

La trifluoperazina aumenta la concentración intracelular de calcio en neuronas de *Helix aspersa*

Humberto Cruzblanca,* Sergio Márquez Gamiño,* Francisco Javier Alvarez-Leefmans*

Summary

The effect of trifluoperazine (TFP) on barium current carried through L-type Ca^{2+} channels and intracellular free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were investigated. Barium currents were recorded using a two microelectrode voltage clamp technique. Intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was estimated using the fluorescent Ca^{2+} indicator Fura-2. We found that TFP increases the relaxation time constant of the barium current in agreement with previous observations from our laboratory where Ca^{2+} -dependent inactivation of calcium currents was enhanced by TFP. Fura-2 experiments revealed that TFP produces an oscillatory increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These results suggest that TFP produces increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which may induce Ca^{2+} -dependent inactivation of calcium channels.

Resumen

Previamente reportamos que en las neuronas de *Helix aspersa*, la trifluoperazina (TFP) incrementa la inactivación de la corriente de calcio disparada por el Ca^{2+} . En el presente trabajo se evaluó su efecto sobre la concentración intracelular de calcio iónico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y sobre la velocidad de relajación de las corrientes de bario. Las corrientes de bario se registraron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se estimó por microscopia de fluorescencia, utilizando como indicador intracelular a la molécula fluorescente Fura-2.

La TFP incrementó la velocidad de relajación de la corriente de bario confirmando que incrementa la inactivación de los canales de calcio aun cuando estos sean permeados por Ba^{2+} . La TFP provocó un incremento oscilatorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, probablemente debido a la inhibición de la bomba de Ca^{2+} , que lo acumula activamente en el interior del retículo endoplásmico. Los resultados muestran que además de su acción antidopaminérgica, la TFP incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dicho incremento puede contribuir a la inactivación de los canales de calcio.

Introducción

Generalmente se acepta que las propiedades antipsicóticas de los neurolépticos llamados típicos, como el haloperidol y la trifluoperazina, se deben a su capacidad bloqueante de los receptores a la dopamina del tipo D_2 .¹¹ Estudios más recientes muestran que los neurolépticos también bloquean a otros tipos de receptores como los adrenérgicos tipo α^1 , los colinérgicos muscarínicos y los serotoninérgicos del tipo 5-HT₂.⁹ Por otro lado, se ha

demostrado que un gran número de neurolépticos inhiben a la Calmodulina¹⁰ (CAM) y algunos como la trifluoperazina también inhiben a la proteína cinasa C.⁶ Ambas proteínas forman parte de dos sistemas de segundos mensajeros, mediante los cuales, el calcio iónico (Ca^{2+}) regula una gran variedad de procesos fisiológicos celulares. Entre estos procesos se cuentan aquellos mediante los cuales el Ca^{2+} intracelular regula, por mecanismos de retroacción, su propia entrada a la célula vía canales iónicos, su expulsión hacia el exterior celular o

* División de Investigaciones en Neurociencias. Calz. México-Xochimilco 101. Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México, D.F.

su recaptura hacia depósitos internos tales como el retículo endoplásmico. Estos últimos procesos contribuyen a mantener su concentración libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) dentro de niveles fisiológicos.

La amplia variedad de efectos farmacológicos de los neurolépticos sugiere que la acción antidopaminérgica no es el único mecanismo mediante el cual ejercen estos fármacos sus efectos terapéuticos. La acción de los neurolépticos sobre la CAM y la proteína cinasa C sugieren que estos fármacos pueden alterar los mecanismos de transporte de Ca^{2+} encargados de mantener y regular la $[Ca^{2+}]_i$.

Estudios realizados en nuestro laboratorio en las neuronas de *Helix aspersa* han demostrado que la trifluopirazina (TFP) reduce la entrada de Ca^{2+} que ocurre a través de canales de calcio de alto umbral de activación, también conocidos como canales L^3 . Además, la TFP incrementa la inactivación de estos canales disparada por el propio Ca^{2+} .¹ En este presente trabajo demostramos, con técnicas de fluorescencia, que la TFP produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Se sugiere que este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ contribuye a la inactivación de la corriente de Ca^{2+} descrita previamente.

Métodos

Procedimientos generales

Los experimentos se llevaron a cabo en las neuronas identificadas de los ganglios subesofágicos D y F, del caracol terrestre *Helix aspersa*. Se utilizaron las células 1F, 76F, 78F y 1D. Las preparaciones se obtuvieron de acuerdo con los métodos previamente descritos.²

Registro de las corrientes de Ca^{2+}

Las corrientes de calcio ($I_{Ca^{2+}}$) se registraron en cada célula con un sistema comercial de fijación de voltaje con dos microelectrodos (DAGAN 8500). Los detalles de la técnica y el método empleado para separar farmacológicamente la $I_{Ca^{2+}}$ del resto de las corrientes iónicas transmembranales fueron descritos en un trabajo anterior.⁵

Registro de los cambios en la concentración de calcio libre intracelular por microscopia de fluorescencia

Para estudiar el efecto de la TFP sobre la $[Ca^{2+}]_i$, se utilizó el indicador fluorescente Fura-2.⁸ Cada neurona se microinyectó con la sal pentapotásica de Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR). Para la microinyección, se disolvió el Fura-2 a una concentración final de 2.5 mM, en una solución acuosa de 100 mM de cloruro

de potasio. Simultáneamente a la inyección se registró el potencial de la membrana. La inyección se realizó aplicando 1 ó 2 pulsos de aire a presión (40 psi) con duraciones de 20 a 50 milisegundos, a través de microelectrodos con resistencias de entre 40 y 60 M Ω , para lo cual se utilizó un Picospritzer II (General Valve Corp.). Una vez inyectadas las células, la preparación se transfirió a una cámara de Leiden (Medical Systems Greenvale, NY), donde se fijó entre dos cubreobjetos separados por tiras de Sylgard. Posteriormente la cámara se colocó sobre la platina de un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot, Nikon, Tokyo). El volumen de la cámara fue de 200 μ l. La preparación se perfundió a una tasa de 5 μ l/min.

La $[Ca^{2+}]_i$ se estimó usando la técnica del cociente de fluorescencia, excitando a cada célula cargada con el indicador Fura-2, con dos longitudes de onda, 340 y 380 nm, y registrando la emisión a 510 nm. La luz emitida por cada célula se colectó y se amplificó mediante un fotomultiplicador. Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando un sistema óptico PTI (Photon Technology International, Brunswick, NJ).

Se corrigieron los registros para la fluorescencia de fondo, medida en la misma célula al final del experimento después de apagar completamente la fluorescencia del fluoróforo mediante el uso de una solución de Ringer que contenía Mn^{2+} y el ionóforo ionomicina. Se estimó la $[Ca^{2+}]_i$ utilizando la siguiente fórmula:⁸

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \cdot \frac{(R - R_{min})}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

donde Kd es la constante de disociación del Fura-2 para el Ca^{2+} medida en soluciones de calibración *in vitro* (146 nM); R es el cociente de la fluorescencia medido a 340 nm y 380 nm en cada instante; R_{max} es el cociente de la fluorescencia (340/380) medido cuando el fluoróforo se satura con Ca^{2+} en el interior celular (para ello se permeabilizaron las células con 20 μ M del ionóforo ionomicina, disuelto en Ringer); R_{min} es el cociente de fluorescencia (340/380) en condiciones en que el Ca^{2+} extracelular se elimina con EGTA y las células se equilibran en presencia de la ionomicina, de tal manera que la $[Ca^{2+}]_i$ es nominalmente cero. No en todos los experimentos fue posible hacer esta última medición, por lo que R_{min} se estimó como el 4% de la R_{max} , con base en las mediciones hechas en algunas células. El factor (S_{f2}/S_{b2}) es el cociente de la fluorescencia medido al excitar al Fura-2 con una longitud de onda de 380 nm cuando este fluoróforo se encuentra libre de Ca^{2+} (S_{f2}), sobre la fluorescencia medida cuando dicho fluoróforo está saturado con Ca^{2+} (S_{b2}). Dicho factor se midió en soluciones de calibración y se encontró que la medida fue de 6.73.

Soluciones

La composición de las soluciones fue (en mM/l):

Estándar Ringer (SR): NaCl 82.5; KCl 4; MgCl₂ 5; CaCl₂ 7; HEPES 5; glucosa 5. El pH se ajustó a un valor de 7.5 con NaOH, por lo que la concentración final de Na⁺ en la solución fue de 85 mM.

Trifluoperazina: Para los experimentos de fluorescencia se preparó una solución madre 0.5 M de TFP en dimetilsulfóxido, de la cual se tomaron alícuotas para preparar las soluciones experimentales.

Resultados

Efecto de la TFP sobre la velocidad de relajación de las corrientes entrantes de Ba²⁺

La velocidad de relajación de la I_{Ca²⁺}, producida durante un pulso despolarizante, refleja la cinética de inactivación de los canales de calcio.⁷ En un trabajo anterior en el que se utilizó un protocolo experimental de dos pulsos comando, se demostró que la TFP incrementa la inactivación de la I_{Ca²⁺} producida por el Ca²⁺.^{1,5} En este trabajo se analizó el curso temporal con que se inactivan los canales de calcio permeados por Ba²⁺. Se utilizó Ba²⁺ en lugar de Ca²⁺ porque el primero no dispara *per se* el mecanismo de inactivación de los canales de calcio, además de ser un bloqueador de la conductancia al K⁺. En estas condiciones es posible medir una corriente de Ba²⁺ (I_{Ba²⁺}) a través de los canales de calcio. En la figura 1 se ilustra el efecto de la TFP (50 μM) sobre el curso temporal de la relajación de la I_{Ba²⁺}. Se encontró que la relajación de la I_{Ba²⁺} se acelera en presencia de la TFP. En este experimento, la constante de tiempo de relajación fue de 112.6 ms para la I_{Ba²⁺} control, y se redujó a 66.6 ms a los 25 min de exposición con 50 μM de TFP, lo que sugiere que la TFP aumenta la inactivación aun cuando es el Ba²⁺ el ión que lleva la corriente entrante a través de los canales de calcio. En todos los valores de potencial de membrana que se exploraron ocurrió el

En la figura 1 se ilustra el efecto de la TFP (50 μM) sobre el curso temporal de la relajación de la I_{Ba²⁺}. Se encontró que la relajación de la I_{Ba²⁺} se acelera en presencia de la TFP. En este experimento, la constante de tiempo de relajación fue de 112.6 ms para la I_{Ba²⁺} control, y se redujó a 66.6 ms a los 25 min de exposición con 50 μM de TFP, lo que sugiere que la TFP aumenta la inactivación aun cuando es el Ba²⁺ el ión que lleva la corriente entrante a través de los canales de calcio. En todos los valores de potencial de membrana que se exploraron ocurrió el

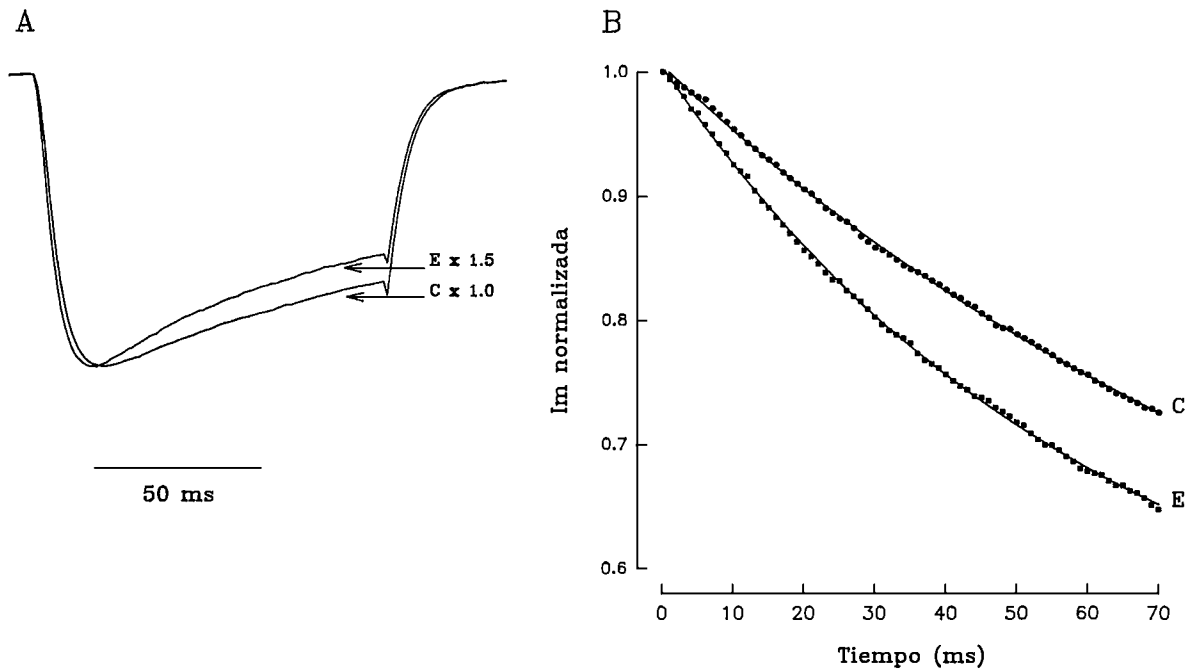


Figura 1. Efecto de la TFP sobre la relajación de la I_{Ba²⁺}. En la parte A se muestra la superposición de 2 registros individuales de la I_{Ba²⁺} obtenidos en respuesta a un pulso despolarizante de -10 mV, antes (C) y 25 min después de la perfusión continua de 50 μM de TFP (E). El registro E se escaló con el objeto de que tuviese la misma amplitud al pico que el registro control (C). En la parte B se muestra el ajuste de la relajación de la I_{Ba²⁺} con una función exponencial simple, decreciente, del tipo: $I_{Ca(t)} = A * \exp(-kt) + B$

donde:

A = la amplitud de I_{Ba²⁺} a t = 0.

k = es la constante de rapidez del proceso. Su inverso es igual a la constante de tiempo de inactivación.

B = la amplitud de I_{Ba²⁺} al final del pulso comando.

t = tiempo (en ms).

Célula 78F.

incremento en la velocidad de relajación. El efecto de la TFP sobre la relajación de la $I_{Ba^{2+}}$ es compatible con el aumento que provoca dicho fármaco sobre la inactivación de la $I_{Ca^{2+}}$.^{1,5}

Efecto de la TFP sobre la $[Ca^{2+}]_i$

Es posible que el aumento de la inactivación de los canales de calcio observado en presencia de TFP, se deba a un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Como la TFP bloquea la bomba de calcio, que es una ATP-asa activada por CAM,⁴ es factible que la TFP bloquee el bombeo de Ca^{2+} produciendo su acumulación intracelular. La figura 2 muestra que la TFP produce un incremento sostenido en la $[Ca^{2+}]_i$. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se acompaña a menudo de oscilaciones. Este Ca^{2+} puede provenir de depósitos internos mobilizables por cafeína o por inositol trifosfato (IP_3) o del exterior celular a consecuencia de la inhibición de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plásmatica. La subsecuente aplicación de cafeína (5 mM), en presencia de TFP, produjo una espiga de Ca^{2+} que se relajó hasta que la $[Ca^{2+}]_i$ regresó a su valor control, sugiriendo la depleción del depósito sensible a esta droga.

Discusión

En este trabajo se demostró que la TFP incrementa la velocidad de relajación de la $I_{Ba^{2+}}$ (fig.1). Como la inactivación de los canales de calcio es el mecanismo que provoca dicha relajación,⁷ los resultados confirman que la TFP incrementa la inactivación de los canales de Ca^{2+} .^{1,5} En este tipo de inactivación, el grado de inhibi-

ción que produce el Ca^{2+} sobre la $I_{Ca^{2+}}$ depende directamente de la cantidad de Ca^{2+} libre que hay dentro de la célula. Ahora bien: ¿sí la TFP también reduce la entrada de Ca^{2+} ,³ cómo es que la inactivación disparada por el Ca^{2+} se incrementa en presencia de TFP?. Los experimentos en los que se midió la $[Ca^{2+}]_i$ muestran que la TFP provoca un incremento oscilatorio del Ca^{2+} intracelular. Lo anterior sugiere que dicho aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ contribuye al incremento en la inactivación de los canales de Ca^{2+} .

Se ha reportado que la TFP y otras fenotiazinas inhiben la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y, por ende, la acumulación activa de Ca^{2+} .¹² La inhibición de la bomba de Ca^{2+} provocaría entonces la acumulación de Ca^{2+} en el citosol. Es probable que, por analogía, la TFP inhiba la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, que es la contraparte del retículo sarcoplásmico en las células no musculares. Se sugiere que éste es el mecanismo mediante el cual la TFP incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ en nuestras condiciones experimentales.

La inhibición de la bomba de Ca^{2+} no parece ser el único mecanismo implicado en el aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Se ha reportado que la TFP y otros antagonistas de la calmodulina provocan la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, a través del canal de calcio reticular estimulado por la cafeína.³ En nuestros experimentos no podemos eliminar esta posibilidad, sin embargo, dado que el curso temporal de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ provocados por la TFP y la cafeína, son diferentes, se sugiere que la TFP inhibe un proceso de recaptura más que promover un proceso de liberación.

Los resultados aquí reportados muestran que la TFP, además de su acción conocida como antagonista de los

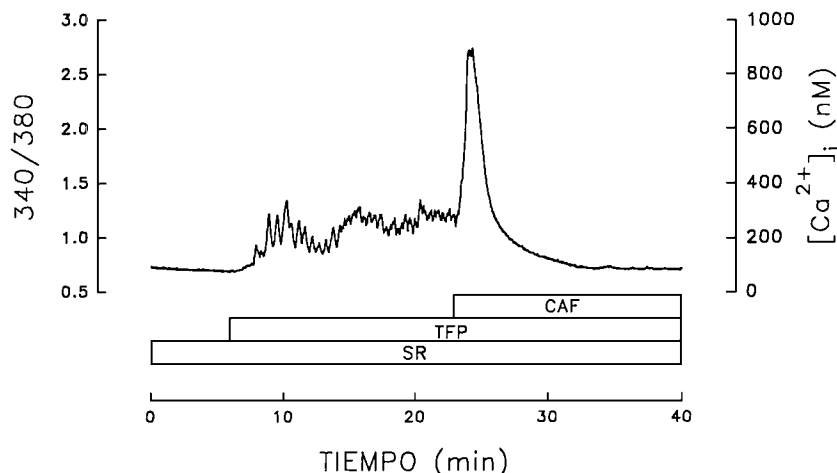


Figura 2. Efecto de la TFP y de la cafeína sobre la $[Ca^{2+}]_i$. El eje de la izquierda indica el coeficiente de fluorescencia del Fura-2 de donde se estimó la $[Ca^{2+}]_i$ (eje derecho). Las barras indican el tiempo en que fueron expuestas las neuronas a 100 μ M de TFP y a 5 mM de cafeína (CAF), durante el experimento. Las neuronas se perfundieron con la solución estándar de Ringer (SR) durante todo el registro. Célula 77F.

receptores dopaminérgicos, produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$; con las profundas implicaciones fisiológicas que esto tiene debido al papel central del Ca^{2+} como segundo mensajero de múltiples procesos celulares.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias al donativo otorgado a FJAL por el National Institute of Neurological Disorders and Stroke, de los Estados Unidos (Grant NS29227). Los autores agradecen el magnífico apoyo técnico del Ing. José Rodolfo Fernández Calderón y del Sr. Sergio Márquez Baltazar.

Referencias

1. ALVAREZ-LEEFMANS FJ, CRUZBLANCA H, BERNAL J: Trifluoperazine enhances Ca^{2+} dependent inactivation of Ca^{2+} currents in *Helix* neurons. *Biophys J*, 55:594a, 1989.
2. ALVAREZ-LEEFMANS FJ, GAMINO SM, REUSS L: Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurons. *J Physiol*, 458:603-619, 1992.
3. BERNAL MJ, FERNANDEZ JR, ALVAREZ-LEEFMANS FJ: Trifluoperazine blocks Ca^{2+} inward currents in *Helix* neurons in a reversible and dose dependent manner. *Biophys J*, 51:33a, 1987.
4. CARAFOLI E, KREBS J, CHIESI M: Calmodulin in the transport of calcium across biomembranes. En: *Molecular Aspects of Cellular Regulation*. Vol. 5 Calmodulin. Eds. Cohen, P and Klee, CB, pp. 297-312, Elsevier, NY. 1988.
5. CRUZBLANCA H, REGEN C, ALVAREZ-LEEFMANS FJ: Efectos de activadores de la proteína cinasa C sobre la corriente de calcio en neuronas de *Helix aspersa*. *Memorias*. IV Reunión de Investigación del Instituto Mexicano de Psiquiatría, pp. 133-142, 1988.
6. DeRIEMER SA, GREENGARD P, KACZMAREK LK: Calcium/Phosphatidylserine/Diacylglycerol-dependent protein phosphorylation in the *Aplysia* nervous system. *J Neurosci*, 5:2672-2676, 1985.
7. ECKERT R, CHAD JE: Inactivation of Ca channels. *Prog. Biophys Molec Biol*, 44:215-267, 1985.
8. GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEN RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260:3440-3450, 1985.
9. REYNOLDS GP: Developments in the drug treatment of schizophrenia. *TiPS*, 12:116-121, 1992.
10. ROUFOGALIS BD: Specificity of trifluoperazine and related phenothiazines for calcium-binding proteins. En: *Calcium and Cell Function*. Vol. 3, pp. 130-159. Academic Press, NY. 1982.
11. SEEMAN P: Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, 1:133-152, 1987.
12. VOLPE P, COSTELLO B, CHU A, FLEISCHER S: The effect of phenothiazines on Ca^{2+} fluxes in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 233:175-179, 1984.
13. WYSKOVSKY W, HAUPTNER R, SUKO J: Drug-induced calcium release from heavy sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta*, 938:89-96, 1988.