de AMPc intracelulares anormalmente altos. En la Figura 21-A, se muestra el registro de un canal de K^+ obtenido en la modalidad "cell attached" que tiene una relación corriente voltaje idéntica a la del canal de K^+ que se registra en las larvas de la cepa silvestre, (Figura 18, triángulos), pero que presenta en estas condiciones una fracción de tiempo abierto mayor ($P_o = 0.16 \pm 0.05$). Luego de aislar la membrana, la fracción de tiempo abierto registrada con la pipeta adosada a la membrana del músculo disminuye a niveles similares a los medidos en la cepa silvestre en "inside-out" en "solución citoplasmática" sin AMPc, Figura 21-B. En vista de estas observaciones se procedió a investigar si el canal registrado en la membrana de las larvas de cepa *dunce*^{M14} podía ser activado directamente por AMPc. En la Figura 21-C, se muestra un registro de corriente obtenido al exponer la misma

A cell attached



B excised

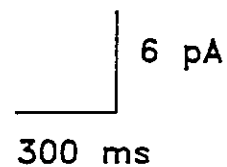
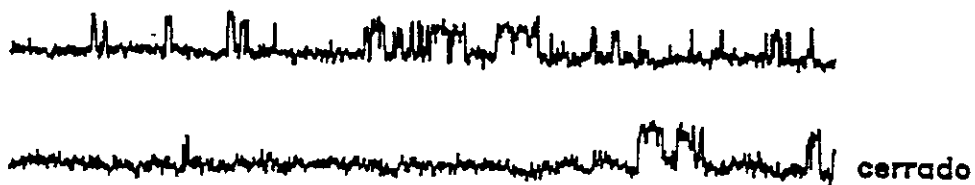


Figura 20

Registro efectuado en la membrana de los músculos de una larva silvestre de *Drosophila* que fue incubada 30 minutos con 8-Br AMPc. A. Registro obtenido en la modalidad "cell-attached" luego de lavar el 8-Br AMPc de la cámara. B. Registro obtenido en la modalidad "inside-out" luego de retirar la pipeta y aislar la membrana del músculo. Este tipo de registros se obtuvo en 4 larvas que se incubaron con 8-Br AMPc. La pipeta contenía solución salina normal. El potencial a través de la membrana durante el registro se mantuvo en 30 mV.

A *dunce* cell attached

B excised

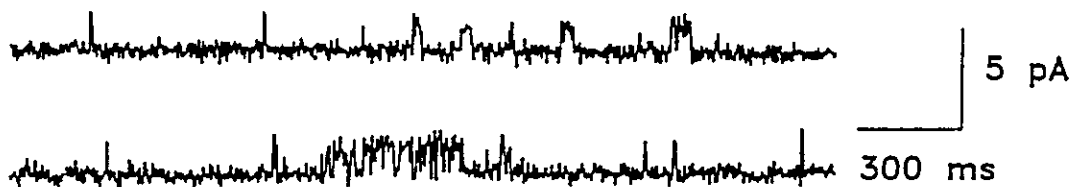
C 60 μ M cAMP

Figura 21

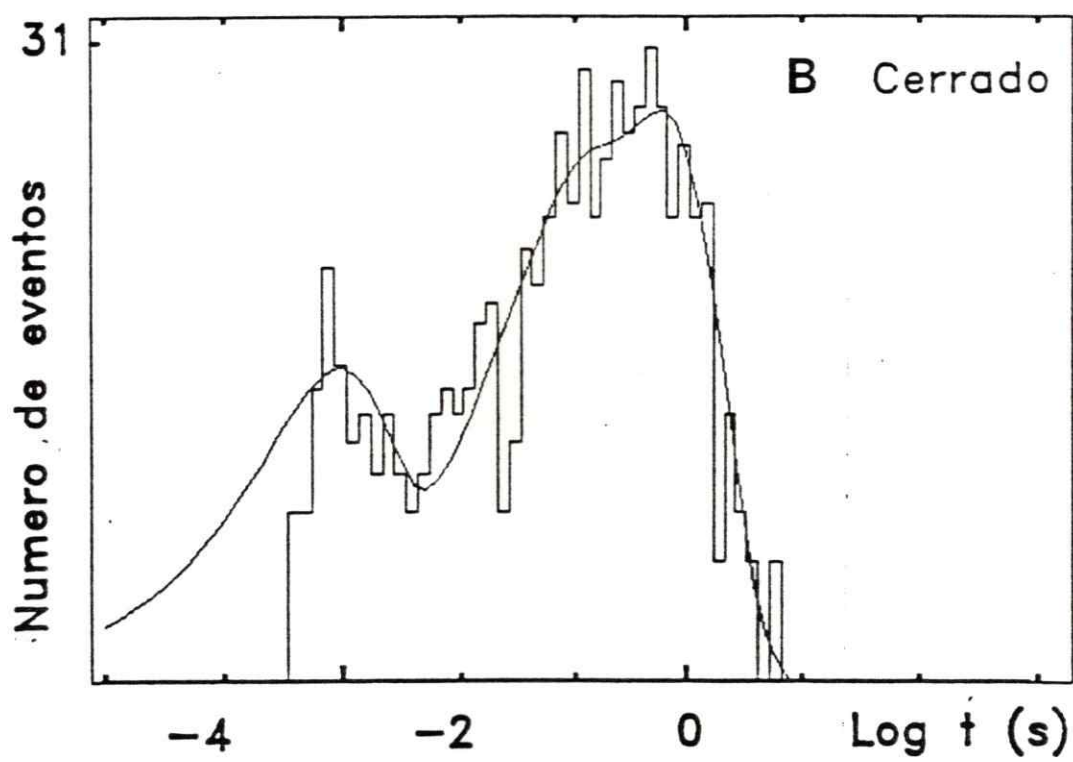
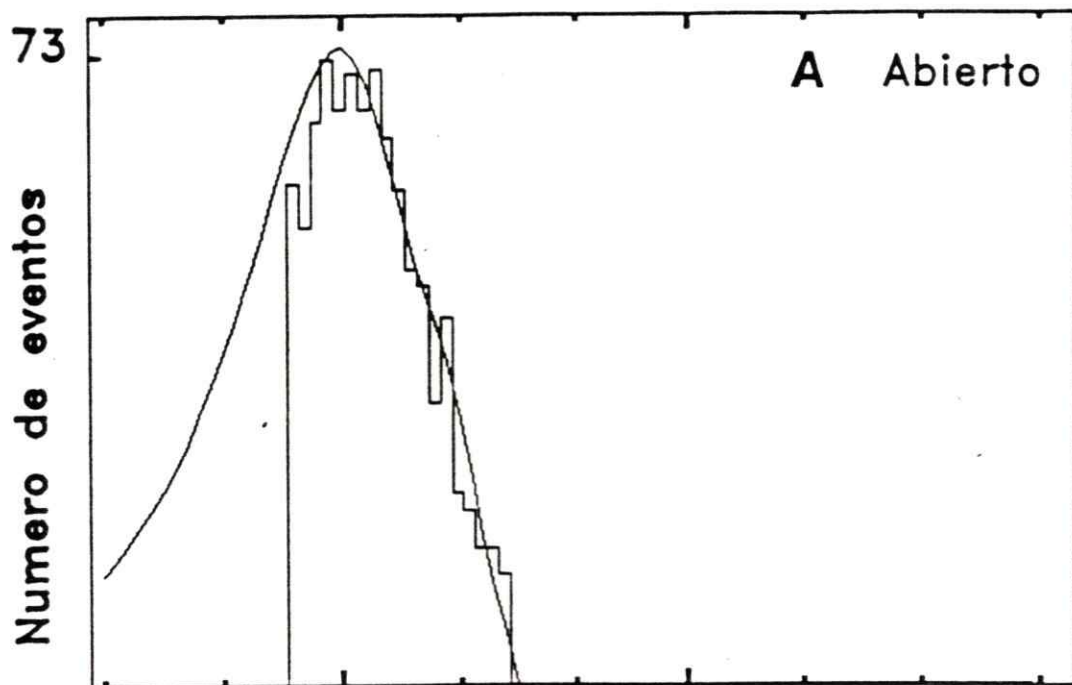
Registro de corrientes de salida obtenido en la membrana de los músculos de una larva de la cepa *dunce* de *Drosophila*. A Registro en "cell attached". B Registro en "inside out" obtenido luego de retirar la pipeta y aislar la membrana del músculo. C Registro obtenido luego de perfundir la cámara con 60 μ M AMPc. La pipeta contenía solución salina normal y el potencial a través de la membrana durante el registro fué mantenido a -10 mV.

membrana en la que se obtuvo el registro de la figura 21-A y 21-B, luego de exponerla a AMPc $60 \mu\text{M}$. Se puede observar que la disminución en fracción de tiempo abierto producida al aislar la membrana del músculo, puede ser recuperada al exponer la membrana a concentraciones micromolares de AMPc. Estos resultados indican que el canal presente en los músculos de las larvas de la cepa *dunce*^{M14}, se corresponde con la conductancia activada por AMPc estudiada en la cepa silvestre y se encuentra persistentemente activada por los niveles de AMPc endógenos.

Este tipo de registros se obtuvo en un 36 % de los registros efectuados en larvas machos, obtenidas de los cultivos *dunce*^{M14} que se mantenían en nuestro laboratorio ($n=27$). El reconocimiento visual de las mutantes *dunce* adultos de nuestros cultivos, indica que el 41 % ($n=600$) de los machos adultos presenta el fenotipo *dunce*. Usando como criterio estadístico la prueba del "Chi-cuadrado" ($\chi^2=1.033$), nuestros resultados indican que la proporción de registros en los cuales P_o es alto es la misma que el número de machos en la población.

2.5. Cinética

El estudio de la distribución de los tiempos de permanencia de las fluctuaciones del canal, registradas en membranas aisladas y limitadas a transiciones mayores que $500 \mu\text{s}$, revela dos componentes cinéticos para el estado abierto y tres componentes para el estado cerrado. Las constantes de tiempo para el estado abierto son 0.95 ± 0.25 y 4.15 ± 0.5 ms y que contribuyen con el 45 y el 55 % del tiempo abierto respectivamente, Figura 22-A. Mientras que para el estado cerrado el análisis muestra tres componentes caracterizados por aperturas promedios 0.5 ± 0.2 , 10.5 ± 4.8 y 414 ± 43 ms que contribuyen con el 0.54, 18.8 y al 81 % del tiempo cerrado respectivamente, Figura 22-B. En presencia de AMPc se observa igual número de componentes que los detectados en el control, tanto para el estado abierto como para el



Leyenda Figura 22

Histograma de la distribución de los tiempos de permanencia del canal de K^+ activado por AMPc. **A** histograma de los tiempos abiertos. **B** histograma de los tiempos cerrados. En la abscisa se grafica los tiempos de permanencia agrupadas en intervalos de tiempo en escala logarítmica. En la ordenada se grafica la raíz cuadrada del número de eventos. La distribución de los tiempos abiertos puede ser ajustada por la suma de dos componentes exponenciales con constantes de tiempo de 0.95 ± 0.25 ms, 4.15 ± 0.5 ms con una contribución de 45 y 55 % respectivamente. La distribución de los tiempos de permanencia del estado cerrado puede ser ajustada por la suma de tres componentes exponenciales con constantes de tiempo de 0.5 ± 0.2 , 10.5 ± 4.8 y 414 ± 43 ms, con una contribución de 0.54, 18.8 y 81 % respectivamente. (Los valores corresponden al promedio de cuatro experimentos). El registro fué filtrado a 1 kHz y muestreado por computador a 20 kHz. La determinación de las constantes de los componentes exponenciales se hizo empleando el criterio de máxima verosimilitud.

cerrado. En estas condiciones se observa un aumento en la duración de los intervalos abiertos más largos, Figura 23-A y una disminución en la duración de los intervalos cerrados de mayor duración, Figura 23-B. Así por ejemplo cuando la concentración de AMPc es $60 \mu\text{M}$ las constantes de tiempo para el estado abierto son 1.5 ± 0.212 y 8.34 ± 1.64 que contribuyen al 47 y al 53 % del tiempo abierto respectivamente, mientras que las constantes de tiempo para el estado cerrado son 0.644 ± 0.37 , 6.265 ± 1.78 y 258 ± 39.6 que contribuyen al 44, 28 y 27 % del tiempo cerrado respectivamente.

La relación de vecindad de las diferentes conformaciones cinéticamente distinguibles del canal puede ser obtenida de un estudio de correlación entre los componentes cinéticos (Blatz y Magleby, 1989). Con éste propósito se efectuó un estudio del porcentaje de los eventos abiertos que preceden o anteceden una población de eventos cerrados comprendidos en intervalos de tiempo crecientes y cada vez mayores. La metodología utilizada para realizar este análisis corresponde a un refinamiento de la metodología que se usó para la determinación de las constantes de tiempo de los componentes cinéticos mostradas en la figura 22. En la Figura 24, se puede observar que los intervalos cerrados de corta duración, se encuentran vecinos a intervalos abiertos largos y que los intervalos cerrados de mayor duración están relacionados con aperturas cortas.

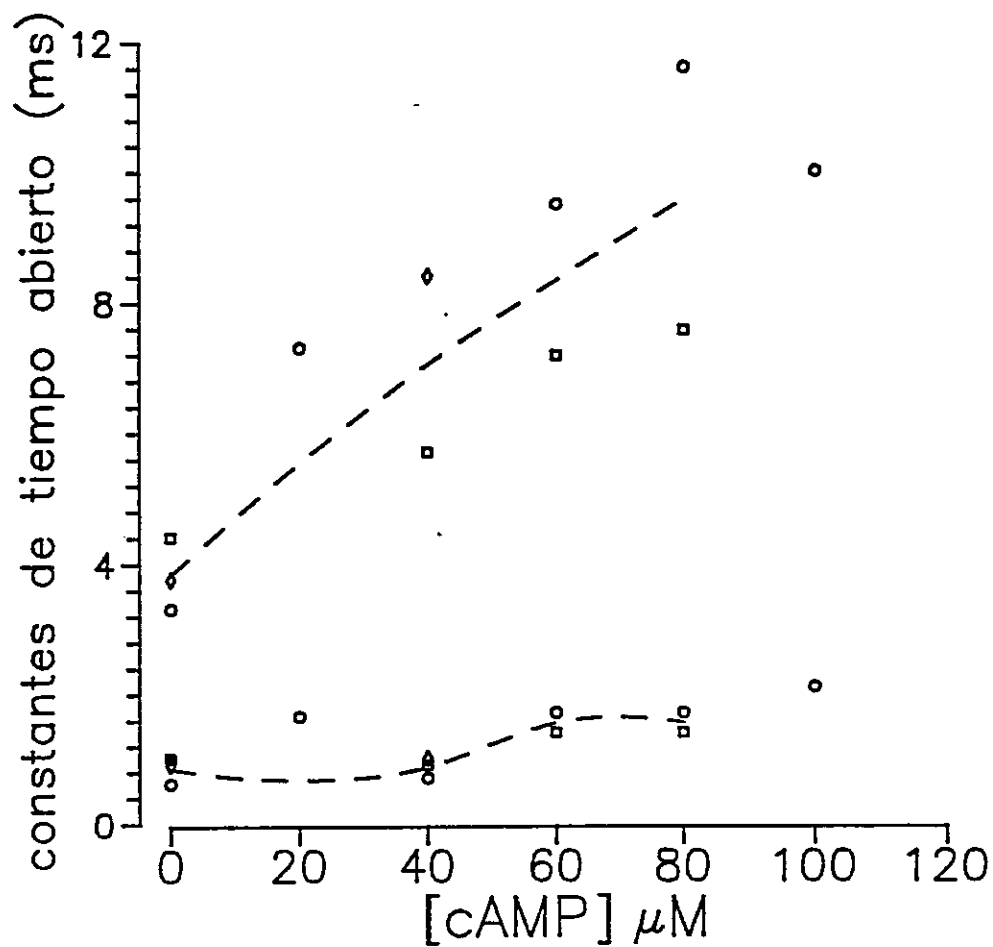
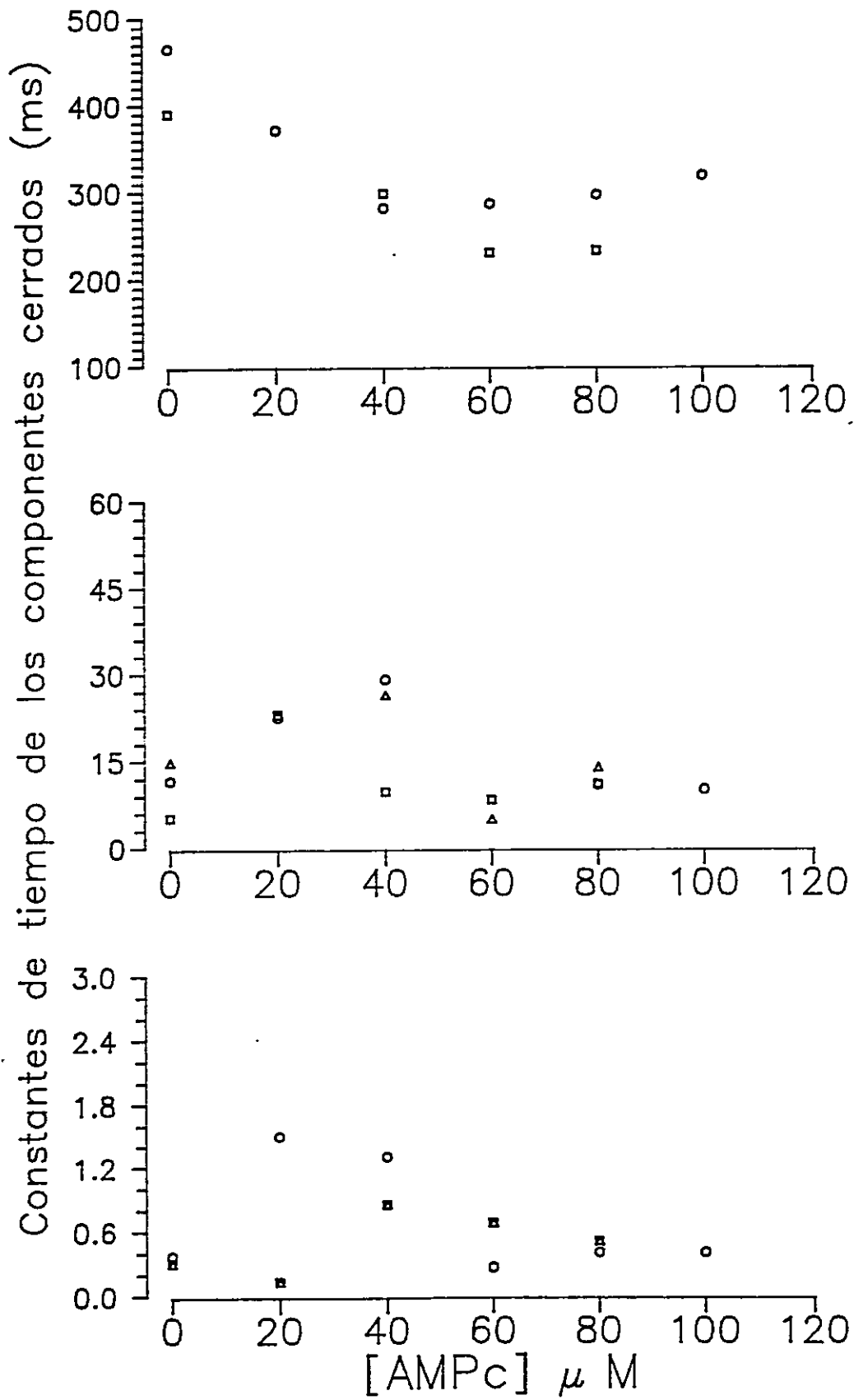


Figura 23-A

Constantes de tiempo del estado abierto en función de la concentración de AMPc. Los puntos corresponden a los valores de las constantes de tiempo de los componentes exponenciales que ajustan la distribución de los tiempos de permanencia medidos a diferentes concentraciones de AMPc. La línea a través de los puntos representa el promedio de los valores de las tres determinaciones mostradas.



Leyenda Figura 23-B

Constantes de tiempos del estado cerrado en función de la concentración de AMPc. Se grafica los valores de las constantes de tiempo de los componentes exponenciales que ajustan la distribución de los tiempos de permanencia de los registros obtenidos a diferentes concentraciones de AMPc, en función de la concentración de AMPc. En A se grafican los valores de la constante de tiempo del estado cerrado de menor duración (C_2). En B se grafican los valores de la constante de tiempo del estado cerrado de duración intermedia (C_1). En C se grafican los valores de la constante de tiempo del estado cerrado de mayor duración (C_3)

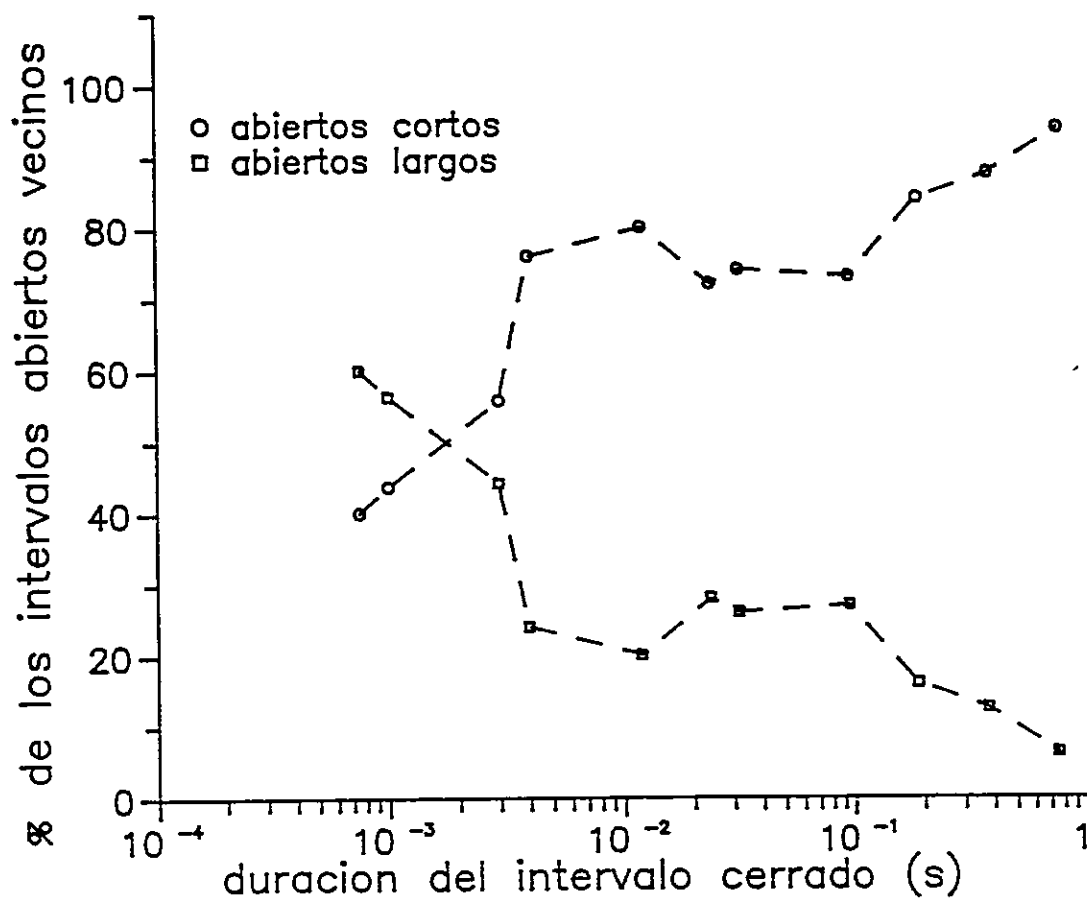


Figura 24

Correlación entre la duración de los eventos abiertos del canal de K^+ activado por AMPc y la duración de los eventos cerrados, determinados usando el análisis condicional. Los resultados que se grafican se obtuvieron de los registros efectuados en ausencia de AMPc. Se grafica el porcentaje de eventos de cada uno de los componentes cinéticos del estado abierto en relación con la duración de los intervalos de tiempo del estado cerrado condicionante.

DISCUSION:

La actividad eléctrica de las células excitables es consecuencia de la apertura y cierre de canales iónicos. El proceso de apertura y cierre de canales iónicos puede ser modulado por mecanismos tales como el ligamen de neurotransmisores o de mensajeros secundarios, la deformación mecánica de la membrana plasmática o por el potencial eléctrico. Durante el desarrollo de ésta tesis se efectuó la caracterización de tres conductancias iónicas presentes en los músculos de la larva de *Drosophila*, que son modulados por agonistas. Dos de estas conductancias son moduladas por el L-glutamato y la tercera es modulada por el AMPc intracelular.

I. Receptores de L-glutamato:

El rol del L-glutamato como neurotransmisor excitatorio en los músculos de *Drosophila* fue propuesto por Jan y Jan en 1976. Sin embargo hasta ahora no habian sido realizado trabajos en este sistema experimental tendientes a establecer las propiedades farmacológicas de estos receptores, ni menos realizado estudios a nivel de canales únicos, a pesar que trabajos electrofisiológicos efectuados en músculos de otros artrópodos habian demostrado incluso la existencia de receptores inhibitorios activados por el L-glutamato (Cull-Candy 1976; Franke et al. 1986). Los resultados obtenidos de los estudios de potencial de membrana efectuados en esta tesis, muestran que el L-glutamato a concentraciones menores que 20 μ M tiene un efecto despolarizante de la membrana, mientras que concentraciones mayores inducen una repolarización gradual que puede llevar el potencial a niveles normales cuando la concentración de L-glutamato en la solución que baña los músculos es 500 μ M. Observaciones similares fueron hechas por Jan y Jan (1976) quienes encontraron que el L-glutamato aplicado

iontoforéticamente produce la despolarización transiente de los músculos pero que cuando los músculos son expuestos crónicamente 1 mM L-glutamato el potencial de membrana no es significativamente distinto del potencial medido en ausencia de L-glutamato. El efecto repolarizante de L-glutamato a concentraciones mayores que 20 μ M observado en nuestros experimentos, sugiere entonces la presencia de una segunda clase de receptores activados por L-glutamato. Estos receptores ligarían L-glutamato con menor afinidad que los que producen despolarización y activarían conductancias con diferente selectividad. La presencia de una población de receptores con estas características es demostrada por los experimentos de potencial de membrana efectuados en ausencia de iones Cl⁻. Por lo tanto, similarmente a las observaciones efectuadas en los músculos de la langosta *Shistocerca gregaria* (Cull-Candy 1976) y en el cangrejo *Austropotambius torrentium* (Franke et al 1986), en los músculos de la larva de *Drosophila*, L-glutamato activaría receptores excitatorios e inhibitorios cuya activación provoca la despolarización y repolarización de la membrana respectivamente.

La presencia de receptores inhibitorios en los músculos de la larva de éste insecto reviste interés debido a las ventajas que ofrece *Drosophila* como sistema experimental. Su utilización como sistema modelo permitiría indagar propiedades específicas de estas proteínas en relación con su estructura.

El estudio de la farmacología básica de los receptores de L-glutamato, efectuado en ésta tesis, muestra que los receptores que afectan el potencial de membrana presentes en los músculos de la larva de *Drosophila* pueden ser activados por L-glutamato, quisqualato, kainato y GABA. L-glutamato y quisqualato serían capaces de activar receptores excitatorios e inhibitorios mientras que kainato y GABA sólo activan receptores que repolarizan la membrana.

El trabajo efectuado por Jan y Jan (1976) permitió postular la presencia de sinapsis excitatorias en los músculos de la larva de *Drosophila*. Sin embargo no se habían realizados trabajos que permitieran postular la existencia de sinapsis inhibitorias en este sistema

experimental. La detección de potenciales de miniatura post-sinápticos hiperpolarizantes evocados por la liberación espontánea de neurotransmisor desde los terminales sinápticos, constituye una prueba que sugiere la existencia de sinapsis inhibitorias en estos músculos.

El estudio de los receptores de L-glutamato a nivel de canal único efectuado en este sistema experimental por primera vez en ésta tesis, permitió confirmar la presencia de dos poblaciones de receptores de L-glutamato que poseen diferente afinidad por el agonista y que activan conductancias con diferente selectividad. De acuerdo a los resultados expuestos se puede sugerir que concentraciones bajas activarian canales catiónicos que provocan la despolarización de la membrana, mientras que concentraciones más altas de L-glutamato activarian canales aniónicos selectivos a iones Cl^- , capaces de repolarizar la membrana. Los canales aniónicos que pudieron ser caracterizados de manera mas completa, presentan un nivel de 38 pS de conductancia y un estado menos frecuente de 23 pS, cuando se les activa con L-glutamato o GABA en registros efectuados con la pipeta adosada a la membrana de la célula. En registros efectuados en la modalidad "outside-out" se observan al menos dos subestados de conductancia bien definidos cuya frecuencia de aparición parece depender del agonista con que se efectúe la activación. Estas observaciones han sido efectuadas también en el cangrejo (Franke et al. 1986) y neuronas de cerebelo de rata, (Cull-Candy y Usowicz, 1987), donde claramente cada agonista parece activar preferentemente un estado de conductancia. Los resultados obtenidos de nuestros experimentos indican que en presencia de L-glutamato son más probables los estados de menor conductancia, mientras que con GABA la probabilidad de visita a los estados de mayor conductancia es mas alta.

Los resultados obtenidos de los estudios de la distribución de tiempos abiertos de los canales activados por el L-glutamato, restringido a transiciones mayores que 1 ms, permiten postular que el canal catiónico tiene al menos dos estados abiertos cuando la activación es efectuada con 50 μM L-glutamato, de los cuales sería visitado con mayor probabilidad el estado

que muestra aperturas con duraciones promedios de 16 ms. Por otra parte, el estudio de la distribución de tiempos abierto de los canales aniónicos activados con 200 μ M L-glutamato, permite postular que a esta concentración el receptor expresa tres estados de conductancia capaces de conducir iones Cl^- .

La caracterización de los receptores activados por el L-glutamato presentada en esta tesis abre el camino para estudios posteriores. Tales estudios deberán incluir una definición de la cinética de activación de estos receptores y una caracterización farmacológica detallada consistente en la identificación de antagonistas del L-glutamato y bloqueadores de la conducción de iones.

II. Canales activados por AMPc.

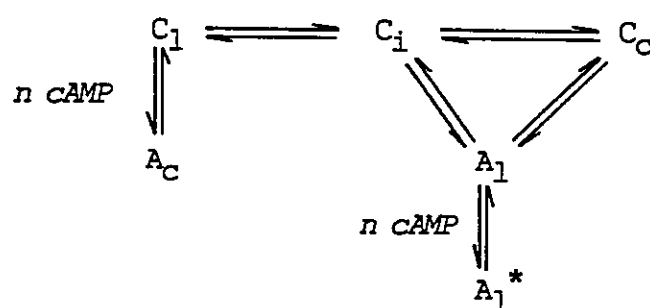
En el mecanismo de modulación de la actividad de canales iónicos por segundos mensajeros participan nucleótidos tales como el GMPc, el AMPc, el ATP y el Ca^{2+} . La acción de estos agentes puede ser ejercida directamente interactuando con sitios de unión de la proteína canal, como ocurre con los canales de K^+ que son activados directa y reversiblemente por Ca^{2+} (Latorre et al 1989) o por la activación de sistemas enzimáticos que ejercen su efecto sobre los canales. El estudio de canales iónicos modulados por segundos mensajeros, ha llevado a postular que la modulación de conductancias selectivas al K^+ en membranas excitables por el AMPc es mediado por la modificación covalente de la proteína canal por una proteína quinasa dependiente de AMPc. De otra parte, el GMPc y el AMPc activan directamente conductancias selectivas al Na^+ y al K^+ en fotoreceptores (Fesenko et al., 1985; Yau y Baylor, 1989) y al Ca^{2+} en neuronas olfatorias (Nakamura y Gold 1987). En esta tesis se ha demostrado por primera vez que el AMPc puede activar directa y reversiblemente una conductancia selectiva al K^+ presente en las membranas excitables de *Drosophila*. Esta

conclusión se deriva de los estudios de activación, realizados con el canal aislado del ambiente citoplasmático, en ausencia del metabolismo celular.

Los resultados obtenidos de los estudios dosis-respuesta del canal de K^+ activado por AMPc de la *Drosophila*, son similares a los encontrados en otros sistemas. Las conductancias activadas por GMPc presentes en la membrana de fotorreceptores tienen coeficiente de Hill, entre 1.7 a 3.1 y un K_d en valores de 10 a 50 μM (Yau y Baylor 1989). Las conductancias activadas por nucleótidos cíclicos presentes en cilios de neuronas del epitelio olfatorio tienen un coeficiente de Hill entre 1.1 a 1.9 y un K_d en el intervalo 2.4 a 30 μM (Nakamura y Gold 1987). Sin embargo el K_d para el canal de K^+ activado por el AMPc de la *Drosophila*, es bastante mayor que la concentración de AMPc en el adulto estimada de un homogenizado de moscas completas (Byres et al. 1981). Por otra parte, los experimentos realizados en larvas de la cepa *dunce*^{M14}, muestran que la fracción de tiempo abierto registrada en "cell attached" puede ser recobrada luego exponer la membrana a AMPc 60 μM . Por lo tanto, no se puede descartar que la concentración local de AMPc en tejidos específicos de la larva en condiciones determinadas sea más alta que lo estimado por estos autores. Por otra parte los experimentos, efectuado con la pipeta adosada a la membrana del músculo de larvas de la cepa silvestre incubadas en 8-BrAMPc, muestran que esta conductancia es funcional en la célula.

Los estudios efectuados en la cepa *dunce*^{M14}, que presenta deficiencias en los procesos de aprendizaje y retención, muestran que el canal de K^+ activado por AMPc se encuentra persistentemente activado en la membrana de los músculos de esta cepa. A pesar que no sabemos si esta anomalía se expresa también en las neuronas de estos individuos, en conjunto con los trabajos realizados en la cepa *shaker* (Solc et al. 1987, Cowan y Siegel 1986), parece que es posible postular que mutaciones que afecten la actividad eléctrica de la membrana plasmática pueden resultar en alteraciones en procesos complejos como el aprendizaje asociativo y la retención.

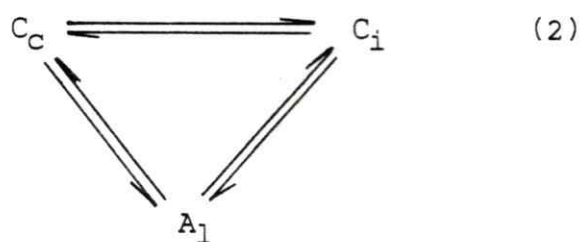
Por otro lado, las constantes de tiempo de los componentes C_1 y C_o no varían con la concentración de AMPc, descartando en principio, que las reacciones parciales del esquema cinético 2, impliquen ligamen de AMPc. Sin embargo, la contribución de los componente C_1 y C_o al tiempo cerrado, disminuye, por lo tanto se puede postular que el aumento en la constante de tiempo del estado abierto A_1 se produce por un aumento en la estabilidad de la forma A_1 de la proteína canal, que la lleva a un estado A_1^* . Un esquema general que es compatible con los resultados experimentales sería:



La resolución definitiva de un esquema cinético adecuado para dar cuenta de las observaciones experimentales surgirán de estudios posteriores que escapan a los objetivos de esta tesis. Tal esquema deberá dar cuenta de los resultados obtenidos del análisis cinético del análisis de correlación entre tiempos abiertos y cerrados y la correlación entre la fracción del tiempo abierto versus concentración de AMPc. Estos estudios cinéticos, por su parte, deberán ser complementados con las correcciones adecuadas para incluir eventos no capturados, corrección que no se llevó a cabo en esta primera etapa de análisis.

III. Estudios cinéticos del canal de K^+ activado por AMPc:

Los resultados obtenidos del análisis condicional de los registros efectuados en ausencia de AMPc (figura 23), sugieren que las aperturas de corta duración (A_c) surgen del estado cerrado mas largo (C_l) y que el cierre de A_c lo lleva nuevamente a C_l . El análisis muestra también que el tiempo abierto A_l se correlaciona con estados cerrados mas cortos C_c y C_i y estos son alcanzados preferentemente desde los tiempos abiertos largos. Ambas observaciones pueden ser resumida por esquemas cinéticos del tipo:



El análisis de tiempos de permanencia como función de la concentración de AMPc, muestra una disminución en la constante de tiempo de los cerrados largos (C_l) (fig. 22-B), y un incremento en el tiempo de permanencia en los estados abiertos largos (A_l) (fig 22-A). Por otra parte, dado que la duración promedio del componente A_c no cambia en presencia de cAMP, el aumento en la contribución del componente abierto corto implica un aumento en la frecuencia de visita a este estado. Estos resultados sugieren que la transición entre el estado cerrado de mayor duración C_l y el abierto corto A_c incluye un paso de ligamen de AMPc.

CONCLUSIONES

1. El estudio del efecto del L-glutamato sobre el potencial de membrana de los músculos de la larva de *Drosophila*, en conjunto con los estudios a nivel de canal único de los canales activados por L-glutamato permiten concluir que:
 - a) En estos músculos existen dos poblaciones de receptores capaces de ligar L-glutamato con diferente afinidad.
 - b) La unión del agonista al receptor de mayor afinidad causa la apertura de canales catiónicos que despolarizan la membrana de los músculos. La unión del L-glutamato al receptor de menor afinidad provoca la apertura de canales aniónicos que repolarizan la membrana.
2. Los estudios de la conductancia que es modulada por la concentración intracelular de AMPc permiten concluir que:
 - a) En los músculos de la larva de *Drosophila* existe un canal selectivo a iones K^+ que modifica su permanencia en el estado abierto en presencia de AMPc. La activación del canal es dosis dependiente y aumenta aproximadamente 10 veces cuando la concentración de AMPc intracelular es $60 \mu M$.
 - b) En la cepa *dunce*^{M14}, que presenta deficiencias en los procesos de aprendizaje y retención, esta conductancia está persistentemente activada con valores de $f_o = 0.16$.
3. Estos estudios dejan de manifiesto la potencialidad de la *Drosophila* como un sistema experimental en el que es posible efectuar estudios electrofisiológicas, que permiten relacionar defectos neurológicos con cambios en las propiedades de excitabilidad de la membrana plasmática.

REFERENCIAS:

- Blatz A. L. y Magleby (1989). Adjacent interval analysis distinguishes among gating mechanisms for the fast chloride channel from rat skeletal muscle. *J. Physiol. (London)* **410**: 561-585.
- Byres D., Davis R. L. y Kiger J. A. (1981) Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **298**: 79-81
- Cotman C. W. e Iversen L. L. (1987) Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. *TINS* **10** (7): 263-265.
- Cowan I. y Siegel R. W. (1986) *Drosophila* mutation that alter ionic conduction disrupt acquisition and retention of a conditioned odor response. *J. Neurogenetic* **3**: 187-207
- Cull-Candy S. G. (1976) Two types of extrajunctional L-glutamate receptors in locus muscle fibres. *J Physiol. (London)* **255**: 449-464.
- Cull-Candy S. G. y Usowics M. M. (1987) Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. *Nature* **325**: 525- 528.
- Davis R. L. Kiger J. A. (1978) Genetic manipulation of cyclic AMP level in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81** (4): 1180- 1186.
- Davis R. L. Kiger J. A. (1981) dunce, mutants of *Drosophila melanogaster*: Mutant defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *J. Cell. Biol.* **90**: 101-107.

Dudai Y. (1983) Mutation affect-storage and use of memory differentially in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. **80**: 5445-5448.

Dudai Y. y Zvis S. (1984) Adenylate cyclase the *Drosophila* memory mutant *rutabaga* displays an altered Ca^{2+} sensitivity. Neurosci. Lett. **47**: 119-124.

Dudai Y., Jan Y. N., Byres D., Quinn W. G. y Benzer S. (1976) dunce, a mutant of *Drosophila* deficient en learning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73** (5): 1684-1688.

Dudai Y., Ussam A. y Zvi S. (1985) Abnormal activity of adenylate cyclase in the *Drosophila* memory mutant *rutabaga*. Neurosci. Lett. **42**: 207-212.

Fesenko E. E. Kolesnikov y Lyubarsky A. L. (1986). Direct action of cGMP on the conductance of retinal rod plasma membrane. Biochimica et Biophysica Acta **856** 661-671.

Franke Ch., Hatt H. y Dudel J. (1986) The inhibitory chloride channel activated by glutamate as well as GABA. J. Comp. Physiol. (A) **156**: 159-609.

Ganetzky B. y Wu C-F. (1983) Genes and membrane excitability in *Drosophila*. TINS **322-326**.

Gho M. y Mallart A. (1986) Two distinct calcium-activated potassium currents in larval muscle fibres of *Drososphila melanogaster*. Plüger Arch. **407**: 526- 533.

Goldman (1943) Potential. Impedance and rectification in membranes J. Gen. Physiol. **27**: 37-60.

- Grigliatti T. A. Hall L. Rosenbluth R., Suzuki D. T. (1973) Temperature-Sensitive mutation in *Drosophila melanogaster*: A selection of immobile adults. *Mol. Gen. genetic.* **120**: 107-114
- Hall J. (1982). Genetics of the nervous system in *Drosophila*, *Quart. Rev. Biophys.* **15**: 223- 479.
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B. y Sigworth F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* **391**: 85- 100.
- Hodkin A. L., Huxley A. F. (1952) Current carried by sodium and potassium ion through the membrane of giant axon of *Loligo*. *J. Physiol (London)* **116**: 449-472.
- Jan L. Y. y Jan Y. N. (1976) L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J. Physiol.* **262**: 215-236.
- Jan Y. N., Jan L. Y. y Dennis M. J. (1977) Two mutation of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc. R. Sci. B.* **198**: 87-108.
- Kandel E. R. y Schwartz J. H. (1982) Molecular biology of learning: Modulation of transmitter release. *Science* **218**: 433-443.
- Kaplan W. D. y Trout W. E. III. (1969) The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* **61**: 399-409.
- Kauvar L. M. (1982) Reduced [³H] tetrodotoxin binding in the *nap* paralytic mutant of *Drosophila*.

Mol. Gen. Genet. **187**: 172-173.

Latorre R., Oberhauser A. Labarca P. y Alvarez O. (1989) Varieties of calcium-activated potassium channels. Ann. Rev. Physiol. **51**: 385-399.

Livingstone M. S., Sziber P. P. y Quinn W. G. (1984). Loss of calcium/calmodulin responsiveness in Adenylate cyclase of *rutabaga* a *Drosophila* learning mutant. Cell **37**: 205-215.

Nakamura T. y Gold G. (1987) A cyclic nucleotide gated conductance in olfactory receptors cilia. Nature **335**: 442-444.

O' Dow D. K. y Aldrich R. W. (1989) J. Neurosci. En prensa.

Salkoff L. B. (1983) *Drosophila* mutant reveal two components of fast outward current. Nature **302**: 249-255

Salkoff L. B. y Wyman R. J. (1981) a). Genetic modification of potassium channels in *Drosophila shaker* mutants. Nature **293**: 228- 230

Salkoff L. B. y Wyman R. J. (1981) b). Outward currents in developing *Drosophila* flight muscle. Science **212**: 461-463.

Salkoff L. B. y Wyman R. J. (1983) a) Ion currents in *Drosophila* flight muscle. J. Physiol. **337**: 709.

Salkoff L. B. y Wyman R. J. (1983) b) Ion channels in *Drosophila* muscle. TINS **6**: 128-133

Shmith R. F., Choi, K.-W., Tully T. y Quinn W. G. (1986) Deficient protein kinase C Activity in *turnip* a *Drosophila* learning mutant Soc. Neurosc. Abstr. **12**: 399.

Siddiqi Q., Benzer S. (1976) Neurophysiological defects in temperature-sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl. Acad. Sci. USA **73**: 3253-3257.

Siworth F. J. y Sine S. M. (1987). Data transformations for improved display and fitting of single channel dwell time histograms. Biophys. J. **52**: 1047-1054.

Solc Ch. K., Zagotta W. N. y Aldrich R. W. Single-channels and genetics analysis reveal two distinct A-type potassium channels in *Drosophila*. Science **36**: 1094-1098.

Suzuki N., Wu C.-F. (1984) Altered sensitivity to sodium channel-specific neurotoxin in cultured neuron from temperature-sensitive paralytic mutant of *Drosophila* J. Neurogenetic **1**: 225-238.

Suzuki D. T. Grigliatti T., Williamson R. (1971) Temperature-sensitive mutant in *Drosophila melanogaster*: A mutation (*para*) causing reversible adult paralysis. Proc Natl. Acad Sci USA **68**: 890-893.

Tanouye M. A., Ferrus A. Y Fujita S.C (1981) Abnormal action potential associated with the *shaker* complex locus of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 6548-6552.

Trout W. E. III, Kaplan W. D. 1973 Genetic manipulation of motor output in *Shaker* mutant of *Drosophila*. J. Neurobiol. **4**: 495-512.

Tully T. y Quinn W. G. (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster* J. Comp. Physiol. **157**: 263-277.

Tully T. (1987) *Drosophila* learning and memory revisited. TINS **10** (8) 330-335.

Wu C.-F. y Ganetzky B. (1980). Genetic alteration of nerve membrane excitability in temperature-sensitive paralytic mutants of *Drosophila melanogaster*. Nature **286**: 814-816.

Wu C.-F. y Haugland F. N. (1985) Voltage clamped analysis of membrane currents in larval muscle fibres of *Drosophila*: alteration of potassium currents in *shaker* mutants. J. Neurosci. **5** (10) 2626-2640.

Wu C.-F. y Ganetzky B., Jan L. Y., Jan Y. N. y Benzer S. (1978) A *Drosophila* mutant with a temperature-sensitive in nerve conduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 4047-4051

Wu C-F, Ganetzky B., Haugland F.N., Liu A-X (1983) Potassium currents in *Drosophila*: Different components affected by mutation of two genes. Science **220**: 1076-1078.

Wu C.-F. Suzuki N. y Poo M. (1983) Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larvae central nervous system in cell culture. J Neurosci. **3**: 1888-1889.

Yau K. W. y Baylor D. A. (1989) Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptors cell. Ann. Rev. Neurosci. **12**: 289-327.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS
DERIVADAS DE ESTA TESIS

PUBLICACIONES

Delgado, R., Barla, R., Latorre, R. and Labarca, P. (1989) L-glutamate activates excitatory and inhibitory channels in *Drosophila* larval muscle. *FEBS Letters* **243**:337-342.

Delgado, R., Latorre, R. and Labarca, P. (1990). A cyclic AMP-activated K⁺ channel in *Drosophila* larval muscle is persistently activated in *dunce*^{M14}. Enviado a publicación.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

"Canales excitatorios e inhibitorios activados por L-glutamato en larvas de *Drosophila melanogaster*". Arch. Med. Exp. **20**: R193. XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. La Serena 25-28 Nov. de 1987.

"Canales excitatorios e inhibitorios activados por L-glutamato en larvas de *Drosophila melanogaster*". XVI Reunión de la Sociedad Argentina de Biofísica. Primer Encuentro de Biofísicos del Cono Sur "Centenario Bernardo Houssay". Buenos Aires, Argentina. 2-4 Diciembre 1987.

"Modulación de canales iónicos en músculos de la larva de *Drosophila*". III Reunión anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Quilpue (Viña del Mar) 29-30 de abril de 1988

"Un canal de K^+ activado por AMPc en la larva de *Drosophila*". IV Reunión anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Montemar (Viña del Mar), 4-5 Mayo de 1989.

"Un canal de K^+ activado por AMPc en la larva de *Drosophila melanogaster*". I Congreso Iberoamericano de Biofísica. Sevilla, España, 25-28 de Septiembre 1989.