



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014

TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

SIMULADOR DE CORRIENTES DE CALCIO PQ EN NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS DE NEOESTRIADO DE RATA

Reyes Lazalde Arturo¹, Marleni Reyes Monreal², Pérez Bonilla María Eugenia¹
y Beatriz Sarahí Méndez Rodríguez¹

¹Escuela de Biología, BUAP, Puebla, Pue., bonillaeugenia@gmail.com,
arturoreyeslazalde@yahoo.com.mx, betty_0236@hotmail.com

²Dirección General de Innovación Educativa, BUAP, Puebla, Pue.,
marleni.reyes@yahoo.com.mx


RESUMEN

Introducción: El ión calcio es muy importante en el funcionamiento celular; participa en la liberación del neurotransmisor en las sinapsis químicas. Existen varios tipos de corrientes iónicas de calcio, por ejemplo: las corrientes de tipo T, L, N, P y PQ, que están involucradas en esta actividad y en otras más. **Objetivo:** desarrollar un simulador computacional para la enseñanza aprendizaje de las corrientes de calcio en cursos de biofísica, fisiología y materias afines. **Metodología:** El simulador fue desarrollado con el lenguaje Visual Basic® versión 5.0 para ambiente Windows®, desde XP hasta Windows 8, con una resolución de 1366 x 768. La corriente de calcio simulada corresponde a corrientes tipo PQ, registradas en neuronas espinosas medianas del neocórtex de rata. Los coeficientes y las funciones de activación e inactivación fueron obtenidos por medio de ajustes matemáticos a los datos experimentales. El simulador está basado en un modelo matemático que considera los cambios en la concentración del calcio intracelular. **Resultados:** El simulador se ejecuta directamente del archivo "CalcioPq.exe". La pantalla de interfaz muestra del lado izquierdo dos recuadros, en el superior se representa una pantalla de osciloscopio, donde se registra la corriente de calcio, que corresponde a la corriente $-vs-$ tiempo; el inferior se visualiza un osciloscopio que muestra el estímulo de voltaje, que corresponde al voltaje clamp $-vs-$ tiempo. Del lado derecho de la interfaz, se muestra un recuadro donde se ingresan los datos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentración de calcio externo, concentración de calcio interno (mM) y la amplitud del estímulo (mV). **Conclusión:** El simulador es de fácil manejo, muestra la influencia de las concentraciones de calcio internas y externas, se puede observar la activación y la inactivación de la corriente. Los trazos de la corriente reproducen los registros obtenidos en las neuronas de proyección del neocórtex.

1. INTRODUCCIÓN

El calcio (Ca^{2+}) es uno de los iones más importantes en los procesos celulares, se sabe que su liberación desde depósitos intracelulares hacia el citoplasma es utilizada por distintos tipos de células para regular diversas funciones. Está involucrado como segundo mensajero, en la liberación de neurotransmisores, estrés mecánico y proteínas musculares, así como en la comunicación célula-célula; también ayuda a mantener el balance osmótico dentro de la célula por la modulación de aniones, cationes y la permeabilidad al agua (Wiercinski, 1989).

El influjo de calcio al citoplasma intracelular es regulado principalmente por canales para calcio voltaje-dependientes y por el complejo receptor sináptico N-metil-D-aspartato (NMDA) de



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

membrana; así como por la liberación desde sitios de almacenaje intracelulares del retículo endoplásmico (Koch y cols., 1999).

Los canales para calcio voltaje-dependientes pertenecen a una superfamilia de canales iónicos voltaje-dependientes, dentro de la que se encuentran los canales para sodio y potasio. Son como máquinas macromoleculares que controlan la entrada de calcio a la célula, en respuesta a cambios en el potencial de membrana y juegan un rol importante en la interacción entre la señal eléctrica y la señal química en los sistemas biológicos (Koch y cols., 1999). Su arquitectura molecular consiste de cuatro componentes básicos, denominados subunidad $CaV\alpha1$, $CaV\beta$, CaM (calmodulina) y $CaV\alpha2\delta$. $CaV\alpha1$ está codificada por diez genes distintos en mamíferos (Catterall y Few, 2008), es la subunidad de transmembrana que constituye el sensor de voltaje y el poro selectivo para calcio, la subunidad está formada por seis dominios o segmentos protéicos (S1-S6), los primeros cuatro (segmentos S1-S4) forman el dominio que sensa el voltaje; mientras que los dos segmentos restantes (S5 y S6) forman el poro selectivo para calcio. Aproximadamente la mitad del polipéptido $CaV\alpha1$ forma la masa intracelular del canal, comprendiendo la terminación carboxilo (C) y amino (N) de los dominios intracelulares y las tres regiones de interdominio (conocidas como lazos I-II, II-III y III-IV). Estos dominios son los sitios de acción para la gama de factores de regulación y señalización intracelular (Van Petegem y Minor, 2006). Las subunidades $CaV\beta$ y CaM son intracelulares y se unen al complejo por medio del lazo I-II y del extremo C-terminal respectivamente, y tienen un papel importante en la inactivación voltaje-dependiente, la inactivación dependiente de calcio y la facilitación dependiente de calcio, siendo las dos últimas las que colaboran en la terminación del influjo de calcio a la célula. La subunidad protéica $CaV\alpha2\delta$ es producto de un solo gen que es proteolíticamente procesado dentro de los componentes extracelular ($\alpha2$) y transmembranal (δ) que permanecen covalentemente asociados por un enlace disulfuro, se sabe que este es el blanco a gaba-pertina, analgésicos y antiepilépticos que actúan por vías aún desconocidas. Una subunidad final que está asociada a los canales para calcio del músculo esquelético es la $CaV\gamma$, cuya función se desconoce (Van Petegem y Minor, 2006).

Las corrientes de calcio tienen algunas similitudes y diferencias con las corrientes de sodio. Son similares en que ambas son activadas por despolarización, son corrientes entrantes en potenciales de membrana normales y ambas tienen algún grado de inactivación, dependiendo del tipo de corrientes de calcio o sodio que se esté midiendo. Difieren básicamente porque los canales son selectivos para calcio. Además, el modelo del circuito para corrientes iónicas usado para describir las corrientes de sodio y potasio no es adecuado para representar a las corrientes de calcio (Johnston y Miao-Sin Wu, 1995).

Se han observado varias clases de corrientes de calcio funcional y farmacológicamente distintas denominadas N, T, L, P, R y PQ (Van Petegem y Minor., 2006; Johnston y Miao-Sin Wu, 1995). El calcio entra a las neuronas a través de los canales de tipo P/Q y N, que son los responsables primarios de iniciar la transmisión sináptica (Catterall y Few, 2008; Dunlap y cols., 1995). Las corrientes de calcio a través de canales tipo N son más importantes en la formación de sinapsis entre neuronas del sistema nervioso periférico y son predominantes en la liberación del neurotransmisor. En contraste, las corrientes de tipo P/Q que juegan un rol importante en muchas sinapsis formadas entre las neuronas del sistema nervioso central de mamíferos (Poncer y cols., 1997) y en el sistema nervioso periférico, además su contribución en la liberación del neurotransmisor incrementa en la etapa posnatal del desarrollo (Tsujiyama y cols., 2002).



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 5, 6 y 7 de junio de 2014 TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

Los ganglios basales conforman un núcleo cerebral localizado en el cerebro medio y posterior de mamíferos, aves y reptiles. La visión más ampliamente aceptada de la función de los ganglios basales está fundamentada en observaciones de aflicciones humanas con enfermedades degenerativas que atacan estas estructuras. En todos los casos, estas enfermedades producen déficit severo en el movimiento. Los ganglios basales tienen un papel importante en la selección de movimientos entre los candidatos, los objetivos, estrategias y en la interpretación de la información sensorial. En muchos casos, los ganglios basales hacen esta selección basados en el pasado histórico de sucesos bajo circunstancias similares (Shepherd, 2004). El neoestriado es la estructura más grande que forma parte de los ganglios basales y la que recibe un gran número de conexiones aferentes (Shepherd, 2004).

En humanos y algunos otros primates, el neoestriado está formado por neuronas conjuntas dentro de grupos de alta densidad, separados por áreas de baja densidad celular. La organización del neoestriado está constituido por islas celulares llamadas estriosomas o solo parches, y el área entre ellos llamada matriz (Shepherd, 2004). Además de sus diferentes entradas sinápticas, los estriosomas y la matriz tienen diferentes blancos de salida, al menos por sus proyecciones a la sustancia nigra. Los estriosomas proyectan preferentemente a la sustancia nigra compacta, donde se localizan las neuronas nigroestriatales dopaminérgicas, mientras que la matriz proyecta a la sustancia nigra reticulata, donde las neuronas no dopaminérgicas proyectan al tálamo y se encuentran los colículos superiores. Las neuronas principales del neoestriado son denominadas espinosas porque tienen un gran número de espinas dendríticas que cubren sus dendritas. Las neuronas de proyección del neoestriado expresan canales para calcio tipo PQ, los cuales contribuyen a la activación de las corrientes de potasio dependientes de calcio (Shepherd, 2004).

En este proyecto se desarrolló un simulador computacional interactivo para la enseñanza aprendizaje del comportamiento de las corrientes de calcio de neuronas espinosas medianas del neoestriado de rata.

2. METODOLOGÍA

Se diseñó y desarrolló un simulador de las corrientes iónicas de calcio tipo PQ, registradas en neuronas espinosas medianas del neoestriado de la rata (Bargas, 2004; Salgado, 2004; Vilchis y cols., 2000). Para este propósito se usó el programa Visual Basic®, versión 5.0, para ambiente Windows®, con resolución de 1366 x 768.

El modelo matemático usado corresponde a las corrientes iónicas de calcio que no sigue una relación lineal de la curva corriente contra voltaje y por lo que no presenta un punto de inversión (Gabbiani y Cox, 2010; Balderas, 2004). Las expresiones matemáticas son las siguientes:

V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

$$I_{PQ} = mh\phi$$

$$\cos \phi = P_{max} \frac{z^2 F^2 V}{RT} \left[\frac{Ca_{in} - Ca_{ex} e^{-\frac{VzF}{RT}}}{1 - e^{-\frac{VzF}{RT}}} \right]$$

$$\tau_m \frac{dm}{dt} = m_{\infty} - m$$

$$\tau_h \frac{dh}{dt} = h_{\infty} - h$$

$$\frac{dCa_{in}}{dt} = -\alpha I_{PQ}$$

$$\tau_m(V) = 0,2 + \frac{1}{1,0631e^{0,041V} + 0,0015e^{-0,1638V}}$$

$$\tau_h(V) = 25 + \frac{1}{0,0031e^{0,0372V} + 0,0005e^{-0,028V}}$$

$$m_{\infty}(V) = 0,42 + \frac{0,16}{1 + e^{(0,0967V + 6,8665)}} + \frac{0,4}{1 + e^{(0,1428V + 2,5714)}}$$

$$h_{\infty}(V) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{(V+14)}{6,3}}}$$

El valor de los coeficientes fue reportado por Balderas (2004), después de realizar ajustes matemáticos a las corrientes experimentales con el método de mínimos cuadrados. La solución de estas ecuaciones ha sido realizada con MatLab 7.0 (Balderas, 2004). En este trabajo las ecuaciones diferenciales fueron resueltas de manera simultánea por el método numérico de Euler.

3. RESULTADOS

El simulador se ejecuta directamente del archivo "Calciopq.exe". La pantalla de interfaz muestra del lado izquierdo dos recuadros, en el superior se representa una pantalla de osciloscopio, donde se registra la corriente de calcio, que corresponde a la corriente $-vs-$ tiempo; el inferior se visualiza una pantalla de osciloscopio que muestra el estímulo de voltaje, que corresponde al voltaje clamp $-vs-$ tiempo. Del lado derecho de la interfaz, se muestra un recuadro donde se ingresan los datos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentración de calcio externo, concentración de calcio interno (mM) y la amplitud del estímulo (mV) (figura 1).

La concentración externa de calcio con la que se realizaron los experimentos fue de 13 mM, a una temperatura de 20°C y una concentración interna del ion de 0.001 mM; teniendo dicha concentración externa y dando un estímulo de -50 mV se obtiene una amplitud de la corriente más cercana a -1000 nA y una inactivación lenta del canal (figura 1).

En las figuras 2, 3 y 4 se representan los trazos que corresponden a la corriente de calcio cuando la concentración externa del ion cambia progresivamente, se observa que la amplitud de la corriente y el tiempo de inactivación del canal es diferente respecto a la concentración externa, es decir la amplitud disminuye.

V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

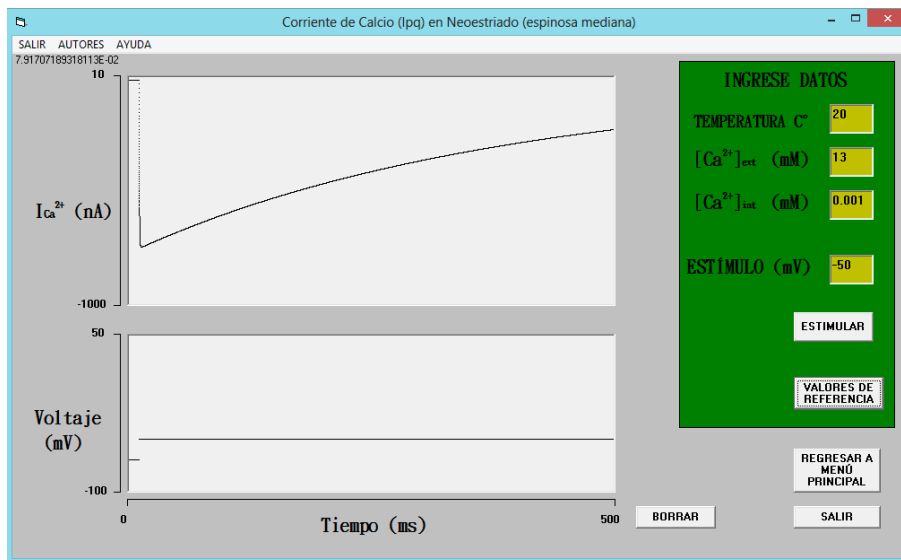


Figura 1. Registro de la corriente de calcio cuando la concentración externa es de 13 mM y el estímulo que se da es de -50 mV.

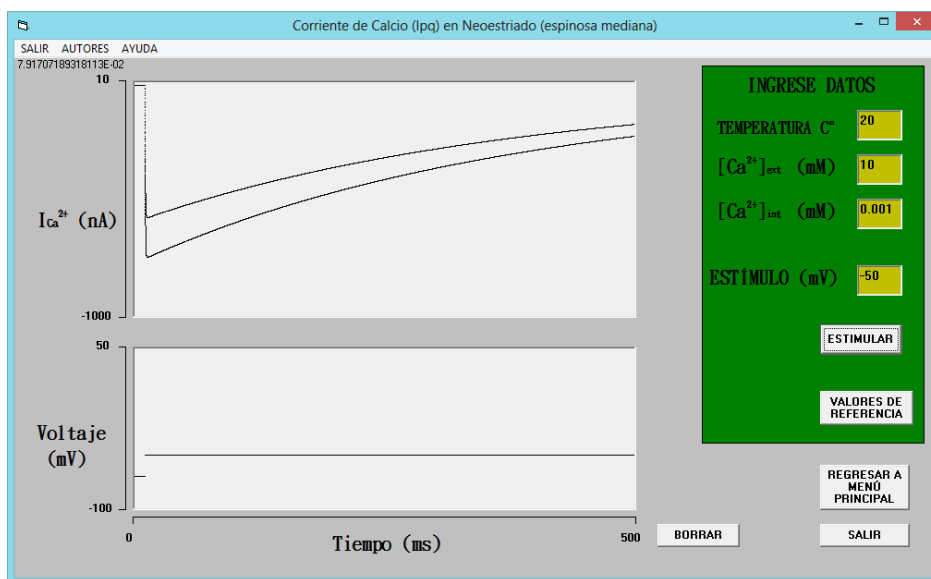


Figura 2. Registro de la corriente de calcio cuando la concentración externa es de 13 mM (trazo inferior) y 10 mM (trazo superior) y el estímulo que se da es de -50 mV.

V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

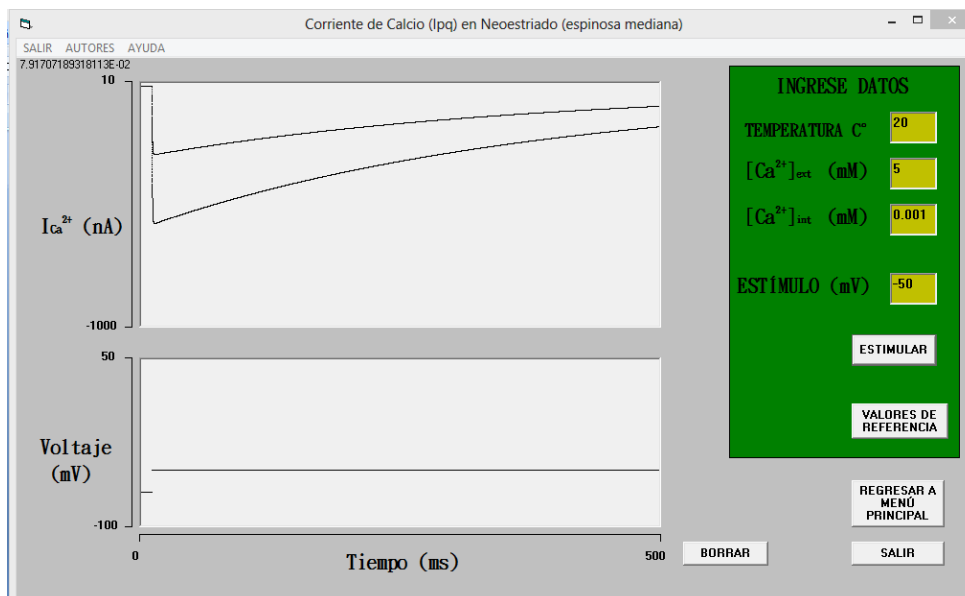


Figura 3. Registro de la corriente de calcio cuando la concentración externa es de 10 mM (trazo inferior) y 5 mM (trazo superior) y el estímulo que se da es de -50 mV.

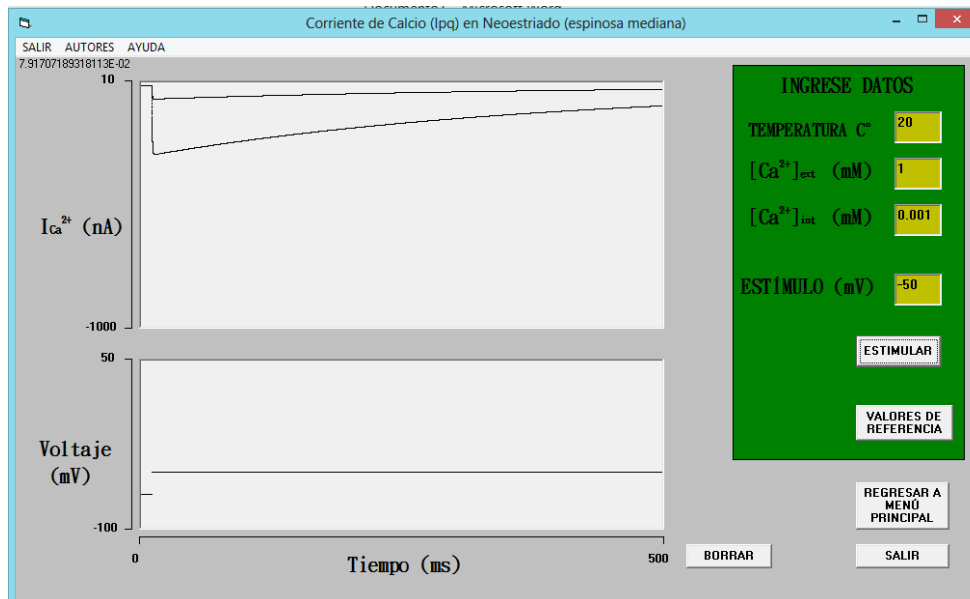


Figura 4. Registro de la corriente de calcio cuando la concentración externa es de 5 mM (trazo inferior) y 1 mM (trazo superior) y el estímulo que se da es de -50 mV.

V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

Cuando se mantiene constante la concentración externa de calcio y se cambia progresivamente el voltaje del estímulo, en los trazos resultantes se observa que la amplitud de la corriente y el tiempo de activación e inactivación del ion. La amplitud incrementa y el tiempo de inactivación disminuye a medida que el estímulo aumenta.

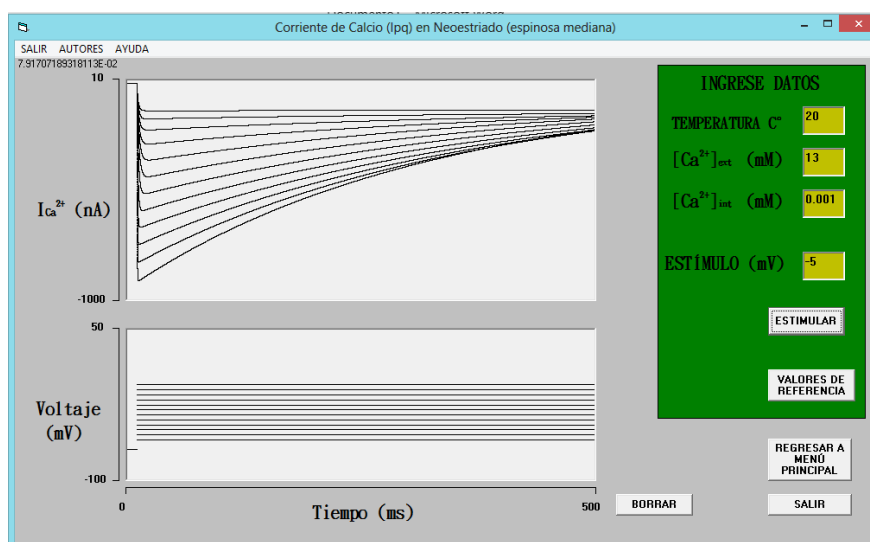


Figura 5. Registro de la corriente de calcio cuando la concentración externa es de 13 mM y los estímulos que se dieron van de -60 mV a -5 mV (en los trazos de inferior a superior).

4. CONCLUSIONES

El simulador está basado en registros obtenidos en las neuronas de proyección del neostriado de rata y a partir de modelos matemáticos que describen las corrientes de calcio de tipo PQ. El programa es de fácil manejo mediante una interfaz amigable, donde se muestra la influencia de las concentraciones interna y externa del ion calcio, así como la activación e inactivación del canal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bargas, J., Cervantes, L., E., Galarraga E., Fraguera A. "Ion Channels: Keys to neuronal specialization". En: The Handbook of Brain Theory and Neuronal Networks. M.A. Arbib. BradfordBooks. The MIT Press. Massachusetts, 2002.
2. Balderas, S. "Modelo Matemático para la corriente de Calcio tipo PQ para la neurona espinosa mediana". Tesis (Licenciatura en Matemáticas Aplicadas). Puebla, Pue. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Septiembre 2004.
3. Catterall W. A. and Few A. P. "Calcium channel regulation and presynaptic plasticity", Neuron. Vol. 59,1, 2008, pp. 882-901.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

4. Dunlap K. et al. "Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons". Trends. Neurosci. Vol.18,1, 1995, pp. 89–98.
5. Gabbiani, F., Cox, J.E. "Mathematics for neuroscientists", Academic Press, New York, 2010.
6. Johnston D. and Miao-Sin Wu S., 1995, "Foundations of cellular neurophysiology", (1ra edición), The MIT Press, United States of America. pp. 192-209.
7. Koch C., 1999, "Biophysics of Computation: information processing in single neuron", (1ra edición), Oxford University Press, United States of America. pp. 212-224.
8. Poncer, J.C., McKinney R. A., Gahwiler B. H. and Thompson S. M. "Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses". Neuron. Vol. 18,1, 1997, pp. 463–472.
9. Salgado, H. "Caracterización Biofísica y Farmacológica de los Canales de Calcio en Neuronas Disociadas del Estriado de la Rata". Tesis (Biólogo). México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
10. Shepherd G. M. "The Synaptic Organization of the Brain" (5ta edición, 2004), Oxford University Press, United States of America. Cap. 9. pp. 361-413.
11. Tsujimoto T. et al. "Neuronal Calcium Sensor 1 and Activity-Dependent Facilitation of P/Q-Type Calcium Currents at Presynaptic Nerve Terminals". Science. Vol. 295,5563, 2002, pp. 2276-2279
12. Van Petegem F. and Minor D. L., Jr. "The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation", Biochem. Soc. Transact. Vol. 34,5, 2006, pp. 887-893.
13. Vilchis, C., Bargas J., Ayala G. X., Galván E. and Galarraga E. "Ca²⁺ Channels that Activated Ca²⁺-Dependent K⁺ Currents in Neostriatal Neurons". Neuroscience, 95,3, 2000, pp. 745-752.
14. Wiercinski F. J. "Calcium, an overview", Biol. Bull. Vol.176,1, 1989, pp. 195-217.