

UCHA-FC  
Biotecnología  
9473  
C.I.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



## “Efectos del cobre sobre las corrientes de sodio de neuronas olfatorias de rana y de rata”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

**JORGE ALEJANDRO VERA BUSCHMANN**

*Dra. Cecilia Vergara M.*  
**Director Seminario de Título**

Comisión de evaluación del seminario de título:

*Dr. Osvaldo Álvarez*  
**Presidente comisión**

*Dra. Magdalena Sanhueza*  
**Correctora**

*[Handwritten signature]*

*C. Vergara M.*

*[Handwritten signature]*



Santiago de Chile, Diciembre de 2008.



*Mi historia comienza un día 31 de diciembre de 1982 en Santiago, ciudad en la cual viví mi niñez. Durante mi adolescencia fui un completo chillanejo, más bien chillanvejano, hasta que retorné a la capital a los 16 años.*

*Mi historial académico es variado, en donde cuenta el paso por un total de 9 colegios, que en orden cronológico son: Wellcome School (PreKinder), Salesianos de Macul (Kinder), Insume (1° y 2° básico), Comewealth School (3° básico, I semestre), Esc. Juan Madrid (3° básico, II semestre), Esc. Los Héroes (4°-8° básico), Insuco (I medio, de donde fui expulsado como el peor de los peores), Lic. Narciso Tondreau (II) y Lic. José Victorino Lastarria (III y IV medio).*

*Durante el 2001 realizo un preU y, principalmente, me dedico a desarrollar una de mis grandes pasiones, las artes circenses.*

*En el año 2002 entro a la Universidad de Chile a la carrera de Biología Ambiental porque no me alcanzó el puntaje para Biotecnología. Eso, junto con el amor por la ciencia, me motiva para ser un alumno destacado, lo cual me permite cambiarme sin problemas a la carrera que ingenuamente deseaba, Biotecnología. El año 2003 quedo embarazado (obviamente que yo no, sino que mi entonces polola que ahora es mi esposa) y comienza la que será mi principal preocupación, la familia.*

*Luego de los años descubro que no tengo nada de biotecnólogo y mucho de biólogo, lo cual me lleva por el camino de la ciencia básica, particularmente la neurobiología. Durante este proceso de diferenciación llego al laboratorio de fisiología celular de la facultad, en donde encuentro las facilidades para desarrollarme como científico.*

*Este primer logro académico se lo dedico...*



*A mi Madre por darme fuerzas y ejemplos...*

*A mi Padre por darme carácter y convicción...*

*A mi Tiuchita por quererme y cuidarme...*

*A mi ex-posa por potenciarme, expandirme y*

*aterrizarme... A mi Gasparín por hacerme Padre...*

*Y, obviamente, a mis hermanos por aguantarme.*



*Mis más sinceros agradecimientos a todos los profesores del laboratorio: Profe Magda, Profe Julio, Profe Juan y Profe Osvaldo.*

*Agradecimientos especiales merece "el Maestro", Prof. Ricardo Delgado, por toda la pa-ciencia y apoyo entregados, y por ser un gran ejemplo de humildad, de dedicación y de científico.*

*También agradezco de corazón a la Prof. Ceci Vergara, mi tutora, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio con la libertad de hacer cuanto cosa se me viniera a la mente, a pesar de que muchas no funcionen. Gracias también por el apoyo maternal que siempre es bienvenido en momentos de crisis y por creer que soy un maniático obsesivo (eso me agrada).*

*Muchas gracias también a todos los elementos que pertenecen o pertenecieron al conjunto JB Y JA lab={ Danny A, Jannette B, Jorge A, Germán F, M Pezzoli, Nacho D (Copper Team), Camilo G, Gaciela D, Marcelo S, Fabián L, Pancho, Hermana (Carola G), Carola R, KC, Lupe A, Feña O, Vivi V, Romina V, Belen, Carola Nueva, Estefanía L y Lore S,} (disculpas si olvidé a alguien).*

*También muchas gracias a Maritza O y Matías F por la compañía, ayuda y preocupación durante la tortuosa escritura (doble) de esta memoria... xD.*

*Finalmente, no pueden faltar los agradecimientos a Justin Timberlake y Britney Spears.*

***We did it Britneeeeeeeeeeeeeeyyyyyyyyyy!!***



# I ÍNDICE

## I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	ÍNDICE.....	5
I.1	ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	6
I.2	ÍNDICE DE TABLAS.....	7
I.3	ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
I.4	LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
II.	RESUMEN.....	10
III.	ABSTRACT.....	13
IV.	INTRODUCCIÓN.....	15
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
V.1.	SOLUCIONES PARA LOS REGISTROS ELECTROCTROFISIOLÓGICOS.....	18
V.2.	PREPARACIÓN DE NEURONAS DISOCIADAS .....	19
V.3.	REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	19
V.4.	POTENCIAL DE JUNTURA Y POTENCIAL DE ELECTRODO.....	21
V.5.	OBTENCIÓN DE LAS CORRIENTES DE SODIO.....	22
V.6.	CARACTERIZACIÓN DE LAS CORRIENTES DE SODIO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	23
V.6.1	<i>Curva de conductancia relativa</i> .....	23
V.6.2	<i>Curva de inactivación</i> .....	24
V.6.3	<i>Constantes de tiempo de inactivación, <math>\tau_h</math></i> .....	24
V.7	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL COBRE SOBRE LAS CORRIENTES DE SODIO.....	25
VI.	RESULTADOS.....	27
VI.1	ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RANA (NOR).....	27

VI.1.1	<i>Caracterización de las corrientes de sodio de NOR</i> .....	27
VI.1.2	<i>Estudio del efecto del cobre sobre las corrientes de sodio de NOR</i> .....	29
VI.2	Estudio en neuronas olfatorias de rata (NOT).....	43
VI.2.1	<i>Caracterización de las corrientes de sodio de NOT</i> .....	43
VI.2.2	<i>Efecto de cobre 0,1 <math>\mu</math>M</i> .....	46
VI.2.3	<i>Efecto de cobre 10 <math>\mu</math>M</i> .....	49
VII.	DISCUSIÓN.....	53
VII.1	ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RANA (NOR).....	53
VII.1.1	<i>Disminución de la amplitud de la corriente de sodio en NORs</i> ....	56
VII.2	ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RATA (NOT).....	58
VIII.	CONCLUSIÓN.....	62
VIII.1	ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RANA.....	62
VIII.2	ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RATA.....	62
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	64



## I.2 ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de las soluciones utilizadas en la disociación y registros de las neuronas olfatorias.....	18
<b>Tabla 2.</b> Potenciales de juntura y potenciales de electrodo estimados para las soluciones utilizadas.....	21
<b>Tabla 3.</b> Modificación de los parámetros de las curvas estudiadas en las distintas condiciones con cobre para las NOR.....	30
<b>Tabla 4.</b> Efecto del tiempo sobre las propiedades de las corrientes de sodio de NOT.....	45
<b>Tabla 5.</b> Efecto de cobre 0,1 $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de NOT.....	48
<b>Tabla 6.</b> Efecto de cobre 10 $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de NOT.....	49
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de las corrientes de sodio de NORs en condición control.....	53



## I.3 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Protocolo de dos pulsos utilizado en NOR para la obtención de las corrientes de sodio.....	22
<b>Figura 2.</b> Corrientes de sodio de NOR.....	27
<b>Figura 3.</b> Propiedades de las corrientes de sodio de las NOR.....	28
<b>Figura 4.</b> Variación de las propiedades de las corrientes de sodio de célula 1 en tabla 2 (NOR).....	31
<b>Figura 5</b> Variación de las propiedades de las corrientes de sodio de célula 2 en tabla 3.....	32
<b>Figura 6.</b> Variación de las propiedades de las corrientes de sodio de célula 3 en tabla 3.....	34
<b>Figura 7.</b> Corrientes de sodio de dos neuronas olfatorias de rana obtenidas en presencia de bloqueadores de corrientes de potasio.....	36
<b>Figura 8.</b> Modificación de las corrientes de sodio de NORs sin la presencia de cobre.....	39
<b>Figura 9.</b> Efecto de Cobre 0,1 $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de dos NOR.....	41
<b>Figura 10.</b> Efecto de Cobre 0,1 y 10 $\mu$ M sobre la misma neurona.....	42
<b>Figura 11.</b> Modificaciones de las $I_{Na^+}$ durante el transcurso del tiempo.....	44
<b>Figura 12.</b> Efecto de cobre 0,1 $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de células 5 y 7 de la tabla 5 (NOT) .....	47
<b>Figura 13.</b> Efecto de cobre 10 $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de célula 5, tabla 6 (NOT).....	51
<b>Figura 14.</b> Efecto de la exposición prolongada a cobre 10 $\mu$ M (célula 7 tabla 6, NOT).....	52





### I.3 LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP: 4-aminopiridina

I: Corriente

NOR: Neurona olfatoria de rana

NOT: Neurona olfatoria de rata

RONs: *Rat olfactory neurons*

TEA: Tetraetilamonio

TONs: *Toad olfactory neurons*

V: Voltaje

V<sub>H</sub>: Voltaje de mantención



## II. RESUMEN

En esta memoria se estudió el efecto del cobre sobre las corrientes de sodio de neuronas olfatorias dissociadas de ranas *Caudiverbera caudiverbera* y ratas Sprague Dawley, usando la técnica convencional de *Patch-Clamp* en la modalidad de célula completa. Estudios previos sugieren que el cobre modifica de manera bifásica las corrientes de sodio en neuronas olfatorias de rana. Según estos estudios, a bajas concentraciones (0,05 – 0,1  $\mu\text{M}$ ) el cobre aumenta la amplitud máxima de estas corrientes y acelera su cinética, mientras que a concentraciones mayores (5  $\mu\text{M}$ ) tiene el efecto contrario, disminuyendo la amplitud máxima en cerca de un 30 % y haciendo más lenta la cinética de las corrientes (Delgado R. y col., 2006). Con el objetivo de contribuir en la identificación de los posibles sitios de unión de cobre a los canales de sodio, el presente trabajo buscó hacer un estudio cuantitativo del efecto del cobre sobre las corrientes de sodio de neuronas olfatorias de rana. Además, utilizando neuronas olfatorias de rata, se estudió si este efecto modulador del cobre está conservado en neuronas de mamíferos.

En ambos modelos neuronales las corrientes de sodio presentaron cambios graduales con el transcurso del experimento en ausencia de cobre: una reducción de la amplitud pico, una disminución del tiempo a la amplitud pico y un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación. Por este motivo dichos parámetros no fueron utilizados para evaluar posibles efectos del metal. Por el contrario, en ambos modelos la curva de conductancia relativa

presentó estabilidad, lo que permitió utilizarla como indicador de modificaciones producidas por cobre.

Los resultados sugieren que la disminución de la amplitud se debe a una reducción del número de canales disponibles para abrirse en la membrana. La causa de tal disminución no pudo determinarse para las neuronas de rana, mientras que en las neuronas de rata fue producto del desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación.

En las neuronas olfatorias de rana se observó que el cobre 0,01-0,1  $\mu\text{M}$  produce un efecto variable sobre la curva de conductancia relativa. En parte de las neuronas estudiadas la presencia del metal disminuye el umbral de activación de las corrientes, desplazando hacia la izquierda la curva de conductancia relativa. Estos resultados concuerdan con el efecto activador del cobre descrito previamente. La observación de que algunas neuronas no fueron afectadas por cobre (i.e. que el cobre no modificó la curva de conductancia relativa) podría explicarse por la existencia de distintos grupos neuronales en el epitelio olfatorio.

En las neuronas olfatorias de rata la adición de cobre 0,01-1  $\mu\text{M}$  produce un efecto variable sobre la curva de conductancia relativa, que comparado con las variaciones de la curva en condición control, no permiten afirmar que el cobre tiene la propiedad de modificarlas. Sin embargo la incubación de las neuronas por más de 5 minutos con cobre 10  $\mu\text{M}$  inhibe completamente las corrientes de sodio. Este efecto puede ser revertido mediante hiperpolarización,

lo cual sugiere que la modificación se produce vía interacción electrostática y no mediante reacción redox.

Con estos resultados se concluye que los modelos experimentales utilizados no constituyen un sistema estable para caracterizar el efecto del cobre sobre las corrientes de sodio.

### III. ABSTRACT

In this study, the effects of copper on sodium currents were investigated in acutely dissociated olfactory neurons from *Caudiverbera caudiverbera* toads and Sprague Dawley rats using the conventional whole-cell *Patch-Clamp* technique. Previous studies indicated that copper modifies toad sodium currents in a biphasic manner. According to these studies at low concentrations (0.05 - 0.1  $\mu\text{M}$ ) copper increases the peak amplitude and accelerates its kinetic, whereas at higher concentrations (5  $\mu\text{M}$ ) has the opposite effect, lowering the peak amplitude in about 30% and making slower the kinetic (Delgado R. et al., 2006). With the aim of contributing to the identification of possible copper binding sites on sodium channels the present study sought to make a quantitative study of the effects of copper in toad olfactory sodium currents,. In addition, we studied in rat olfactory neurons whether this modulating effect of copper is conserved in mammal's neurons. Sodium currents from both cell models showed progressive changes during the time course of the basal measurements without added copper: reduction in peak amplitude and in time to peak and a leftward shift of inactivation curve. Because of that, these parameters were not used to evaluate potential effects of this metal. On the contrary, in both models the relative conductance curve was stable, allowing us to use it as an indicator of changes caused by copper.

Our results suggest that the peak amplitude decrease is due to a reduction in the available number of sodium channels to be open in the

membrane. For toad neurons we could not determine the cause of this reduction, while in rat neurons was due to a leftward shift of the inactivation curve.

In toad olfactory neurons copper 0.01-0.1  $\mu\text{M}$  produces a variable effect on the relative conductance curve. In some toad neurons the presence of the metal lowers the current activation threshold, producing a leftward shift of the relative conductance curve. These results agree with the activating copper effect previously described. The observation that some neurons were not affected by copper (i.e. the metal did not change the relative conductance curve) could be explained by the existence of different neuronal groups present in the olfactory epithelium.

In rat olfactory neurons the addition of 0.01-1  $\mu\text{M}$  copper caused variable effects on the relative conductance curve. Given that for rat neurons the relative conductance curve varied in control conditions, it is not possible to confirm that copper has the property to modify them. However the incubation of neurons by more than 5 minutes with 10  $\mu\text{M}$  copper completely inhibits the sodium currents. This effect can be reversed through hiperpolarización, suggesting that the change occurs via electrostatic interaction and not through redox reactions.

We conclude that the experimental models used in this investigation do not constitute a stable system to characterize the effect of copper on sodium currents.

## IV. INTRODUCCIÓN

El cobre es un metal esencial para los organismos aeróbicos debido a su participación como cofactor de enzimas que están involucradas en reacciones de transferencias de electrones que son indispensables en los procesos biológicos.

Además del rol metabólico descrito para este metal, se ha acumulado evidencia suficiente para pensar que ejerce un papel neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC). El cobre presenta una distribución diferencial en el SNC, con una mayor concentración en regiones particulares del cerebro como en la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipotálamo e hipocampo, donde es acumulado en vesículas sinápticas (Kardos J. y col., 1989; Ono S. y Cherian M., 1999). Se estima que la concentración en el espacio sináptico puede alcanzar valores de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  (Hopt A. y col., 2003).

Mediante distintas aproximaciones experimentales se ha demostrado que la adición de cobre en concentraciones micromolares es capaz de alterar la excitabilidad neuronal. El cobre disminuye las conductancias de membrana, tanto las activadas por ligando (NMDA, AMPA, GABA), como las sensibles a voltaje. Como excepción de este papel inhibitorio, está el aumento de actividad los receptores P2X<sub>2</sub>, producto de cobre micromolar (revisado por Mathie A. y col., 2006).

Con el objetivo de estudiar el papel modulador del cobre sobre la excitabilidad neuronal con un enfoque en las conductancias sensibles a voltaje, se ha usado como modelo experimental el epitelio olfatorio del sapo chileno *Caudiverbera caudiverbera* (Delgado R. y col., 2006; Aedo F. y col., 2007). Estos trabajos han mostrado que la adición de cobre 0,05  $\mu\text{M}$  produce un aumento de cuatro veces en la tasa de disparos espontáneos de las neuronas en el epitelio, mientras que al aumentar la concentración

a 1  $\mu\text{M}$  la tasa de disparos espontáneos cae a menos de la mitad de la frecuencia control. Investigando el mecanismo por el cual se produce la modulación se encontró que cobre 1  $\mu\text{M}$  no produce el efecto inhibitor en presencia del agente reductor DTT, el cual mantiene los grupos tioles de las cisteínas en estado reducido, mientras que la adición de cobre junto al agente alquilante de histidina, DPEC, elimina completamente el efecto modulador bifásico. Estos resultados sugieren que las modificaciones producidas por cobre se producen mediante mecanismos redox que podrían involucrar residuos de cisteína e histidina (Aedo F. y col., 2007).

Estudios realizados en estas neuronas disociadas desde epitelio olfatorio han mostrado que las corrientes de sodio macroscópicas son las más afectadas por el cobre, el cual a concentración 0,1  $\mu\text{M}$  produce un aumento de la amplitud máxima junto con una aceleración en la cinética de activación e inactivación de la corriente (Delgado R. y col., 2006). De manera contraria, cobre 5  $\mu\text{M}$  disminuye la amplitud máxima en un 70 % respecto a la condición control. También se encontró que las corrientes de entrada de calcio son completamente eliminadas por cobre 10  $\mu\text{M}$  (Delgado R. y col., 2006).

Basándose en estos resultados se postuló que en este modelo experimental la modulación bifásica se produce por la existencia de dos sitios de unión a cobre en los canales de sodio. Un sitio de alta afinidad responsable del efecto activador del cobre en concentraciones 0,05 - 0,1  $\mu\text{M}$ , el cual podría contener residuos de histidina. El segundo sitio sería de baja afinidad y produciría el efecto inhibitorio a concentraciones 1-5  $\mu\text{M}$ . Este sitio podría contener residuos de histidina y cisteína (Aedo F. y col., 2006).

El objetivo de esta memoria fue cuantificar el efecto modulador bifásico que ejerce el cobre sobre las corrientes de sodio de las neuronas olfatorias de la rana



chilena (Delgado R. y col., 2006) y estudiar si este papel modulador del cobre sobre las corrientes de sodio está conservado en neuronas olfatorias de rata.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1 SOLUCIONES PARA LOS REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Las soluciones utilizadas para la disociación de las neuronas y para los registros electrofisiológicos están detalladas en la tabla 1. Los reactivos para su preparación fueron adquiridos en SIGMA o MERCK. Las soluciones utilizadas en los registros de NOR se confeccionaron según se describe para estas neuronas y no se controló la osmolaridad (Delgado R. y Labarca P., 1993).

Para los registros en NOT las soluciones fueron modificadas a partir de lo descrito en la literatura, utilizando fluoruro como un ión intracelular para mejorar la calidad de los sellos (Qu W. y col., 2000). La osmolaridad de las soluciones se mantuvo en  $300 \pm 10$  mOsm (soluciones extracelulares) y  $290 \pm 10$  (soluciones de la pipeta). La osmolaridad de las soluciones fue medida con un osmómetro de presión de vapor (Vapro 5520, Wescor).

**Tabla 1. Composición de las soluciones utilizadas en la disociación y registros de NOR (izquierda) y NOT (derecha).** Concentración de solutos en mM. ER1, extracelular rana 1; ERB1 y ERB2, extracelular rana con bloqueadores 1 y 2, respectivamente, PR1 pipeta rana 1, PRB1 pipeta rana con bloqueadores. GMM, general mamífero modificada, PFG1 y PFG2 pipeta fluoruro/glutamato 1 y 2, respectivamente. HEPES ácido 5 N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etansulfónico, EGTA ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetilero)-N,N,N',N'-tetra acético, TEA-Cl cloruro de tetraetilamonio, 4-AP 4-aminopiridina.

pH = 7,6	ER1	ERB1	ERB2	PR1	PRB1
NaCl	115	115	115	5	5
KCl	3	**	**	**	**
CsCl	**	**	**	120	100
CaCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	1	1
HEPES	10	10	10	4	4
EGTA	**	**	**	2	2
Sacarosa	10	**	10	**	**
TEA-Cl	**	20	**	**	20
4-AP	**	10	5	**	**

pH = 7,4	GMM	PFG1	PFG2
NaCl	135	10	10
CsF	**	60	20
Ac. Glutámico	**	60	100
CsOH	**	60	100
CsCl	5	**	**
CaCl <sub>2</sub>	1	1	1
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1
HEPES	10	10	10
EGTA	**	2	2
Glucosa	10	**	**
TEA-Cl	**	20	20
4-AP	5	**	**

## V.2 PREPARACIÓN DE NEURONAS DISOCIADAS

Para obtener las neuronas olfatorias de ranas (NORs), los animales (*Caudiverbera caudiverbera*) fueron anestesiados mediante enfriamiento en hielo antes de ser sacrificados mediante desmedulación. La zona anterior de la cabeza que contiene el epitelio fue extraída y almacenada en solución ER1 (tabla 1) a 4 °C por no más de 48 hrs. La disociación se realizó extrayendo un trozo de epitelio olfatorio desde la nariz, el cual fue desmenuzado cuidadosamente con micropinzas en solución ER1. Los trozos obtenidos fueron agitados suavemente con una micropipeta. Se usó 500  $\mu$ l de la suspensión de células para cada registro.

Las NOT fueron obtenidas de ratas Sprague Dawley machos de entre 18 y 25 días de edad. Los animales fueron decapitados sin anestesia utilizando una guillotina. El epitelio fue extraído desde la nariz y almacenado en solución Hanks a 37 °C por no más de 8 horas. Trozos de epitelio fueron extraídos en solución GMM y desmenuzados cuidadosamente con micropinzas. Los trozos obtenidos fueron agitados con una micropipeta. Se usó 500  $\mu$ l de la suspensión de células para cada registro. Luego de que las neuronas decantaran se lavó la solución de la cámara mediante perfusión con 4 ml de GMM.

En ambos casos las neuronas fueron identificadas por su morfología típica, un soma ovoide (con un diámetro cercano a lo 8  $\mu$ m para NOR y 4  $\mu$ m para NOT) con una gran dendrita única que generalmente contenía los cilios olfatorios.

## V.3 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $20 \pm 1$  °C, a menos que se indique lo contrario) en una cámara de registro de 500  $\mu$ L de capacidad,

provista con un sistema de perfusión por gravedad. La cámara de registro fue montada en un microscopio Eclipse E600FN (Nikon Instrument) con iluminación de campo claro.

Se realizaron registros de corrientes de célula completa mediante la técnica de *Voltage Clamp*. Utilizando pipetas de 4-6 M $\Omega$  de resistencia, se formaron sellos de al menos 10 G $\Omega$  entre la pipeta y la membrana celular. La condición de *whole cell* se obtuvo rompiendo el parche de membrana aplicando succión en la pipeta. Luego se fijó el potencial de mantención desde el cual las corrientes fueron evocadas según el protocolo de estimulación correspondiente. Las soluciones de registro utilizadas y su composición se muestran en la Tabla 1. Se reemplazó el K<sup>+</sup> por Cs<sup>+</sup> en la solución de la pipeta con el propósito de registrar las corrientes de sodio en ausencia de las corrientes de K<sup>+</sup> que poseen estas neuronas. Las corrientes fueron registradas utilizando un amplificador comercial (Patch Clamp PC-501A, Warner Instruments). A las corrientes evocadas se les restó digitalmente la corriente capacitiva utilizando el protocolo P/4 (en algunas NOR y en todas las NOT). No se utilizó Sylgard en la punta de las pipetas porque no se observó una disminución significativa en las corrientes capacitivas. Los registros fueron filtrados a 5 kHz mediante un filtro pasa-bajos Bessel de 8 polos, digitalizados con 16 bits de resolución y almacenados en un computador a una tasa de 1 muestra por cada 25  $\mu$ s. Al mismo tiempo, las corrientes fueron observadas en un osciloscopio. Los protocolos de pulsos se confeccionaron con el programa PClamp 6 (Axon Instruments) y el análisis de los datos se realizó con el programa Igor Pro 5.02 (Wavemetrics). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

## V.4 POTENCIAL DE JUNTURA Y POTENCIAL DE ELECTRODO

Debido a que las soluciones experimentales utilizadas en la cámara de registro (solución extracelular) y en la pipeta (solución intracelular) diferían en sus composiciones y concentraciones se produjo un potencial de juntura (Barry y Lynch, 1991). Los potenciales de juntura existentes entre las soluciones utilizadas se calcularon utilizando la herramienta "LJP Calculator" incluida en el programa Pclamp9.2 (Axon Instrument) y se muestran en la tabla 2.

Del mismo modo, la diferencia de concentración de ion  $\text{Cl}^-$  entre las soluciones extracelular y de la pipeta para los experimentos en NOT, sumado a la no utilización de un puente salino entre el electrodo de tierra y la solución de la cámara, generó un potencial de electrodo de 36,4 mV entre el electrodo de registro respecto al electrodo de referencia (calculado según la ecuación de Nernst, tabla 2).

Al momento de introducir la pipeta en el baño el potencial de juntura y el potencial de electrodo fueron compensados ajustando a cero la corriente observada. Debido a que al lograr la configuración de *whole cell* el potencial de juntura desaparece, el voltaje que lo compensaba queda como voltaje permanente en el

**Tabla 2. Potenciales de juntura y potenciales de electrodo estimados\* para las soluciones utilizadas. P<sub>JL</sub>\*\***, potencial de juntura líquida; **PE**, potencial de electrodo.

Pares de soluciones	P <sub>JL</sub>	PE
ER1-PR1	6,4	-1,0
ERB1-PR1	5,4	2,2
ERB2-PRB1	3,3	-1,6
GMM-PFG1	5,5	36,4
GMM-PFG2	3,3	36,4

\* Los cálculos de P<sub>JL</sub> no incluyen el aporte de 4-AP.

\*\*Por convención el P<sub>JL</sub> se mide como potencial del baño respecto a la pipeta (Barry y Lynch, 1991).

electrodo de la pipeta durante el experimento (Barry y Lynch, 1991). Este potencial adicional fue corregido en el análisis de los datos. Por otra parte, el potencial de electrodo se mantiene durante todo el experimento, por lo que no requiere ser corregido.

## V.5 OBTENCIÓN DE LAS CORRIENTES DE SODIO

### *Protocolo de dos pulsos*

Este protocolo consiste en evocar las corrientes de sodio desde el voltaje de mantención (-80 mV para las NOR y -90 mV para las NOT) con un pulso P1 que toma valores desde -70 mV para NOR (-160 mV para NOT), con incrementos de 5 o 10 mV entre registros sucesivos. A continuación de P1 se aplica un segundo pulso (P2) que no varía (-20 mV para las NOR, -10 mV para las NOT). El tiempo entre la aplicación de cada barrido fue de 2 s. En algunas ocasiones se cambiaron los tiempos de duración



**Figura 1. Protocolo de dos pulsos utilizado en NOR para la obtención de las corrientes de sodio. Arriba.** Las corrientes registradas fueron evocadas desde un potencial de mantención de -80 mV con una serie de pulsos despolarizantes (P1) de 10 ms de duración y que aumenta desde -70 mV hasta 0 mV en saltos de 5 mV por cada barrido del protocolo. El tiempo entre cada barrido del protocolo fue de 2 s con un voltaje de mantención de -80 mV. **Abajo.** Corrientes de sodio evocadas en respuesta al protocolo descrito.

de los pulsos, los rangos de voltaje y la magnitud de los saltos de voltaje de P1. Estas modificaciones son informadas cuando corresponde. Como ejemplo se muestra en la figura 1 el protocolo de dos pulsos usado en las primeras NOR.

## V.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS CORRIENTES DE SODIO Y ANÁLISIS DE DATOS

La caracterización de las corrientes de sodio se realizó de la manera utilizada por Delgado R. y Labarca P, 1993.

### V.6.1 Curva de conductancia relativa

A partir de los registros obtenidos con los protocolos de dos pulsos se estudió la conductancia pico como función del voltaje aplicado. La conductancia pico de la corriente evocada por el pulso P1 se obtuvo de la expresión (Delgado R. y Labarca P., 1993)

$$G_{P1} = \frac{I_{P1}}{V_{P1} - V_{Na}} \quad (1)$$

en donde  $I_{P1}$  es la corriente pico evocada por el pulso P1,  $V_{P1}$  es el voltaje del pulso P1 y  $V_{Na}$  es el voltaje de inversión de la corriente de sodio. La relación entre la conductancia pico y el voltaje puede describirse de buena manera según la expresión (Delgado R. y Labarca P., 1993):

$$\frac{G_{P1}}{G_{P1Max}} = \frac{1}{1 + e^{-(V-V_g)/A}} \quad (2)$$

en la cual  $G_{P1}$  es la conductancia pico obtenida con cada voltaje del pulso P1,  $G_{P1Max}$  es el mayor valor de conductancia registrado y es una aproximación al valor asintótico de

la conductancia para  $V \geq V_g$ , donde  $V_g$  es el voltaje al cual la conductancia pico alcanza la mitad de su valor máximo. La variable  $A$  es una medida de la pendiente de la curva para  $V = V_g$  y tiene unidades de mV.

### V.6.2 Curva de inactivación

La inactivación de la corriente en estado estacionario se estudió utilizando la corriente pico obtenida en el pulso P2 en función del voltaje del pulso P1 correspondiente. Los resultados obtenidos se describieron con la función:

$$\frac{I_{P2}}{I_{P2Max}} = \frac{1}{1 + e^{(V-V_i)/B}} \quad (3)$$

donde  $I_{P2}$  es la corriente pico registrada con el pulso P2,  $I_{P2Max}$  es la máxima corriente pico registrada y es una aproximación al valor asintótico para la corriente pico en condiciones en que  $V \geq V_i$ , con  $V$  el voltaje del pulso P1 y  $V_i$  el voltaje al cual se produce la mitad de la inactivación. El parámetro  $B$  es una medida de la pendiente de la curva para  $V = V_i$  y tiene unidades de mV.

### V.6.3 Constantes de tiempo de inactivación, $\tau_h$ .

La inactivación de estas corrientes produce una fase de decaimiento que sigue una caída exponencial simple (Delgado R. y Labarca P., 1993). Se obtuvo las constantes de tiempo de inactivación ajustando la región de decaimiento de las corrientes evocadas por el pulso P1 a la función exponencial

$$I(t) = I_0 e^{-(t-t_0)/\tau_i} + C_1 \quad (4)$$



en donde  $I(t)$  es la corriente de sodio instantánea,  $I_0$  es la corriente medida al inicio de la caída exponencial del registro (tiempo  $t_0$ ),  $\tau_i$  es la constante de tiempo de la inactivación y  $C_1$  es una constante.

La dependencia de voltaje de  $\tau_i$  para los voltajes por sobre los -50 mV puede ser ajustada a una caída exponencial,

$$\tau_i(V) = \tau_0 e^{-(V+40)/\tau_v} + C_2 \quad (5)$$

donde  $\tau_0 + C_2$  es el valor de  $\tau_i$  en -40 mV,  $C_2$  es el valor mínimo al que cae la función y  $\tau_v$  es una constante que determina la dependencia a voltaje de la curva y tiene unidades de mV.

## V.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL COBRE SOBRE LAS CORRIENTES DE SODIO

Para evaluar el efecto de cobre sobre las corrientes de sodio se compararon las curvas de conductancia relativa y de inactivación para la condición control con las obtenidas luego de reemplazar la solución extracelular por al menos 8 volúmenes (4 ml) de solución extracelular con la concentración de cobre indicada. En algunas células se estudió el efecto de diferentes concentraciones de cobre agregado en forma consecutiva. Las curvas de inactivación y conductancia relativa fueron ajustadas a las curvas empíricas y los parámetros obtenidos se utilizaron como criterio para comprobar si había ocurrido algún cambio en las distintas condiciones estudiadas. Si el movimiento de las curvas permitía inferir un aumento de la amplitud de las corrientes, el efecto fue clasificado como activador. De esta manera, un movimiento hacia la derecha de la curva de inactivación o hacia la izquierda de la curva de conductancia

relativa se consideró como efecto activador. Por otra parte, un movimiento en sentido contrario al descrito previamente, fue interpretado como un efecto inhibitorio.

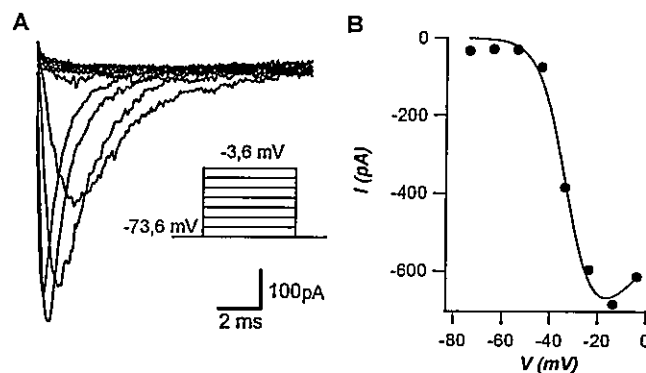
## VI. RESULTADOS

### VI.1 ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RANA (NOR)

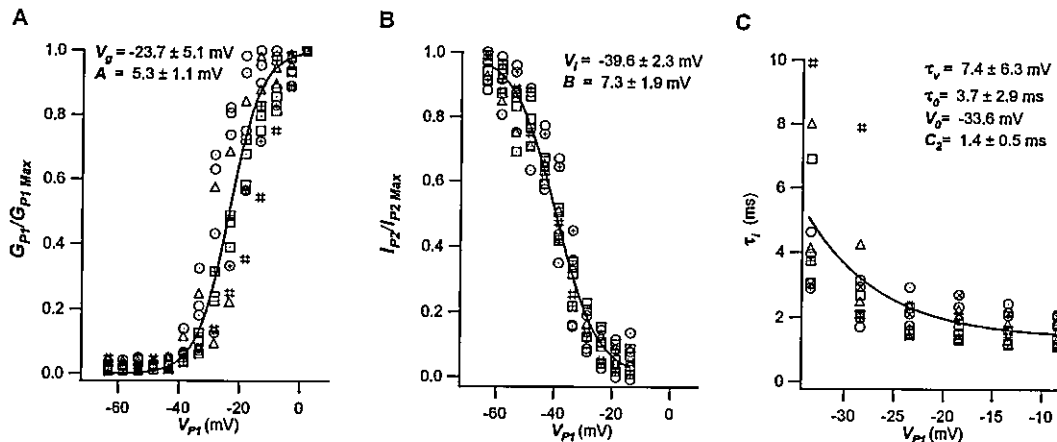
#### VI.1.1 Caracterización de las corrientes de sodio de NOR

En la figura 2 se muestra un registro representativo de una familia de corrientes de sodio evocadas en respuesta a una serie de pulsos despolarizantes. Estas corrientes se activan con potenciales de membrana mayores a -50 mV, presentan una amplitud máxima que varía de una célula a otra, con un promedio de  $-443 \pm 127$  pA ( $V_{hf} = -73,6$  mV,  $n = 10$ ) que se produce con voltajes en torno a los -15 mV. El desarrollo temporal de estas corrientes dura menos de 12 ms a temperatura ambiente.

Se estudiaron las propiedades de las corrientes de sodio en condición control en un total de 10 NOR utilizando el protocolo de dos pulsos (ver Materiales y Métodos). Se determinó la dependencia a voltaje de la curva de conductancia relativa ( $G/G_{max}$ ), de la inactivación de la corriente y de la constante de tiempo de la inactivación ( $\tau_h$ ). Los resultados se muestran en la figura 3.



**Figura 2. Corrientes de sodio de NOR.** A Registro de una familia de corrientes de sodio. Estas corrientes fueron evocadas con una escalera de voltajes desde -73,6 mV hasta -3,6 mV con incrementos de 10 mV. La célula se mantuvo en -73,6 mV entre cada barrido del protocolo. Inserto, protocolo de estimulación. B Curva I-V para los valores máximos de las corrientes mostradas en A. Círculos, datos experimentales; línea continua, ajuste según modelo H&H.



**Figura 3. Propiedades de las corrientes de sodio de las NOR.** Las tres curvas fueron obtenidas del estudio de 10 neuronas olfatorias de rana según se describe en materiales y métodos. En cada gráfico los símbolos abiertos representan los datos experimentales. La línea continua se construyó con el promedio de los parámetros de cada uno de los ajustes. **A:** Curva de conductancia relativa ( $G/G_{max}$ ) **B:** Curva de inactivación de la corriente. **C:** Curva de la constante de tiempo de la inactivación.

La curva de conductancia relativa presenta un umbral de activación por sobre los -40 mV alcanzando su plateau por sobre los 0 mV. Los parámetros obtenidos para esta curva a partir de los ajustes promedian  $-23.7 \pm 5,1$  mV y  $5.3 \pm 1,1$  mV para  $V_g$  y  $A$ , respectivamente ( $n=10$ ). Con estos valores y la ecuación 1, se construyó la línea continua de la figura 3A.

La inactivación en estado estacionario de estas corrientes comienza a producirse por sobre los -70 mV, completándose cerca de los -15 mV (figura 3B). El ajuste de los datos experimentales a la ecuación 2 produce un voltaje de media inactivación de  $-39,6 \pm 2,3$  mV y un parámetro B de  $7,3 \pm 1,9$  mV ( $n = 10$ , figura 4B). La línea continua corresponde a la curva que se obtiene reemplazando los valores promedio en la ecuación 2.

Los parámetros obtenidos para las curvas de conductancia relativa y de inactivación de la corriente coinciden de buena manera con los reportados en la literatura (Delgado R. y Labarca P., 1993).

En la figura 3C se grafican las curvas obtenidas para las constantes de tiempo de inactivación ( $\tau_h$ ). De las tres propiedades estudiadas, esta fue la que presentó mayor variación entre las células registradas. Los coeficientes promedio de la caída exponencial que describe la dependencia a voltaje de estas curvas son  $7,4 \pm 6,3$  mV para la constante de voltaje de la caída,  $3,7 \pm 2,9$  ms para el  $\tau_h$  en  $-33,6$  mV y una base constante de  $1,4 \pm 0,5$  ms. Estos resultados contrastan con los reportados en la literatura (Delgado R. y Labarca P., 1993), donde se reporta que la dependencia de voltaje de la constante de tiempo de inactivación es de  $19,8$  mV. Estas diferencias pueden deberse a pequeñas corrientes de calcio que no fueron bloqueadas en este trabajo.

#### VI.1.2 *Estudio del efecto del cobre sobre las corrientes de sodio de NOR*

Como primera aproximación experimental se estudió el efecto del cobre sobre las corrientes de sodio utilizando el protocolo de dos pulsos (ver Materiales y Métodos). El pulso P1, de 10 ms de duración, tomó valores entre  $-73,6$  mV y  $-8,6$  mV con incrementos de 5 mV. El pulso P2 fue de 30 ms y tuvo un valor de  $-13,4$  mV. En la tabla 3 se resumen los parámetros obtenidos del estudio del efecto de cobre en 3 células distintas, en las cuales fue posible completar el experimento de manera exitosa. La tabla contiene la amplitud máxima de cada registro y los parámetros de las curvas de conductancia relativa y la de inactivación obtenidos para las tres células.

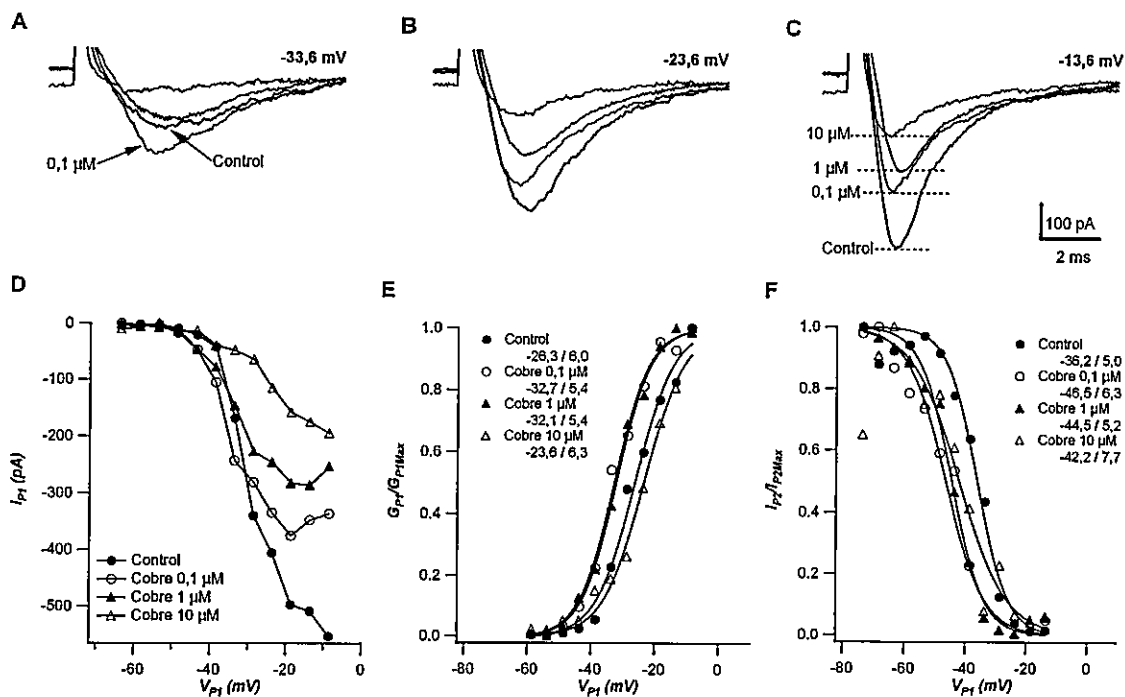
**Tabla 3. Modificación de los parámetros de las curvas estudiadas en las distintas condiciones con cobre para las NOR.** Se muestra el resumen de los parámetros obtenidos para tres células distintas expuestas a soluciones con cobre. Se muestran la amplitud máxima registrada en cada condición y los parámetros de la curva de conductancia relativa ( $V_g$ ,  $A$ ) y de la curva de inactivación ( $V_i$ ,  $B$ ). Las distintas soluciones se agregaron secuencialmente y en orden de concentración creciente.

Cobre ( $\mu\text{M}$ )	Célula 1				Célula 2				Célula 3			
	Control	0,1	1	10	Control	0,01	0,05	0,1	Control	0,1	10	100
$I_{\text{max}}$ (pA)	-553	-375	-286	-195	-553	-350	-253	-197	-396	-195	-158	-135
$V_g$ (mV)	-26,3	-32,7	-32,1	-23,6	-29,4	-29,7	-22,1	-22,4	-25,0	-25,8	-25,4	-25,8
$A$ (mV)	6,0	5,4	5,4	6,3	3,6	7,5	7,2	7,0	5,2	5,0	4,9	5,0
$V_i$ (mV)	-36,2	-46,5	-44,5	-42,2	-36,7	-42,2	-44,7	-45,2	-35,1	-36,0	-44,7	-47,9
$B$ (mV)	5,0	6,3	5,2	7,7	4,5	5,4	7,4	7,0	6,4	7,1	6,7	8,0

Debido a que los voltajes explorados con el pulso P1 llegan hasta los -8 mV, las corrientes evocadas no alcanzan a llegar al plateau de la conductancia máxima, lo que hace imposible generar la curva de conductancia relativa completa. A pesar de esto, se confeccionaron las curvas de conductancia relativa truncadas (sin el plateau) ya que la máxima conductancia registrada ( $P1 = -8,6$  mV) ocurre a voltajes muy cercanos a los del plateau reportado en la literatura ( $\sim 0$  mV, Delgado R. y Labarca P., 1993). Por este motivo, el error asociado a la confección de las curvas no debe ser dramático y estas sirven para mostrar de buena manera su dependencia a voltaje. Para el cálculo de las conductancias se utilizó el potencial de inversión de Nernst de 79 mV.

Las curvas de las constantes de tiempo de inactivación no se muestran debido a su alta variabilidad.

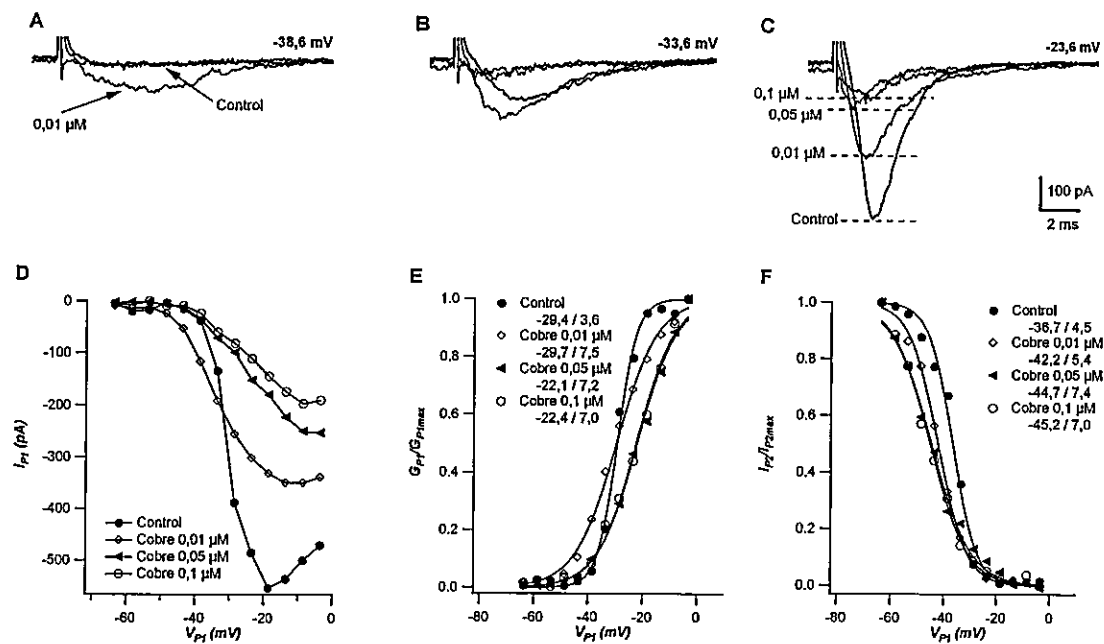
En las tres células estudiadas es posible ver que la adición de cobre entre 0,01 y 100  $\mu\text{M}$  produce cambios en las corrientes de sodio. El efecto más notorio es una continua disminución de la amplitud máxima que se observa cada vez que se reemplaza la solución de la cámara de registro, cayendo a valores cercanos al 35% del valor control durante el experimento (figuras 4,5 y 6, valores en tabla 3). Esta disminución de



**Figura 4. Variación de las propiedades de las corrientes de sodio de célula 1 en tabla 3. A, B y C** Registros de las corrientes evocadas con  $P_1 = -33,6$  mV,  $-23,6$  mV y  $-13,6$  mV, respectivamente para las distintas condiciones estudiadas. El trazo más grueso es la condición control. **D** Curvas corriente-voltaje. **E** Modificaciones de la curva de conductancia relativa. **F** Modificaciones de la curva de inactivación. Los coeficientes de los ajustes de cada curva se muestran en la parte superior de los gráficos E y F como  $V_g / A$  y  $V_i / B$ , respectivamente, todos en mV.

la amplitud fue observada en la mayoría de células estudiadas y se encontró que dicho comportamiento, sin embargo, no guarda relación con la presencia de cobre en la solución de registro (se discute más adelante).

En la célula 1 se estudió secuencialmente el efecto de cobre  $0,1$ ,  $1$  y  $10 \mu\text{M}$ . Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 3 y la figura 4. Las figuras 4 A, B y C muestran las corrientes registradas en respuesta a pulsos  $P_1$  de  $-33,6$  mV,  $-23,6$  mV y  $-13,6$  mV, respectivamente, para las distintas condiciones estudiadas. Es posible ver que, a pesar de la disminución de la amplitud, la corriente evocada con  $P_1$  de  $-33,6$  mV logra mayor amplitud con cobre  $0,1 \mu\text{M}$  ( $-248$  pA) que en la condición control ( $-175$  pA) y



**Figura 5 Variación de las propiedades de las corrientes de sodio de célula 2 en tabla 3. A, B y C** Registros de las corrientes para las distintas condiciones estudiadas evocadas con  $P1 = -38,6$  mV,  $-33,6$  mV y  $-23,6$  mV, respectivamente. El trazo más grueso es la condición control. **D** Curvas corriente-voltaje. **E** Modificaciones de la curva de conductancia relativa. **F** Modificaciones de la curva de inactivación. Los coeficientes de los ajustes de cada curva se muestran en la parte superior de los gráficos E y F como  $V_g / A$  y  $V_i / B$ , respectivamente, todos en mV.

además, el pico de la corriente con cobre  $0,1 \mu\text{M}$  se produce  $0,3$  ms antes (figura 4A). En general, en las condiciones con cobre  $0,1$  y  $1 \mu\text{M}$  la corriente de sodio tiene una mayor amplitud que la condición control para los voltajes entre  $-45$  y  $-35$  mV en los cuales comienza a desarrollarse la corriente (figura 4D).

Las curvas de conductancia relativa y de inactivación de la corriente se ven modificadas de de manera similar por cobre  $0,1 \mu\text{M}$ , desplazándose hacia la izquierda (figuras 4, E y F). Al subir la concentración de cobre a  $1 \mu\text{M}$ , las curvas no presentaron mayor modificación. Al aumentar a cobre  $10 \mu\text{M}$  la curva de conductancia relativa se mueve hacia la derecha, en sentido contrario de la primera modificación y la curva de



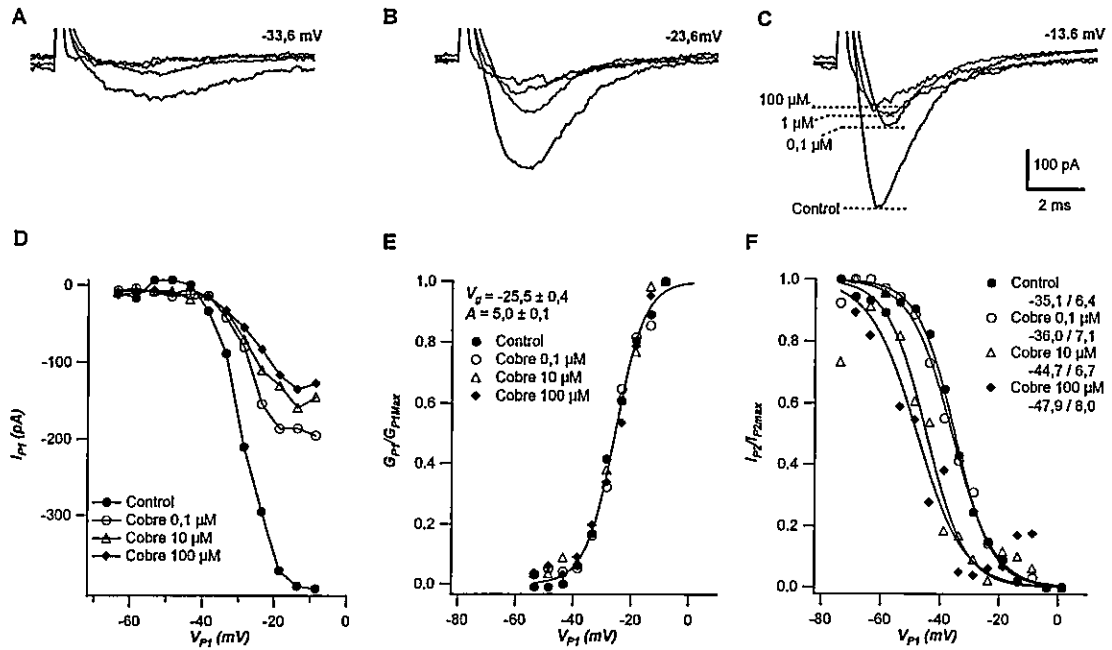
inactivación disminuye su pendiente (figura 4, E y F). Estos resultados pueden entenderse como un efecto activador del cobre en las concentraciones 0,1 y 1  $\mu\text{M}$  y que se revierte con cobre 10  $\mu\text{M}$ .

La figura 5 muestra los resultados obtenidos en la célula 2, en la cual se estudió el efecto de cobre en un rango más bajo de concentraciones, 0,01, 0,05 y 0,1  $\mu\text{M}$ .

Las distintas condiciones con cobre también producen modificaciones de las propiedades de las corrientes de esta neurona. De manera similar al caso anterior, la adición de cobre 0,01  $\mu\text{M}$  provoca un desarrollo de las corrientes a voltajes más negativos. La figura 6A muestra que con P1 de -38,6 mV no se evoca corriente en la condición control, mientras que con cobre 0,01  $\mu\text{M}$  se evoca una corriente de -116 pA. Con P1 de -33,6 mV la corriente con cobre 0,01  $\mu\text{M}$  (-192 pA) es de mayor amplitud que en la condición control (-134 pA) y el pico de la corriente ocurre 1,2 ms más temprano. Este aumento de la corriente a voltajes cercanos a -35 mV puede verse también como la modificación de la curva de conductancia relativa (disminución de la pendiente) producto de un aumento en el factor A luego de la adición de cobre 0,01  $\mu\text{M}$  (desde 3,5 a 7,5 mV, tabla 3 y figura 5E).

Con las otras concentraciones de cobre estudiadas (0,05 y 0,1  $\mu\text{M}$ ) la amplitud de la corriente siempre está por debajo de la condición control, lo que podría deberse a una disminución de amplitud independiente de cobre (se discute más adelante). Esta disminución de amplitud esta asociada, además, a un corrimiento hacia la derecha en 7 mV de la curva de conductancia relativa que muestra un cambio en la sensibilidad a voltaje de las corrientes (tabla 3 y figura 5E).

La figura 5F muestran las variaciones de las curvas de inactivación frente a las distintas condiciones estudiadas. Cobre 0,01  $\mu\text{M}$  produce el desplazamiento de la curva de inactivación en 5 mV hacia la izquierda con una disminución de la pendiente. Al



**Figura 6. Variación de las propiedades de las corrientes de sodio de célula 3 en tabla 3. A, B y C** Registros de las corrientes para las distintas condiciones estudiadas evocadas con  $P1 = -33,6$  mV,  $-23,6$  mV y  $-13,6$  mV, respectivamente. El trazo más grueso es la condición control. **D** Curvas corriente-voltaje. **E** Modificaciones de la curva de conductancia relativa. **F** Modificaciones de la curva de inactivación. Los coeficientes de los ajustes de cada curva se muestran en la parte superior de los gráficos E y F como  $V_g / A$  y  $V_i / B$ , respectivamente, todos en mV.

al aumentar el cobre a  $0,05 \mu\text{M}$  la curva de inactivación nuevamente se desplaza hacia la izquierda en  $2,6$  mV, disminuyendo levemente su pendiente. La curva no presenta mayor variación al agregar cobre  $0,1 \mu\text{M}$  (ver valores en tabla 3).

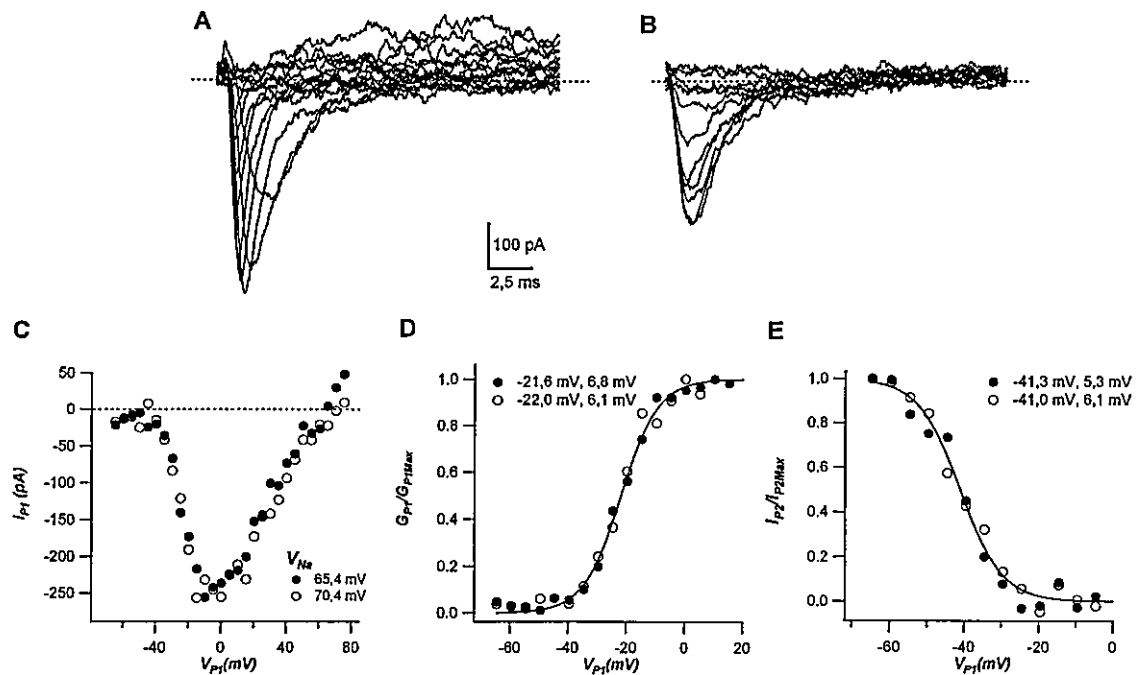
El cobre  $0,01 \mu\text{M}$  en esta célula tiene un claro efecto activador que se produce por un cambio en la sensibilidad a voltaje de la corriente. Por otra parte, el efecto de cobre  $0,05$  y  $0,1 \mu\text{M}$  es de carácter inhibitorio.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos en la célula 3, en la cual se estudió el efecto de cobre  $0,1$ ,  $10$  y  $100 \mu\text{M}$ . En los registros que se muestran en la figura 6 (A, B y C) puede verse que a diferencia de lo descrito en los casos anteriores, la condición control siempre presenta una mayor amplitud (figura 6D), por lo que no es posible concluir que el cobre tiene algún efecto sobre estas corrientes.

Para esta neurona la curva de conductancia relativa, a pesar de la disminución de la amplitud de la corriente, no se ve afectada por las distintas concentraciones de cobre, incluso con una concentración tan alta como  $100 \mu\text{M}$  ( $V_g = -25,5 \pm 0,4 \text{ mV}$ ,  $A = 5,0 \pm 0,1$ , para la condición control y con cobre  $0,1$ ,  $10$  y  $100 \mu\text{M}$ , figura 6E).

La curva de inactivación no se ve modificada significativamente por la adición de cobre  $0,1 \mu\text{M}$  respecto a la curva control. Al reemplazar por solución con cobre  $10 \mu\text{M}$  la curva de inactivación se desplaza hacia la izquierda cerca de  $9 \text{ mV}$ , sin un cambio significativo en la pendiente. Con la adición de cobre  $100 \mu\text{M}$  la curva se mueve levemente a la izquierda y casi no disminuye su pendiente (figura 6F, valores en tabla 3). Estos movimientos de la curva de inactivación hacia la izquierda muestran que hay un mayor grado de inactivación de la corriente. Este aumento de la inactivación podría dar cuenta de la disminución de la amplitud observada. Sin embargo, como el voltaje de mantención de la célula es de  $-73.6 \text{ mV}$ , el nivel de inactivación de la corriente varía muy poco en las distintas condiciones como para ser responsable de la disminución de amplitud.

Con el objetivo de obtener el voltaje de inversión de las corrientes de sodio, éstas fueron exploradas en un rango de potenciales más amplio que permitiera extender la curva corriente-voltaje. Para esto fue necesario eliminar las corrientes de salida que aún quedan luego del reemplazo por cesio y que son evidentes con voltajes positivos (Delgado R. y Labarca P., 1993). Se agregó  $20 \text{ mM}$  de TEA y  $10 \text{ mM}$  de 4-AP a la solución extracelular para bloquear las corrientes de potasio (solución ERB1, Materiales y Métodos). También se modificó el protocolo de estimulación, alargando la duración del pulso P1 a  $30 \text{ ms}$  para asegurar que la curva de inactivación obtenida sea en estado estacionario. Para eliminar las corrientes capacitivas de los registros se utilizó el protocolo P/4 (Bezanilla F. y Armstrong C., 1977).



**Figura 7. Corrientes de sodio de dos neuronas olfatorias de rana obtenidas en presencia de bloqueadores de corrientes de potasio.** Resultados obtenidos del registro de las corrientes de sodio de 2 neuronas, utilizando el protocolo de dos pulsos (P1 de 30 ms, desde -64,6 mV hasta 75,4 mV en saltos de 5 mV,  $V_H = -74,6$  mV). Los bloqueadores de las corrientes de potasio utilizados fueron TEA 20 mM y 4-AP 10 mM. Las corrientes capacitivas fueron sustraídas utilizando el protocolo P/4. **A** Corrientes evocadas en respuestas al pulso P1. **B** Familia de corrientes evocadas con el pulso P2, que muestran la inactivación de la corriente en estado estacionario. Ambos registros (A y B) corresponden a las corrientes de sodio de la neurona, cuyos valores máximos son graficados como círculos blancos en las demás figuras. En ambos registros también se han omitido algunas corrientes para evitar un aspecto saturado. **C** Curvas corriente voltaje para la amplitud máxima de las corrientes de sodio registradas. **D** Curva de conductancia relativa. **E** Curva de inactivación. Las líneas continuas mostradas en D y E se construyeron utilizando el promedio de los coeficientes de los ajustes de cada curva, los que se muestran en cada gráfico en la forma de  $V_g, A$  y  $V_i, B$ .

La figura 7 muestra los resultados obtenidos con estas nuevas condiciones para dos neuronas, en las cuales se exploraron las corrientes de sodio entre -64,6 mV y 75,4 mV con incrementos de 5 mV. La figura 7 (A y B) muestra los registros obtenidos para una de estas células con los pulsos P1 y P2 del protocolo, respectivamente. Estos registros son más ruidosos que los anteriores por la aplicación del protocolo P/4. Estas dos células presentan corrientes con iguales curvas I-V, curva de inactivación y curva

de conductancia relativa (figura 7C, 7D y 7E, respectivamente). La adición de los bloqueadores no produce mayor variación de las corrientes de sodio respecto a las registradas en la condición sin bloqueadores. La curva I-V de la figura 7C muestra que el potencial de inversión de esta corriente está cercano a los 68 mV, 10 mV por debajo que el calculado por el potencial de Nernst (79 mV).

Con estas condiciones fue posible medir las corrientes de sodio en un mayor rango de potenciales, sin embargo no se logró eliminar por completo las corrientes de salida (Figura 7A). Para lograr esta condición, nuevamente se modificaron las soluciones de registro, disminuyendo 4-AP a 5 mM en la solución extracelular y poniendo 20 mM de TEA en la solución de la pipeta (solución ERB2).

Para determinar en qué medida el procedimiento experimental era capaz de modificar las propiedades de las corrientes de sodio por sí solo, se realizó un experimento control en ausencia de cobre en dos neuronas. Se registró consecutivamente las corrientes de sodio de cada neurona y entre cada registro se reemplazó la solución extracelular por más de la misma solución sin cobre (figura 8). Estos resultados muestran que las corrientes de sodio en ausencia del metal presentan, en general, tanta variación como las obtenidas con cobre.

En estos experimentos sin cobre también se produce la disminución de la amplitud observada en los experimentos anteriores, aunque en menor magnitud (figura 8, A y C). Las curvas I-V de la figura 8C1 presentan 17% de disminución de la amplitud máxima entre el segundo y tercer registro, sin una disminución significativa con los otros cambios de solución. La amplitud máxima alcanzada en las curvas I-V que se muestran en la figura 8C2 disminuye en un 12% con el primer cambio de solución y un 26% con el segundo cambio.

En los dos controles realizados es posible ver que, en ausencia de cobre, el tiempo en que se produce la corriente pico disminuye con cada cambio de la solución (indicados con flechas en figura 8, B1 y B2). Por su parte, las curvas de inactivación también se ven modificadas por los cambios de solución, desplazándose hacia la izquierda (figura 8E1 y 8E2).

Un resultado muy importante de estos dos experimentos controles es que, a pesar de la variación de la curva I-V, la curva de inactivación y el tiempo en que se produce la corriente pico, la curva de conductancia relativa se mantuvo constante para todas las repeticiones del protocolo experimental. En las figura 8D1 y D2 puede verse que las curvas obtenidas a lo largo del experimento están en la misma posición. La línea continua de los gráficos se construyó utilizando el promedio de los coeficientes de cada uno de los ajustes ( $V_g = -19,6 \pm 0,6$  mV,  $A = 6,1 \pm 0,8$  mV,  $n = 4$ , figura 8D1 y  $V_g = -28,6 \pm 1,7$  mV,  $A = 7,4 \pm 0,4$  mV,  $n = 3$ , figura 8D2). Este resultado indica que las modificaciones producidas en las curva de conductancia relativa observados en los experimentos anteriores son causa de la adición de cobre.

Cabe destacar que, a diferencia de los casos anteriores, las curvas de inactivación de las corriente mostradas en la figura 8 poseen un  $V_i$  desplazado 20 mV hacia la izquierda respecto a los promedios mostrados en la figura 3B. Esta diferencia podría deberse a que estas corrientes se registraron a mayor temperatura (25°C) o también a que la fisiología de la Rana sufre cambios estacionales (cambios fuertes de la

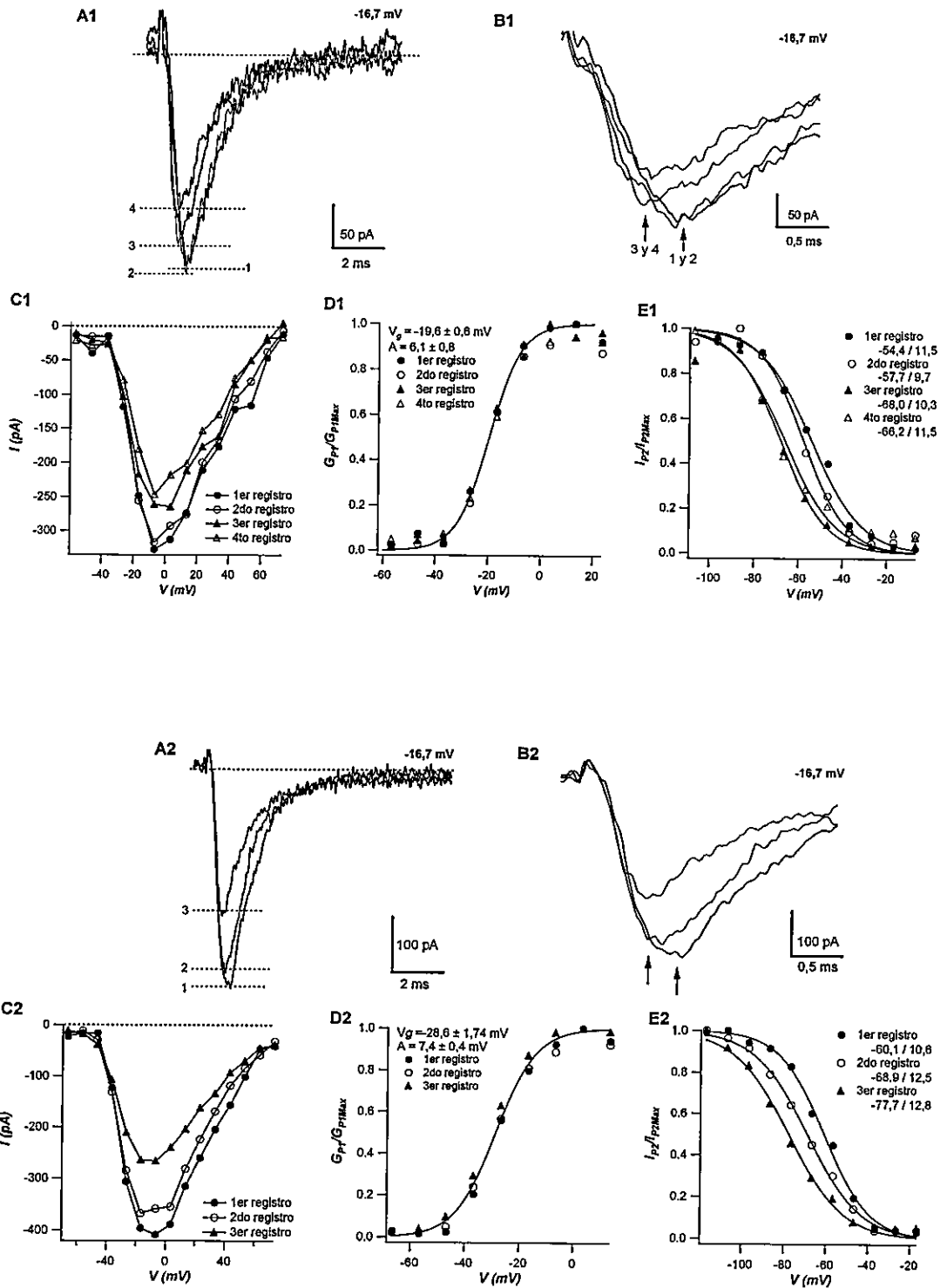


Figura 8. Modificación de las corrientes de sodio en ausencia de cobre. Leyenda de la figura en página siguiente.

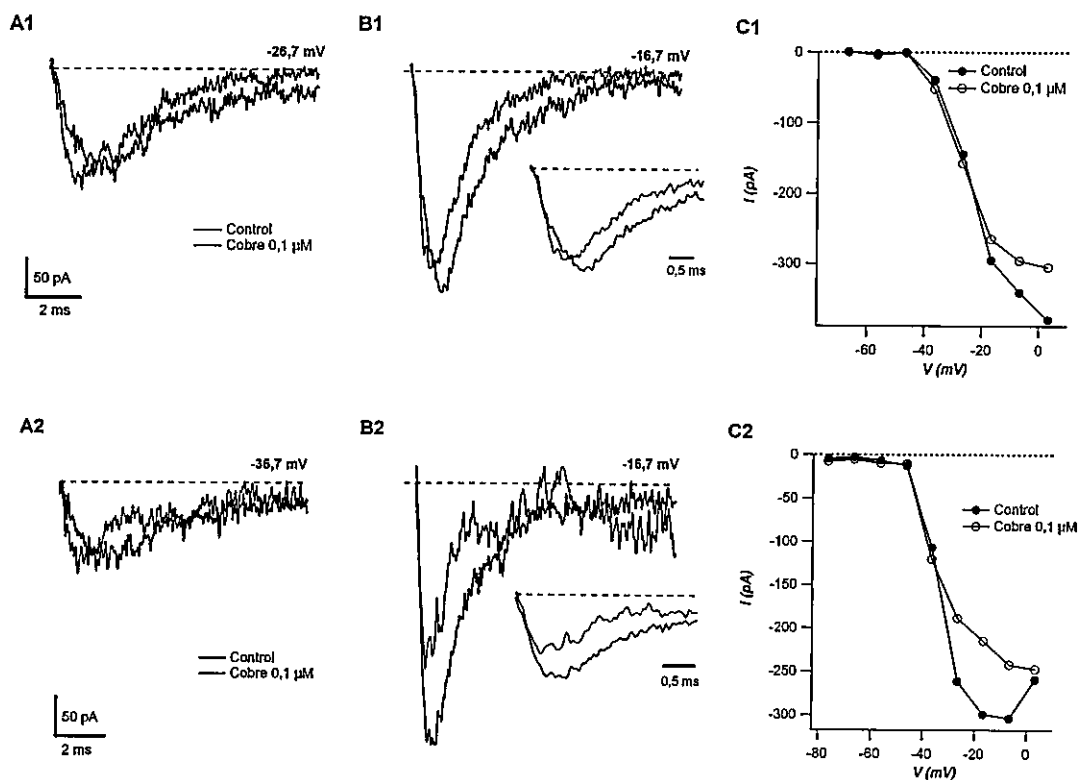
**Figura 8. Modificación de las propiedades de las corrientes de sodio sin la presencia de cobre.** Se muestran los resultados obtenidos de dos células en las que se evaluó el efecto del tiempo y de la manipulación experimental sobre las propiedades de las corrientes de sodio. En el control experimental 1 (arriba) se registraron 4 veces las corrientes de sodio en la misma neurona, reemplazando la solución de registro con 8 volúmenes de la misma solución entre cada registro como control mecánico. En el control experimental 2 (abajo), se realizó el mismo procedimiento, pero se registraron solamente 3 veces las corrientes de sodio. **A** Gráfico de las corrientes evocadas con el pulso P1 de -16,7 mV para las distintas repeticiones. El orden temporal de cada registro se indica con números. **B** aumento del gráfico mostrado en A. **C** Curvas corriente voltaje. **D** Curvas de conductancia relativa. La línea continua se construyó con el promedio de los coeficientes de cada ajuste, los que se muestran en la parte superior del gráfico. **E** Curvas de inactivación de las corrientes de sodio. Los parámetros de los ajustes se muestran como  $V_i / B$ , ambos en mV. Estos experimentos fueron realizados a  $25 \pm 1$  °C.

expresión génica, Baccari G., Minucci S. y Chieffi G., 1994) y estos experimentos fueron realizados en verano, mientras los controles, en otoño.

Este corrimiento hace posible que la disminución de la amplitud observada pueda deberse a un aumento en la inactivación de la corriente desde el voltaje de mantención (-76,7 mV). Suponiendo que la disminución de la amplitud de la corriente se produce por un decaimiento temporal y que esto impide la observación de un efecto activador del cobre (como el aumento de amplitud que produce cobre  $0,1 \mu\text{M}$  reportado por Delgado R. y col, 2006), se intentó evitar la disminución de la amplitud. Con este objetivo se modificó el protocolo de estimulación para minimizar la duración de cada experimento. Las corrientes fueron evocadas por un solo pulso de voltaje de 20 ms de duración que varió entre -76,7 y 3,3 mV, con incrementos de 10 mV. Además se redujo el número de barridos del protocolo, enfocando el análisis en la curva I-V. Se aplicó este nuevo protocolo experimental tres células, las que se denominaron célula 4, 5 y 6, respectivamente.

La figura 9 muestra los resultados de las células 4 y 5 en las que se estudió el efecto de cobre  $0,1 \mu\text{M}$ . A pesar de las modificaciones experimentales implementadas se produjo la disminución de la amplitud de las corrientes (20% y 19% de disminución para las curvas de la figura 9C, 1 y 2, respectivamente). En estas mismas figuras se ve

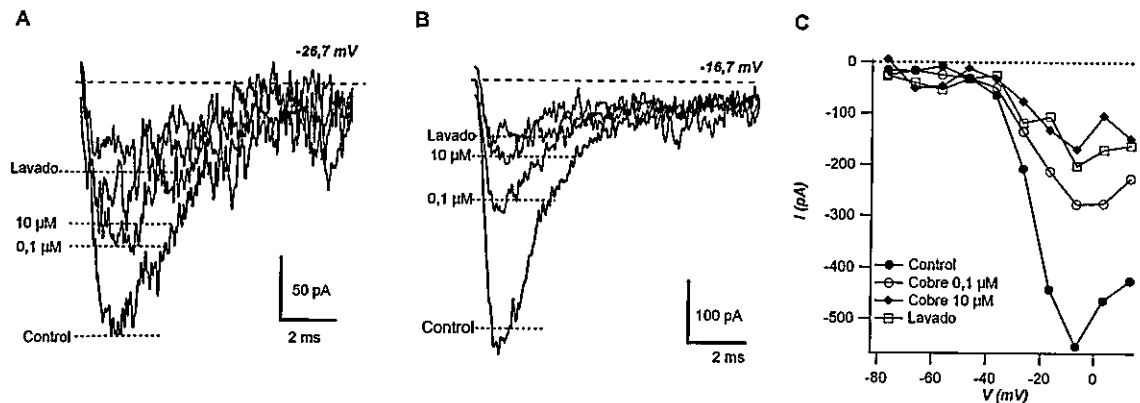




**Figura 9. Efecto de cobre  $0,1 \mu\text{M}$  sobre las corrientes de sodio de dos NOR.** Se registraron las corrientes de sodio en presencia de bloqueadores de corrientes de potasio (solución ERB2), y sustrayendo digitalmente las corrientes capacitivas con el protocolo P/4. Las corrientes fueron registradas en condición control (P1 de 20 ms, desde  $-66,7 \text{ mV}$  hasta  $3,3 \text{ mV}$ , con incrementos de  $10 \text{ mV}$ ,  $V_H = -76,7 \text{ mV}$ ) y luego se reemplazó la solución del baño por 8 volúmenes de la solución con cobre  $0,1 \mu\text{M}$ . **A y B** Registros de las corrientes de sodio para las dos condiciones. En la parte superior se indica el voltaje del pulso. La línea punteada es el nivel de corriente cero. El inserto en B es una ampliación del registro. **C** Curvas I-V para la amplitud máxima de las corrientes de sodio. Los experimentos fueron realizados a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

que en ninguna de las dos células se modifica la curva I-V en la región de voltajes en que se activan las corrientes (entre  $-50$  y  $-40 \text{ mV}$ ). El tiempo en que se produce la corriente pico disminuye en la condición con cobre para la célula 4 (figura 9B1) no así en la célula 5 (figura 9B2). Por lo tanto, en ninguna de las dos células hay modificaciones que puedan ser atribuidas exclusivamente a la adición de cobre.

Finalmente se estudió el efecto de cobre  $0,1 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{M}$  agregados secuencialmente sobre la misma neurona, para luego sacar el cobre de la solución de registro mediante lavado. Los resultados se muestran en la figura 10. Lo más evidente



**Figura 10. Efecto de Cobre 0,1 y 10  $\mu\text{M}$  sobre la misma neurona.** Se registraron las corrientes de sodio en presencia de bloqueadores de corrientes de potasio (solución ERB2) y sustrayendo digitalmente las corrientes capacitivas con el protocolo P/4. Las corrientes fueron evocadas con un pulso de 20 ms de duración que varió entre -66,7 mV y 3,3 mV, con incrementos de 10 mV. El potencial de mantención fue de -76,7 mV. **A y B** Registros de las corrientes evocadas, el voltaje del pulso se indica en la parte superior. **C** Curvas I-V para las distintas condiciones. Experimento realizado a 25 °C.

de las curvas obtenidas es la disminución en un 50% de la amplitud de la corriente máxima (figura 10C) que se produce al agregar la solución con cobre 0,1  $\mu\text{M}$ . Después, al agregar el cobre 10  $\mu\text{M}$  disminuye en un 27%. Después del lavado la amplitud disminuye un 15% respecto a la condición anterior. No se observan modificaciones en el tiempo en que se produce la corriente pico para ninguna de las condiciones estudiadas (figura 10B). Luego del lavado se ve un leve aumento de la amplitud en la curva I-V, lo cual podría indicar que parte de la disminución de la amplitud es causada por el cobre 10  $\mu\text{M}$ , efecto que se recupera mediante lavado (figura 10C).

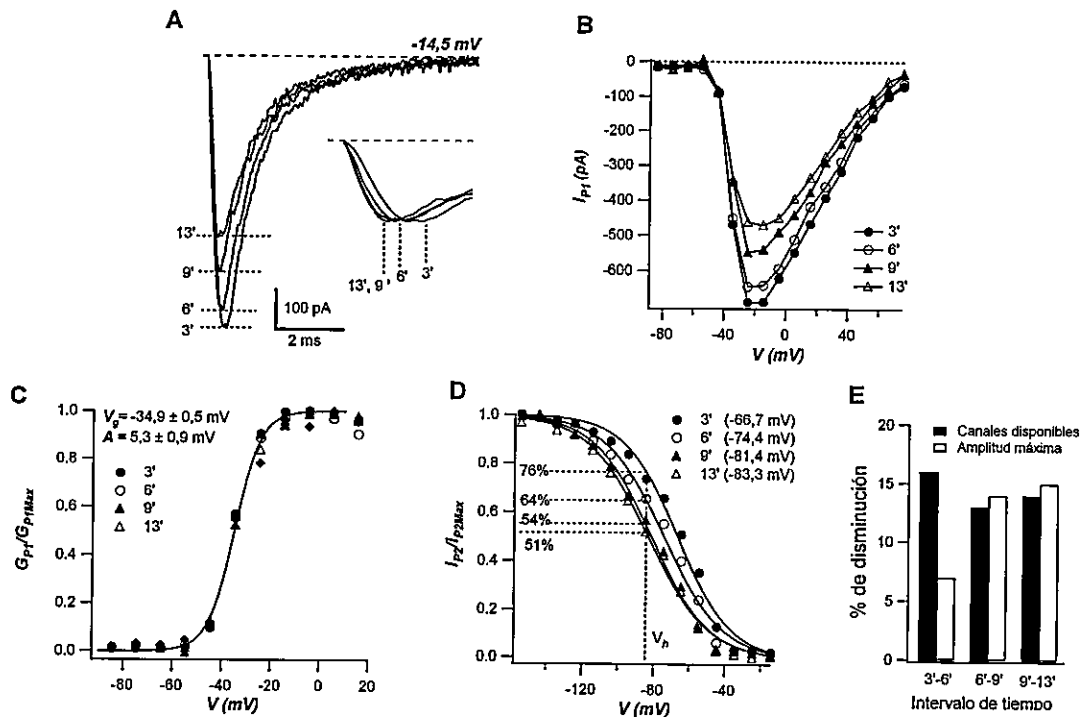
## VI.2 ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RATA (NOT)

El segundo objetivo de la memoria fue saber si el efecto modificador del cobre reportado en las NOR (Delgado R. y col., 2006) ocurre en mamíferos. Para esto se utilizaron neuronas olfatorias de rata, las que fueron registradas con la misma metodología ya descrita, con algunas leves modificaciones en las soluciones de registro (ver Materiales y Métodos).

### VI.2.1 Caracterización de las corrientes de sodio de NOT

Antes de hacer experimentos con cobre se estudió el comportamiento de las corrientes de sodio durante el tiempo de experimentación con el objetivo de asegurar una condición estable que permita evaluar un posible efecto del cobre. La figura 11 muestra un experimento representativo en donde se siguió durante 15 minutos las propiedades de las corrientes de sodio de una NOT, haciendo registros con el protocolo de 2 pulsos en 4 oportunidades (a los 3, 6, 9 y 13 minutos, figura 11).

Durante los primeros minutos de registro la amplitud de la corriente evocada con un pulso cuadrado de voltaje constante aumentó gradualmente con cada repetición, hasta lograr un valor máximo. Luego de un tiempo de estabilización cercano a los 3 minutos a partir del momento en que se logra la configuración de *whole cell*, se alcanza una amplitud constante (datos no mostrados). Este proceso es posible que ocurra debido a la adquisición de un nuevo estado de equilibrio intracelular luego de la diálisis producida con la solución de la pipeta, que en este caso contiene 1 mM de ATPMg.



**Figura 11.** Modificaciones de las  $I_{Na^+}$  durante el transcurso del tiempo. Se registró la corriente de sodio utilizando el protocolo de 2 pulsos (P1 de 30 ms, desde -155,5 hasta 75,5 mV; P2 de 15 ms a -4,5 mV) a los 3, 6, 9 y 13 minutos, aproximadamente, de comenzado el registro. **A** Registros de las  $I_{Na^+}$  evocadas con P1 = -14,5 mV para los 4 tiempos estudiados. En el inserto se muestran los mismos registros de manera estandarizada y ampliada para notar los cambios en el tiempo en que se produce la corriente pico. **B** Curvas I-V para los distintos tiempos en que se aplicó el protocolo de dos pulsos. **C** Curva de conductancia relativa confeccionada utilizando los promedios de los parámetros de cada ajuste. **D** Curvas de inactivación. Se indica el porcentaje de canales disponibles al voltaje de mantención  $V_H = -84,5$  mV. **E** Gráfico que muestra la disminución de los canales de sodio disponibles al voltaje de mantención y la disminución de la amplitud de la corriente máxima (medida como el máximo de la curva I-V) que se produce entre cada intervalo de tiempo estudiado. Ambos valores se muestran como porcentajes.

En la neurona de la figura 11 la corriente de sodio (registrada a los 3 minutos de experimento) presentó un umbral de activación cercano a los -50 mV y alcanzó la conductancia relativa máxima por sobre los -10 mV. La inactivación en estado estacionario se completa a potenciales por sobre los -20 mV y su voltaje de media inactivación de -66,7 mV.

**Tabla 4.** Efecto del tiempo sobre las propiedades de las corrientes de sodio de NOT. Se registró 4 veces las corrientes de sodio utilizando el protocolo de dos pulsos en misma neurona (detalles en figura 12). Se muestran la corriente máxima y los parámetros de la curva de conductancia relativa y la curva de inactivación.

Tiempo	3'	6'	9'	13'
<i>I</i> <sub>max</sub> (pA)	-401	-333	-173	-146
<i>V</i> <sub>g</sub> (mV)	-35,4	-35,4	-35,0	-35,1
<i>A</i> (mV)	4,3	4,7	4,7	5,6
<i>V</i> <sub>I</sub> (mV)	-66,7	-74,4	-81,4	-83,3
<i>B</i> (mV)	4,3	4,8	5,6	6,6

Luego de alcanzar un valor estable de amplitud máxima la corriente comienza a disminuir gradualmente su amplitud cada vez que se realiza un nuevo registro, de la misma manera que se describió previamente en las corrientes de sodio de NOR. Esta disminución de la amplitud puede verse en la figura 11 (A y B, valores en tabla 4) en donde se obtuvo corrientes de menor amplitud para cada repetición del protocolo. También puede verse que, junto con la disminución de la amplitud, la corriente pico ocurre más temprano a medida que transcurre el experimento (inserto de figura 11A).

La curva de conductancia relativa no se ve modificada por las variaciones en la amplitud de la corriente, puesto que la primera se mantiene sin modificaciones durante los 15 minutos de observación (figura 11C).

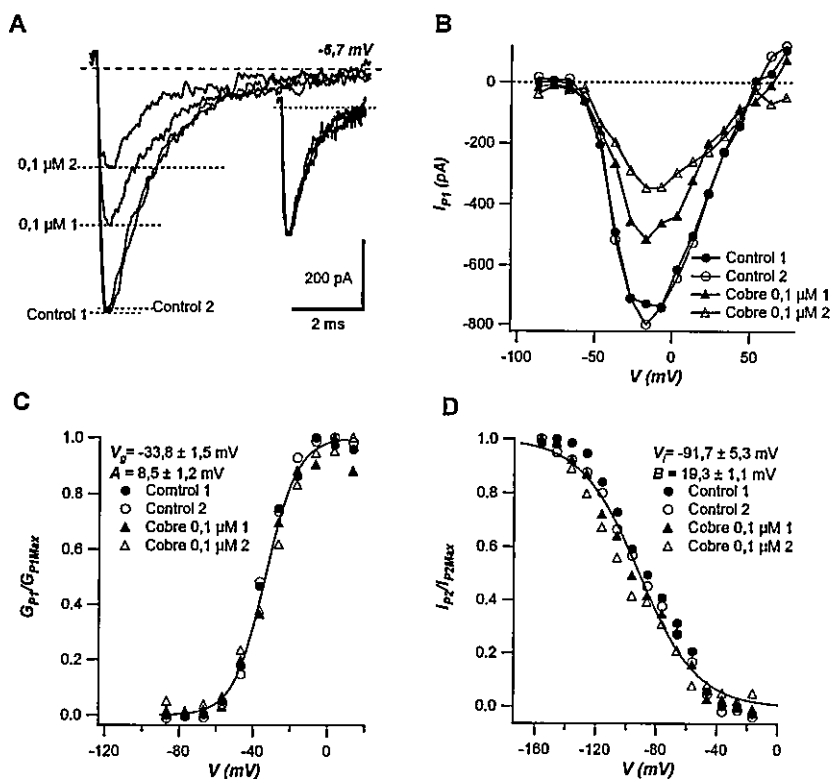
La curva de inactivación de la corriente presenta un desplazamiento hacia la izquierda en 16 mV que se produce principalmente entre el primer y tercer registro, además de un aumento gradual de 2,3 mV en la pendiente de la curva (figura 11D, tabla 4). Debido a que estas corrientes poseen las curvas de inactivación centradas en torno a los -70 mV, el corrimiento de la curva hacia la izquierda refleja un aumento de la fracción de canales inactivados desde el potencial de mantención, disminuyendo así la amplitud máxima de la corriente evocada ( $V_H = -84,5$  mV, figura 11D). Esta relación se muestra en la figura 11E donde se grafica la disminución de la fracción de canales

disponible al potencial de mantención, junto con la disminución de la amplitud (calculada como la máxima de la curva I-V), ambos valores como porcentajes del valor inicial.

#### VI.2.2 Efecto de cobre 0,1 $\mu$ M

Se estudió el efecto de cobre 0,1  $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de 13 NOT. Los resultados obtenidos presentan mucha heterogeneidad y no permiten ser presentados en forma de promedios. Por claridad, se muestran de manera representativa los resultados obtenidos en sólo cuatro de estas células (tabla 5).

La figura 12 muestra uno de los resultados obtenidos en el cual se registraron las corrientes de sodio en condición control, luego se lavó con solución control y posteriormente a eso se agregó el cobre, condición en la que se registró la corriente 2 veces seguidas. Puede verse en los registros y la curva I-V (figuras 12, A y B) que durante los dos registros sin cobre no se produce disminución de la amplitud, sin embargo, al agregar el cobre la amplitud disminuye cerca de un 35% (de -796 pA a -516 pA), y continúa disminuyendo en presencia del metal hasta un 45% del valor inicial, el cual se obtiene en el segundo registro con cobre, realizado inmediatamente después. En los cuatro registros realizados no se producen cambios en la curva de conductancia relativa, mientras que la curva de inactivación tiene un desplazamiento mínimo hacia la izquierda (figura 12, C y D). Según esto último, en esta neurona la disminución de la amplitud no puede relacionarse con un aumento de la fracción de canales inactivados desde el potencial de mantención, quedando la posibilidad de que la disminución de la amplitud se deba a la modificación por cobre de otra propiedad de la corriente. Sin embargo, este efecto se ve sólo en esta neurona.



**Figura 12. Efecto de cobre  $0,1 \mu\text{M}$  sobre las corrientes de sodio de células 5 y 7 de la tabla 5.** Los resultados que se muestran en la parte superior corresponden a una neurona en que se registro 2 veces seguidas la corriente en condición control, luego se agregó el cobre y nuevamente se registro dos veces sus corrientes. En los registros de la parte inferior de la figura se determinó una vez la condición control y luego dos veces después de agregar el cobre. **A** Trazos de las corrientes evocadas con  $P1 = -10 \text{ mV}$  (arriba) ó  $0 \text{ mV}$  (abajo) para las distintas condiciones. La línea punteada superior indica el nivel de corriente cero. En el inserto se muestran los mismos trazos estandarizados por su amplitud máxima. **B** Curvas  $I-V$  para  $\text{Na}^+$  para cada condición. **C** Curvas de inactivación. **D** Curvas de conductancia relativa.

En la tabla 5 se muestran los resultados de 4 experimentos en los cuales se registró las corrientes de sodio en condición control, en presencia de cobre y luego de lavar con solución control. Esto se realizó en distinto orden para saber cuáles cambios de las corrientes de sodio se debían la adición del metal y cuáles a la manipulación experimental.

En las cuatro neuronas se observa una disminución de la amplitud máxima cercana al 50% que se produce gradualmente durante el procedimiento experimental, ya sea después de agregar cobre (células 1 y 2), antes de agregarlo (célula 3) o

**Tabla 5. Efecto de cobre 0,1  $\mu$ M sobre las corrientes de sodio de NOT.** Se muestran como cambian los parámetros de las corrientes de sodio de 4 NOT en las que se agregó cobre 0,1  $\mu$ M. En la célula 1 se registró la condición control, luego de agregar el cobre se registró la corriente 2 veces. En la célula 2 se registro la condición control, luego se agregó el cobre y finalmente se sacó el metal lavando con solución control. En la célula 2 se registro 2 veces luego de sacar el cobre (lavado + control) para ver el efecto del tiempo sobre las corrientes. En las células 3 y 4 se alteró el orden del procedimiento. Las distintas condiciones experimentales se muestran según el orden en que se realizaron. Para cada condición se muestra la amplitud máxima de la curva I-V y los parámetros de la curva de conductancia relativa y curva de inactivación.

Condición	Célula 1			Célula 2				Célula 3			Célula 4			
	Control	Cu(II)	Cu(II)	Control	Cu(II)	Lavado	Control	Control	Lavado	Cu(II)	Cu(II)	Lavado	Control	
<i>I</i> <sub>max</sub> (pA)	-728	-513	-347	-273	-173	-146	-141	-461	-309	-183	-1029	-693	-473	
<i>V</i> <sub>g</sub> (mV)	-35,2	-32,9	-22,8	-33,1	-41,0	-43,0	-46,2	-38,0	-42,0	-43,9	-38,2	-46,3	-46,2	
A (mV)	7,2	9,7	16,8	5,9	8,7	6,0	8,1	6,2	5,5	5,0	5,3	4,9	6,0	
<i>V</i> <sub>i</sub> (mV)	-90,3	-93,3	-98,7	-94,3	-106,1	-108,6	-108,5	-92,7	-102,8	-112,6	-70,7	-93,4	-104,8	
B (mV)	19,4	19,4	20,2	18,0	15,8	14,8	14,0	16,8	14,8	14,0	15,8	15,8	15,8	

partiendo desde el primer registro con cobre y luego lavándolo con solución control (célula 4). Estos resultados muestran que no es posible atribuirle al cobre la disminución de la amplitud de la corriente.

Las curvas de conductancia relativa presentaron movimiento hacia la derecha en dos de las trece células (una de ellas es la célula 1). En las otras células en las que se agregó cobre luego de la condición control, la curva de conductancia relativa se desplazó hacia la izquierda entre 5 y 10 mV, sugiriendo un efecto activador ( $n=5$ ). Por otra parte, este mismo efecto se observó antes de agregar el cobre o una vez que este ya había sido lavado de la solución (células 3 y 4, respectivamente), mostrando que el desplazamiento de la curva puede ser un efecto temporal y no necesariamente debido al cobre. De la misma manera, la pendiente de la curva presenta tanta variación (independiente del tratamiento experimental) como la posición de la curva, por lo que no es posible relacionarla con efectos de este metal.

La curva de inactivación de la corriente también presenta un desplazamiento hacia la izquierda durante los distintos tratamientos experimentales. Este corrimiento de entre 4 y 12 mV por cada nuevo registro ocurre ya sea luego de la adición de cobre



(célula 1 y 2) o durante los cambios de solución control en donde no hay cobre presente (células 3 y 4). Esto indica que el corrimiento hacia la izquierda de la curva de inactivación es un proceso gradual que ocurre con el transcurso del experimento y no a causa de la adición de cobre. La pendiente de la curva también presenta todas las variaciones posibles durante el transcurso del experimento, aumenta (célula 1), disminuye (célula 2 y 3) y se mantiene constante (célula 4), sin poder relacionar la presencia de cobre con algún efecto específico sobre este parámetro.

### VI.2.3 Efecto de cobre 10 $\mu\text{M}$

Se estudió el efecto del cobre 10  $\mu\text{M}$  en tres NOT, denominadas células 5, 6 y 7. Los resultados se resumen en la tabla 6.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos en la célula 5, los cuales son representativos también de la célula 6. Al igual que en los casos anteriores, en las células 5 y 6 se observa la disminución de la amplitud de la corriente para cada nuevo registro. Además, luego de la adición de cobre el pico de la corriente se observa más temprano, aparentemente por una fase de activación e inactivación más rápidas (figura 13A).

La curva de conductancia relativa no varía considerablemente luego de la adición de cobre en ninguna de las dos células (figura 13C, tabla 6). Por su parte, en la

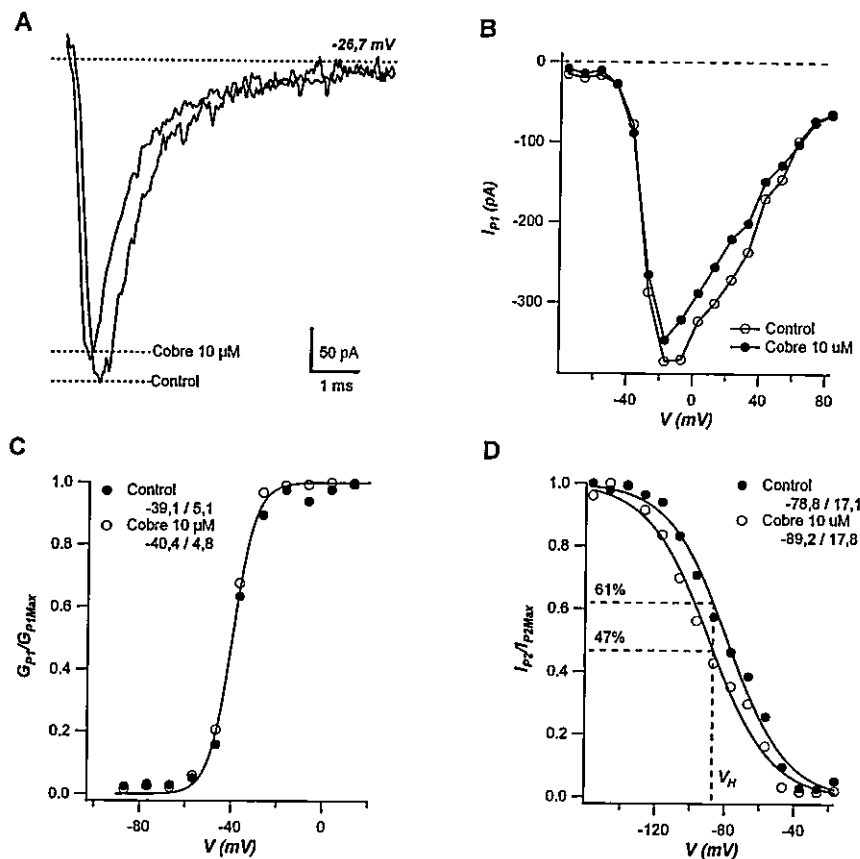
**Tabla 6. Efecto de cobre 10  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes de sodio.** Se muestran la amplitud máxima, los parámetros de la curva de conductancia relativa y de la curva de inactivación de las corrientes de sodio de tres NOT que fueron expuestas a cobre 10  $\mu\text{M}$ .

Condición	Célula 5		Célula 6		Célula 7
	Control	Cu(II)	Control	Cu(II)	Cu(II)
<i>I</i> <sub>max</sub> (pA)	-373	-347	-565	-302	-375
<i>V</i> <sub>g</sub> (mV)	-39,1	-40,4	-34,2	-36,8	-30,4
<i>A</i> (mV)	5,2	4,8	5,9	6,8	6,2
<i>V</i> <sub>I</sub> (mV)	-78,8	-89,2	-83,1	-87,5	-84,2
<i>B</i> (mV)	16,8	18,0	18,0	22,9	25,2

célula 5 la curva de inactivación se mueve 10 mV hacia la izquierda con un aumento en la pendiente de 1,2 mV (figura 13D). Respecto a la relación entre la disminución de la amplitud y la curva de inactivación para la célula 5, la modificación de esta última curva significa una disminución en un 14% de los canales disponibles desde el potencial de mantención, mientras que la amplitud máxima de la corriente cae sólo un 7% (figura 13D). Por lo tanto, en esta neurona se observa que luego de la adición de cobre 10  $\mu$ M la disminución de la amplitud es menor que la esperada según la modificación de la curva de inactivación.

En el caso de la célula 6 la disminución de la amplitud en un 46,5% es considerablemente mayor al 11% en que disminuye la disponibilidad de canales (datos no mostrados). Esto es similar a lo observado en las NOR y NOT que se describieron anteriormente en condición control, por lo que posiblemente no se deba a la presencia del metal.

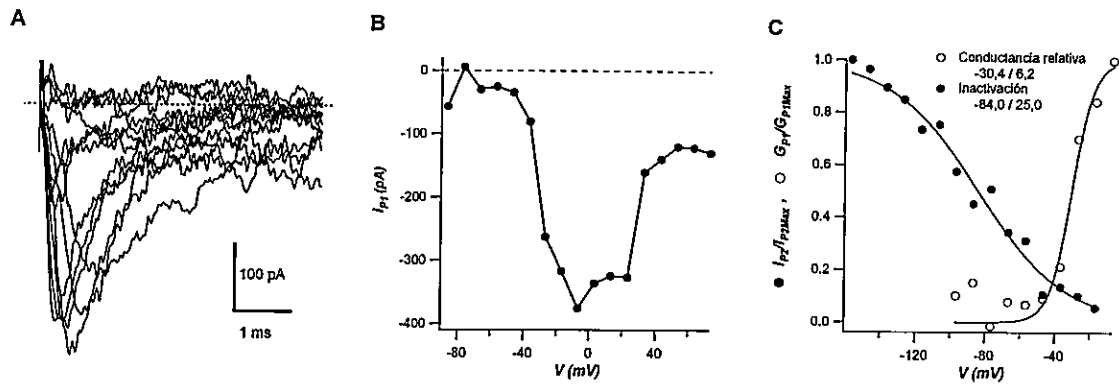
Para evitar los cambios que se producen debido al tiempo y la manipulación experimental se intentó obtener registros cuya condición inicial fuera en cobre 10  $\mu$ M, para así poder evaluar si los parámetros obtenidos diferían de los registrados en condición control. Luego de repetidos intentos de registrar corrientes de sodio en células que estuvieron expuestas entre 3 y 10 minutos a cobre 10  $\mu$ M (sin realizar un registro control), de 10 células estudiadas ninguna presentó corrientes de sodio (datos no mostrados). La célula 7 (tabla 6) estuvo aproximadamente 8 minutos en cobre 10  $\mu$ M y tampoco presentó corrientes de sodio en respuesta al pulso P1 en los primeros intentos. Sin embargo, luego de una hiperpolarización a -120 mV durante 15 segundos, fue posible recuperar las corrientes de sodio en esta neurona (figura 14). La curva I-V que se obtuvo de estas corrientes está dentro de la normalidad (figura 14B). Del mismo modo, esta corriente recuperada presenta la curva de conductancia relativa y curva de



**Figura 13. Efecto de cobre 10  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes de sodio de célula 5, tabla 6. A** Trazos de las corrientes evocadas con  $P1 = -26,7 \text{ mV}$ . La línea punteada superior indica el nivel de corriente cero. **B** Curvas I-V para la condición control y con cobre. **C** Curvas de conductancia relativa. Se muestran los parámetros de los ajustes de cada curva como  $V_g/A$  ambos en mV. La línea continua se construyó utilizando los promedios de ambos parámetros. **D** Curvas de inactivación indicando el porcentaje de canales sin inactivación al potencial de mantención. Los parámetros de los ajustes de cada curva se muestran como  $V_H/B$ , ambos en mV.

inactivación en posiciones normales respecto a los valores controles observados, aunque la curva de conductancia relativa podría estar corrida hacia la derecha (figura 14C).

Con esta última observación se puede inferir que el cobre 10  $\mu\text{M}$  produce una modificación sobre los canales de sodio que tarda unos minutos en eliminar las corrientes. Esta eliminación de la corriente puede ser el resultado del corrimiento hacia la izquierda de la curva de inactivación hasta el punto de no dejar canales disponibles



**Figura 14. Efecto de la exposición prolongada a cobre  $10 \mu\text{M}$  (célula 7 tabla 6).** Después de 8 minutos de exposición a cobre  $10 \mu\text{M}$  esta neurona no presentó corrientes de sodio (datos no mostrados) posiblemente debido a la exposición prolongada a este metal. Las corrientes pudieron ser recuperadas luego de una hiperpolarización con  $-120 \text{ mV}$  durante 15 segundos. **A** Familia de corrientes evocadas con la serie de pulsos P1. **B** Curva I-V. **C** Curva de conductancia relativa y curva de inactivación.

para conducir corriente. También puede ocurrir por un desplazamiento hacia la derecha de la curva de conductancia relativa, lo que involucraría cambios en los procesos de activación y/o inactivación. Por otra parte, también es posible que el cobre agregado en esa concentración produzca una despolarización sostenida en la neurona, lo que eliminaría las corrientes de sodio por mantener todos los canales inactivados. Esta modificación puede ser revertida mediante la hiperpolarización de la célula.

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1 ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RANA

El tema de esta memoria surge como continuación de la investigación que encontró que el cobre tiene la capacidad de modificar las corrientes de sodio de NOR (Delgado R. y col, 2006). En ella se describe al cobre como un modulador bifásico de las corrientes de sodio, el cual a concentraciones nanomolares aumenta la amplitud de la corriente, mientras que al aumentar la concentración a 5  $\mu\text{M}$  o mayores, la amplitud disminuye. Los objetivos iniciales de la memoria fueron cuantificar esa modulación e intentar dilucidar el mecanismo por el cual se produce.

Como primera parte de la investigación se caracterizó las corrientes de sodio de NOR (figura 3). Los resultados obtenidos de la curva de conductancia relativa y curva de inactivación concuerdan de buena manera con la información reportada en la literatura, lo que valida la metodología experimental y el análisis de los datos (Tabla 7). Por su parte, las curvas de las constantes de tiempo de inactivación presentaron gran variabilidad entre las distintas neuronas estudiadas por lo que no se utilizaron posteriormente en los análisis. Esta variación encontrada puede deberse a la presencia

**Tabla 7.** Parámetros de las corrientes de sodio de NORs en condición control. Se muestran los parámetros de la curva de conductancia relativa y de la curva de inactivación obtenidos junto con los reportados en la literatura. Puede verse que los valores son similares, presentando leves diferencias en los parámetros de las pendientes de las curvas<sup>1</sup>. Los parámetros correspondientes a las curvas de las constantes de inactivación no se muestran puesto que el método de análisis difiere entre ambas investigaciones.

Parámetro	Curva de Conductancia relativa		Curva de Inactivación	
	$V_g$ (mV)	A (mV)	$V_i$ (mV)	B (mV)
Vera J.	$-23,7 \pm 5,3$ (n=10)	$5,3 \pm 1,1$ (n=10)	$-39,6 \pm 2,3$ (n=10)	$7,3 \pm 1,9$ (n=10)
Delgado R. y Labarca P., 1993	$-22,9 \pm 2,4$ (n=4)	$6,5 \pm 0,4$ (n=4)	$-37,8 \pm 1,0$ (n=6)	$4,9 \pm 0,6$ (n=6)

<sup>1</sup> La diferencia que se observa en los parámetros A y B puede ser consecuencia de que los experimentos en esta memoria se realizaron a  $-20$  °C, 2 grados por encima de la utilizada por Delgado R. y Labarca P.

de corrientes persistentes de entrada cuya amplitud varía de célula a célula, alterando el resultado de los ajustes (Delgado R. y Labarca P., 1993).

Al momento de realizar los experimentos para poder cuantificar el efecto modificador del cobre se observó que en las distintas condiciones con cobre se producen cambios en las corrientes de sodio, algunos de los cuales no ocurren en la investigación que motiva esta memoria (Delgado R. y col, 2006). De éstos, la modificación más evidente es la disminución de hasta un 65% de la amplitud de la corriente que se produce gradualmente a lo largo de los experimentos (tabla 2, figuras 4, 5 y 6). Una vez realizados los controles en los cuales se repitió el procedimiento experimental, pero en ausencia de cobre, fue posible concluir que la disminución de la corriente no se debió a la presencia del metal y más bien se trató de una disminución gradual que se produce con el tiempo de experimentación (figura 8). No se hicieron experimentos para determinar la naturaleza de la disminución de la corriente y tampoco se pudo relacionar su causa con las modificaciones observadas en la curva de conductancia relativa o en la curva de inactivación (salvo en dos células que se discuten más adelante).

Los cambios observados en el tiempo a la corriente pico y la curva de inactivación (figuras 4, 5 y 6) tampoco pueden ser atribuidos a la presencia del metal, puesto que estos cambios también ocurren en los controles realizados en ausencia de cobre (figura 8).

A pesar de la disminución general de la amplitud fue posible notar que para ciertos voltajes se produce un aumento de la corriente al agregar cobre. En los registros de las figuras 4A y 5A se observa que al reemplazar la solución control por la solución con cobre (0,1 y 0,01  $\mu\text{M}$  en figura 4 y 5, respectivamente), se produce un aumento en la amplitud de la corriente evocada con voltajes entre -50 y -35 mV. Este

aumento de la corriente puede entenderse como un cambio en la sensibilidad a voltaje que se traduce en un desarrollo de la corriente a potenciales menores, efecto que se aprecia en las curvas de conductancia relativa como un desplazamiento hacia la izquierda. Debido a que en los controles realizados en ausencia de cobre se observa que la curva de conductancia relativa permanece constante durante todo el experimento, es posible atribuirle al cobre los cambios que se experimentan luego de agregar este metal.

Los cambios producidos en la curva de conductancia relativa en la célula 1 (figura 4) coinciden con los resultados esperados. Con cobre  $0,1 \mu\text{M}$  la curva se mueve hacia la izquierda, observándose mayores conductancias relativas con menores potenciales aplicados. Esto muestra que el cobre tiene un efecto activador sobre las corrientes de esta célula. Este efecto se mantiene con cobre  $1 \mu\text{M}$ , mientras que al aumentar a  $10 \mu\text{M}$  la curva se desplaza hacia la derecha perdiendo el estado activado. Sin embargo, este movimiento devuelve a la curva a la condición control sin producir un efecto inhibitorio respecto a la curva sin cobre. Debido a que esta curva se confecciona con los valores de la corriente pico, los factores que componen la curva involucran tanto procesos en el equilibrio (curva de activación e inactivación de la corriente) como factores cinéticos (constantes de tiempo de los procesos de activación e inactivación) por lo que no es posible saber cuál o cuáles de ellos son modificados.

La adición de cobre en las otras dos células estudiadas produce efectos distintos. En la célula 2 el cobre  $0,01 \mu\text{M}$  produce un aumento en la pendiente de la curva, mientras que cobre  $0,05 \mu\text{M}$  tiene un efecto inhibitorio sobre las corrientes, desplazando la curva hacia la derecha. Al aumentarla concentración de cobre a  $0,1 \mu\text{M}$  la curva mantiene la posición anterior y no se ve el efecto activador (figura 5). Mientras

que en la célula 3 la adición de cobre entre 0,1 y 100  $\mu\text{M}$  no tiene efecto alguno sobre esta curva (figura 6).

Se ha demostrado que es mediante mecanismos redox que el cobre tiene un efecto inhibitorio sobre la tasa de disparo de estas neuronas en el epitelio (Aedo F. y col, 2007), y de esa manera también disminuye la probabilidad de tiempo abierto de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Morera F. y col., 2003; sin embargo se discuten otros mecanismos, Ma Z. y col., 2000). Sabiendo esto, es posible que la variabilidad de los efectos observados luego de agregar cobre, se deba a que las neuronas presentan distintos estados iniciales redox, factor que podría determinar el grado de modificación de los canales. Otra posibilidad de explicar las diferencias encontradas es que existan distintos grupos neuronales dentro del epitelio olfatorio, cuyas corrientes de sodio posean distintas sensibilidades a cobre.

#### VII.1.1 *Disminución de la amplitud de la corriente de sodio en NORs*

Sin duda que la disminución de la amplitud de la corriente de sodio es el fenómeno que más llama la atención al momento de ver los resultados. Debido a que el valor de la curva de inactivación en el voltaje de mantención ( $V_H$ ) define la fracción de canales que conducirá la corriente en respuesta a un pulso despolarizante (siempre que se cumpla la condición de estado estacionario; Hodgkin y Huxley, 1952), la disminución de la amplitud que se observa en este trabajo podría explicarse por el corrimiento de la curva de inactivación hacia la izquierda. No obstante, esto no ocurre puesto que la curva nunca se desplaza más a la izquierda que el potencial de mantención ( $V_H \sim -75 \text{ mV}$ ), siendo despreciable el aumento en inactivación como explicación de la caída de amplitud observada.



El problema que surge con la disminución de la amplitud es que al estar relacionada con los parámetros estudiados, dificulta la interpretación de las observaciones experimentales.

Para intentar separar el proceso de disminución de la amplitud de posibles efectos del cobre, se determinó experimentalmente que la disminución de la amplitud no modificaba la cinética de recuperación desde la inactivación de las corrientes de sodio (datos no mostrados). También se vio en la sección de resultados que la disminución de la amplitud tampoco produce modificaciones en la curva de conductancia relativa. Además, la disminución de la amplitud tampoco es producto de un aumento de la inactivación de los canales. Estas observaciones sugieren que la disminución de la amplitud se produce por una disminución del número de canales disponibles para conducir corriente, sin alterar la cinética de los canales que permanecen conduciendo iones. Una excepción ocurre con las neuronas que se muestran en la figura 9. En este caso las curvas de inactivación en condición control están corridas hacia potenciales más negativos que lo observado normalmente. Esto produce que el corrimiento hacia la izquierda de la curva aumente el número de canales inactivados desde el potencial de mantención provocando la disminución de la amplitud de la corriente.

Los canales de sodio son altamente regulados por el metabolismo celular mediante fosforilaciones en distintos residuos de la cara citoplasmática de la proteína (Yu F. y Catterall W., 2003). Es posible que la ausencia de ATP en la solución de la pipeta haya producido un continuo agotamiento de la corriente de sodio, aunque no se ha encontrado información en la literatura que avale ese tipo de fenómeno en este modelo de estudio.

La inactivación lenta de los canales de sodio sería otra posible explicación para la disminución de amplitud. Este es un proceso fisiológico que le ocurre a algunos tipos de canales de sodio y que produce una disminución de la disponibilidad de canales durante períodos prolongados de actividad (Vilin Y y Ruben P., 2001). En corrientes de sodio de neuronas olfatorias este tipo de inactivación no ha sido descrito.

## VII.2 ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RATA

En esta parte de la memoria se estudió el efecto del cobre sobre las corrientes de sodio de neuronas olfatorias de rata con el objetivo de saber si estas neuronas de mamífero comparten con las neuronas olfatorias de rana la capacidad de ser modificadas por cobre en concentración micromolar baja.

En general, estas neuronas y sus corrientes de sodio tienen características especiales que hacen muy difícil trabajar con ellas (Barry P., comunicación personal). Son neuronas muy pequeñas, con un diámetro entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  y poseen una resistencia de entrada de entre 20 y 30  $\text{G}\Omega$ . La curva de inactivación de estas corrientes presenta un voltaje de media inactivación cercano a los -110 mV (Rajendra S., Lynch J. y Barry P., 1992).

Conociendo lo ocurrido con las corrientes de sodio de rana, lo primero que se buscó fue obtener corrientes de sodio estables para estudiar el efecto del cobre. Estas corrientes presentaron un problema adicional y es que al momento de romper el sello la corriente que se registraba no presentó una amplitud máxima constante. Frente a la aplicación de un pulso cuadrado de voltaje constante la corriente evocada comenzaba con una amplitud máxima pequeña que a medida que pasaba el tiempo aumentaba hasta lograr un valor constante. Esta condición de estabilidad de la corriente duraba

muy poco, pues la amplitud de la corriente comenzaba a disminuir terminando con el estado estable. Aplicando pulsos de voltaje a distinta frecuencia (0,1; 0,2 y 2 Hz) se determinó que el aumento de la amplitud de la corriente no depende del uso de los canales de sodio (datos no mostrados).

Se encontró que la fase en que la amplitud máxima de la corriente aumentaba, coincidía con una estabilización del tiempo a la corriente pico (datos no mostrados), que comenzaba con valores cercanos a los 1,4 ms y luego se estabilizaba cerca de los 0,7 ms, medidos desde el comienzo del pulso. Estas dos variables (amplitud máxima y el tiempo a la corriente pico) alcanzaban estabilidad de manera sincronizada. Esta relación permite entender la fase de aumento de la amplitud máxima como un proceso de estabilización de la cinética de los canales de sodio. Este cambio en la cinética puede ser el resultado de la diálisis celular y la adquisición de un nuevo estado interno.

Al igual que en las neuronas de rana, se encontró que durante la fase de disminución de la amplitud se produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación, mientras la curva de conductancia relativa permanece constante para todas las mediciones realizadas. Al contrario de lo observado en las corrientes de NORs, en estas neuronas la disminución de la amplitud de la corriente se debe al desplazamiento de la curva de inactivación. Esta diferencia no se produce por un mayor desplazamiento de la curva respecto a lo que ocurre en las NORs, sino porque en las NOT la curva de inactivación en condición control está centrada en torno a los -80 mV, potencial muy cercano al voltaje de mantención de las células (-90 mV). Un desplazamiento hacia la izquierda se traduce en una disminución del número de canales disponibles para conducir corriente. Esta relación se ve claramente en el gráfico 12E donde se muestra la disminución de la amplitud de la corriente junto con la disminución de la fracción de canales disponibles desde el potencial de mantención.

Puesto que la amplitud de la corriente, el tiempo a la corriente pico y la curva de inactivación cambian durante la condición control, la curva de conductancia relativa era el único parámetro estudiado que podía indicar un efecto modulador del cobre. Sin embargo, la observación general de los resultados muestra que no hay una modificación reproducible sobre la curva de conductancia relativa con cobre  $0,1 \mu\text{M}$ . Se observan desplazamientos de la curva tanto a la izquierda como hacia la derecha luego de agregar el metal, sugiriendo efectos que potencian o disminuyen las corrientes de sodio, respectivamente. Sin embargo, estos cambios también ocurren en ausencia de cobre (luego de lavar la cámara de registro con solución control), lo cual hace más difícil la interpretación de los resultados.

Al estudiar el efecto del cobre  $10 \mu\text{M}$  no se observó cambios en la curva de conductancia relativa al momento de aplicar el metal. Debido a que esta es una concentración alta, se esperaba que modificara las corrientes en un sentido inhibitorio y de manera rápida de acuerdo a lo reportado en la literatura para otros canales iónicos (Mathie A. y col., 2006; Ma Z. y col., 2008). En dos neuronas estudiadas el primer registro en cobre  $10 \mu\text{M}$  no tuvo ninguna diferencia con la condición control. Sin embargo en una de estas células, un segundo registro en condición con cobre, produjo un desplazamiento de la curva de conductancia relativa hacia la derecha y disminuyó su pendiente, lo que constituye un claro efecto inhibitorio sobre la corriente.

Otra observación interesante fue que una célula que estuvo en cobre  $10 \mu\text{M}$  alrededor de 8 minutos, al momento de ser registrada no presentó corrientes de sodio; estas fueron reactivadas luego que la célula fuera hiperpolarizada hasta  $-120 \text{ mV}$ . Esta observación sugiere que la exposición prolongada a cobre  $10 \mu\text{M}$  produce un efecto modificador de los canales de sodio que se traduce en una inhibición completa de la corriente macroscópica. Alternativamente, la incubación con cobre pudo despolarizar la

célula, de modo que al comenzar el registro las corrientes de sodio estuvieran inactivadas.

## VIII. CONCLUSIÓN

### VIII.1 ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RANA

Estos resultados indican que el cobre (0,01-0,1  $\mu\text{M}$ ) tiene la capacidad de modificar la curva de conductancia relativa de algunas NOR. Puede desplazar estas curvas hacia la izquierda (potenciando las corrientes) o hacia la derecha (inhibiendo las corrientes).

La amplitud de la corriente, el tiempo a la corriente pico y la curva de inactivación cambian durante el transcurso del experimento independientemente de la presencia de cobre. La disminución de la corriente es independiente de la cinética de los canales y no se pudo determinar su causa.

Estos factores imposibilitaron hacer el estudio cuantitativo que se deseaba sobre el efecto modulador del cobre.

### VIII.2 ESTUDIO EN NEURONAS OLFATORIAS DE RATA

A pesar de ser una preparación de neuronas de mamíferos fácil y rápida de obtener, las neuronas olfatorias de rata presentan dificultades técnicas que las convierten en un mal modelo para este tipo de experimentos y no permitieron evaluar de buena manera si el cobre producía o no algún efecto sobre las corrientes de sodio.

Las corrientes de sodio de estas neuronas presentan variaciones en sus parámetros que son dependientes del tiempo y no del uso de los canales. Por este motivo no es posible obtener las corrientes en un estado estacionario que permita evaluar de manera precisa y reproducible un posible efecto modulador del cobre.

Los resultados del efecto de cobre  $0,1 \mu\text{M}$  presentan gran heterogeneidad. Es posible que la variabilidad de las respuestas que se observan en la presencia de cobre pueda tener relación con la existencia de distintas poblaciones de neuronas, cada una con su propia manera de responder a estímulos externos.

La variabilidad de los efectos observados con concentraciones bajas de cobre ( $0,1 \mu\text{M}$ ) no permite concluir si éste modifica o no a las corrientes de sodio. Los resultados obtenidos con concentraciones altas de cobre ( $10 \mu\text{M}$ ) permiten inferir que el cobre posee un efecto inhibitorio sobre las corrientes de sodio que se produce por un desplazamiento de la curva de inactivación hacia la izquierda, y que puede ser revertido mediante una hiperpolarización a  $-120 \text{ mV}$  durante 8 segundos.

Finalmente, la variabilidad del modelo experimental no permitió determinar de manera confiable si el cobre tiene la capacidad de modular las corrientes de sodio de las neuronas olfatorias de rata.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aedo F., Delgado R., Wolff D. y Vergara C. (2007) Copper and zinc as modulators of neuronal excitability in a physiologically significant concentration range. *Neurochem. Int.* **50**: 591-600.
- Baccari G., Minucci S. y Chieffi G. (1994) Regional and seasonal variations of RNA synthesis in the brain of the green frog, *Rana esculenta*. *Eur. J. Histochem.* **38**:193-202.
- Barry P. y Lynch J. (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Membr.* **121**:101-17.
- Bezanilla F. y Armstrong C. (1977) Inactivation of the sodium channel. Sodium currents experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**: 567-590
- Delgado R. y Labarca P. (1993) Properties of whole cell currents in isolated olfactory neurons from chilean toad *Caudiverbera caudiverbera*. *Am. J. Physiol.* **264**: C1418-C1427.
- Delgado R., Vergara C. y Wolf D. (2006) Divalent cations as modulators of neuronal excitability: emphasis on copper and zinc. *Biol. Res.* **39**:173-182.
- Hodkin L. y Huxley F. (1952) A quantitative description of membrane current and its applications of conductions and excitations in nerve. *J. Physiol.* **117**: 500-544.
- Hopt A., Korte S., Fink H., Panne U., Niesser R., Jahn R., Kretzschmar H. y Hemrs H. (2003) Methods for studying synaptosomal copper release. *J. Neurosc. Methods* **128**:159-172.
- Kardos J., Kovacs I., Hajos F., Kalman M. y Simonyi M. (1989). Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci. Lett.* **103**:139-144.
- Ma Z., Wong K. y Horrigan F. (2008) An extracellular Cu<sup>+2</sup> binding site in the voltage sensor of BK and Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **131**: 483-502.
- Mathie A., Sutton G., Clarke C. y Veale E. (2006) Zinc and copper: Pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol. Ther.* **111**: 567-583.
- Morera F., Wolff D. y Vergara C. (2003) External copper inhibits the activity of the large-conductance calcium- and voltage-sensitive potassium channel from skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* **192**: 5-72.
- Ono S. y Cherian M. (1999) Regional distribution of metallothionein, zinc and copper in the brain of different strains of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **69**:151-159.
- Qu W., Moorhouse J., Rajendra S. y Barry P. (2000) Very negative potential for half-inactivation of, and effects of anions on, voltage-dependent sodium currents in acutely isolated rat olfactory receptor neurons. *J. Membrane Biol.* **175**: 123-138.
- Rajendra S., Lynch J. y Barry P. (1992) An analysis of Na<sup>+</sup> currents in rat olfactory receptor neurons. *Pflügers Arch.* **420**: 342-346.



Vilin Y. y Ruben P. (2001) Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem. Biophys.* **35**:171-90

Yu F. y Catterall W. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* **4**: 207.1-207.2

