



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE IONES METALICOS EN LA  
ACTIVIDAD DE CANALES Cav3 CLONADOS DE  
HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
DANIEL DIAZ ESPINOSA DE LOS MONTEROS



DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN CARLOS GOMORA MARTINEZ

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A doña chabe “mamá ogro”*

*por todo lo que nos diste, y por lo que te faltó enseñarnos...*

*con cariño te recordamos:*

*Ilse, Miguel, Yobas y Daniel*

*A mis padres y mis hermanos*

*Lulú, Sefe, Luis, César y Emmanuel*

*Gracias...*

*¿Para qué poetas?*

## PRESENTACIÓN

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica del Instituto Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM.

Algunos de los resultados del presente trabajo de investigación se presentaron en el siguiente congreso:

**Díaz D**, Delgadillo DM, Perez-Reyes E, and Gomora, JC.

Blocking effect of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{La}^{3+}$  on  $\text{Ca}_v3$  channels: unblocking at extreme voltages. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, MD, USA. *Biophysical Society Abstracts* 86(1): 426a, 2004.

La tesis se presenta en dos secciones: el manuscrito principal y el artículo publicado (Apéndice).

**D. Díaz**, R. Bartolo, D.M. Delgadillo, F. Higueldo, J.C. Gomora (2005) Contrasting Effects of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  on the Blocking/Unblocking of Human  $\text{Ca}_v3$  Channels. *J. Membrane Biol.* 207: 91-105.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Gómora por su valioso apoyo y contribución a la realización de mi trabajo.

Agradezco a los sinodales por sus sugerencias y comentarios para mejorar el trabajo escrito, Dra. Tamara Rosebaunn, Dr. Julio Prieto, M. en C. Enrique Moreno y Dr. Arturo Hernández.

A la Dra. Dulce María Delgadillo por sus críticas, sugerencias y comentarios al presente trabajo de tesis.

De manera muy especial, agradezco a todos los que me faltaron.

## CONTENIDO

I.	RESUMEN .....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	3
III.	ANTECEDENTES .....	5
A.	Excitabilidad Celular y Canales Iónicos .....	5
B.	Canales de Calcio Dependientes de Voltaje .....	7
1.	<i>Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje</i> .....	8
C.	Propiedades Moleculares de los Canales de Calcio.....	12
1.	<i>Subunidad <math>\alpha 1</math></i> .....	12
2.	<i>Subunidades <math>\beta</math></i> .....	15
3.	<i>Subunidades <math>\alpha 2 \delta</math> y <math>\gamma</math></i> .....	16
D.	Funciones Fisiológicas y Distribución de los Canales LVA .....	18
E.	Bloqueadores Específicos de Canales de Calcio.....	20
1.	<i>Cationes metálicos divalentes</i> .....	22
IV.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	24
A.	Hipótesis .....	24
B.	Objetivos .....	24
1.	<i>Objetivos Específicos</i> .....	25
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
A.	Cultivo Celular .....	26
B.	Electrofisiología .....	27
1.	<i>Experimentos de Fijación de Voltaje</i> .....	27
2.	<i>Soluciones de Registro</i> .....	29
3.	<i>Captura de Datos</i> .....	30
4.	<i>Análisis de Datos</i> .....	32

<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
A. Construcción de Curvas Dosis-Respuesta: Mayor Sensibilidad de $\alpha 1H$ al Bloqueo por Cationes Divalentes.....	34
B. Curvas Corriente-Voltaje.....	39
1. <i>El bloqueo producido por <math>Co^{2+}</math> y <math>Ni^{2+}</math> es más potente a potenciales negativos</i> .....	45
C. Colas de Corriente.....	48
1. <i>Efecto de voltajes extremos en las colas de corriente de los canales <math>Ca_v3</math></i> .....	48
1.1 <i>La hiperpolarización a voltajes extremos promueve el desbloqueo de los canales <math>Ca_v3</math> en presencia de <math>Cd^{2+}</math>, pero intensifica el bloqueo inducido por <math>Co^{2+}</math> y <math>Ni^{2+}</math>.</i> .....	50
1.2 <i>Efecto de potenciales extremos positivos en el bloqueo de los canales <math>Ca_v3</math> por iones inorgánicos</i> .....	54
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
A. Los Metales Divalentes Bloquean con Mayor Especificidad a los Canales $\alpha 1H$ .....	68
B. Bloqueo Dependiente de Voltaje de los Canales $Ca_v3$ .....	70
C. Efectos en las Colas de Corriente.....	71
1. <i>Desbloqueo inducido por potenciales extremos positivos y negativos</i> .....	71
2. <i>Modificaciones en la cinética de desactivación.</i> .....	74
D. Conclusiones.....	76
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÉNDICE (Artículo).....</b>	<b>83</b>

## I. RESUMEN

El influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por los canales de calcio activados por voltaje desencadena una serie de procesos celulares tales como la regulación de cascadas de segundos mensajeros, liberación de calcio de almacenes citoplásmicos y expresión génica. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  contribuyen a la excitabilidad neuronal, crecimiento de neuritas, secreción de hormonas y neurotransmisores, y contracción muscular. Las células expresan diferentes tipos de canales de calcio, cada uno asociado a funciones fisiológicas específicas. La relevancia clínica de estos canales se ejemplifica con las varias clases de fármacos conocidos como “bloqueadores de canales de calcio” utilizados como agentes antihipertensivos. Los canales de calcio son proteínas integrales de la membrana formados por varias subunidades. La subunidad principal, llamada  $\alpha_1$ , forma el poro del canal, une varios agentes farmacológicos y contiene el sensor de voltaje. Las subunidades accesorias son llamadas  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  y  $\gamma$ . Estas subunidades regulan la actividad de la subunidad  $\alpha_1$ , modificando su dependencia al voltaje, la cinética de sus corrientes, y la afinidad para unir fármacos. La existencia de mutaciones en varias de estas subunidades de canales de calcio se han relacionado con enfermedades hereditarias en humanos (conocidas como Canalopatías) y a la epilepsia en ratones. Hasta hace 5 años, la mayor cantidad de información bibliográfica acerca de la regulación y estructura molecular de este tipo de proteínas provenía de los canales de calcio tipo HVA, es decir, aquellos que se activan con fuertes despolarizaciones. En contraste, poco se sabía acerca de los canales de calcio que se activan a potenciales relativamente negativos (cerca del potencial de reposo de neuronas y células excitables), también conocidos como canales LVA ó tipo T. Esta diferencia en la magnitud del conocimiento fue ocasionada en gran medida debido a la ausencia de una entidad molecular que generara corrientes LVA. Afortunadamente, en 1998 el grupo del Dr. Perez-Reyes reportó y demostró la existencia del sustrato molecular de dichos canales con la clonación de tres subunidades  $\alpha_1$  que generan corrientes tipo T. A partir de entonces, el estudio de los canales LVA se ha visto favorecido de manera considerable, y el laboratorio donde se realizó la presente tesis tiene como finalidad



principal el estudio de las propiedades electrofisiológicas, farmacológicas, de estructura-función y de regulación de dichos canales. En particular, el presente proyecto de investigación se enfoca a estudiar los efectos de iones inorgánicos divalentes, en concreto los del  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , en la actividad de los canales de calcio LVA clonados de humano. Para tal fin, se realizaron experimentos con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch clamp) en la configuración de célula completa en células HEK-293 que expresan de manera estable las subunidades  $\alpha 1\text{G}$ ,  $\alpha 1\text{H}$  y  $\alpha 1\text{I}$ , la cuales generan corrientes tipo LVA. Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que los canales  $\alpha 1\text{H}$  son los más sensibles a la acción de los metales divalentes, además de que el bloqueo de estos mismos canales es prácticamente independiente del voltaje. Por otra parte, a pesar de que  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{I}$  son menos sensibles al bloqueo por los iones inorgánicos, la inhibición de sus corrientes presenta modificaciones en su dependencia al voltaje. Los resultados muestran, además, que el  $\text{Co}^{2+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  inhiben la actividad de los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{I}$  con características similares: mayor bloqueo a potenciales negativos, corrimiento de la curva  $I-V$  hacia voltajes más positivos y aceleración de la desactivación de los canales. En cambio, el  $\text{Cd}^{2+}$  bloquea en mayor proporción la corriente a voltajes positivos y no modifica la relación  $I-V$  de los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{I}$ . Finalmente, el análisis de las colas de corriente indica que únicamente los canales  $\alpha 1\text{I}$ , no se pueden cerrar mientras el  $\text{Cd}^{2+}$  se encuentra en la vía de permeación del canal. Las diferencias observadas en los efectos del bloqueo por  $\text{Cd}^{2+}$ , en relación con los observados con  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  son explicadas parcialmente por los diferentes tamaños de radios iónicos de los metales divalentes, así como por diferencias en la secuencia de las subunidades  $\alpha 1$  de los canales. La información obtenida a partir de los experimentos del presente trabajo constituye una aportación importante para aumentar el conocimiento de las propiedades biofísicas y farmacológicas de los canales de calcio LVA.

## II. INTRODUCCIÓN

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) desempeñan una función fundamental en la fisiología celular permitiendo la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma, lo cual da lugar a diversos eventos fisiológicos como la contracción muscular, la secreción de hormonas, la liberación de neurotransmisores, la excitabilidad celular y la expresión génica (Catterall, 2000; Hille, 2001).

Los CCDV son complejos proteicos transmembranales formados por varias subunidades. La subunidad principal, llamada  $\alpha 1$ , forma el poro del canal o vía de conducción iónica y contiene el sensor de voltaje. El canal completo se constituye además por las subunidades  $\alpha 2\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , a las cuales se les conoce como subunidades accesorias y su función consiste en regular varios aspectos de la actividad de la subunidad  $\alpha 1$  (Arikkath & Campbell, 2003; Birnbaumer et al., 1998; Randall & Benham, 1999).

La clasificación más general de los CCDV los divide en dos grandes familias: de bajo umbral o LVA y de alto umbral o HVA. La primera incluye la subfamilia de canales  $\text{Ca}_v3$ , y la segunda se compone por las subfamilias  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2$  (Ertel et al., 2000). El empleo de herramientas farmacológicas y electrofisiológicas como toxinas, iones inorgánicos y diferentes fármacos que bloquean de manera preferencial un determinado tipo de canal, permitió esclarecer la existencia de varios tipos de canales dentro de una misma subfamilia, particularmente en el caso de los canales HVA (Catterall, 2000). A partir de esta clase de estudios se lograron diferenciar varias corrientes HVA denominadas tipo P/Q, L, N y R; mientras que los canales LVA sólo presentaban un tipo de corriente, la tipo T. Todas estas corrientes pueden ser registradas en una misma célula y algunas de estas corrientes presentan propiedades biofísicas similares (Randall & Tsien, 1995). De esta forma el conocimiento de la estructura y del funcionamiento de los CCDV ha sido sustancialmente mejorado mediante el uso de fármacos y bloqueadores específicos que interactúan diferencialmente con uno o más tipos de canales (Yunker, 2003).

Las toxinas de caracoles marinos y arañas, como la  $\omega$ -conotoxina GVIA y la  $\omega$ -agatoxina IVA, y fármacos como las dihidropiridinas (DHP) son frecuentemente utilizados para definir la contribución específica de cada tipo de corriente en los eventos dependientes de la concentración de calcio intracelular, por ejemplo durante la neurotransmisión y la regulación de la expresión génica (Doering & Zamponi, 2003). Asimismo, los bloqueadores selectivos han sido de fundamental importancia para caracterizar las propiedades biofísicas de los CCDV, así como para establecer la identidad molecular de la subunidad que forma el poro ( $\alpha 1$ ) en los canales HVA (Curtis & Catterall, 1984; Tanabe et al., 1987; Witcher et al., 1993). No obstante, esta valiosa herramienta no ha sido completamente explorada en los canales  $Ca_v3$ , a pesar de que hace ya casi 30 años, Hagiwara et al. (1975) lograron obtener los primeros registros de corrientes de calcio tipo T (denominadas **T**ransientes por sus características cinéticas y producidas por los canales LVA). Una de las posibles razones es que a la fecha no se cuenta con bloqueadores específicos para los canales tipo LVA. Esta misma circunstancia “retardó” la identificación del sustrato molecular (subunidad  $\alpha 1$ ) que da origen a las corrientes tipo T, suceso que significó una de las principales herramientas de estudio para el entendimiento del funcionamiento y la estructura de los canales HVA (Yunker, 2003).

Las corrientes tipo T que se han registrado en diversos tipos celulares, presentan diferencias en la cinética de las corrientes, en la dependencia al voltaje de su activación y en la sensibilidad al bloqueo por cationes inorgánicos y dihidropiridinas (Huguenard, 1996). Lo anterior sugiere la existencia de diferentes entidades moleculares que generan las corrientes tipo T. Lo cual se confirmó con la reciente clonación de tres subunidades  $\alpha 1$  que generan este tipo de corrientes y que conforman la subfamilia de canales  $Ca_v3$  (Cribbs et al., 1998; Cribbs et al., 2000; Lee et al., 1999a; Perez-Reyes et al., 1998).

Debido a su reciente clonación, el conocimiento acerca de la estructura y funcionamiento de los canales tipo T es todavía muy escaso, por lo que el propósito de este trabajo es contribuir a la caracterización básica, para el mejor entendimiento de la actividad de estos canales iónicos. Concretamente, el objetivo general del presente trabajo experimental consiste en evaluar los efectos de diferentes cationes

divalentes ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ ) en la actividad de los canales de calcio de la familia  $\text{Ca}_v3$  clonados de humano. Además, con base en los resultados obtenidos en la presente tesis se pretende aportar herramientas farmacológicas para poder discriminar entre los diferentes tipos de canales  $\text{Ca}_v3$ , y facilitar su estudio en preparaciones (neuronas o células secretoras, por ejemplo) donde coexistan diferentes subtipos de estos canales.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Excitabilidad Celular y Canales Iónicos

La excitabilidad celular es una propiedad intrínseca que permite a las células generar una señal eléctrica o potencial de acción (PA, cambio súbito y transitorio en el potencial de membrana que desplaza el voltaje hasta un valor positivo para posteriormente regresar a su valor inicial) en respuesta a estímulos de diferentes intensidades (Sperelakis, 1995). Los iones desempeñan un papel fundamental en la excitabilidad de los nervios y los músculos, tal como lo demostró Sydney Ringer en una serie de trabajos clásicos realizados hacia finales del siglo XVIII. Sus trabajos con corazón de rana, demostraron que el latido de dicho órgano se mantenía únicamente cuando era incluido en una solución compuesta por sales de sodio, potasio y calcio, mezclados en diferentes proporciones. Pocos años después, el trabajo de Nernst con potenciales eléctricos originados por la difusión de diferentes electrólitos en solución logró inspirar diversas especulaciones sobre el posible origen iónico de los potenciales bioeléctricos (Hille, 2001).

La excitabilidad y el señalamiento eléctrico en el sistema nervioso involucra el movimiento de los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ , considerados como los principales generadores de la actividad eléctrica en las células (Hille, 2001). La capacidad celular de separar iones selectivamente a través de la membrana citoplásmica genera una distribución diferencial de las cargas eléctricas a ambos lados de la misma. Como resultado de dicha separación se generan gradientes de iones (químicos) y de cargas (eléctricos) entre el interior y el exterior de la célula, dando origen a una fuerza impulsora conocida como gradiente electroquímico. Esta fuerza determina la dirección de los iones e influye sobre la velocidad de los mismos cuando son transportados a través de proteínas especializadas que se encuentran en la membrana plasmática. Dichas proteínas transmembranales reciben el nombre de canales iónicos, y se trata de complejos multiproteicos que forman poros hidrofílicos en las membranas por los que pueden ser transportados diferentes tipos de iones. Los canales iónicos se expresan tanto en células excitables como en otros tipos de células animales y vegetales y permiten a las células generar

diferentes tipos de actividad eléctrica espontánea, así como en respuesta a diferentes estímulos (Aidley, 1989).

Existen diferentes tipos de canales iónicos, algunos responden a cambios en el potencial de membrana de la célula ( $V_m$ ), otros se activan por la acción de un ligando y otros más por cambios en la presión o en la temperatura, todos ellos son, en mayor o menor grado, selectivamente permeables a diferentes tipos de iones (Aidley, 1989; Fernández de Miguel, 1998). Debido a que los iones presentan carga eléctrica neta, su movimiento a través de los canales genera corrientes eléctricas que se traducen en cambios del  $V_m$ , lo cual eventualmente puede originar un PA. Los potenciales de acción son las señales eléctricas con las cuales se comunican las neuronas y otros tipos celulares excitables.

Además de su evidente importancia en la generación de señales eléctricas, los canales iónicos también participan en diferentes procesos fisiológicos relacionados con la secreción de hormonas y neurotransmisores, contracción muscular, regulación metabólica y expresión génica (Catterall, 2000; Perez-Reyes, 2003; Randall & Benham, 1999; Yunker & McEnery, 2003). Los canales iónicos también se encuentran en las membranas de organelos intracelulares, como el retículo endoplásmico, la mitocondria y el núcleo (Lipscombe et al., 2002). Dentro de la gran variedad de familias de canales iónicos que existen, el interés del presente trabajo se centra en los canales iónicos cuya actividad depende del voltaje, y de manera particular, los que permiten el flujo selectivo de iones  $Ca^{2+}$ , estos canales se denominan canales de calcio dependientes de voltaje y en adelante serán llamados indistintamente canales  $Ca_v$  o canales de calcio.

## B. Canales de Calcio Dependientes de Voltaje

Debido a las similitudes estructurales y funcionales que comparten entre ellos, los canales de sodio, de potasio y de calcio sensibles al voltaje forman la superfamilia de canales dependientes de voltaje (Hille, 2001). Además de contar con un poro hidrofílico que permite el flujo pasivo de iones a través de la membrana plasmática y presentar una alta selectividad por el catión respectivo, los miembros de esta superfamilia de canales iónicos poseen, como característica distintiva, regiones altamente especializadas que detectan los cambios de voltaje transmembranal y que se localizan en el segmento transmembranal S4. Estos sensores de voltaje moleculares se desplazan a través de la membrana, provocando cambios conformacionales en otras regiones de la proteína llamadas compuertas de activación. A su vez, las compuertas determinan la apertura o cierre del canal (Armstrong & Hille, 1998).

Los canales  $Ca_v$  son proteínas transmembranales que se activan en respuesta a un cambio en el  $V_m$ , permitiendo así el flujo pasivo de iones  $Ca^{2+}$  hacia el interior celular (Catterall, 2000). Actualmente, existe un consenso en la noción de que la actividad de estos canales es esencial para el funcionamiento de las células excitables, así como para otras células no excitables (Hille, 2001). De esta forma los canales de calcio proveen un enlace crucial entre la excitabilidad celular y el enorme número de procesos intracelulares que utilizan el ion  $Ca^{2+}$ , ya sea de forma directa (por ejemplo, los eventos que utilizan elevaciones de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular como una señal funcional), o de forma indirecta, tal como la modulación de las cascadas de señales dependientes de  $Ca^{2+}$  (Randall & Benham, 1999).

Múltiples tipos de corrientes de calcio han sido identificadas a partir de sus propiedades fisiológicas y farmacológicas y han sido correlacionadas con las subunidades de los canales clonados que se han caracterizado *in vitro* (Catterall, 2000). A continuación se presenta una perspectiva general sobre la clasificación de los diferentes tipos de corrientes que se han descrito, así como la nomenclatura de las subunidades que originan a estas corrientes.

## ***1. Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje***

La primera clasificación de los canales  $Ca_v$  tomó en consideración el voltaje que se requiere para activarlos. De acuerdo a los estudios electrofisiológicos realizados en la década de 1980-1990, se logró identificar a dos grandes clases de canales de calcio, los de bajo umbral de activación ó LVA y los de alto umbral ó HVA (Bean, 1989; Carbone & Lux, 1984; Matteson & Armstrong, 1986). Los canales LVA se activan a valores de  $V_m$  cercanos a -60 mV, mientras que los canales de la familia HVA se activan a voltajes más positivos, entre -30 y -20 mV. Además de su bajo umbral de activación, los canales LVA también se caracterizan por su rápida inactivación durante una despolarización sostenida, su lenta desactivación o cierre del canal, y una conductancia unitaria de aproximadamente 8 pico Siemens (pS). Mientras que los canales HVA se inactivan más lentamente, se cierran muy rápido y tienen una conductancia unitaria tres veces más grande que los LVA (Matteson & Armstrong, 1986; Nowycky et al., 1985).

Los canales de calcio se diferencian funcionalmente de acuerdo a sus propiedades de inactivación en canales de corrientes transitorias (tipo T) o canales de corrientes de larga duración (tipo L) (Abernethy & Soldatov, 2002; Nowycky et al., 1985). Adicionalmente se han descubierto otros tipos de corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ). Así, se tienen las corrientes tipo N (identificadas originalmente en neuronas), las corrientes tipo P (registradas por primera vez en neuronas de Purkinje), las corrientes tipo Q (caracterizadas en células granulares del cerebelo) y finalmente las corrientes tipo R (que se refiere a la corriente de calcio remanente después de haber bloqueado el resto de los canales HVA). Los diversos tipos de corrientes de calcio pueden ser distinguidos de forma individual por sus propiedades biofísicas, así como por su sensibilidad a diferentes toxinas y fármacos (Catterall, 2000).

Combinando estudios de clonación, expresión de los canales recombinantes y farmacología, a la fecha se ha logrado la identificación de diez genes que codifican para subunidades  $\alpha_1$  de canales de calcio. Siete de dichas subunidades generan corrientes tipo HVA (Tsien et al., 1995), mientras que los restantes tres genes codifican para subunidades  $\alpha_1$  que dan origen a corrientes tipo LVA (Perez-Reyes, 2003). La correspondencia entre subunidad  $\alpha_1$  y tipo de canal de calcio, así como



su localización principal se presenta en la Tabla 1. Como se puede concluir a partir de la información de dicha tabla, existen diferentes formas de identificar a un mismo tipo de canal de calcio. Con la idea de unificar criterios y designar una nomenclatura distintiva a cada miembro de la familia de canales de calcio, recientemente se designó una nomenclatura ya utilizada en otras familias de canales dependientes de voltaje (Ertel et al., 2000; Goldin et al., 2000; Jan & Jan, 1990). El primer termino de la nomenclatura se refiere al ion permeante ( $\text{Ca}^{2+}$ , en este caso), seguido del estímulo principal para la apertura o cierre del canal, que en este caso es el voltaje (indicado como subíndice). Finalmente dos números separados por un punto; el primero indica la familia de proteínas, mientras que el segundo identifica a la isoforma particular. Por ejemplo, el canal  $\text{Ca}_v3.2$  identifica al canal de calcio dependiente de voltaje tipo T, codificado por la subunidad  $\alpha 1\text{H}$ . En el presente trabajo, se empleará principalmente la clasificación basada en las subunidades  $\alpha 1$ , aunque para hacer referencia a la subfamilia de canales LVA se usarán los términos  $\text{Ca}_v3$  o tipo T.

En la Fig. 1 se presenta la clasificación más reciente de los canales de calcio en base a la similitud que comparten las diferentes subunidades  $\alpha 1$ . Como ya se había mencionado, existen dos subfamilias, los HVA y los LVA. Los primeros se subdividen a su vez en canales tipo L que se caracterizan por ser sensibles a las DHP (fármacos empleados en la clínica como antihipertensivos) y abarcan las subunidades  $\alpha 1\text{S}$ ,  $\alpha 1\text{C}$ ,  $\alpha 1\text{D}$  y  $\alpha 1\text{F}$ . Estas subunidades generan corrientes tipo L cuando se expresan en sistemas heterólogos por ejemplo: ovocitos de rana o células de mamífero. La segunda subfamilia de canales HVA esta compuesta por las subunidades  $\alpha 1\text{A}$  (canales tipo P/Q),  $\alpha 1\text{B}$  (canales tipo N), y  $\alpha 1\text{E}$  (canales tipo R), mismos que se agrupan como canales tipo No L, debido a que son menos sensibles a las DHP. En cambio, son bloqueados de manera selectiva por toxinas específicas de caracoles marinos y arañas (Doering & Zamponi, 2003). Por su parte, la subfamilia de canales LVA consiste de tres subunidades  $\alpha 1$ : G, H e I (Perez-Reyes, 2003), mismas que fueron clonadas más recientemente, y por lo tanto, el conocimiento acerca de este tipo de canales es apenas incipiente.

Tabla 1. Clasificación de los Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.

Nombre de la subunidad $\alpha 1$	Tipo de corriente	Localización primaria	Familia de canales
$\alpha 1S$	L	Músculo esquelético	HVA
$\alpha 1C$	L	Músculo cardíaco Células endocrinas Neuronas	HVA
$\alpha 1D$	L	Células endocrinas Neuronas	HVA
$\alpha 1F$	L	Retina	HVA
$\alpha 1A$	P/Q	Terminales nerviosas Dendritas	HVA
$\alpha 1B$	N	Terminales nerviosas Dendritas	HVA
$\alpha 1E$	R	Cuerpos celulares Dendritas Nervios	HVA
$\alpha 1G$	T	Músculo cardíaco Músculo esquelético Neuronas	LVA
$\alpha 1H$	T	Músculo cardíaco Neuronas	LVA
$\alpha 1I$	T	Neuronas	LVA

Nombre de las subunidades  $\alpha 1$  de los CCDV, tipo de corriente de  $Ca^{2+}$  que produce cada subunidad y localización primaria en los tejidos (Modificada de Catterall, 2000).

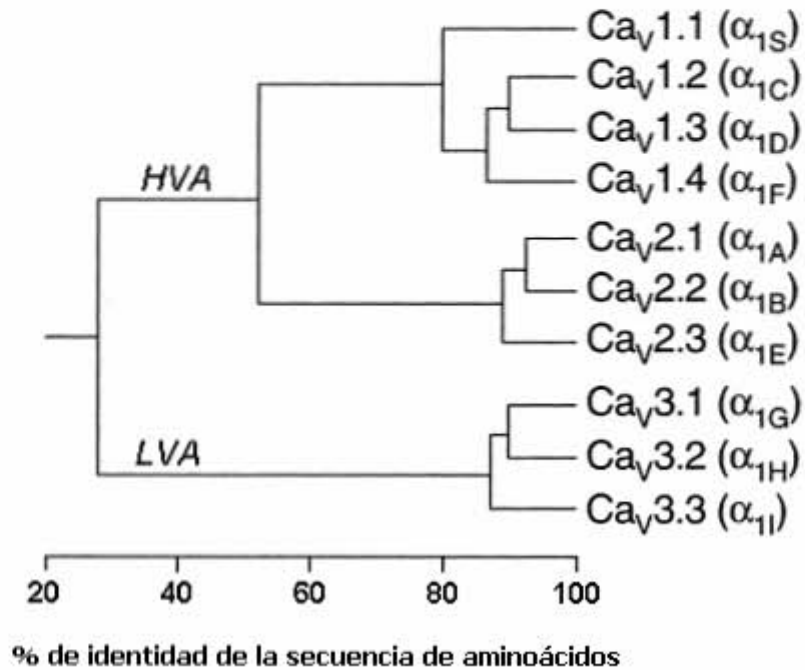


Figura 1. **Filogenia de las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de calcio.**

Árbol genealógico indicando las subfamilias de canales de calcio dependientes de voltaje. La secuencia completa de cada subunidad  $\alpha_1$  fue reducida exclusivamente a las regiones que atraviesan la membrana, lo cual generó una base de datos de 350 aminoácidos. Posteriormente, dichas bases de datos fueron alineadas utilizando el programa DNASIS tomando como base el algoritmo de CLUSTAL (Modificado de Perez-Reyes, 1999).

## C. Propiedades Moleculares de los Canales de Calcio

Los canales de calcio son complejos de proteínas formados por 4 ó 5 subunidades, codificadas por múltiples genes que llevan los nombres genéricos de  $\alpha 1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$ , y  $\gamma$ . Como en el caso de los canales de sodio y potasio, la subunidad  $\alpha 1$  es la más grande (212 a 273 kDa) y su topología estructural es similar a la de la subunidad  $\alpha 1$  de los canales de sodio (Catterall, 2000). A continuación se hace una breve descripción de las subunidades que forman los canales  $Ca_v$ .

### 1. Subunidad $\alpha 1$

La subunidad  $\alpha 1$  forma el poro hidrofílico que permite el flujo de iones y contiene regiones especializadas que determinan la selectividad del canal (filtro de selectividad) y su sensibilidad al voltaje (sensor de voltaje). De acuerdo con modelos de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad  $\alpha 1$  de canales de calcio, estas proteínas son cadenas de aminoácidos que forman cuatro dominios homólogos (numerados del I al IV), unidos entre si por asas intracelulares. Cada dominio contiene seis segmentos transmembranales llamados S1 a S6 (partiendo del amino hacia el carboxilo terminal) e interconectados por asas intra y extracelulares (Fig. 2A). Los segmentos S5 y S6 se encuentran unidos por una secuencia de aminoácidos que forman un asa que se invagina parcialmente en la membrana, y que se conoce como el asa del poro. Estudios recientes indican que el extremo intracelular del poro está delineado por los segmentos S6, y el extremo opuesto (extracelular) está revestido por las asas del poro de cada dominio (Jiang et al., 2003b; Jiang et al., 2003a). Tales asas forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que su secuencia de aminoácidos es un factor determinante de la conductancia, la selectividad iónica del canal y de su afinidad por diversas toxinas que modifican la actividad de la subunidad  $\alpha 1$  (Catterall, 2000).

En los canales HVA la selectividad del poro esta determinada por un anillo de cargas negativas formado por residuos de ácido glutámico (E) en posiciones similares en cada una de las cuatro asas del poro (EEEE) (Yang et al., 1993). Este anillo da origen a un sitio de unión único con

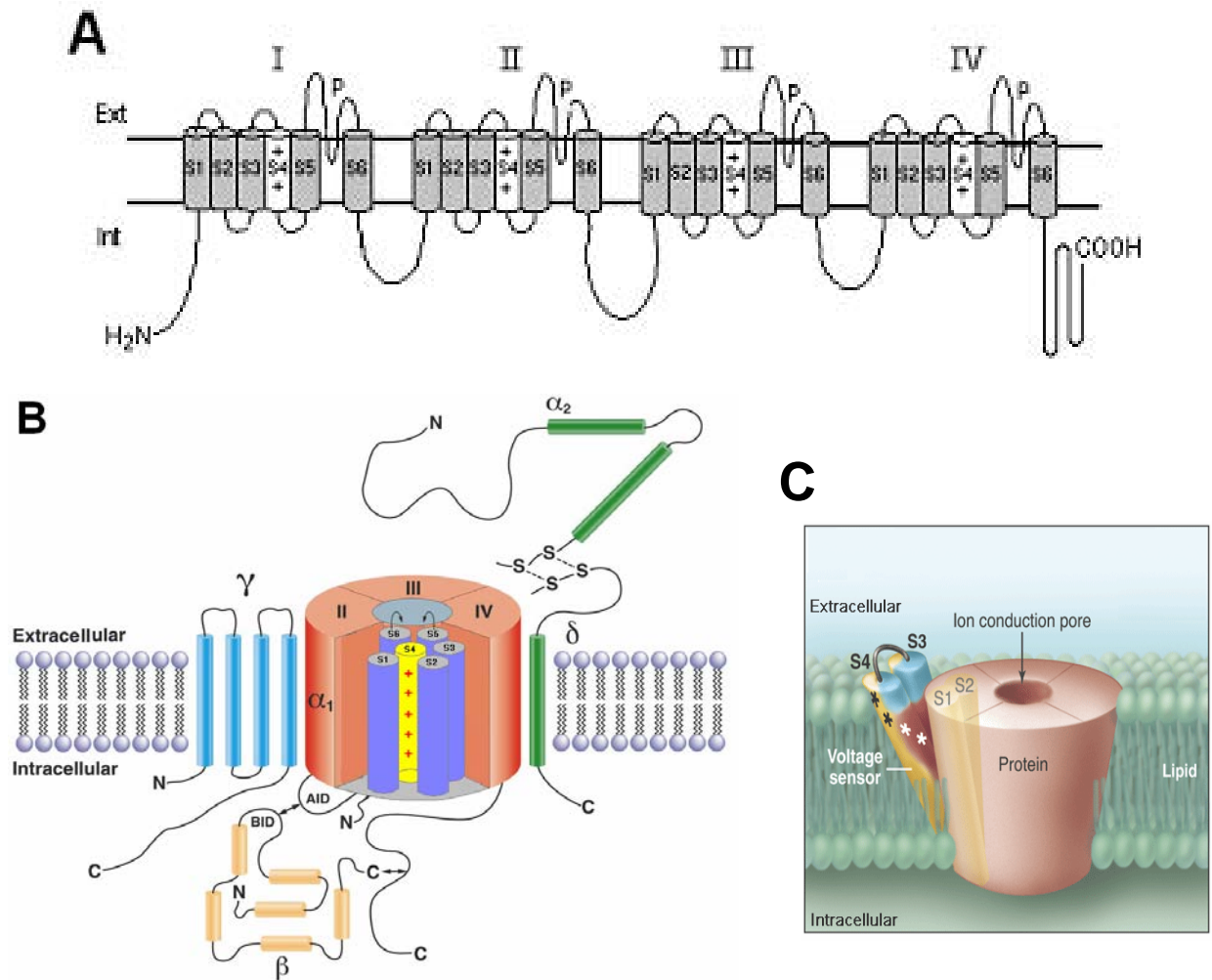


Figura 2. **Composición y estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje.**

**A)** Representación esquemática de la estructura primaria de las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de calcio. Los canales de calcio LVA y HVA se componen de una proteína de  $\sim 270$  kDa (subunidad  $\alpha_1$ ) la cual consiste de cuatro repetidos (I al IV), cada uno de los cuales contiene seis regiones transmembranales (S1 a S6) y una asa del poro (P). El segmento S4 se caracteriza por poseer varios aminoácidos con carga positiva, razón por la cual cumple con la función de detectar los cambios en el voltaje transmembranal. La subunidad  $\alpha_1$  es el elemento principal del canal, ya que contiene el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y por si sola es capaz de permitir el acceso de iones. **B)** Topología propuesta del patrón de ensamblaje de un canal HVA. Se muestra el probable arreglo de las diferentes subunidades accesorias ( $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  y  $\gamma$ ) en relación con la subunidad  $\alpha_1$ . El poro central se forma por el plegamiento de los cuatro dominios que conforman la subunidad  $\alpha_1$ . En este esquema, el sensor de voltaje (S4) se presenta aislado del ambiente lipídico de la membrana por el resto de la proteína de la subunidad  $\alpha_1$ . Las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  interactúan en un sitio denominado AID (Alpha Interaction Domain o dominio de interacción alfa) en el asa que une los dominios I y II de la subunidad  $\alpha_1$  (Modificado de Randall & Benham, 1999).

una alta afinidad por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d \sim 0.7 \mu\text{M}$ ), de tal manera que a la concentración extracelular fisiológica ( $\sim 2 \text{ mM}$ ), el sitio siempre se encuentra ocupado por el ion  $\text{Ca}^{2+}$  (para una revisión véase, Sather & McCleskey, 2003). Si cualquiera de los residuos de glutamato es sustituido por una lisina (que tiene carga positiva) el canal pierde su selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  y permite entonces también el flujo de  $\text{Na}^+$ . Es importante mencionar que en las subunidades  $\alpha 1$  de los canales LVA, dos glutamatos están remplazados por aspartatos que, aunque también tienen carga negativa (Perez-Reyes, 2003), probablemente inducen cambios en las propiedades de permeación de los canales.

Otra característica distintiva de los canales dependientes de voltaje, como los canales de calcio, es el sensor de voltaje. El modelo con que se contaba hasta principios del 2003 para el funcionamiento del sensor de voltaje proponía que la estructura molecular responsable se limitaba al segmento S4, el cual se caracteriza por la abundancia de aminoácidos con carga positiva (argininas y lisinas, principalmente) que se repiten cada tres residuos (Fig. 2B). Dicho modelo, propone además que el segmento S4 se encuentra rodeado por el resto de la subunidad  $\alpha 1$ , con lo cual las cargas positivas quedarían protegidas del ambiente hidrofóbico de los lípidos. En consecuencia, el sensor de voltaje se orienta paralelamente al poro del canal y en respuesta a la despolarización, las cargas positivas del sensor se desplazan sobre su propio eje hacia la cara externa de la membrana celular, acoplando así el cambio en el voltaje con la apertura del canal (Stuhmer et al., 1989; Yamaguchi et al., 1999). Sin embargo, los resultados obtenidos por el grupo de MacKinnon con la cristalografía de rayos X de un canal de  $\text{K}^+$  activado por voltaje plantean un modelo muy diferente (e inesperado) para el sensor de voltaje (Jiang et al., 2003b; Jiang et al., 2003a).

---

**C)** Modelo propuesto para el sensor de voltaje de los canales activados por voltaje. Los estudios más recientes de cristalografía y reconstitución de canales en bicapas lipídicas apoyan la noción de que el segmento S4 se ubica en la periferia de la subunidad que forma el poro de conducción, aunque la mayor parte de la carga del sensor de voltaje (aminoácidos como arginina y lisina, indicados en la figura con \*) se encuentra de frente con el ambiente proteico de la subunidad  $\alpha 1$ , de tal forma que el contacto con los lípidos de la membrana es mínimo (Modificado de MacKinnon, 2004).

La estructura tridimensional de dicho canal, cristalizado de la arqueobacteria termófila *Aeropyrum pernix* (por lo que se le denominó canal KvAP), confirmó que la estructura involucrada en el sensor de voltaje es en efecto el segmento S4 con una parcial contribución del extremo carboxilo del segmento S3. No obstante, el sensor de voltaje está en un plano perpendicular al eje del poro del canal, rodeando su perímetro externo, en la interfase lípido-agua de la membrana. En respuesta a un estímulo despolarizante, el sensor de voltaje se desplazaría desde la superficie intracelular de la membrana hasta la superficie extracelular, a través de la bicapa lipídica, semejando un “golpe de remo” que alejaría a los segmentos S5 y S6 del eje del poro, produciendo así la apertura del canal (Jiang et al., 2003b; Jiang et al., 2003a).. Recientemente, el grupo de Eduardo Perozo (Cuello et al., 2004) reportó hallazgos interesantes que fortalecen la noción de que el segmento S4 se sitúa en la periferia del canal, por lo que el modelo más probable para el sensor de voltaje es el que lo ubica precisamente en el perímetro del poro del canal (Fig. 2C; MacKinnon, 2004).

Por otro lado, el análisis de las secuencias de las proteínas que codifican las subunidades  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$  revelan gran similitud con respecto a la subunidad  $\alpha 1$  de los canales HVA. La subunidad  $\alpha 1$  de los canales  $Ca_v3$  es una proteína de aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos, y la distribución transmembranal (Fig. 3) que presenta es muy parecida a la subunidad  $\alpha 1$  de los canales HVA y de  $Na^+$  (Noda & Numa, 1987; Tanabe et al., 1987). No obstante, una diferencia digna de hacer notar entre los canales LVA y HVA, es que al parecer los primeros sólo están constituidos por la subunidad  $\alpha 1$  (Dolphin et al., 1999; Lambert et al., 1997; Leuranguer et al., 1998), mientras que los segundos, requieren de diferentes subunidades accesorias (Fig. 2B; véase más adelante) para generar corrientes similares a las observadas en preparaciones nativas (Arikkath & Campbell, 2003).

## **2. Subunidades $\beta$**

La clonación de los canales de calcio inició con la purificación y secuenciación del receptor a DHP del músculo esquelético hace ya casi 20 años (Takahashi et al.,

1987). Mediante el análisis bioquímico se logró conocer la composición del canal de calcio, el cual además de la subunidad principal ( $\alpha 1$ ), incluía otras proteínas de menor tamaño que recibieron el nombre de subunidades  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$ , y  $\gamma$ . La subunidad  $\beta$ , de aproximadamente 55 kDa, consiste de varias  $\alpha$  hélices y se localiza en su totalidad en el citoplasma de la célula (Figura 2B). Esta subunidad, de la que se conocen cuatro diferentes genes ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ ), tiene varias acciones de regulación en el funcionamiento de la subunidad  $\alpha 1$ . La regulación incluye el tráfico de la subunidad  $\alpha 1$  hacia la membrana celular, cambios en la dependencia al voltaje de la activación y la inactivación de los canales, modificaciones significativas en la tasa de inactivación de las corrientes y cambios en la sensibilidad a fármacos que modulan la actividad de la subunidad  $\alpha 1$  (Dolphin, 2003; Hanlon & Wallace, 2002).

### **3. Subunidades $\alpha 2\delta$ y $\gamma$**

La subunidad  $\alpha 2\delta$  es una macroproteína altamente glicosilada. Cada subunidad es codificada por un sólo gen que genera dos proteínas: el fragmento extracelular  $\alpha 2$  y el fragmento transmembranal  $\delta$  unidos entre sí por un enlace disulfuro, el complejo proteico que forman las subunidades tiene un peso de aproximadamente 170 kDa y poseen cuatro segmentos transmembranales de  $\sim 33$  kDa (Fig. 2B) (De Jongh et al., 1990). Se conocen cuatro genes diferentes ( $\alpha 2\delta$ -1 a  $\alpha 2\delta$ -4) que originan 12-13 variantes mediante procesamiento alternativo. Los efectos funcionales de coexpresar subunidades  $\alpha 1$  de canales HVA y  $\alpha 2\delta$  son similares a los ejercidos por las subunidades  $\beta$  y en algunos casos se requiere la presencia de alguna de éstas (Klugbauer et al., 2003).

La subunidad  $\gamma$  existe tanto en canales de calcio del músculo esquelético como en neuronas. Se conocen 8 diferentes genes que codifican para las subunidades, cuyas cadenas varían considerablemente desde  $\sim 25$  kDa, equivalentes a unos 222 aminoácidos para  $\gamma 1$  hasta  $\sim 50$  kDa y unos 420 residuos para  $\gamma 8$ , aunque todas comparten dominios conservados, como los que las unen al canal. Los análisis de hidrofobicidad predicen que la subunidad  $\gamma$  consiste de cuatro segmentos transmembranales con los extremos amino y carboxilo localizados en



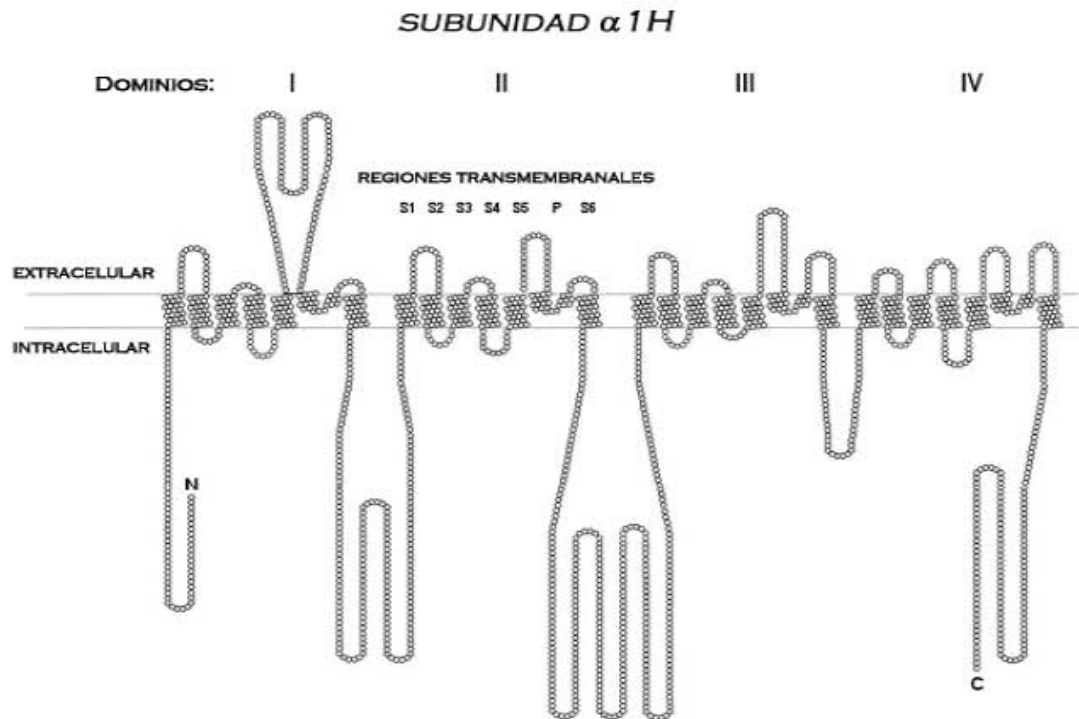


Figura 3. **Representación esquemática de la subunidad  $\alpha 1H$ .**

La figura muestra cada uno de los aminoácidos que componen la subunidad  $\alpha 1H$  representados por un círculo. La secuencia del cDNA de la subunidad  $\alpha 1H$  de humano (No. de acceso del GenBank AF051946) codifica para una proteína de 2353 aminoácidos. Nótese que la mayor parte de la proteína se concentra en las asas intracelulares y en menor grado en la parte extracelular. Al igual que los canales HVA y de sodio, el asa que une los dominios III y IV es la más corta comparada con el resto de las asas intracelulares.

el citoplasma (Fig. 2B). La subunidad  $\gamma_1$  está restringida al músculo esquelético, mientras que las  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$  están asociadas a los canales tipo N y P/Q. Las subunidades  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  inhiben las corrientes de calcio y alteran la cinética de activación e inactivación de los canales y reducen drásticamente las corrientes de los canales tipo N (Arikkath & Campbell, 2003; Black, III, 2003).

#### **D. Funciones Fisiológicas y Distribución de los Canales LVA**

Es ampliamente conocido que la función de los canales de calcio juega un papel determinante en múltiples funciones celulares que van desde la regulación de la excitabilidad celular hasta la regulación génica (Hille, 2001). Desde un punto de vista muy general, los canales de calcio desempeñan dos papeles fisiológicos muy importantes, uno electrogénico y otro de regulación. El primero hace referencia al flujo de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de calcio que genera una corriente de cargas positivas hacia el interior celular, actividad que provoca la despolarización de la membrana plasmática y esto a su vez induce la activación de un mayor número de canales. El aspecto de regulación consiste en traducir la actividad eléctrica en otras formas de actividad fisiológica, es decir, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresan a la célula actúan como un segundo mensajero intracelular capaz de activar a su vez una amplia variedad de funciones celulares (Hille, 2001).

Uno de los primeros papeles fisiológicos que se propusieron para los canales de calcio LVA fue el de participar en la corriente de marcapasos del corazón. Un papel similar de marcapasos ha sido descrito en las neuronas, en donde los canales  $\text{Ca}_v3$  producen las espigas de bajo umbral o LTS (Low Threshold Spikes) que permiten la aparición de una ráfaga de PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Suzuki & Rogawski, 1989). Las corrientes tipo T han sido descritas en una amplia variedad de células (Bean, 1989), pero a pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado hasta la fecha su función fisiológica aún no se conoce totalmente. Algunas de las posibles funciones en las que participan este tipo de corrientes son: la actividad neuronal de disparo en ráfagas (Huguenard, 1996), la actividad marcapasos del corazón (Hess et al., 1986), la fertilización del óvulo (Lievano et al., 1996), entre otras posibles funciones aún no determinadas (Perez-Reyes & Schneider, 1995).

Los canales  $Ca_v3$  neuronales presentan la característica de disparar en ráfaga y generar un comportamiento oscilatorio, actividad que es prominente en el tálamo y que juega un importante papel en la actividad sensorial y el sueño. De hecho, el término *arritmias talamocorticales*, ha sido acuñado para la descripción de cambios patológicos en estas oscilaciones. La pérdida o alteración de la actividad oscilatoria ha sido implicada en una amplia variedad de desordenes neurológicos, entre los que se incluyen: la epilepsia de tipo ausencia, el tremor asociado a la enfermedad de Parkinson, desordenes neuropsiquiátricos y el dolor neurogénico (Jeanmonod et al., 2001; Llinas et al., 2001). En el mismo contexto, se ha reportado que el aumento en la expresión de la corriente tipo T se asocia con una variedad de enfermedades que incluyen la hipertrofia cardíaca, la hipertensión, la epilepsia y el cáncer (Chemin et al., 2002; Chen et al., 2003; Frishman et al., 1985; Hirooka et al., 2002; Mariot et al., 2002). Desafortunadamente la ausencia de bloqueadores específicos para la corriente tipo T ha retrasado en gran medida el conocimiento preciso del papel que estos canales juegan en tales alteraciones funcionales (Bean & McDonough, 1998).

Los canales  $Ca_v3$  se expresan en prácticamente todas las células excitables y en muchas no excitables. El sistema nervioso central y periférico, el corazón, el hígado, el músculo liso, los espermatozoides y en muchos otros órganos endocrinos (Perez-Reyes, 2003; Talley et al., 1999). En general, se puede hacer una buena correlación entre la distribución de las diferentes subunidades  $\alpha 1$  de canales  $Ca_v3$  y los registros electrofisiológicos de corrientes tipo T. Asimismo, las propiedades electrofisiológicas de las corrientes de los canales LVA registradas en varios tipos celulares son similares, sin embargo se han notado diferencias importantes en la inactivación de los canales y en sus propiedades farmacológicas (Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999a; Perez-Reyes et al., 1998). Una diferencia importante es la cinética de inactivación de los canales tipo T clonados, mientras que las corrientes de los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$  se inactivan rápidamente, los canales  $\alpha 1I$  lo hacen aproximadamente 6 a 8 veces más lentamente (Fig. 4). Hasta la fecha, sólo un par de preparaciones neuronales han mostrado corrientes tipo T con la cinética de las corrientes expresadas por la subunidad  $\alpha 1I$ : la habénula lateral y el núcleo reticular del tálamo (Huguenard et al., 1993; Huguenard & Prince, 1992).

## E. Bloqueadores Específicos de Canales de Calcio

Durante los últimos 20 años, la combinación de la técnica de patch clamp (ver Métodos) junto con los métodos de biología molecular han permitido ampliar nuestro conocimiento sobre los diferentes tipos de canales de calcio y el papel fisiológico que desempeñan. Un componente crucial para lograr este avance ha sido el descubrimiento de bloqueadores específicos, los cuales no sólo permitieron asignar un papel fisiológico a cada tipo de canal, sino que su alta especificidad se aprovechó para utilizarlos en el tratamiento de algunas enfermedades (Elmslie, 2004). Los bloqueadores de canales de calcio más conocidos son las DHP, mismas que se han utilizado durante muchos años para el tratamiento de enfermedades como hipertensión arterial y dolor de pecho (Abernethy & Soldatov, 2002; Mitterdorfer et al., 1998). La acción de las DHP se centra en la inhibición de las corrientes transportada por los canales tipo L que se encuentran abundantemente en el músculo liso de las arterias.

Los canales HVA clasificados como tipo No L, son blanco específico de varias toxinas de animales marinos y arañas. Las corrientes tipo P/Q, producidas por los canales  $Ca_v2.1$ , se registraron por primera vez en neuronas de Purkinje (Llinas et al., 1989) y se distinguen por su alta sensibilidad a la  $\omega$ -agatoxina IVA que proviene del veneno de una araña (Lin et al., 1990); mientras que las corrientes tipo N, producidas por los canales  $Ca_v2.2$ , son bloqueadas por la  $\omega$ -conotoxina GVIA que proviene de un caracol marino (Ahmad & Miljanich, 1988). Las corrientes tipo R, producidas por los canales  $Ca_v2.3$ , son bloqueadas específicamente por la toxina de origen sintético SNX-482, que se deriva del veneno de una tarántula (Miljanich & Ramachandran, 1995).

En contraste, las corrientes de calcio tipo T, producidas por los canales  $Ca_v3$ , no cuentan con un bloqueador selectivo (Heady et al., 2001). El compuesto orgánico mibefradil es el mejor bloqueador orgánico de los canales  $Ca_v3$ , ya que la sensibilidad de los canales HVA, es de 3 a 5 veces menor en comparación con la de los canales  $Ca_v3$  (Mishra & Hermsmeyer, 1994).

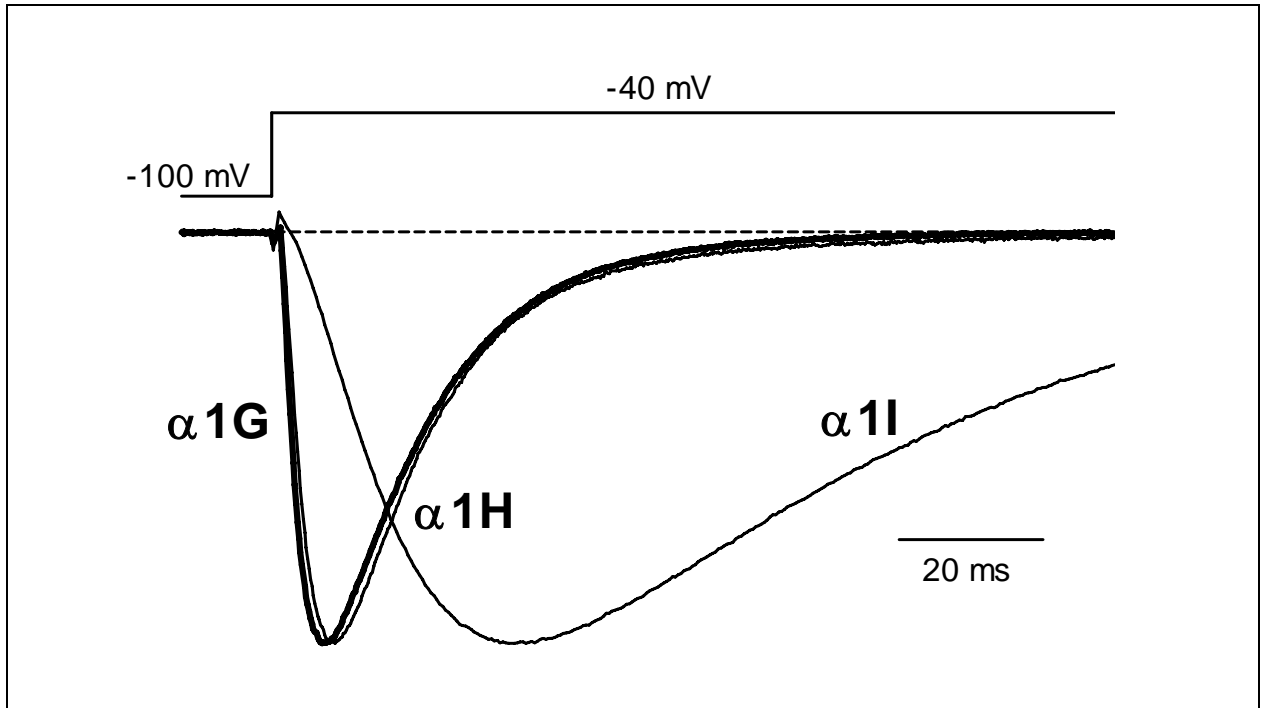


Figura 4. **La cinética de la corriente de los canales  $\alpha 1I$  es considerablemente más lenta.**

Trazos normalizados de corrientes de calcio evocadas por pulsos despolarizantes a -40 mV, en presencia de 2 mM de  $Ca^{2+}$  como acarreador de carga. Registros obtenidos de células HEK-293 establemente transfectadas con las subunidades  $\alpha 1$  que se indican (Datos no publicados del Dr. Gómora).

De hecho, el mibefradil salió al mercado como el mejor fármaco contra la hipertensión, pues a diferencia de las DHP, éste no provocaba el efecto ionotrópico asociado a la disminución de la presión arterial (Ertel et al., 1997). Desafortunadamente, la interacción farmacocinética con los metabolitos de otros fármacos provocaron la muerte de varios pacientes por lo que fue retirado del mercado (Benardeau et al., 2000). No obstante, su uso con fines de investigación básica es todavía aceptado. Por lo anterior, existe una imperiosa necesidad de desarrollar o encontrar más y mejores bloqueadores específicos que ayuden en la discriminación de los diferentes subtipos de canales  $Ca_v3$ . Sin duda, su descubrimiento sería de gran utilidad no únicamente para su uso en la clínica, sino también para ser empleado como herramientas en experimentos encaminados a investigar el funcionamiento básico de estos canales, así como para relacionar varios aspectos de su estructura con la función de los mismos.

### **1. *Cationes metálicas divalentes***

Debido a la ausencia de bloqueadores orgánicos de los canales  $Ca_v3$ , los iones inorgánicos han sido utilizados como inhibidores de la  $I_{Ca}$  para estudiar algunas propiedades biofísicas de los canales tipo T y más recientemente como herramientas para diferenciar entre subtipos de canales T (Beedle et al., 2002; Jeong et al., 2003; Lee et al., 1999b). Debido a que los iones metálicos son simples, tienen estructuras atómicas bien caracterizadas, y muestran pequeñas diferencias en su tamaño, significan una magnífica herramienta para estudiar mecanismos de permeabilidad, así como para establecer una relación entre la estructura y la función de los canales de calcio (Elinder & Arhem, 2003). Por mencionar un ejemplo, la cinética de bloqueo de los canales por los iones inorgánicos nos ha proporcionado información importante sobre el mecanismo de permeación de los iones a través de los canales iónicos (Hille, 2001; Sather & McCleskey, 2003).

Los cationes metálicos polivalentes han sido utilizados en varios estudios para bloquear las corrientes tipo T nativas (Akaike et al., 1989a; Kaneda et al., 1990; Kaneda & Akaike, 1989; Mlinar & Enyeart, 1993; Todorovic & Lingle, 1998). Las variaciones observadas en las concentraciones necesarias para inhibir la  $I_{Ca}$  de bajo

umbral, sugirió la existencia de más de un subtipo de canal LVA en tales preparaciones. Por ejemplo, el perfil de bloqueo obtenido de neuronas del hipotálamo, neuronas del hipocampo, ganglio de la raíz dorsal y músculo liso indicaron el siguiente orden preferencial de bloqueo de la  $I_{Ca}$ :  $La^{3+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$ ; el cual muestra diferencias con respecto al obtenido con células del músculo esquelético,  $La^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}$ ; o con neuronas de la amígdala,  $La^{3+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} = Cd^{2+}$  (Yunker, 2003). Hasta finales del siglo pasado, la noción más generalizada aceptaba que el  $Cd^{2+}$  era mejor bloqueador de los canales HVA que de los LVA, y el  $Ni^{2+}$  bloqueaba preferencialmente los canales LVA sobre los HVA. No obstante, para bloquear el 50% de la  $I_{Ca}$  de algunos canales LVA se requería de bajas concentraciones micromolares (10  $\mu M$ ; Mlinar & Enyeart, 1993), mientras que otras necesitaban 50 veces más bloqueador para reducir su actividad en la misma proporción (Todorovic & Lingle, 1998). Con el trabajo de Lee et al. (1999b) quedó claro que las diferencias son debidas en gran parte a la diferente sensibilidad de los canales  $Ca_v3$  clonados al bloqueo por el  $Ni^{2+}$ . En consecuencia, resulta evidente que el empleo de los iones inorgánicos es una herramienta muy útil en el estudio de las propiedades biofísicas de los canales de calcio y que pueden proporcionar información relevante acerca de la estructura y la función de este tipo de canales. Aunado a ello, la posibilidad de realizar tales estudios en canales recombinantes que permiten analizar los efectos de los iones inorgánicos en corrientes aisladas y robustas aumenta la relevancia de los resultados.

## IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### A. Hipótesis

Los antecedentes sobre la sensibilidad de los canales  $Ca_v3$  a diferentes iones inorgánicos sugieren diferencias en el bloqueo de las corrientes tipo T. Uno de los principales factores involucrados puede ser la existencia de diferentes subunidades  $\alpha1$  que integran a los canales  $Ca_v3$  ( $\alpha1G$ ,  $\alpha1H$  y  $\alpha1I$ ), sin embargo, otros factores que también deben ser considerados son el sistema celular de expresión de los canales recombinantes, el tipo de acarreador de carga y su concentración, las diferentes isoformas de las subunidades  $\alpha1$ , y el tejido específico del cual procede la subunidad  $\alpha1$ .

En base a la distinta secuencia de aminoácidos de las subunidades  $\alpha1$  de los canales  $Ca_v3$ , sería de esperarse que se encuentren diferencias en los efectos de los iones inorgánicos en los tres tipos de canales tipo T ( $Ca_v3$ ) clonados de humano. En particular, se puede hipotetizar que los canales tipo T presentarán diferencias importantes en la concentración de los cationes necesaria para bloquear el 50% de la corriente ( $IC_{50}$ ), en la relación  $I-V$ , en el efecto de potenciales extremos sobre el bloqueo de los iones inorgánicos, así como en las propiedades cinéticas de los canales.

### B. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo consiste en caracterizar los efectos de los iones inorgánicos  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  en la actividad de los canales  $Ca_v3$  clonados de humano ( $\alpha1G$ ,  $\alpha1H$  y  $\alpha1I$ ) expresados de forma estable en células HEK-293. Para cumplir con tal meta, se plantean los siguientes objetivos específicos:



## ***1. Objetivos Específicos***

- Determinar la potencia del bloqueo de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  en las subunidades  $\alpha 1\text{G}$ ,  $\alpha 1\text{H}$  y  $\alpha 1\text{I}$ , con la finalidad de obtener el valor de  $\text{IC}_{50}$  para cada uno de los cationes.
- Investigar el efecto del bloqueo de los iones inorgánicos en la relación corriente-voltaje ( $I-V$ ) de los canales  $\text{Ca}_v3$ , así como sus posibles efectos en la activación e inactivación de las corrientes.
- Caracterizar el efecto de potenciales extremos (positivos y negativos) en el bloqueo de los canales  $\text{Ca}_v3$  inducido por los diferentes iones inorgánicos.
- Analizar las colas de corriente en presencia y ausencia de los iones inorgánicos, para determinar si el cierre de los canales se modifica por el bloqueo con los mismos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Cultivo Celular

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron en células HEK-293 transfectadas establemente con las subunidades  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  ó  $\alpha 1I$ . La conveniencia de utilizar las células HEK-293 se basa en que esta línea celular inmortalizada, proveniente de riñón de embrión humano, no presenta corrientes de calcio endógenas. Por esta razón significa un excelente sistema de expresión de los canales  $Ca_v3$  clonados.

En el laboratorio del Dr. Gómora se cuenta con una reserva de células HEK-293 transfectadas establemente con las siguientes subunidades de los canales  $Ca_v3$ :  $\alpha 1G$ ,  $Ca_v3.1a$  (Número de acceso del GeneBank: AF190860; Cribbs et al., 2000);  $\alpha 1H$ ,  $Ca_v3.2$  (AF051946; Cribbs et al., 1998); y  $\alpha 1I$ ,  $Ca_v3.3$  (AF393329; Gomora et al., 2002). Las tres líneas celulares fueron una amable donación del Dr. Edward Perez-Reyes de la Universidad de Virginia de los Estados Unidos de América.

Las células fueron crecidas en monocapas sobre cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro en las siguientes condiciones de incubación: atmósfera saturada de agua y compuesta por 95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$  a 37°C. La composición del medio de cultivo fue la siguiente: 90% de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U  $ml^{-1}$  de penicilina y 100  $\mu g\ ml^{-1}$  de estreptomicina. Todos los productos químicos para el cultivo y mantenimiento de las células se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen (Carlsbad, CA).

Una o dos veces por semana (cuando la monocapa de células se encontraba entre 85 y 95% de confluencia), las células fueron despegadas con una solución que contenía 0.05% de tripsina y 0.53 mM EDTA en una solución balanceada de Hanks libre de calcio, y se disociaron mecánicamente mediante la utilización de pipetas serológicas de 10 ml. Las células fueron resembradas a una densidad aproximadamente 50 veces menor en una caja de Petri nueva, a su vez esta misma suspensión celular permitió sembrar las células sobre

cubreobjetos circulares de vidrio de 11 mm de diámetro empleados para el registro electrofisiológico. Las células sembradas en los cubreobjetos se mantuvieron en incubación hasta el momento de ser empleadas, aproximadamente 2 horas después de ser sembradas.

## **B. Electrofisiología**

### ***1. Experimentos de Fijación de Voltaje***

Para registrar la actividad macroscópica de los canales  $Ca_v3$  en las células HEK-293, se utilizó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch clamp) en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981; Marty & Neher, 1995). Los registros se obtuvieron a una temperatura de 21 a 23°C, con la ayuda de un amplificador de patch clamp Axopatch 200B, que se encontraba conectado directamente a una interfase Digidata 1322 A/D, misma que se encarga de convertir las señales analógicas provenientes de la célula en señales digitales para ser almacenadas en una computadora. La adquisición de datos fue realizada con el software de pClamp 8.02 que se encuentra instalado en la computadora y que permite diseñar y aplicar los diferentes protocolos de voltaje que se utilizan para el registro electrofisiológico. El amplificador, la interfase y el software de adquisición de datos se obtuvieron de Axon Instruments (Foster City, CA). Todos los componentes anteriores, así como sus conexiones se muestran en la Fig. 5.

Antes de iniciar los registros electrofisiológicos, un cubreobjetos con células fue colocado sobre la cámara de registro de un microscopio óptico invertido modelo Eclipse TE300 (Nikon, Japón). La solución contenida en la cámara, denominada solución externa de registro (ver Soluciones de Registro) fue recambiada constantemente por un sistema de perfusión impulsado por gravedad y controlado por una válvula de seis vías. El flujo fue de aproximadamente 1.5-2.0 ml/min. Las células fueron visualizadas con un aumento de 400X y se registraron ~5 minutos después de haber sido colocadas en la cámara, siendo reemplazadas aproximadamente cada hora con un cubreobjetos nuevo. Los electrodos de registro se fabricaron a partir de capilares de vidrio (TW150-3, WPI Inc., Sarasota, FL) con la ayuda de un estirador horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA).

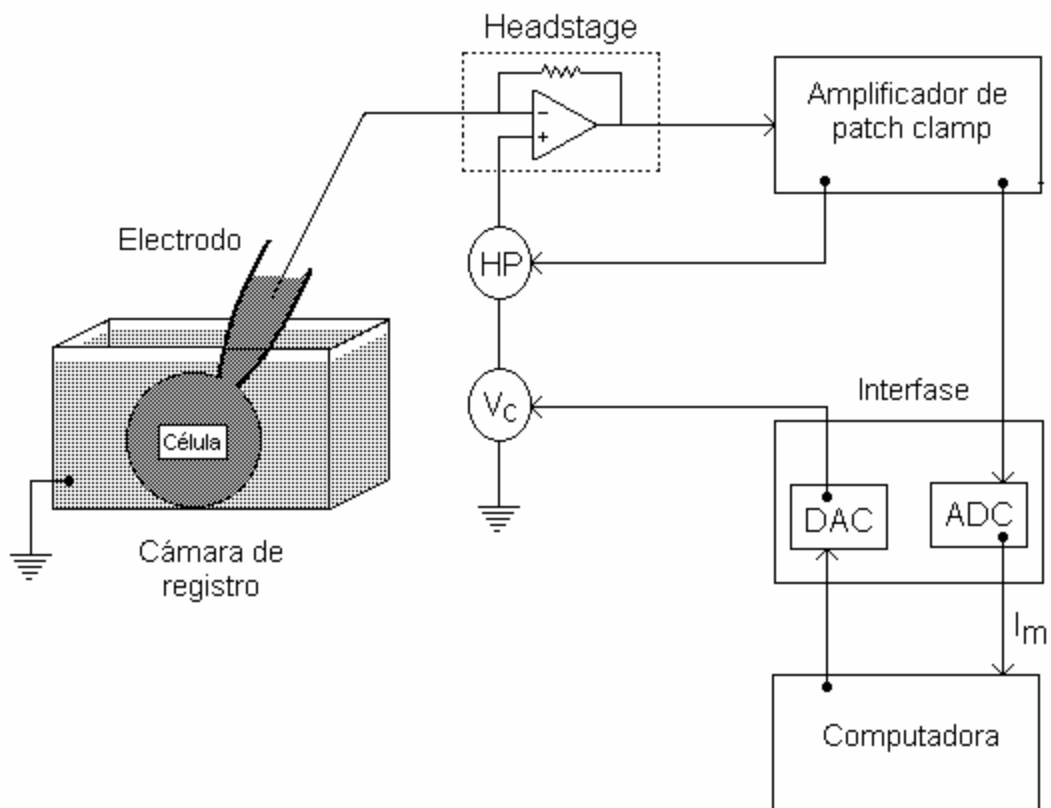


Figura 5. **Sistema de registro electrofisiológico de los experimentos de fijación de voltaje.**

Las corrientes iónicas transportadas a través de los canales de calcio se registraron con la modalidad de célula completa de la técnica de patch clamp. El transductor (headstage) controla el nivel de voltaje dentro del electrodo, a la vez que mide la corriente de la membrana ( $I_m$ ). Los pulsos comando ( $V_c$ ) se generaron en el convertidor digital-análogo (DAC) de la interfase, mientras que el potencial de mantenimiento (HP) entre cada pulso lo proporcionó el amplificador. Este mismo instrumento permitió reducir las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de los pulsos. La señal de corriente inducida por  $V_c$  fue digitalizada mediante el convertidor analógico-digital (ADC) de la interfase y capturada en el disco duro de la computadora para su posterior análisis. La  $I_m$  se visualizó en el monitor de la computadora para vigilar la formación de un sello de alta resistencia entre al punta del electrodo y la membrana celular, así como para supervisar la cancelación analógica de las espigas capacitivas.

Posteriormente, las puntas de los electrodos así obtenidos, fueron pulidas al calor con una microforja (MF-830, Narishigue Co., Japón). Para los registros se utilizaron electrodos con resistencias de 2 a 3 mega ohmios ( $M\Omega$ ) una vez llenados con la solución interna de registro (ver Soluciones de Registro).

El estudio de cada célula consistió de tres etapas iniciales. En primer lugar se obtuvo un sello de alta resistencia, igual o mayor a 1 giga ohmio ( $G\Omega$ ), entre la membrana plasmática y la punta del electrodo. Luego se aplicó un nivel estacionario de voltaje a -100 mV dentro del electrodo y se rompió el parche de membrana incluido en la punta del mismo para establecer la configuración de célula completa. Finalmente, se cancelaron de manera analógica las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos breves hiperpolarizantes de 5 mV de amplitud. Una vez completadas estas etapas, se procedió al registro de las corrientes de calcio tipo T.

## ***2. Soluciones de Registro***

Las corrientes de  $Ca^{2+}$  fueron registradas utilizando una solución externa con la siguiente composición (en mM): 175 cloruro de tetra-etil-amonio (TEA-Cl), 2  $CaCl_2$  y 10 HEPES, con un valor de pH ajustado a 7.4 con TEA-OH. La solución interna de la pipeta contenía los siguientes compuestos (en mM): 135 CsCl, 10 EGTA, 2  $CaCl_2$  (con una concentración de  $Ca^{2+}$  libre de  $\sim 28$  nM, calculado con el programa BAD), 1  $MgCl_2$ , 4 Mg-ATP, 0.3  $Na_3GTP$  y 10 HEPES, con un valor de pH ajustado a 7.3 con CsOH.

Con la finalidad de investigar el efecto de los iones inorgánicos sobre la actividad de los canales  $Ca_v3$ , se prepararon soluciones stock de 100 mM de  $CdCl_2$ ,  $NiCl_2$  y  $CoCl_2$ , mismas que se diluyeron con solución externa para obtener las concentraciones requeridas, justo al momento de ser utilizadas. Los iones inorgánicos, así como el resto de los reactivos para preparar las soluciones de registro se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

### ***3. Captura de Datos***

La actividad de los canales  $\text{Ca}_v3$  fue inducida mediante pulsos comando (protocolos de voltaje) despolarizantes de amplitud y duración variable. Los protocolos de voltaje empleados en el presente trabajo fueron básicamente cuatro y en todos ellos el potencial de mantenimiento (HP) fue de -100 mV: 1) pulso sencillo a -40 mV de 150 o 500 ms de duración. Debido a que las corrientes generadas por  $\alpha1I$  son considerablemente más lentas que las de  $\alpha1G$  y  $\alpha1H$  (Fig. 4), se emplearon pulsos más largos para registrar la actividad de los primeros. Generalmente, con este protocolo se inicia el registro de la corriente de calcio en cada célula y sirve para monitorear el efecto de los iones inorgánicos sobre la amplitud y cinética de la corriente iónica. 2) serie de pulsos despolarizantes con incrementos de 10 mV entre uno y otro, desde -80 y hasta +80 mV. La aplicación de este protocolo permite muestrear la activación de la corriente en función de un espectro de voltajes (relación  $I-V$ ). También proporciona indicios acerca de un posible efecto dependiente del voltaje del bloqueo de los canales tipo T por los metales inorgánicos. Así mismo, permite observar posibles efectos sobre la cinética de las corrientes a diferentes voltajes. 3) protocolo de dos pulsos, uno breve (2 ó 10 ms) despolarizante a +60 mV; y el segundo, más largo (25 ms) que lleva el potencial de la membrana ( $V_m$ ) a diferentes voltajes desde -180 hasta -20 mV en incrementos de 10 mV. Este protocolo nos sirvió para explorar el efecto de fuertes hiperpolarizaciones sobre la actividad de los canales bloqueados por los iones inorgánicos, mediante el análisis de las corrientes de cola que se generan en respuesta a cada uno de las repolarizaciones del protocolo. 4) serie de pulsos despolarizantes a diferentes valores de  $V_m$  desde -50 hasta +120 mV en incrementos de 10 mV, con la peculiaridad de que cada pulso es de diferente duración. La finalidad de esta última característica es la de cortar la despolarización al momento o unos microsegundos ( $\mu\text{s}$ ) después de que la corriente ha alcanzado su valor máximo a determinado voltaje. En todos los pulsos del protocolo el valor de  $V_m$  al que se repolariza la célula es de -100 mV. Este protocolo nos permitió analizar el efecto de fuertes despolarizaciones sobre la actividad de los canales bloqueados por los iones inorgánicos, de igual manera que el protocolo 3, mediante el análisis de las corrientes de cola que se generan al repolarizar la célula a -100 mV.

La eficiencia de la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa se asocia inevitablemente con los parámetros de la capacitancia de la membrana,  $C_m$ , y la resistencia en serie ( $R_s$ ), esta última, resultado de la sumatoria de la resistencia de acceso de la célula y la resistencia del electrodo. El producto  $C_m R_s$  determina la constante de tiempo con la que se instalan los cambios en  $V_m$  ocasionados por la aplicación de los pulsos de voltaje en el interior del electrodo. Por tal razón, en todos los experimentos aquí reportados se procuró que el resultado de tal producto no excediera los 50  $\mu$ s, para garantizar una excelente resolución temporal en el registro de las corrientes. Ambos parámetros ( $C_m$  y  $R_s$ ) se cancelaron de forma analógica con el amplificador de patch clamp antes de comenzar el registro de la actividad de los canales, y cuando fue necesario, se revisaron y reajustaron a lo largo del experimento. En la mayoría de los registros la corriente de fuga (corriente que se escapa a través del sello entre la punta del electrodo de registro y la membrana de la célula) asociada a la configuración de célula completa se realizó *off-line* (es decir, hasta que se analizaron los registros de corriente adquiridos con los diferentes protocolos), y esto se llevó a cabo utilizando el algoritmo de Resistencia Pasiva que se incluye en el software pClamp 8.02. En algunos casos las corrientes fueron registradas en dos canales, uno con la sustracción en línea de la corriente de fuga empleando el método P/-4, y el otro sin la sustracción de dicha corriente, para registrar la corriente cruda y monitorear la estabilidad de la célula.

Utilizando el mismo filtro del amplificador de patch clamp, las señales de corriente fueron filtradas a 5 kHz, excepto cuando los registros de corriente involucraban colas de corriente, en cuyo caso las señales se filtraron a 10 kHz. Debido a la velocidad con la que se lleva a cabo el cierre de los canales  $Ca_v3$ , el corte de frecuencias debe disminuirse con la finalidad de tener una mejor resolución de las colas de corriente. Finalmente, las señales de corriente fueron digitalizadas cada 10, 100, ó 200  $\mu$ s (dependiendo del protocolo de voltaje aplicado) con el convertidor analógico-digital de la interfase y almacenadas en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

#### 4. Análisis de Datos

Los datos electrofisiológicos fueron analizados y graficados utilizando el software de pClamp 8.2 (Clampfit) en combinación con los programas Lotus 123 9.0 y Prism 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

Para evaluar la potencia de cada uno de los iones inorgánicos como antagonistas de los canales  $Ca_v3$ , se cuantificó el efecto de concentraciones crecientes de cada uno de ellos sobre la amplitud de la corriente de calcio ( $I_{Ca}$ ). La fracción de corriente bloqueada con cada concentración se normalizó respecto a la amplitud inicial y se graficó en función de la concentración respectiva. Los datos experimentales obtenidos de esta manera se ajustaron con la ecuación de Hill incluida en el programa Prism 4:

$$Y = 1 / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * b)})$$

donde  $X$  es el logaritmo de la concentración,  $Y$  es la fracción de la corriente control que permanece después de la adición del antagonista,  $IC_{50}$  es la concentración del antagonista que causa el 50% de la inhibición de la corriente, y  $b$  es el coeficiente de Hill que indica la pendiente de la curva y la relación estequiométrica entre las moléculas bloqueadoras y su sitio de unión específico dentro del canal. Para analizar la dependencia al voltaje de la activación de la  $I_{Ca}$  se utilizó una ecuación de Boltzmann modificada para ajustar los datos experimentales de la curva  $I-V$ :

$$I = I_{\max}(V_m - V_{\text{rev}}) / (1 + \exp((V_{1/2} - V_m) / k))$$

donde  $I$  es corriente,  $V_m$  es el potencial de membrana,  $V_{\text{rev}}$  es el potencial de reversión aparente,  $V_{1/2}$  es el punto medio de la activación y  $k$  es la pendiente. Las colas de corriente se analizaron en dos etapas. Primero, la amplitud de cada una de ellas se graficó en función del potencial al que fueron generadas en ausencia y en presencia del antagonista. El valor de amplitud de la cola de corriente en presencia del antagonista se dividió entre el de la corriente control y el resultado, expresado como porcentaje y se utilizó para graficar el porcentaje de bloqueo a los distintos valores de  $V_m$ . La segunda etapa consistió en el ajuste de funciones exponenciales al decaimiento de la corriente a consecuencia de la repolarización de la membrana. La región incluida en el ajuste comenzó al pico máximo de la



cola de corriente, usualmente a los 0.15 - 0.35 ms después del corte del pulso y se extendió hasta los 15 ms. Los valores de la constante de tiempo ( $\tau$  ó tau) obtenidos con los ajustes de exponenciales, se graficaron en función del potencial de repolarización. Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar (SEM) de los valores obtenidos en diferentes células. En algunos casos fue necesario realizar pruebas de significancia estadística entre las medias y para ello se empleó la  $t$  de Student para muestras no pareadas.

## VI. RESULTADOS

### A. Construcción de Curvas Dosis-Respuesta: Mayor Sensibilidad de $\alpha 1H$ al Bloqueo por Cationes Divalentes

Para determinar de forma cuantitativa el efecto del  $Cd^{2+}$  y del  $Co^{2+}$  como bloqueadores de la  $I_{Ca}$  acarreada a través de los canales  $Ca_v3$ , se construyeron curvas dosis-respuesta para cada uno de estos canales en presencia de cada uno de los dos bloqueadores inorgánicos. Los experimentos electrofisiológicos para la construcción de curvas dosis-respuesta consistieron en la aplicación de pulsos despolarizantes a  $-40$  mV de  $150$  ms de duración, para el caso de  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$ , y de  $500$  ms en el caso de  $\alpha 1I$ , partiendo de un HP de  $-100$  mV. Un experimento típico para tal propósito realizado en una célula que expresa de manera estable canales  $\alpha 1H$  se ilustra en la Fig. 6. En el panel *A* se muestran trazos de la  $I_{Ca}$  registrada a  $-40$  mV, utilizando  $2$  mM de  $Ca^{2+}$  como acarreador de carga. En respuesta a cada despolarización se observa una deflexión hacia valores negativos de la señal de corriente (el valor cero de corriente se indica por la línea punteada), dicha deflexión es indicativa de una corriente entrante (el ion  $Ca^{2+}$  está entrando a la célula). La corriente entrante evocada por la despolarización a  $-40$  mV alcanza un valor máximo (corriente al pico,  $I_{pico}$ ) después de unos cuantos ms y posteriormente la corriente tiende a disminuir en amplitud más lentamente. En adelante, se referirá a estos dos procesos como activación e inactivación, respectivamente. Después de  $1.5$  a  $2.5$  minutos de haber establecido la configuración de célula completa, y cuando la  $I_{Ca}$  ha alcanzado un valor de amplitud estable, se inició la perfusión de diferentes concentraciones de  $Cd^{2+}$  disuelto en la solución externa de registro. Como se puede observar en la Fig. 6*A*, cada una de las concentraciones de  $Cd^{2+}$  utilizadas produjo una disminución en la amplitud de la  $I_{Ca}$  registrada a  $-40$  mV. Una vez que se alcanzó un bloqueo estacionario por la concentración de  $Cd^{2+}$  en turno, se probó el efecto de una concentración más alta, y así sucesivamente hasta lograr bloquear casi por completo la  $I_{Ca}$ . La disminución en la amplitud de la  $I_{Ca}$  se puede atribuir a la adición consecutiva de  $Cd^{2+}$ , pues al perfundir nuevamente la célula con solución

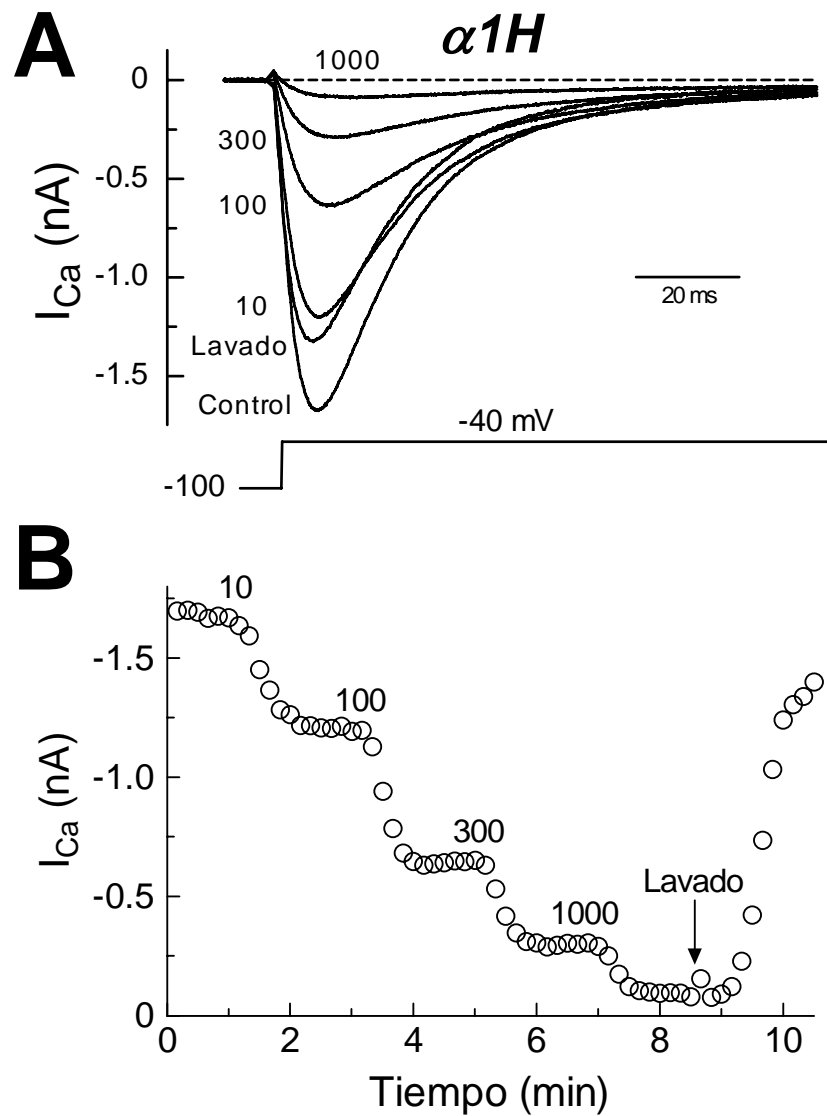


Figura 6. Bloqueo de la  $I_{Ca}$  de los canales  $\alpha 1H$  por el catión divalente  $Cd^{2+}$ .

**A)** Trazos representativos de la  $I_{Ca}$  registrada a  $-40$  mV en condiciones control, en presencia de concentraciones ( $\mu M$ ) crecientes de  $Cd^{2+}$  y después de retirar el bloqueador del baño (*Lavado*). **B)** Curso temporal del bloqueo de la  $I_{Ca}$  a  $-40$  mV para la misma célula mostrada en (**A**). Los registros se obtuvieron de una célula HEK-293 transfectada establemente con la subunidad  $\alpha 1H$ , a la cual se le aplicó el protocolo ilustrado en (**A**) cada 10 s.

externa libre de  $\text{Cd}^{2+}$ , la corriente tendió a recuperar su amplitud inicial (Fig. 6A y B).

El mismo tipo de experimentos se llevaron a cabo para investigar el efecto del  $\text{Co}^{2+}$  en la actividad de los canales  $\text{Ca}_v3$ . En la Fig. 7A se muestran los trazos representativos de la  $I_{\text{Ca}}$  que se obtuvieron en una célula HEK-293 que expresaba establemente los canales  $\alpha1\text{H}$  en respuesta a incrementos graduales de la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  en la solución externa. En la Fig. 7B se aprecia el curso temporal de la disminución de la  $I_{\text{Ca}}$  ( $I_{\text{pico}}$  a  $-40$  mV) para la misma célula del panel A. Al igual que en el caso del  $\text{Cd}^{2+}$ , el bloqueo por  $\text{Co}^{2+}$  fue reversible. Experimentos como los ilustrados en las Figs. 6 y 7 se realizaron utilizando los otros dos canales  $\text{Ca}_v3$ , es decir, canales  $\alpha1\text{G}$  y  $\alpha1\text{I}$ , con resultados cualitativamente similares.

El porcentaje de corriente bloqueada (calculada a partir de experimentos como los mostrados en las Figs. 6 y 7) a cada una de las concentraciones de los iones inorgánicos se graficó en función de la concentración correspondiente para cada uno de los canales y los resultados se presentan en la Fig. 8. En los paneles A y B se muestran curvas dosis-respuesta para el bloqueo de los canales  $\text{Ca}_v3$  por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , respectivamente. Se puede observar claramente que la actividad de los tres canales tipo T recombinantes disminuye conforme se incrementa la concentración del bloqueador inorgánico. Asimismo, se puede apreciar que la  $I_{\text{Ca}}$  transportada por el canal  $\alpha1\text{H}$  (representado con *triángulos*) es bloqueada por concentraciones más bajas de ambos bloqueadores divalentes, en comparación con los otros dos canales  $\text{Ca}_v3$ . Los datos experimentales fueron ajustados mediante la ecuación de Hill (línea continua; ver Métodos), cuyos parámetros así obtenidos se presentan en la Tabla 2. En primer lugar, en todos los casos el coeficiente de Hill ( $h$ ), presentó valores muy cercanos a 1 (0.7 a 1.2), lo cual sugiere una relación estequiométrica 1:1 entre la molécula bloqueadora y el sitio de unión en la proteína del canal. Dicha característica prevalece también en el bloqueo por  $\text{Ni}^{2+}$  (Lee et al., 1999b), cuyos parámetros se muestran en la Tabla 2 para fines comparativos. Así como en el bloqueo por otros compuestos inorgánicos de los canales tipo T (Beedle et al., 2002; Mlinar & Enyeart, 1993). Por otra parte, la comparación de los valores de  $\text{IC}_{50}$  de la Tabla 2 permite concluir que los canales  $\alpha1\text{H}$  son los más

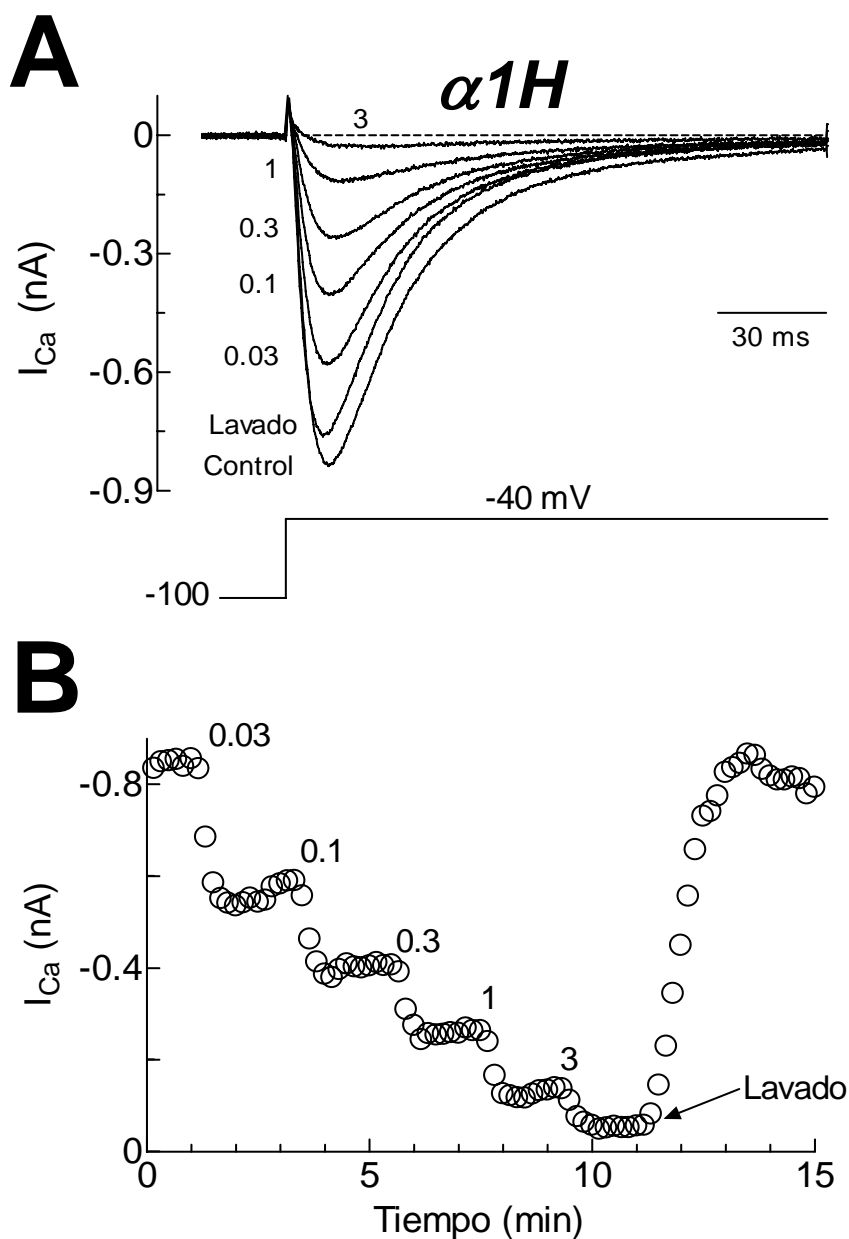


Figura 7. Bloqueo de la  $I_{Ca}$  de los canales  $\alpha 1H$  por el catión divalente  $Co^{2+}$ .

**A)** Trazos representativos de la  $I_{Ca}$  registrada a  $-40$  mV en condiciones control, en presencia de concentraciones ( $\mu M$ ) crecientes de  $Co^{2+}$  y después de retirar el bloqueador del baño (*Lavado*). **B)** Curso temporal del bloqueo de la  $I_{Ca}$  a  $-40$  mV para la misma célula mostrada en **A)**. Los registros se obtuvieron de una célula HEK-293 transfectada establemente con la subunidad  $\alpha 1H$ , a la cual se le aplicó el protocolo ilustrado en **A)** cada 10 s.

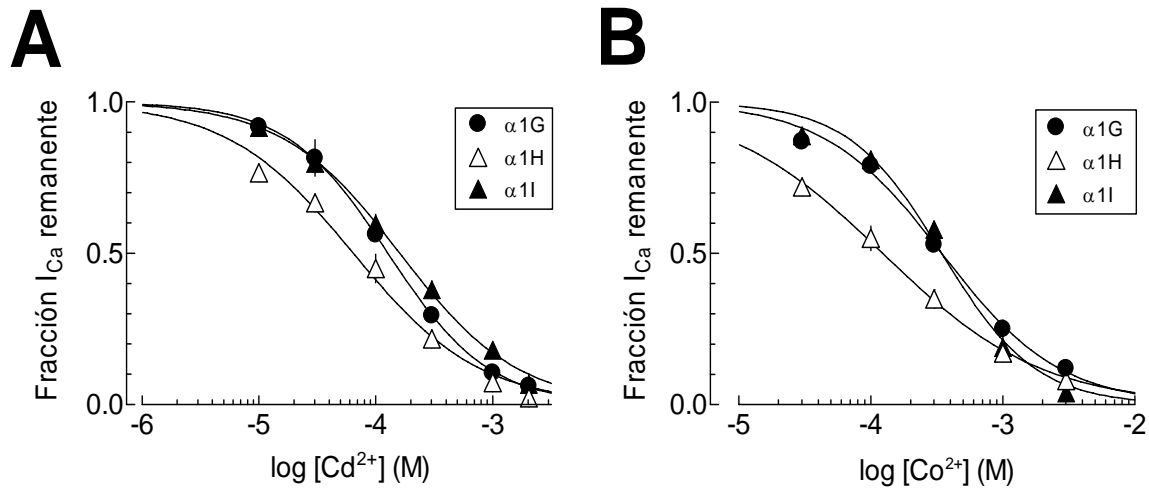


Figura 8. **Curvas dosis-respuesta del bloqueo de canales  $Ca_v3$  por  $Cd^{2+}$  y  $Co^{2+}$ .**

Inhibición de la  $I_{Ca}$  generada por canales  $\alpha1G$ ,  $\alpha1H$  y  $\alpha1I$  en función de la concentración de  $Cd^{2+}$  (**A**) y  $Co^{2+}$  (**B**). La fracción de  $I_{Ca}$  remanente se calculó a partir de la siguiente expresión:  $1 - (I_{pico}^{Me^{2+}} / I_{pico}^{Control})$ , donde el divisor y el dividendo son los valores de la corriente al pico a  $-40$  mV registrada en presencia y en ausencia del metal divalente, respectivamente. Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos experimentales ( $n = 4-7$ , para cada concentración) con la ecuación de Hill (ver Métodos). Los parámetros de dicho análisis se presentan en la Tabla 4. Nótese que la subunidad más sensible al bloqueo por los cationes divalentes es  $\alpha1H$ .

Tabla 2. **Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas dosis-respuesta.**

	$\alpha1G$		$\alpha1H$		$\alpha1I$	
	$IC_{50}$	$h$	$IC_{50}$	$H$	$IC_{50}$	$h$
$Cd^{2+}$	128	<b>-1.0</b>	65	<b>-0.8</b>	157	<b>-0.9</b>
$Co^{2+}$	335	<b>-0.9</b>	122	<b>-0.7</b>	345	<b>-1.2</b>
<sup>a</sup> $Ni^{2+}$	250	<b>-1.0</b>	12	<b>-0.8</b>	216	<b>-0.9</b>

Se presentan los datos de  $IC_{50}$  y el coeficiente de Hill obtenidos al ajustar los datos experimentales de la Figura 8 con la ecuación de Hill. Los números en negritas indican la subunidad más sensible a cada uno de los antagonistas. <sup>a</sup>Datos tomados de Lee et al., 1999b. Los valores de  $IC_{50}$  se expresan en  $\mu M$ .

sensibles de la subfamilia  $Ca_v3$  al bloqueo por  $Cd^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , pues sus corrientes son bloqueadas con concentraciones 2-3 veces más bajas que las requeridas para bloquear un porcentaje similar de las corrientes expresadas por los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$ . La concentración a la cual se logró bloquear el 50% de la  $I_{Ca}$  fue 65 y 122  $\mu M$  de  $Cd^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , respectivamente (Tabla 2). No obstante, dicha diferencia en sensibilidad no es tan grande como la que se manifiesta en el caso del  $Ni^{2+}$ , del cual se requieren concentraciones cercanas a 10  $\mu M$  para bloquear el 50% de los canales  $\alpha1H$ , mientras que los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$  requieren concentraciones 20 veces más altas para ser bloqueados en la misma proporción (Tabla 2).

## B. Curvas Corriente-Voltaje

La relación corriente-voltaje ( $I-V$ ) se determina aplicando una serie de despolarizaciones graduales que exploran el valor máximo de la corriente en cuestión dentro un amplio espectro de voltajes. En la Fig. 9A se muestran los registros de corriente obtenidos de una célula HEK-293 que expresa canales  $\alpha1G$ , en respuesta a la aplicación de un protocolo de voltaje diseñado para determinar la  $I-V$  de la  $I_{Ca}$  de dicha célula. El protocolo de voltaje se ilustra en la parte baja de la misma figura. A partir de un HP de -100 mV, se aplicaron despolarizaciones que llevaron el  $V_m$  a valores desde -80 hasta +80 mV en incrementos de 10 mV, con una duración de 100 ms cada uno de ellos. Después de cada pulso, la célula es mantenida a -100 mV durante 10 s, para permitir que los canales activados durante el potencial de prueba se recuperen de la inactivación. El protocolo se aplicó a la célula en ausencia (*Control*), en presencia de 200  $\mu M$  de  $Cd^{2+}$  ( $Cd^{2+}$ ), y después de retirar el  $Cd^{2+}$  de la cámara de registro (*Lavado*).

En respuesta a la despolarización de la membrana, la  $I_{Ca}$  que fluye a través de los canales  $\alpha1G$  comienza a ser evidente cuando la membrana se despolariza a -60 mV. A potenciales relativamente negativos, la corriente se activa de forma lenta, razón por la cual requiere de decenas de milisegundos para alcanzar el pico de la corriente, además de que la corriente también se inactiva lentamente a estos voltajes. En cambio, a potenciales más

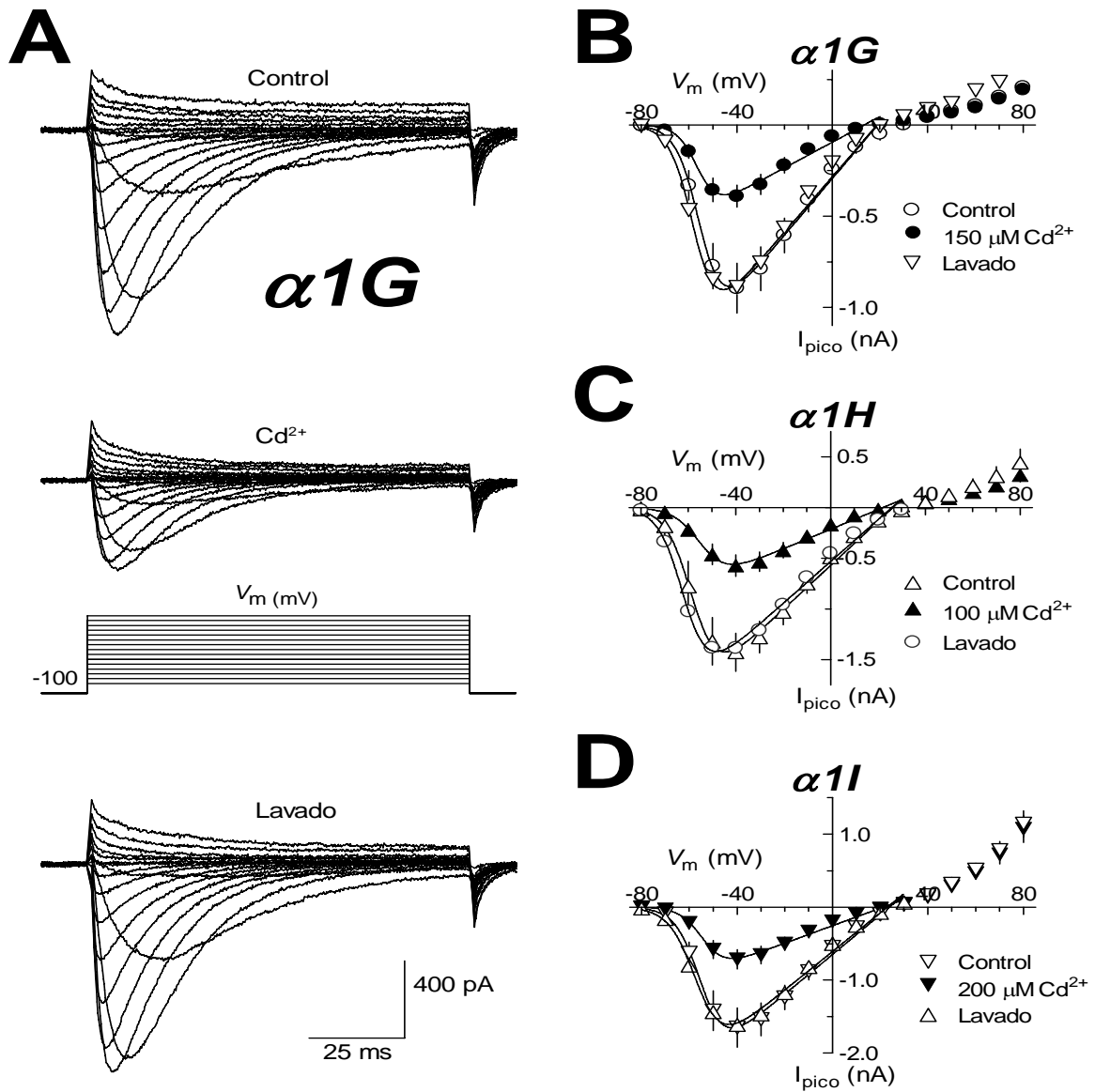


Figura 9. Efecto del  $Cd^{2+}$  sobre la relación  $I-V$  de los canales  $Ca_v3$ .

**A)** Típica familia de corrientes  $\alpha 1G$  obtenidas antes (*Control*), en presencia ( $Cd^{2+}$ ) y después de la exposición (*Lavado*) a 150  $\mu M$  de  $Cd^{2+}$ . Las corrientes fueron evocadas al aplicar pulsos despolarizantes de 100 ms de duración a diferentes valores de  $V_m$  (entre -80 y +80 mV) en escalones de 10 mV, a partir de un HP de -100 mV. Relación  $I-V$  de los canales  $\alpha 1G$  (**B**),  $\alpha 1H$  (**C**), y  $\alpha 1I$  (**D**) para cada una de las condiciones experimentales indicadas. Los puntos experimentales son el promedio  $\pm$  SEM del pico de la corriente máxima ( $I_{pico}$  o  $I_{max}$ ) medida a los diferentes voltajes explorados ( $n = 4-5$  células para cada canal). Las líneas continuas indican el ajuste de los datos con la ecuación modificada de Boltzmann (ver Métodos). Los parámetros ajustados se presentan en la Tabla 3.



despolarizados, tanto la activación como la inactivación son más rápidas, de tal manera que entre más positivo es el voltaje de pulso despolarizante, la corriente se hace cada vez más rápida y el pico máximo de la corriente se alcanza más rápidamente. Esta característica produce un patrón típico, denominado “criss-crossing” (entrecruzamiento), en el que los registros de corriente cruzan por encima de los anteriores (Fig. 9A). Tal comportamiento se debe a la rápida y casi completa inactivación de los canales  $Ca_v3$  (Perez-Reyes, 2003). En cada una de las familias de trazos de la Fig. 9A se observa que a determinados valores de  $V_m$  la corriente cambia de dirección, de entrante a saliente. Es decir, en un rango de voltajes los canales conducen corriente hacia fuera de la célula (ilustrado como una deflexión hacia valores positivos de la señal de corriente) en lugar de hacerlo hacia adentro de la misma. En nuestras condiciones de registro las corrientes entrantes son transportadas por iones  $Ca^{2+}$  (2 mM), mientras que las corrientes salientes son generadas por el movimiento de iones  $Cs^+$  (135 mM) hacia el exterior de la célula, ya que estos pueden ser transportados por los canales  $Ca_v3$  a tales voltajes (ver Soluciones de Registro).

A simple vista, el efecto más visible del  $Cd^{2+}$  en la  $I_{Ca}$  de los canales  $\alpha1G$ , es una disminución en la amplitud de las corrientes entrantes (comparar trazos de *Control* y de  $Cd^{2+}$  de la Fig. 9A). Por su parte, la amplitud de las corrientes salientes no parece ser afectada de manera significativa. El efecto de los diferentes iones inorgánicos en la actividad funcional de los canales  $Ca_v3$  se investigó empleando concentraciones ligeramente por arriba de los valores obtenidos de  $IC_{50}$  (Tabla 2), con la idea de evaluar los efectos cuando la  $I_{Ca}$  se ha bloqueado alrededor de 55-65%. Para analizar con mayor detalle tales efectos, se midió la amplitud máxima de la  $I_{Ca}$  ( $I_{pico}$ ) de cada uno de los trazos de corriente, y se graficó en función del  $V_m$  correspondiente, para cada una de las tres condiciones experimentales ilustradas en la Fig. 9A. Los resultados se concentran en el panel B de la Fig. 9. Los resultados correspondientes a los canales  $\alpha1H$  y  $\alpha1I$  se muestran en los paneles C y D. En los tres tipos de canales, la  $I_{Ca}$  empieza a ser detectable alrededor de -70 mV, y tiende a aumentar en amplitud considerablemente hasta -40 mV, valor al que se alcanza el pico de la curva  $I-V$ . Posteriormente, la corriente tiende a disminuir en amplitud conforme el valor de

$V_m$  de la despolarización se aproxima al potencial de reversión ( $V_{rev}$ ) aparente de la corriente (es decir, el valor de  $V_m$  donde la amplitud de la corriente es cero). En los experimentos ilustrados en la Fig. 9B-D, el valor de  $V_{rev}$  se alcanza entre +30 y +40 mV. Los gráficos también confirman la observación inicial de que el principal efecto del  $Cd^{2+}$  (*símbolos llenos*) en la actividad de los canales  $Ca_v3$  consiste en una reducción considerable en la amplitud de las corrientes entrantes sin afectar mayormente a las corrientes salientes. Las gráficas también indican que el pico de la curva  $I-V$  no se modifica por la presencia del  $Cd^{2+}$  en la solución que baña las células. Los datos experimentales de cada una de las relaciones  $I-V$  fueron ajustados con una función Boltzmann modificada que considera la fuerza impulsora para el flujo de corriente (ver Métodos). Los mejores ajustes con esta ecuación se representan por las líneas continuas trazadas sobre los puntos experimentales, y los parámetros que describen tales ajustes se presentan en la Tabla 3. Los dos parámetros más informativos de las  $I-V$  ajustadas son el valor de  $V_{1/2}$  y  $V_{rev}$ . El primero indica el valor de  $V_m$  al cual se alcanza la activación del 50% de la corriente máxima, y el  $V_{rev}$  el  $V_m$  al cual el flujo neto de corriente es cero.

El análisis de los datos de la Tabla 3 concernientes al  $Cd^{2+}$  indica que los valores de  $V_{1/2}$  no difieren significativamente en la ausencia o presencia del bloqueador inorgánico cuando se experimenta con los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ . Sin embargo, en los canales  $\alpha 1H$  el valor de  $V_{1/2}$  se desplaza 3.6 mV hacia voltajes menos negativos en presencia del  $Cd^{2+}$ . Un efecto más claro, no obstante, se observa en el  $V_{rev}$  de los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$ , mismo que se desplaza 5.6 y 4.2 mV, respectivamente, hacia voltajes menos positivos por la acción del  $Cd^{2+}$ . El efecto fue menos acentuado en el caso de los canales  $\alpha 1I$ , en los que se observó un cambio más pequeño (aunque de igual manera, estadísticamente significativo) de sólo 2.6 mV. Considerando que el  $V_{rev}$  es una referencia de la interacción que existe entre el ion permeante (en este caso el  $Ca^{2+}$ ) y su sitio de unión en el poro del canal (es decir, el filtro de selectividad), y que dicha interacción puede ser modificada por la acción de un bloqueador ( $Cd^{2+}$ , por ejemplo) cuyo sitio de unión puede ser el mismo que el del ion permeante o algún otro sitio ubicado en la ruta de permeación del canal, entonces, los resultados de la

Tabla 3. Valores de  $V_{\text{rev}}$  y  $V_{1/2}$  obtenidos de los ajustes de las curvas  $I$ - $V$ .

		Control		Bloqueador inorgánico		Lavado	
		$V_{\text{rev}}$	$V_{1/2}$	$V_{\text{rev}}$	$V_{1/2}$	$V_{\text{rev}}$	$V_{1/2}$
$\text{Cd}^{2+}$	$\alpha 1\text{G}$	$19.0 \pm 0.6$	<b><math>-55.0 \pm 0.3</math></b>	$13.4 \pm 0.8^*$	<b><math>-56.1 \pm 0.4</math></b>	$18.8 \pm 0.7$	<b><math>-57.8 \pm 0.3</math></b>
	$\alpha 1\text{H}$	$26.3 \pm 0.8$	<b><math>-57.9 \pm 0.4</math></b>	$22.1 \pm 0.8^*$	<b><math>-54.3 \pm 0.5^*</math></b>	$25.9 \pm 0.8$	<b><math>-59.6 \pm 0.3</math></b>
	$\alpha 1\text{I}$	<b><math>23.8 \pm 0.6</math></b>	<b><math>-54.7 \pm 0.3</math></b>	<b><math>21.2 \pm 0.7^*</math></b>	<b><math>-53.9 \pm 0.4</math></b>	<b><math>23.0 \pm 0.6</math></b>	<b><math>-56.6 \pm 0.4</math></b>
$\text{Co}^{2+}$	$\alpha 1\text{G}$	<b><math>25.7 \pm 0.7</math></b>	$-56.3 \pm 0.3$	<b><math>26.3 \pm 0.5</math></b>	$-49.3 \pm 0.3^*$	<b><math>23.5 \pm 0.8</math></b>	<b><math>-59.5 \pm 0.4</math></b>
	$\alpha 1\text{H}$	<b><math>27.7 \pm 0.5</math></b>	<b><math>-49.4 \pm 0.2</math></b>	<b><math>24.3 \pm 0.4^*</math></b>	<b><math>-48.9 \pm 0.3</math></b>	<b><math>24.2 \pm 0.5</math></b>	<b><math>-53.6 \pm 0.3</math></b>
	$\alpha 1\text{I}$	<b><math>23.7 \pm 0.6</math></b>	$-50.0 \pm 0.3$	<b><math>23.9 \pm 0.3</math></b>	$-41.2 \pm 0.2^*$	<b><math>22.7 \pm 0.7</math></b>	<b><math>-52.2 \pm 0.4</math></b>
$\text{Ni}^{2+}$	$\alpha 1\text{G}$	<b><math>23.2 \pm 1.1</math></b>	$-53.7 \pm 0.6$	<b><math>23.0 \pm 0.8</math></b>	$-49.7 \pm 0.5^*$	<b><math>19.7 \pm 0.9</math></b>	<b><math>-55.1 \pm 0.5</math></b>
	$\alpha 1\text{H}$	<b><math>27.3 \pm 0.7</math></b>	<b><math>-56.3 \pm 0.3</math></b>	<b><math>24.9 \pm 0.6^*</math></b>	<b><math>-53.7 \pm 0.4^*</math></b>	<b><math>25.7 \pm 0.8</math></b>	<b><math>-61.2 \pm 0.4</math></b>
	$\alpha 1\text{I}$	<b><math>19.9 \pm 0.6</math></b>	$-55.7 \pm 0.3$	<b><math>20.9 \pm 0.5</math></b>	$-50.7 \pm 0.3^*$	<b><math>22.0 \pm 0.9</math></b>	<b><math>-58.1 \pm 0.5</math></b>

Los valores se expresan en mV. En los casos en los que los promedios de las condiciones *Control* y *Bloqueador inorgánico* fueron estadísticamente diferentes se indican con un (\*) si el valor de  $P$  fue  $<0.01$ . El número de células varía de 3 a 7 para cada condición.

Tabla 3 sugieren que el sitio de unión al  $\text{Cd}^{2+}$  en los canales  $\alpha 1\text{I}$  podría tener una tasa de disociación más lenta comparada con la de los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{H}$ . La disociación más lenta del  $\text{Cd}^{2+}$  de su sitio de unión en el canal (donde quiera que éste se encuentre), explicaría porque el voltaje al cual el  $\text{Cs}^+$  logra fluir a través del canal  $\alpha 1\text{I}$  es casi el mismo en ausencia o presencia del  $\text{Cd}^{2+}$ . Por el contrario, en los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{H}$  se requiere de un  $V_m$  menos positivo cuando el sitio de unión se encuentra ocupado por el  $\text{Cd}^{2+}$ , para que el  $\text{Cs}^+$  pueda fluir a través del canal.

La misma serie de experimentos que se realizaron para investigar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  en los canales  $\text{Ca}_v3$ , se repitieron para estudiar el efecto del  $\text{Co}^{2+}$  y del  $\text{Ni}^{2+}$ . Los resultados correspondientes se presentan de manera resumida en la Fig. 10. Para mayor claridad, en la figura se muestran sólo los datos obtenidos en condiciones control y en presencia del bloqueador inorgánico respectivo. Nuevamente, el efecto más evidente producido por la presencia de  $\text{Co}^{2+}$  ó  $\text{Ni}^{2+}$  en los tres tipos de canales fue la reducción significativa en la amplitud de corriente a voltajes por debajo del  $V_{\text{rev}}$ , y una mínima modificación en la amplitud de las corrientes salientes. Estos datos sugieren que los cationes divalentes  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  actúan como bloqueadores del “canal abierto” (Lansman et al., 1986; Swandulla & Armstrong, 1989). En otras palabras, el sitio de unión de estos bloqueadores inorgánicos se encuentra en la misma ruta que sigue el ion permeante para atravesar el canal de un lado a otro de la membrana. De hecho, el sitio de unión pudiera ser el mismo al que se une el  $\text{Ca}^{2+}$  en el filtro de selectividad de los canales  $\text{Ca}_v3$ . En cualquiera de las dos posibilidades, la presencia del bloqueador inorgánico en el sitio de unión impediría el flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula (inhibición de corrientes entrantes), mientras que a valores de  $V_m$  más positivos que el  $V_{\text{rev}}$ , la fuerza impulsora para la salida del ion  $\text{Cs}^+$  (en nuestras condiciones experimentales) es muy grande de tal manera que “despega” al bloqueador inorgánico del sitio de unión y lo saca de la ruta de permeación del canal, permitiendo el flujo de iones  $\text{Cs}^+$  hacia el exterior de la célula (mínimo efecto en corrientes salientes).

Los datos experimentales de la Fig. 10 se ajustaron bien a la función de Boltzmann (*líneas continuas*). Los parámetros ajustados para cada relación  $I-V$  se muestran también en la

Tabla 3. Al igual que en el caso del  $\text{Cd}^{2+}$ , los valores de  $V_{\text{rev}}$  de los canales  $\alpha 1\text{H}$  se desplazaron de manera significativa hacia voltajes menos positivos (3.4 mV con  $\text{Co}^{2+}$  y 2.4 mV con  $\text{Ni}^{2+}$ ). Sin embargo, un efecto más pronunciado, que se puede observar incluso en los datos de la Fig. 10 (note que el pico de la curva I-V obtenida en presencia del bloqueador inorgánico se desplaza hacia la derecha en las gráficas de los extremos), es la modificación de la dependencia al voltaje de la activación de la  $I_{\text{Ca}}$  de los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{I}$  inducida por ambos bloqueadores inorgánicos (Tabla 3). Los valores de  $V_{1/2}$  se desplazaron a voltajes menos negativos entre 4 y 9 mV. El efecto más drástico se observó en los canales  $\alpha 1\text{I}$ , cuyo valor medio de activación de la corriente cambio de  $-50.0 \pm 0.3$  mV a  $-41.2 \pm 0.2$  mV. Un cambio menos evidente, aunque significativo, se observó en los canales  $\alpha 1\text{H}$  en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ , en tal condición el valor de  $V_{1/2}$  se desplazó 2.6 mV hacia voltajes menos negativos.

### ***1. El bloqueo producido por $\text{Co}^{2+}$ y $\text{Ni}^{2+}$ es más potente a potenciales negativos***

Los datos mostrados en la Tabla 3, así como los de las Figs. 9 y 10, indican que el efecto producido por la acción de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  fue claramente distinto al observado con  $\text{Cd}^{2+}$ . Mientras que los primeros dos tienen un efecto apreciable sobre la dependencia al voltaje de la activación de la  $I_{\text{Ca}}$  generada por los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{I}$ , el último sólo tiene un efecto modesto sobre el  $V_{1/2}$  de la curva  $I-V$  de los canales  $\alpha 1\text{H}$ . Para analizar con mayor detalle el bloqueo dependiente de voltaje de la  $I_{\text{Ca}}$ , se calculó el porcentaje de la corriente bloqueada por la acción de los diferentes iones inorgánicos en los tres tipos de canales  $\text{Ca}_v3$ , y se graficó en función del voltaje correspondiente (Fig. 11 A, C y E). Trazos representativos de la  $I_{\text{Ca}}$  a -60 y -20 mV en ausencia y presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  obtenidos de células HEK-293 que expresan de manera estable canales  $\text{Ca}_v3$  se presentan para fines de comparación (Fig. 11 B, D y F). Como ya se había mencionado, los canales  $\alpha 1\text{H}$  presentaron efectos muy discretos en cuanto al bloqueo dependiente de voltaje inducido por cualesquiera de los tres bloqueadores inorgánicos, pues el porcentaje de la  $I_{\text{Ca}}$  bloqueada en el rango de voltajes de -60 a +10 mV fue muy parecido (Fig. 11C). Este resultado se puede constatar al comparar la proporción de corriente remanente a -60 y -20 mV en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$

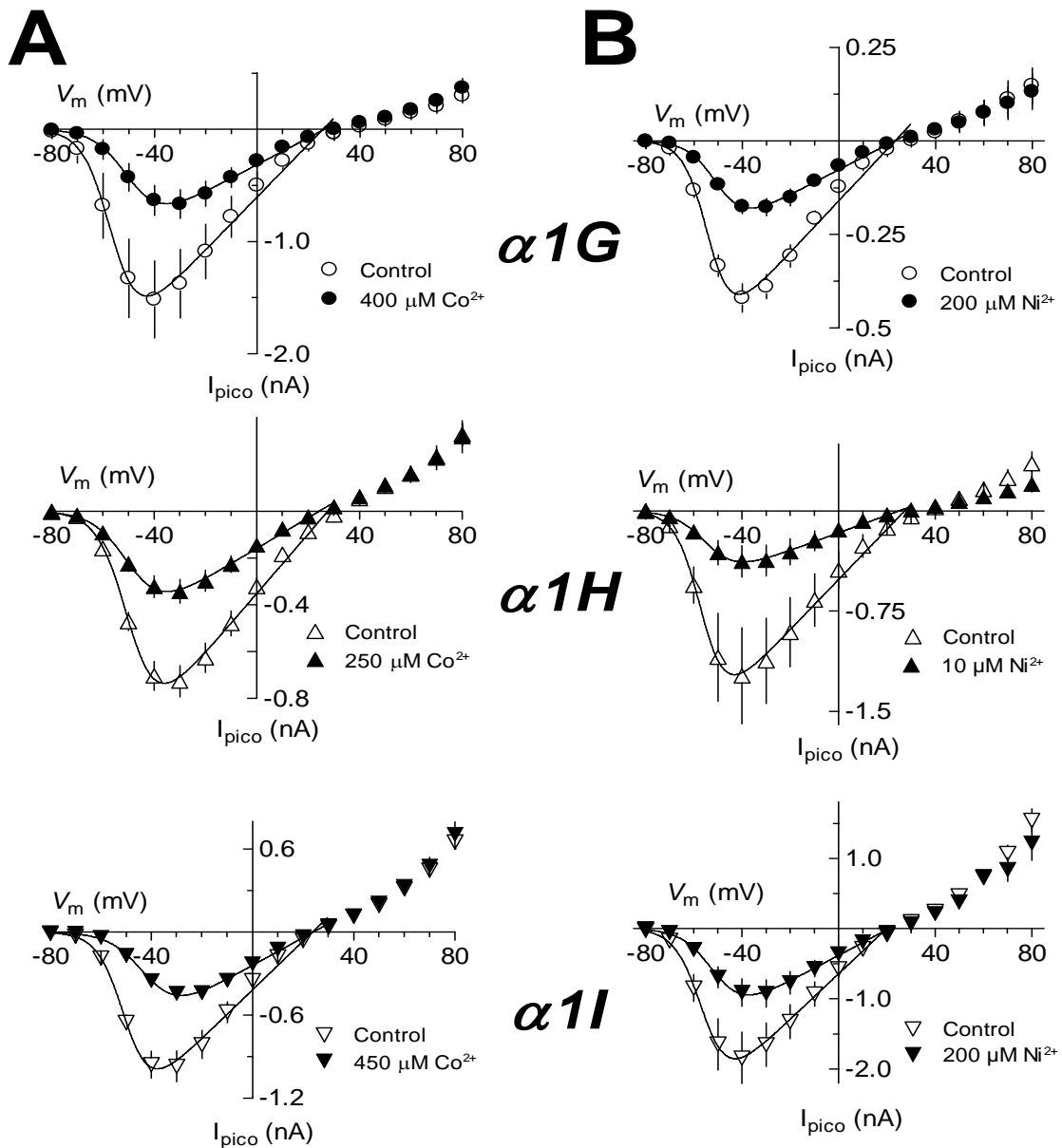


Figura 10. Efecto del  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  sobre la relación  $I$ - $V$  de los canales  $\text{Ca}_v3$ .

Relación  $I$ - $V$  de los canales  $\text{Ca}_v3$  en ausencia y presencia de  $\text{Co}^{2+}$  (A) y  $\text{Ni}^{2+}$  (B). Los puntos experimentales son el promedio  $\pm$  SEM del pico de la corriente medida a los diferentes voltajes explorados ( $n = 4$ -5 células para cada canal). Las líneas continuas indica el ajuste de los datos con la ecuación modificada de Boltzmann (ver Métodos). Los parámetros ajustados se presentan en la Tabla 3.

(registros de corrientes más pequeñas, Fig. 11D) con las correspondientes corrientes control (registros de corrientes más grandes, Fig. 11D). A ambos voltajes, la amplitud de la corriente control disminuye aproximadamente a la mitad en presencia del bloqueador inorgánico. Por el contrario, los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$  manifestaron un pronunciado bloqueo dependiente de voltaje en presencia de  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  (Fig. 11A y E), caracterizado por un bloqueo más fuerte a voltajes negativos (comparar los trazos de  $Co^{2+}$  a -60 mV con aquellos a -20 mV en Fig. 11B y D). En ambos tipos de canales, el bloqueo por  $Co^{2+}$  inhibe casi dos veces más corriente a -60 mV que a 0 mV (Fig. 11E y F). Un efecto menos fuerte, pero también muy evidente en la Fig. 11A, fue el producido por  $Cd^{2+}$  en los canales  $\alpha 1G$ ; sin embargo, en este caso, el porcentaje de bloqueo se incrementó conforme se acentuaba la despolarización del  $V_m$ . El porcentaje de corriente bloqueada aumentó de  $56 \pm 3$  a -60 mV hasta  $81 \pm 6$  a -20 mV ( $n = 5$  células).

Los resultados expuestos en el párrafo anterior son consistentes con trabajos previos que reportan una falta de bloqueo dependiente de voltaje en la inhibición de corrientes de los canales  $\alpha 1H$  por  $Ni^{2+}$  (Lee et al., 1999b; Mlinar & Enyeart, 1993), y también con el desplazamiento de la curva de activación dependiente de voltaje hacia potenciales más positivos de los canales  $\alpha 1G$  en presencia de 1 mM de  $Ni^{2+}$  pero no con 1 mM de  $Cd^{2+}$  (Lacinova et al., 2000). El bloqueo dependiente de voltaje de la  $I_{Ca}$  observado con  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  fue acompañado de modestas pero significativas modificaciones en la cinética de la corriente, principalmente en la inactivación de las corrientes registradas a voltajes entre -60 y -30 mV. La constante de tiempo de la inactivación se enlenteció alrededor de un 25-50% en los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ . Los canales  $\alpha 1H$  no presentaron tales cambios. Los efectos en la cinética de la corriente concuerdan con la observación de que el bloqueo de  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  fue más débil a potenciales positivos que a voltajes negativos (Fig. 11A y E). En presencia de antagonistas (bloqueadores) como el  $Co^{2+}$  y el  $Ni^{2+}$ , los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$  pueden desbloquearse (liberarse del bloqueo) durante el pulso a voltajes positivos, lo que se reflejaría como un enlentecimiento aparente de la inactivación de la corriente. Por otra parte, el  $Cd^{2+}$  aceleró ligeramente la constante de tiempo de los canales  $\alpha 1G$  a voltajes entre -30 y +20 mV

(datos no mostrados). En este caso, debido a que el bloqueo inducido por  $\text{Cd}^{2+}$  fue más potente a voltajes positivos (Fig. 11A y D), entonces el bloqueo del canal ocurre durante el pulso despolarizante, generando tasas de inactivación más rápidas (Gomora et al., 2001).

### C. Colas de Corriente

Los canales  $\text{Ca}_v3$  clonados, al igual que los canales  $\text{Ca}_v3$  nativos, presentan la característica de cerrarse lentamente en respuesta a la repolarización de la membrana, produciendo con ello colas de corriente (Fig. 12A). Las colas de corriente se originan por el incremento en la fuerza impulsora para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a voltajes negativos asociado al cierre de los canales (promovido por la repolarización del  $V_m$ ) que se encontraban abiertos justo al momento de cortar el pulso despolarizante. Por lo tanto, las colas de corriente representan el cierre o desactivación de los canales abiertos que no se inactivaron durante el pulso despolarizante. El curso temporal con el que tal evento sucede puede ser ajustado por funciones exponenciales, generalmente una, aunque como veremos más adelante, algunas corrientes requieren de dos exponenciales para describir adecuadamente su desactivación.

#### 1. *Efecto de voltajes extremos en las colas de corriente de los canales $\text{Ca}_v3$*

Con el propósito de investigar con mayor detalle el efecto bloqueador de los iones inorgánicos en la actividad de los canales tipo T, diseñamos protocolos de voltaje para registrar colas de corriente para explorar la posibilidad de que valores extremos de  $V_m$  pudieran liberar a los canales tipo T del bloqueo ejercido por los antagonistas inorgánicos (desbloqueo). En primer lugar, aplicamos un protocolo de voltaje diseñado para registrar colas de corriente a diferentes valores de  $V_m$  después de un pulso que activó los canales a +60 mV por un breve período de tiempo de tal forma que la inactivación de los canales prácticamente no tenga lugar. Cuando los registros se obtuvieron de canales  $\alpha 1G$  ó  $\alpha 1H$ , la duración del pulso activante fue de 2 ms, y cuando se registraron los canales  $\alpha 1I$ , la duración fue de 10 ms. El protocolo, los trazos representativos y el análisis de los



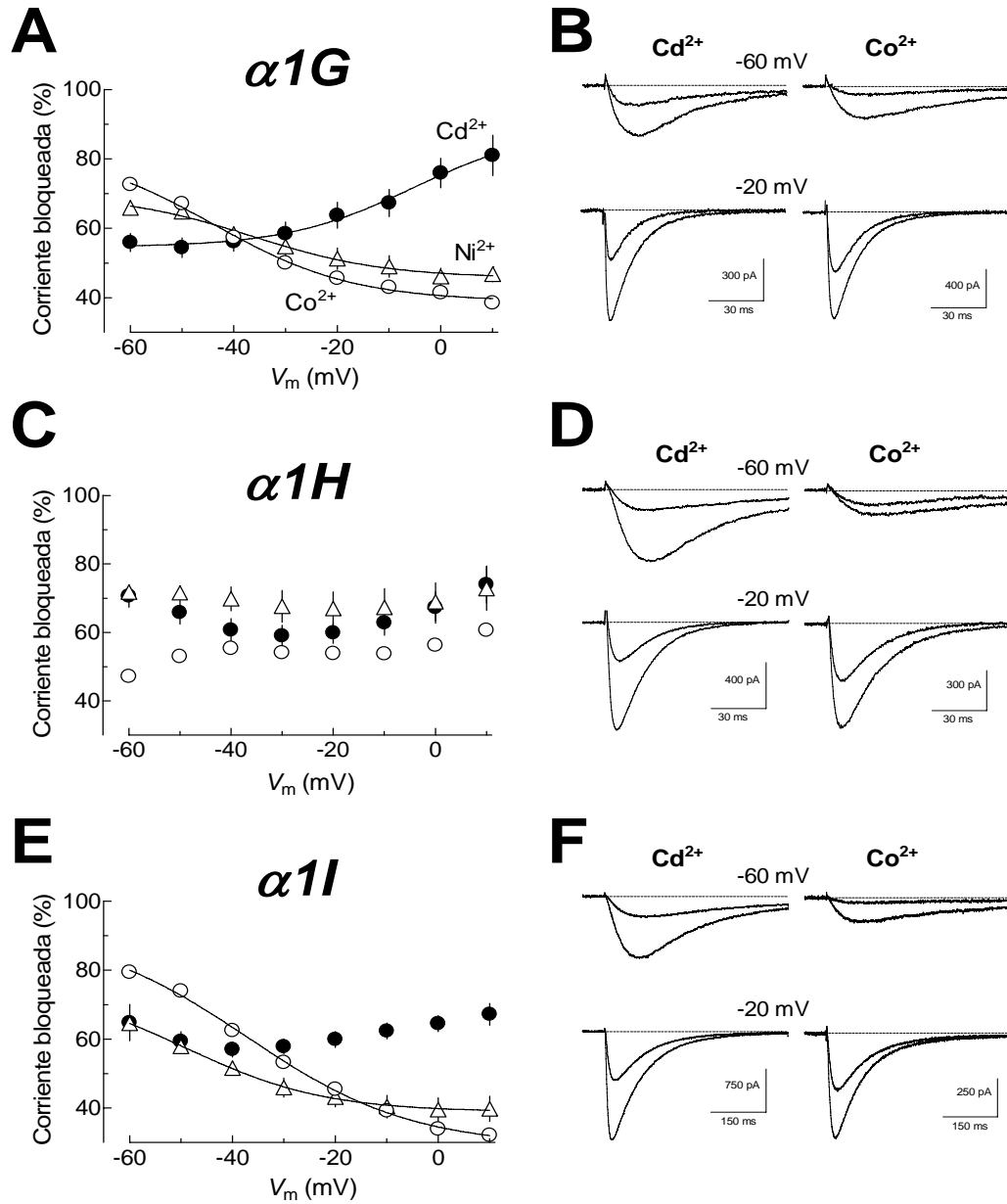


Figura 11. **Bloqueo dependiente de voltaje de los canales  $Ca_v3$  por los cationes divalentes.** Porcentaje de bloqueo de la  $I_{Ca}$  al pico inducido por  $Cd^{2+}$  (círculos rellenos),  $Co^{2+}$  (círculos vacíos) y  $Ni^{2+}$  (triángulos vacíos) en función del potencial de membrana ( $V_m$ ) para los canales  $\alpha1G$  (A),  $\alpha1H$  (C) y  $\alpha1I$  (D). Los datos experimentales se obtuvieron de las mismas células de la Figura 10 y 11. Las líneas continuas trazadas sobre los datos muestran la tendencia del bloqueo dependiente de voltaje. B, D, F) Trazos representativos de la  $I_{Ca}$  obtenida a -60 (trazos superiores) y -20 mV (trazos inferiores) en ausencia (corrientes de mayor amplitud) y en presencia (corrientes de menor amplitud) de  $Cd^{2+}$  (trazos de la izquierda) y  $Co^{2+}$  (trazos de la derecha) para los canales  $\alpha1G$ ,  $\alpha1H$  y  $\alpha1I$ , respectivamente. En presencia de  $Ni^{2+}$ , las corrientes mostraron efectos similares a los de  $Co^{2+}$ , razón por la cual no se presentan.

resultados obtenidos a partir de células HEK-293 que expresaban canales  $\alpha 1G$  en presencia de  $Cd^{2+}$  se presentan en la Fig. 12 y en la Fig. 14 se muestran los resultados cuando se utilizó el  $Co^{2+}$  como bloqueador inorgánico.

### ***1.1 La hiperpolarización a voltajes extremos promueve el desbloqueo de los canales $Ca_v3$ en presencia de $Cd^{2+}$ , pero intensifica el bloqueo inducido por $Co^{2+}$ y $Ni^{2+}$***

En la Fig. 12A se ilustran los trazos representativos de colas de corriente generadas por canales  $\alpha 1G$  en ausencia (*Control*), presencia ( $Cd^{2+}$ ), y después de ser expuestos a  $150 \mu M$  de  $Cd^{2+}$  (*Lavado*). Las colas de corriente fueron registradas a potenciales de repolarización entre  $-180$  y  $-20$  mV; sin embargo, por cuestiones de claridad, en la Fig. 12 (así como en la Fig.14) sólo se muestran los registros correspondientes a los potenciales de  $-180$ ,  $-150$ ,  $-120$ ,  $-90$  y  $-60$  mV. La inhibición de la corriente debida al  $Cd^{2+}$  ( $Co^{2+}$  ó  $Ni^{2+}$ ) se monitoreó mediante la aplicación de un pulso de prueba a  $-40$  mV. Tal como se hizo en el caso de las curvas  $I-V$ , las concentraciones de los iones inorgánicos que se utilizaron para bloquear la  $I_{Ca}$  en los experimentos de colas de corriente fueron ligeramente mayores a los valores  $IC_{50}$ , con el objeto de obtener un bloqueo estacionario cercano al 60%. En el caso particular de la Fig. 12, la aplicación de  $150 \mu M$  de  $Cd^{2+}$  produjo una disminución de la  $I_{Ca}$  en 53% a  $-40$  mV. Sin embargo, el efecto en la amplitud de las colas de corriente fue menos drástico (Fig. 12A). La amplitud promedio de las colas de corriente de canales  $\alpha 1G$  registradas a diferentes valores de  $V_m$  en las condiciones experimentales indicadas se presenta en la Fig. 12B. El porcentaje de bloqueo en las colas de corriente a los voltajes correspondientes se muestra en la Fig. 12C. Se puede observar que el porcentaje de bloqueo causado por  $Cd^{2+}$  en la amplitud de las colas de corriente de los canales  $\alpha 1G$  se redujo considerablemente con la repolarización a potenciales negativos. El bloqueo de las colas de corriente siempre fue menor al que se observó con los pulsos de prueba a  $-40$  mV. Los datos de la Fig. 12C indican que la fracción de canales que se bloquearon a  $-180$  mV ( $26 \pm 2\%$ ) representó únicamente al 50% de los canales que se inhibieron a  $-20$  mV ( $52 \pm 4\%$ ). Esto significa que una repolarización a  $-180$  mV induce el desbloqueo del 50% de los canales que fueron

bloqueados a -20 mV por el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$ . El desbloqueo de los canales  $\alpha 1\text{G}$  en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  muestra una fuerte dependencia al voltaje en el intervalo de -100 a -20 mV, pero a potenciales más negativos que -100 mV el desbloqueo fue casi independiente del voltaje.

Lo anterior se puede concluir por la observación de que el porcentaje de canales bloqueados sólo aumenta de  $26 \pm 2\%$  a  $32 \pm 2\%$  ( $n = 5$ ) en el intervalo de -180 a -100 mV. Cuando se realizaron experimentos similares a los descritos en el párrafo anterior, pero utilizando canales  $\alpha 1\text{H}$  y  $\alpha 1\text{I}$ , los efectos de las hiperpolarizaciones a voltajes muy negativos en el bloqueo debido a  $\text{Cd}^{2+}$ , produjeron resultados muy parecidos a los ya descritos para los canales  $\alpha 1\text{G}$ . Los datos correspondientes se presentan de manera resumida en la Fig. 13. En ella se puede apreciar que el porcentaje de bloqueo de las colas de corriente en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  es semejante para los tres tipos de canales  $\text{Ca}_v3$  (*círculos llenos*), no obstante que los valores de  $\alpha 1\text{H}$  muestran un efecto ligeramente menor. El porcentaje de canales  $\alpha 1\text{H}$  bloqueados disminuyó de  $50 \pm 3\%$  a  $32 \pm 2$  ( $n = 7$ ) al repolarizar la membrana a -20 y -180 mV, respectivamente; mientras que para  $\alpha 1\text{I}$ , los valores fueron de  $55 \pm 4\%$  a  $27 \pm 3\%$  ( $n = 9$ ) a los mismos voltajes.

El efecto de la hiperpolarización a voltajes muy negativos también se investigó en experimentos donde se utilizó como bloqueador al  $\text{Co}^{2+}$  y al  $\text{Ni}^{2+}$ . Interesantemente, los resultados obtenidos fueron completamente contrarios a los observados con  $\text{Cd}^{2+}$ . En la Fig. 14 se presentan de manera resumida los resultados correspondientes obtenidos cuando se empleó  $\text{Co}^{2+}$  como antagonista de los canales  $\alpha 1\text{G}$ . Cualitativamente, los resultados fueron los mismos cuando se utilizó  $\text{Ni}^{2+}$ . En primer lugar, la Fig. 14A muestra que la amplitud de las colas de corriente se abatió drásticamente al repolarizar la membrana a valores de  $V_m$  muy negativos. De hecho, la amplitud promedio de las colas de corriente se mantuvo prácticamente sin cambios en el rango de voltajes desde -180 a -80 mV, y sólo una pequeña disminución en la amplitud a voltajes menos negativos (Fig. 14B). A consecuencia de lo anterior, el porcentaje de bloqueo en la amplitud de las colas de corriente aumentó de manera constante conforme la repolarización se hizo más negativa (Fig. 14C).

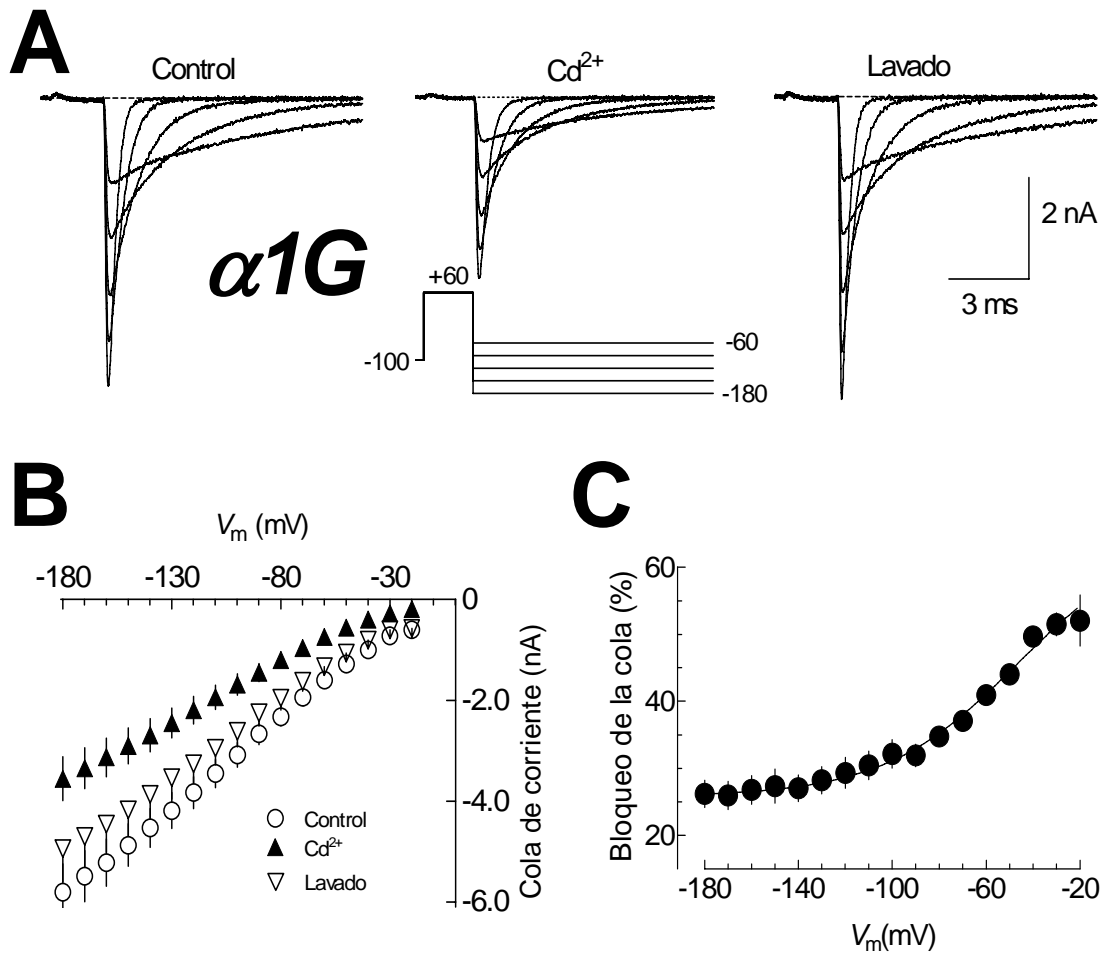


Figura 12. El bloqueo por  $Cd^{2+}$  de las colas de corriente de  $\alpha 1G$  es menor a voltajes negativos extremos.

**A)** Colas de corriente representativas de canales  $\alpha 1G$  evocadas en respuesta a la repolarización a los valores de  $V_m$  indicados, antes (*Control*), durante ( $Cd^{2+}$ ) y después (*Lavado*) de la exposición a  $150 \mu M$  de  $Cd^{2+}$ . Las colas de corriente se obtuvieron al aplicar un pulso despolarizante a  $+60$  mV de 2 ms de duración para activar los canales pero evitar la inactivación de los mismos. Las repolarizaciones fueron desde  $-180$  hasta  $-20$  mV. El HP fue  $-100$  mV. Para mayor claridad sólo se muestran los trazos obtenidos a  $-180$ ,  $-150$ ,  $-120$ ,  $-90$  y  $-60$  mV. Los registros fueron filtrados a  $10$  kHz y digitalizados cada  $20 \mu s$ . **B)** Amplitud de las colas de corriente respecto del valor de  $V_m$  al cual fue evocada bajo las condiciones experimentales indicadas ( $n = 5$ ). **C)** Bloqueo dependiente de voltaje de las colas de corriente en presencia de  $Cd^{2+}$ . El porcentaje de bloqueo a cada  $V_m$  se calculó a partir de los mismos datos del panel **B**.

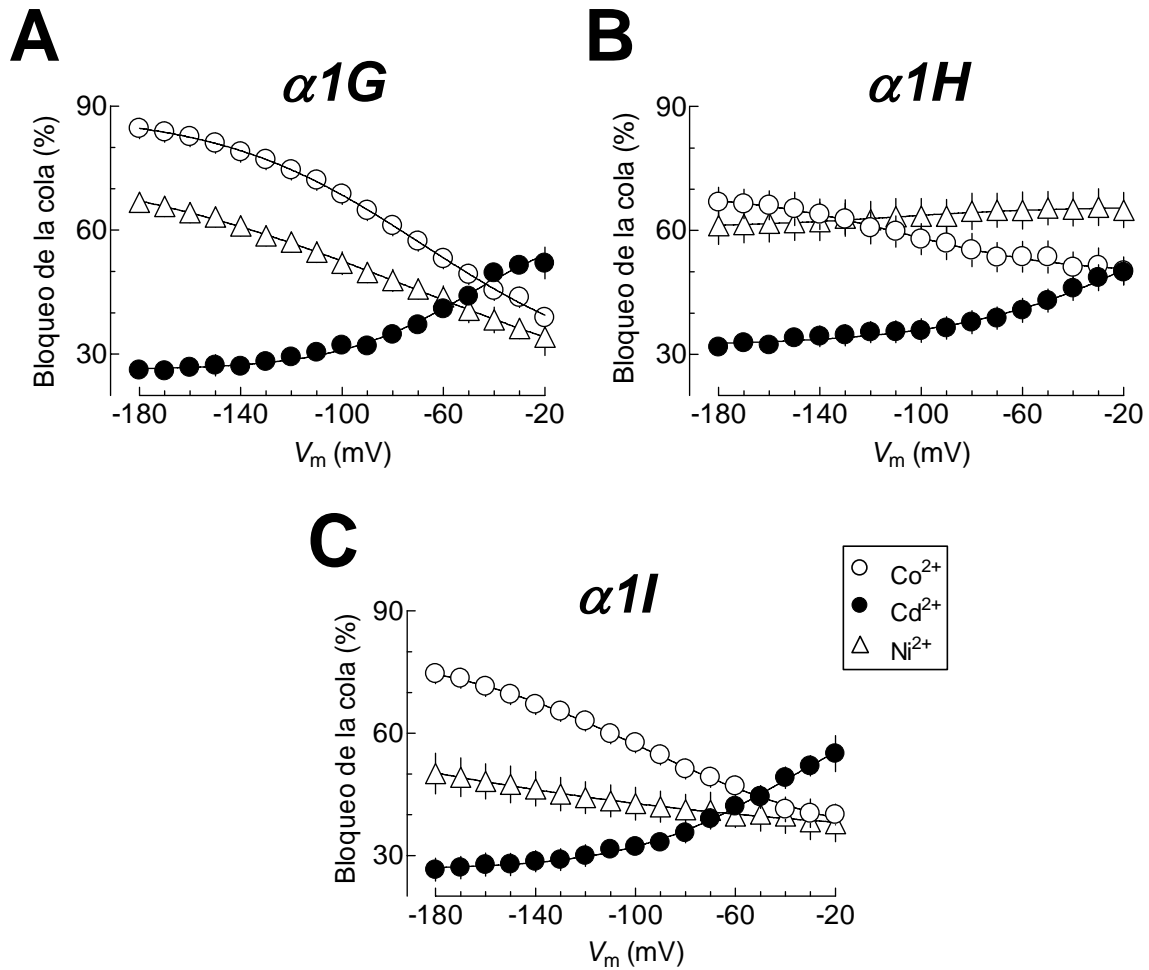


Figura 13. Efecto de potenciales negativos extremos en el bloqueo de canales  $Ca_v3$  por  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ .

Porcentaje de bloqueo de la amplitud de las colas de corriente en función del  $V_m$  al cual fueron evocadas, en presencia de  $Cd^{2+}$  (círculos llenos),  $Co^{2+}$  (círculos vacíos) y  $Ni^{2+}$  (triángulos vacíos) para los canales  $\alpha 1G$  (A),  $\alpha 1H$  (B) y  $\alpha 1I$  (C).  $n = 4-9$  células para cada catión inorgánico. Nótese el efecto contrario que ejerce el  $Cd^{2+}$  en relación con el del  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ , principalmente en los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ .

El porcentaje de canales  $\alpha 1G$  bloqueados a  $-40$  mV fue de  $45 \pm 2\%$ , y aumentó a  $85 \pm 1\%$  ( $n = 6$ ) cuando se llevó el  $V_m$  a  $-180$  mV. Nuevamente, los efectos observados en los canales  $\alpha 1G$  (Fig. 13A) se manifestaron también en los canales  $\alpha 1H$  y  $\alpha 1I$  (Fig. 13B y C; círculos llenos y triángulos llenos, respectivamente). De igual manera, los efectos fueron menos evidentes en los canales  $\alpha 1H$ . En la presencia de  $Co^{2+}$ , el bloqueo de los canales  $\alpha 1H$  se incrementó únicamente de  $51 \pm 4\%$  a  $67 \pm 4\%$  ( $n = 5$ ) de  $-40$  a  $-180$  mV. El caso extremo se observó con estos mismos canales en presencia de  $Ni^{2+}$  (Fig. 13B), donde el porcentaje de bloqueo de las colas de corriente fue prácticamente el mismo a  $-180$  mV ( $61 \pm 5\%$ ) que a  $-40$  mV ( $65 \pm 4\%$ ;  $n = 8$ ).

Los resultados de esta sección indican que las hiperpolarizaciones a voltajes negativos extremos “atraen” al  $Cd^{2+}$  hacia el interior de la célula, permitiendo así el flujo de iones  $Ca^{2+}$  a través del canal, y por lo tanto, disminuyendo el porcentaje de canales bloqueados a valores de  $V_m$  muy negativos. En contraste, la unión de  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  a su sitio de acción (bloqueo) es drásticamente favorecido a potenciales negativos, lo que resulta en una mayor fracción de canales bloqueados a tales voltajes.

## ***1.2 Efecto de potenciales extremos positivos en el bloqueo de los canales $Ca_v3$ por iones inorgánicos***

En diferentes trabajos de investigación sobre neuronas simpáticas de rana, se ha demostrado que la aplicación de potenciales positivos extremos libera transitoriamente a los canales HVA del bloqueo inducido por  $Cd^{2+}$  (Brown et al., 1983; Jones & Marks, 1989; Thevenod & Jones, 1992). Con la finalidad de investigar si dicho comportamiento se presenta también en los canales  $Ca_v3$  recombinantes de humano, se realizó una segunda serie de experimentos para registrar colas de corriente, pero ahora generadas (todas) a  $-100$  mV después de despolarizar el  $V_m$  a voltajes positivos extremos. Un experimento representativo en el que se empleó una célula HEK-293 con canales  $\alpha 1I$  se ilustra en la Fig. 15A. Como lo indica el protocolo de voltaje, en este caso las colas de corriente se producen en respuesta a la repolarización de la célula a  $-100$  mV después de despolarizar el  $V_m$  a diferentes voltajes (desde  $-50$  hasta  $+120$  mV, en escalones de  $10$  mV).

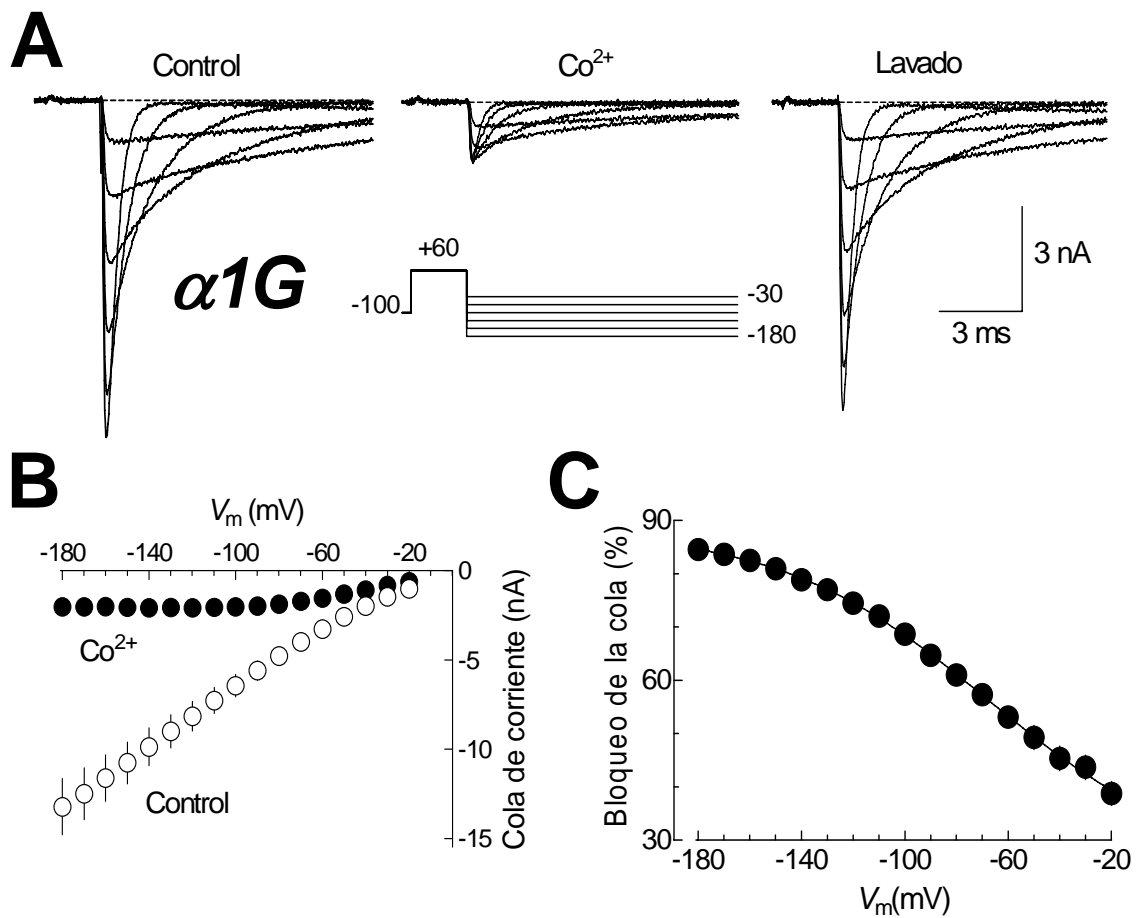


Figura 14. Los potenciales extremos negativos favorecen el bloqueo de los canales  $\alpha 1G$  por  $\text{Co}^{2+}$ .

**A)** Colas de corriente representativas de canales  $\alpha 1G$  evocadas en respuesta a la repolarización a los valores de  $V_m$  indicados, antes (*Control*), durante ( $\text{Co}^{2+}$ ) y después (*Lavado*) de la exposición a  $550 \mu\text{M}$  de  $\text{Co}^{2+}$ . Las colas de corriente se obtuvieron como se explica en la Fig. 12. Se muestran los trazos obtenidos a  $-180$ ,  $-150$ ,  $-120$ ,  $-90$  y  $-60$  mV. Los registros fueron filtrados a  $10$  kHz y digitalizados cada  $20 \mu\text{s}$ . **B)** Amplitud de las colas de corriente respecto del valor de  $V_m$  al cual fue evocada bajo las condiciones experimentales indicadas ( $n = 6$ ). **C)** Bloqueo dependiente de voltaje de las colas de corriente en presencia de  $\text{Co}^{2+}$ . El porcentaje de bloqueo a cada  $V_m$  se calculó a partir de los mismos datos del panel **B**.

La duración de cada uno de los pulsos despolarizantes varió de tal forma que a todos los voltajes, el corte del pulso tuviera lugar al pico máximo de la corriente para así evitar la inactivación de los canales. El tiempo al pico para cada uno de los voltajes se determinó a partir de los registros de corriente obtenidos con los protocolos de voltaje para obtener las curvas  $I-V$  (Fig. 15B). Como se puede apreciar en los registros de la Fig. 15A, el  $\text{Cd}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) provocó una disminución de la amplitud de las colas de corriente de los canales  $\alpha 1\text{I}$  a todos los voltajes explorados. Para mayor claridad, en la figura sólo se muestran 8 de los 18 trazos obtenidos en cada una de las condiciones experimentales indicadas. La Fig. 15C presenta los promedios de 9 células para la amplitud de las colas de corriente en ausencia (*Control*), en presencia ( $\text{Cd}^{2+}$ ), y después de retirar el  $\text{Cd}^{2+}$  (*Lavado*) de la cámara de registro. La amplitud de las colas de corriente mantiene un incremento considerable a voltajes tan positivos como +100 mV, lo que indica que los canales  $\alpha 1\text{I}$  siguen activándose a potenciales muy positivos (Frazier et al., 2001; Gomora et al., 2002). El bloqueo por  $\text{Cd}^{2+}$  no previene ésta peculiaridad de los canales  $\text{Ca}_v3.3$  (Fig. 15C).

A partir de los datos de amplitud de las colas de corriente, se calcularon los porcentajes de bloqueo a cada voltaje, en presencia de cada uno de los tres bloqueadores inorgánicos en los tres tipos de canales  $\text{Ca}_v3$ , y los resultados se presentan a manera de resumen en la Fig. 16. De los tres tipos de canales  $\text{Ca}_v3$ , los  $\alpha 1\text{H}$  exhiben las características más pobres de desbloqueo a potenciales positivos en presencia de cualquiera de los tres antagonistas inorgánicos (Fig. 16B). En presencia del bloqueador inorgánico  $\text{Cd}^{2+}$ , los tres canales presentan un desbloqueo de 12-19% a consecuencia de repolarizar el  $V_m$  desde potenciales negativos (-50 a 0 mV); en cambio, cuando la repolarización fue hecha desde potenciales positivos (+10 a +120 mV) no se evidenció un desbloqueo adicional de canales (Fig. 16A-C). Esta observación es consistente con el desbloqueo observado con  $\text{Cd}^{2+}$  a voltajes negativos (Fig. 13) y el hecho de que las corrientes salientes no fueron modificadas de manera significativa por el bloqueo de  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 9). Por ejemplo, en el caso particular de los canales  $\alpha 1\text{I}$ , mientras que el porcentaje de corriente inhibida durante los pulsos despolarizantes entre -50 y 0 mV fue muy similar ( $63 \pm 3\%$ , datos no mostrados),



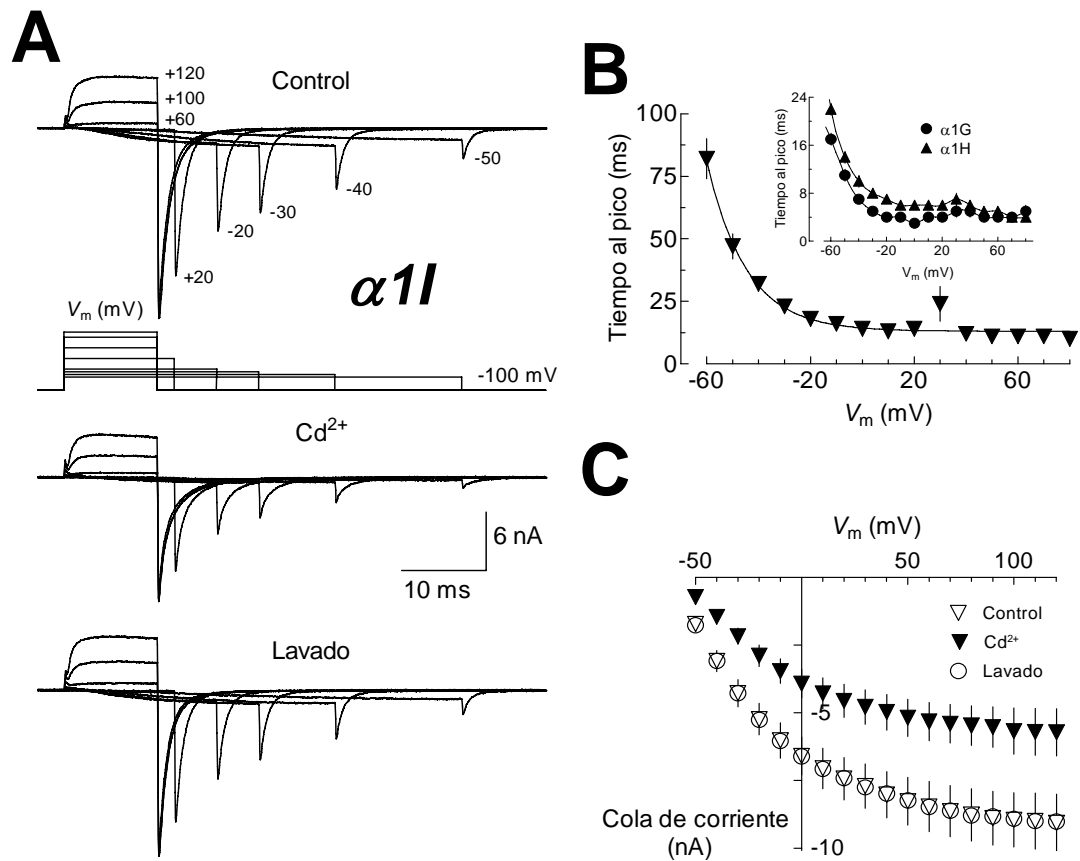


Figura 15. Efecto de fuertes despolarizaciones en el bloqueo por  $Cd^{2+}$  de las colas de corriente de los canales  $\alpha 1I$ .

**A)** Colas de corriente representativas de canales  $\alpha 1I$  antes (*Control*), durante ( $Cd^{2+}$ ) y después (*Lavado*) de la exposición a  $200 \mu M$  de  $Cd^{2+}$ . Todos los registros se obtuvieron a  $-100 mV$ , después de pulsos despolarizantes de diferente duración (indicada por el protocolo) a los valores de  $V_m$  ilustrados. Por cuestiones de claridad sólo se muestran 8 de un total de 18 trazos de colas de corriente registradas en cada condición. **B)** Tiempo al pico de la  $I_{Ca}$  de los canales  $\alpha 1I$  (*triángulos invertidos*) activada durante pulsos despolarizantes de  $500 ms$  de duración a los valores de  $V_m$  indicados. A partir de tales datos se designó la duración de cada uno de los pulsos despolarizantes del protocolo ilustrado en **A**. En el inserto se muestran los datos correspondientes de los canales  $\alpha 1G$  (*círculos*) y  $\alpha 1H$  (*triángulos*). **C)** Amplitud de la cola de corriente como función del  $V_m$  del pulso despolarizante en las condiciones indicadas ( $n = 9$ ).

el porcentaje de inhibición de las colas de corriente mostró una disminución significativa de  $57 \pm 3$  a  $42 \pm 2\%$  en el mismo rango de voltajes (Fig. 16C, *círculos vacíos*). Lo anterior se puede explicar en base al pobre efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre las corrientes salientes (Fig. 9), lo que provoca que las colas de corriente generadas después de repolarizaciones a partir de potenciales más positivos que el  $V_{\text{rev}}$  aparente no resulten en un desbloqueo adicional de canales. Aun más, el porcentaje de corriente bloqueada en el intervalo de voltajes de +60 a +120 mV fue el mismo durante el pulso ( $18 \pm 5$  y  $20 \pm 3\%$ , respectivamente; datos no mostrados) que el exhibido por las colas de corriente ( $34 \pm 3$  y  $33 \pm 3\%$ , respectivamente; Fig. 16C, *círculos vacíos*). Tomados en su conjunto, estos resultados indican que el bloqueo de los canales  $\text{Ca}_v3$  por  $\text{Cd}^{2+}$  puede ser transitoriamente disminuido a voltajes negativos, y que las corrientes salientes no son afectadas de manera significativa.

Por el contrario, en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  se observó un claro desbloqueo de canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$  a consecuencia de despolarizaciones a voltajes muy positivos. Estos mismo canales también se desbloquearon de  $\text{Co}^{2+}$ , pero el efecto fue menos evidente (Fig. 16A y C). La liberación del bloqueo por  $\text{Ni}^{2+}$  a voltajes positivos extremos de canales  $\alpha1I$  ya se ha reportado con anterioridad (Lee et al., 1999b), por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los canales  $\alpha1G$ , pero no  $\alpha1H$ , también pueden ser desbloqueados del efecto de  $\text{Ni}^{2+}$  a potenciales positivos. La amplitud de las colas de corriente de canales  $\alpha1I$  disminuyó  $74 \pm 4$  y  $44 \pm 4\%$  a -50 y +120 mV, respectivamente (Fig. 16E), lo cual indica que el 40% de canales que se encontraban bloqueados a -50 mV fueron desbloqueados a consecuencia de la despolarización a +120 mV. El porcentaje correspondiente para los canales  $\alpha1G$  fue de 30%. En otras palabras, los voltajes positivos extremos promueven de manera significativa el desbloqueo de  $\text{Ni}^{2+}$  en canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$ , pero tienen poco efecto cuando el bloqueador inorgánico es  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ .

## 2. Efectos en la cinética de desactivación de los canales $Ca_v3$

El análisis cinético del cierre o desactivación de los canales tipo T recombinantes se ilustra en la Fig. 17. Las colas de corriente analizadas fueron registradas en respuesta al protocolo ya descrito en la Fig 12A. Los trazos representativos de éste tipo de corrientes registrados en condiciones control, en presencia de  $Ni^{2+}$  y de regreso a control, se ilustran para cada uno de los canales  $Ca_v3$  en la Fig. 17A-C. En todas las condiciones experimentales, las colas de corriente registradas a -100 mV son mostradas junto con los ajustes de exponenciales (indicados con líneas gruesas punteadas). Las colas de corriente generadas por los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1H$ , antes y después de ser expuestos al  $Ni^{2+}$ , se ajustaron bien con una exponencial simple (trazos *Control* y *Lavado*). Sin embargo, en presencia del bloqueador inorgánico, las colas de corriente registradas se ajustaron mejor a dos exponenciales, ya que una sola exponencial deja fuera un componente rápido al inicio de la cola de corriente (Fig. 17A y B, trazos  $Ni^{2+}$ ). En los ajustes con dos exponenciales, la constante de tiempo de la primera exponencial se constriñó al valor observado en condiciones control. La segunda tau (la del componente más rápido) no tuvo ningún tipo de restricción, ya que esta debe reflejar el curso temporal del (re)bloqueo por  $Ni^{2+}$  de los canales abiertos (Thevenod & Jones, 1992). A esta última la hemos denominado constante de tiempo de rebloqueo o tau de rebloqueo. En la Fig. 17D y E, se grafican las constantes de tiempo de los ajustes monoexponenciales y la tau de rebloqueo correspondientes a los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1H$  en experimentos donde se estudió el efecto del  $Ni^{2+}$ . En ambos casos, en condiciones *Control* y *Lavado* la velocidad con la que se cierran los canales es claramente dependiente de voltaje. A valores de  $V_m$  muy negativos los canales se cierran más rápidamente, mientras que a voltajes más fisiológicos los hacen más lentamente. Por otra parte, la tau de rebloqueo es prácticamente independiente del voltaje en el intervalo de voltajes donde las colas de corriente representan principalmente el cierre de los canales (es decir, entre -150 y -100 mV). A voltajes más negativos que -150 mV, no se muestran los valores de la tau de rebloqueo debido a que tales voltajes las colas de corriente en presencia de  $Ni^{2+}$  se ajustaron mejor a una sola exponencial. Lo anterior se explica por la tendencia de los valores de la tau de rebloqueo mostrada en la Fig. 17D y E.

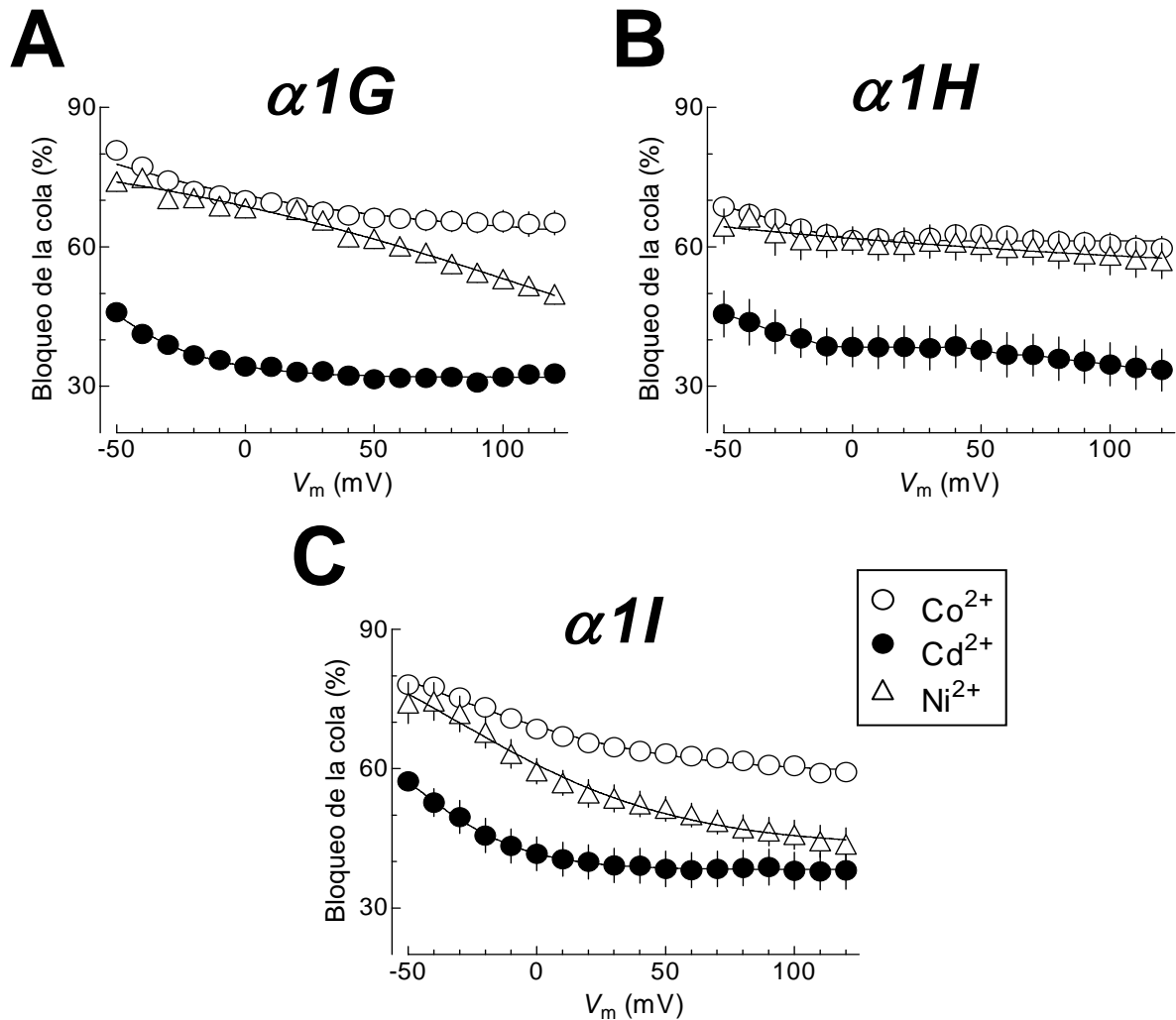


Figura 16. Efecto de potenciales positivos extremos en el bloqueo por cationes inorgánicos de los canales  $Ca_v3$ .

Porcentaje de bloqueo de la amplitud de la cola de corriente a  $-100$  mV, después de despolarizar la membrana a cada  $V_m$  indicado en presencia de  $Cd^{2+}$  (círculos llenos),  $Co^{2+}$  (círculos vacíos) y  $Ni^{2+}$  (triángulos vacíos) para los canales  $\alpha 1G$  (A),  $\alpha 1H$  (B) y  $\alpha 1I$  (C). Los puntos experimentales representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 a 9 células para cada uno de los metales divalentes. Nótese el desbloqueo de  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  a potenciales positivos en los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ . Al igual que en el caso de los potenciales extremos negativos (Fig.13), el bloqueo de los canales  $\alpha 1H$  no se ve modificado considerablemente por la despolarización a voltajes muy positivos.

En ellas se puede ver que la constante de tiempo de desactivación de los canales en condiciones *Control* y *Lavado* tiende a igualarse al de la tau de rebloqueo. La desactivación es un proceso más complejo en los canales  $\alpha 1I$ . Usualmente se requieren de dos exponenciales para ajustar de manera adecuada el cierre de este tipo de canales (Frazier et al., 2001; Gomora et al., 2002). Adicionalmente, si se considera la posible inclusión de una tercera tau debida al efecto de los bloqueadores inorgánicos, el análisis se dificulta aún más. En el presente estudio, las colas de corriente de los canales  $\alpha 1I$  se ajustaron con dos exponenciales en ausencia y presencia de los bloqueadores inorgánicos. Como se puede observar en los registros ilustrados en la Fig. 17C, los ajustes biexponenciales reflejan adecuadamente el curso temporal con el que se desactivaron los canales  $\alpha 1I$ . Por ejemplo, a -100 mV las colas de corriente *Control* decayeron con una tau rápida de  $1.3 \pm 0.1$  y una tau lenta de  $6.2 \pm 0.9$  ( $n = 5$ ). El componente rápido ( $A_1$ ) predominó a potenciales entre -100 y -180 mV, mientras que el componente lento ( $A_2$ ) contribuyó en mayor medida conforme la repolarización progresó hacia voltajes menos negativos. La amplitud de  $A_1$  a -100 mV disminuyó de  $98 \pm 2$  a  $83 \pm 3\%$  por efecto del  $Ni^{2+}$ , con el consecuente incremento en la amplitud de  $A_2$ . Con la idea de simplificar el análisis del efecto de los bloqueadores inorgánicos en las colas de corriente de los canales  $\alpha 1I$  se calculó una tau ponderada de la siguiente forma:

$$\tau \text{ ponderada} = A_1\tau_1 + A_2\tau_2,$$

donde  $A_1$  y  $A_2$  son la amplitud normalizada de los componentes rápido y lento, mientras que  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son las constantes de tiempo respectivas. Previamente se ha mostrado que la tau ponderada refleja adecuadamente la dependencia al voltaje de los componentes rápido y lento de las colas de corriente generadas por los canales  $\alpha 1I$  (Gomora et al., 2002). Los datos de la tau ponderada en función del voltaje de repolarización al que se generaron las colas de corriente en ausencia y en presencia de  $Ni^{2+}$  se presentan en la Fig. 17F. El efecto del  $Ni^{2+}$  en la desactivación de los canales  $\alpha 1I$  fue muy similar al observado en los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$  (Fig. 17D-F). El curso temporal de las colas de corriente se aceleró en la

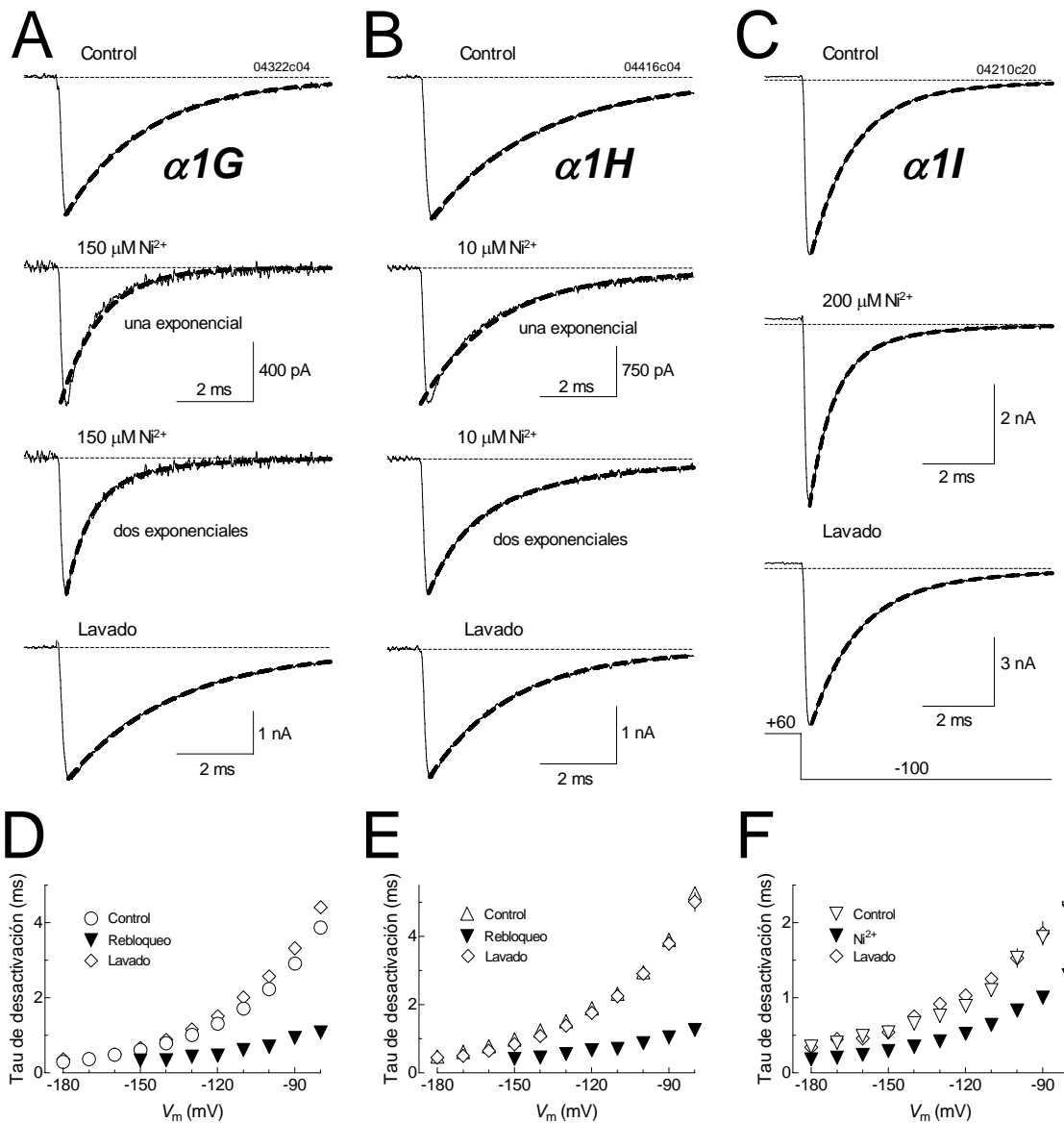


Figura 17. Aceleramiento de las colas de corriente de los canales Ca<sub>v</sub>3 por Ni<sup>2+</sup>.

Registros representativos de colas de corriente a -100 mV después de pulsos despolarizantes a -60 mV obtenidos de canales  $\alpha 1G$  (A),  $\alpha 1H$  (B) y  $\alpha 1I$  (C). Para cada canal se muestran las colas de corriente registradas en ausencia (Control), en presencia (Ni<sup>2+</sup>) y después (Lavado) de aplicar las concentraciones indicadas de Ni<sup>2+</sup>. En A y B, las líneas punteadas son el ajuste con una exponencial simple (Control, Ni<sup>2+</sup> trazos superiores y Lavado), o la suma de dos exponenciales (Ni<sup>2+</sup> trazos inferiores). En C las líneas punteadas muestran el ajuste con dos exponenciales en las tres condiciones experimentales. Para una mejor apreciación de los ajustes, los registros muestran únicamente 0.8 de los 2 ms (para  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$ ) y 1 de los 10 ms (para  $\alpha 1I$ ) que dura la despolarización a +60 mV, y 8 de los 18 ms de la repolarización. Constantes de tiempo (tau) de desactivación en relación al  $V_m$  de repolarización para canales  $\alpha 1G$  (D),  $\alpha 1H$  (E) y  $\alpha 1I$  (F)

presencia del bloqueador inorgánico en el intervalo completo de voltajes investigados, lo cual sugiere que el rebloqueo por  $\text{Ni}^{2+}$  es un mecanismo conservado en los canales  $\text{Ca}_v3$ .

Los resultados obtenidos cuando se utilizó  $\text{Co}^{2+}$  fueron similares a los efectos del  $\text{Ni}^{2+}$  en las colas de corriente de los canales  $\text{Ca}_v3$ , en cambio el  $\text{Cd}^{2+}$  produjo, nuevamente, resultados que contrastan con los de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . Los datos que ilustran estas observaciones se presentan de manera resumida en la Tabla 4. En ella se muestran los valores de las constantes de tiempo obtenidas mediante los ajustes de las colas de corriente registradas a -120 y -100 mV de los tres canales tipo T utilizados en el presente estudio, tanto en ausencia como en presencia de los respectivos bloqueadores inorgánicos. A grandes rasgos, los datos de la Tabla 4 indican que el  $\text{Cd}^{2+}$  no modificó de manera significativa la cinética de cierre de los canales  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{H}$  y, por el contrario, en presencia de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , la desactivación de ambos canales se aceleró notoriamente a los voltajes indicados. Como se mostró en la Fig. 17D y E para el  $\text{Ni}^{2+}$ , los efectos del  $\text{Co}^{2+}$  en las colas de corriente también se presentaron en todo el intervalo de voltajes estudiados, y debido a que los efectos fueron cualitativamente los mismos con ambos divalentes, los efectos del  $\text{Co}^{2+}$  se ejemplifican únicamente con los datos de la Tabla 4.

Como ya se mencionó anteriormente, la tau de rebloqueo es un índice de la velocidad con la que el ion inorgánico bloquea al canal en el estado abierto. Por ejemplo, la tau de rebloqueo por  $\text{Ni}^{2+}$  de los canales  $\alpha 1\text{G}$  a -100 fue de  $0.7 \pm 0.1$  ms ( $n = 6$ ; Tabla 4). Por lo tanto, a la concentración de  $\text{Ni}^{2+}$  utilizada (150  $\mu\text{M}$ ) en los experimentos, dicha tau corresponde a una constante de asociación bimolecular de  $9.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entre el  $\text{Ni}^{2+}$  y su sitio de unión en el canal. El valor correspondiente para el  $\text{Co}^{2+}$  fue de  $1.3 \pm 0.07$  ms ( $n = 6$ ; Tabla 4), y  $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

---

obtenidos de los ajustes con exponenciales de las colas de corriente. En **D** y **E**, se presentan los valores de tau de la segunda exponencial ajustada (*Rebloqueo*) a las colas de corriente en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  (ver pág. 59), misma que refleja el curso temporal del rebloqueo por  $\text{Ni}^{2+}$  del canal abierto. En **F**, todos los valores corresponden a la tau ponderada (ver pág. 61) calculada a partir del ajuste biexponencial de las colas de corriente registradas en las condiciones indicadas. El efecto de  $\text{Co}^{2+}$  sobre los canales  $\text{Ca}_v3$  mostró el mismo efecto de aceleración de las colas de corriente (datos no mostrados).

La aceleración de las colas de corriente que se manifestó en todos los canales  $Ca_v3$  por efecto del  $Ni^{2+}$  y el  $Co^{2+}$ , puede ser debida al bloqueo adicional de canales que fueron abiertos, pero no bloqueados, durante el pulso despolarizante.

A diferencia del  $Co^{2+}$  y el  $Ni^{2+}$ , los efectos del  $Cd^{2+}$  en las colas de corriente de los canales  $Ca_v3$  fueron diferentes. Por un lado, las constantes de tiempo de la desactivación de los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1H$  no sufrieron cambios significativos por la presencia del bloqueador inorgánico (Tabla 4 y Fig. 18A-B). Lo anterior sugiere que el rebloqueo de estos canales por  $Cd^{2+}$  es instantáneo en relación a la velocidad de nuestro sistema de fijación de voltaje (cuya tau es menor a  $60 \mu s$ ). Por lo tanto, la constante de tiempo para el rebloqueo por  $150 \mu M$  de  $Cd^{2+}$  es más rápida que  $0.3 ms$ , lo cual supondría una constante de asociación bimolecular de  $\sim 2.2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ , misma que es ligeramente menor a la reportada en canales de calcio tipo N ( $10^8 M^{-1} s^{-1}$ ; Thevenod & Jones, 1992), y más parecida a la obtenida a partir de datos de canales unitarios de canales de calcio tipo L ( $4 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ ; Lansman et al., 1986). En la literatura no existen datos sobre los efectos de  $Cd^{2+}$  para los canales tipo T (ya sea nativos o recombinantes), no obstante, para el  $Mg^{2+}$  se ha reportado una constante de asociación bimolecular de  $10^7 M^{-1} s^{-1}$  en canales  $\alpha1G$  (Serrano et al., 2000), y  $3.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$  para  $Ni^{2+}$  en canales  $\alpha1I$  (Lee et al., 1999b). Todos estos datos sugieren que el grupo de metales divalentes formado por  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  acceden a su sitio de unión de los canales de calcio muy rápidamente (en particular el  $Cd^{2+}$ ), en esencia, limitados únicamente por la difusión.

Por otro lado, el  $Cd^{2+}$  provocó un efecto completamente diferente en las colas de corriente de los canales  $\alpha1I$ . En estos canales el  $Cd^{2+}$  retardó el curso temporal de la desactivación (Tabla 4 y Fig. 18C-D). Interesantemente, el efecto fue más pronunciado en el intervalo de voltajes donde las colas de corriente reflejan básicamente el cierre de los canales, y la contribución de la inactivación de canales a la cola de corriente es prácticamente nula (de  $-180$  a  $-90 mV$ ). El retardo de la desactivación observado en los canales  $\alpha1I$  indica un efecto del  $Cd^{2+}$  sustancialmente diferente. Como se puede observar en la Fig. 18D, las colas de corriente de los canales  $\alpha1I$  registradas en presencia del bloqueador inorgánico cruzan por encima de los registros *Control*, lo cual sugiere que el  $Cd^{2+}$  retarda realmente el cierre de los



canales  $\alpha 1I$  (lo que se confirma cuando los registros se normalizan en amplitud, Fig. 18D, insertos). Para investigar con mayor detalle el retardo del cierre de los canales  $\alpha 1I$  en presencia de  $Cd^{2+}$ , realizamos una serie de experimentos adicionales utilizando diferentes concentraciones del bloqueador inorgánico y determinando su efecto en la constante de tiempo de las colas de corriente. El retardo de la desactivación no fue detectado con  $30 \mu M$  de  $Cd^{2+}$ , pero con  $100 \mu M$  el efecto se manifestó claramente y alcanzó una saturación con  $500-1000 \mu M$ . Por ejemplo, las constantes de tiempo de la desactivación de los canales  $\alpha 1I$  a  $-120$  mV fueron (en ms):  $1.1 \pm 0.06$  ( $n = 15$ ), control;  $1.0 \pm 0.09$  ( $n = 8$ ),  $30 \mu M$   $Cd^{2+}$ ;  $1.4 \pm 0.12$  ( $n = 7$ ),  $100 \mu M$   $Cd^{2+}$ ;  $1.6 \pm 0.07$  ( $n = 6$ ),  $250 \mu M$   $Cd^{2+}$ ;  $1.8 \pm 0.10$  ( $n = 8$ ),  $500 \mu M$   $Cd^{2+}$ ; y  $1.8 \pm 0.14$  ( $n = 4$ ),  $1000 \mu M$   $Cd^{2+}$ . El entrecruzamiento de las colas de corriente fue observado a todos los voltajes entre  $-180$  y  $-80$  mV. Este resultado indica fuertemente que el  $Cd^{2+}$  retarda el cierre de los canales  $\alpha 1I$  y sugiere que el catión divalente tiene que abandonar la ruta de permeación necesariamente para que el canal se pueda cerrar, ya que interactúa con el movimiento de la compuerta de activación (Swandulla & Armstrong, 1989).

Tabla 4. Constantes de tiempo ( $\tau$ ) obtenidas mediante el ajuste de las colas de corriente con funciones exponenciales.

	$\alpha 1G$			$\alpha 1H$			$\alpha 1I$		
	Control	Bloqueo	Lavado	Control	Bloqueo	Lavado	Control	Bloqueo	Lavado
<b>Cd<sup>2+</sup></b>									
-120 mV	1.3 ± 0.07	1.4 ± 0.05	1.4 ± 0.09	1.5 ± 0.08	1.4 ± 0.04	1.7 ± 0.12	1.0 ± 0.07	1.6 ± 0.08	1.2 ± 0.05
-100 mV	2.3 ± 0.11	2.2 ± 0.11	2.3 ± 0.17	2.4 ± 0.13	2.1 ± 0.07	2.7 ± 0.09	1.5 ± 0.18	2.1 ± 0.10	1.5 ± 0.20
<b>Co<sup>2+</sup></b>									
-120 mV	1.7 ± 0.13	0.8 ± 0.04	1.7 ± 0.06	1.9 ± 0.32	0.6 ± 0.11	2.1 ± 0.33	1.2 ± 0.04	0.7 ± 0.03	1.1 ± 0.07
-100 mV	2.9 ± 0.25	1.3 ± 0.07	2.9 ± 0.08	2.9 ± 0.49	0.7 ± 0.10	3.2 ± 0.46	1.7 ± 0.10	1.1 ± 0.03	1.5 ± 0.11
<b>Ni<sup>2+</sup></b>									
-120 mV	1.3 ± 0.11	0.5 ± 0.04	1.5 ± 0.13	1.9 ± 0.09	0.7 ± 0.08	1.8 ± 0.17	0.9 ± 0.05	0.5 ± 0.03	1.1 ± 0.12
-100 mV	2.2 ± 0.21	0.7 ± 0.11	2.6 ± 0.20	2.9 ± 0.22	0.9 ± 0.13	2.9 ± 0.30	1.5 ± 0.22	0.9 ± 0.07	1.6 ± 0.23

Las colas de corriente de los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$  en condiciones *Control* y *Lavado* a los voltajes indicados fueron ajustadas con una exponencial y con la suma de dos exponenciales en la presencia del bloqueador inorgánico (*Bloqueo*), donde la primera tau se construyó al valor de la que se obtuvo en la condición *Control*, por lo que los valores que se presentan en la columna *Bloqueo* corresponden a la segunda tau, misma que corresponde al rebloqueo del canal abierto por el metal divalente. En el caso de los canales  $\alpha 1I$ , los valores conciernen a la tau ponderada (ver pág. 61) para las tres condiciones experimentales.

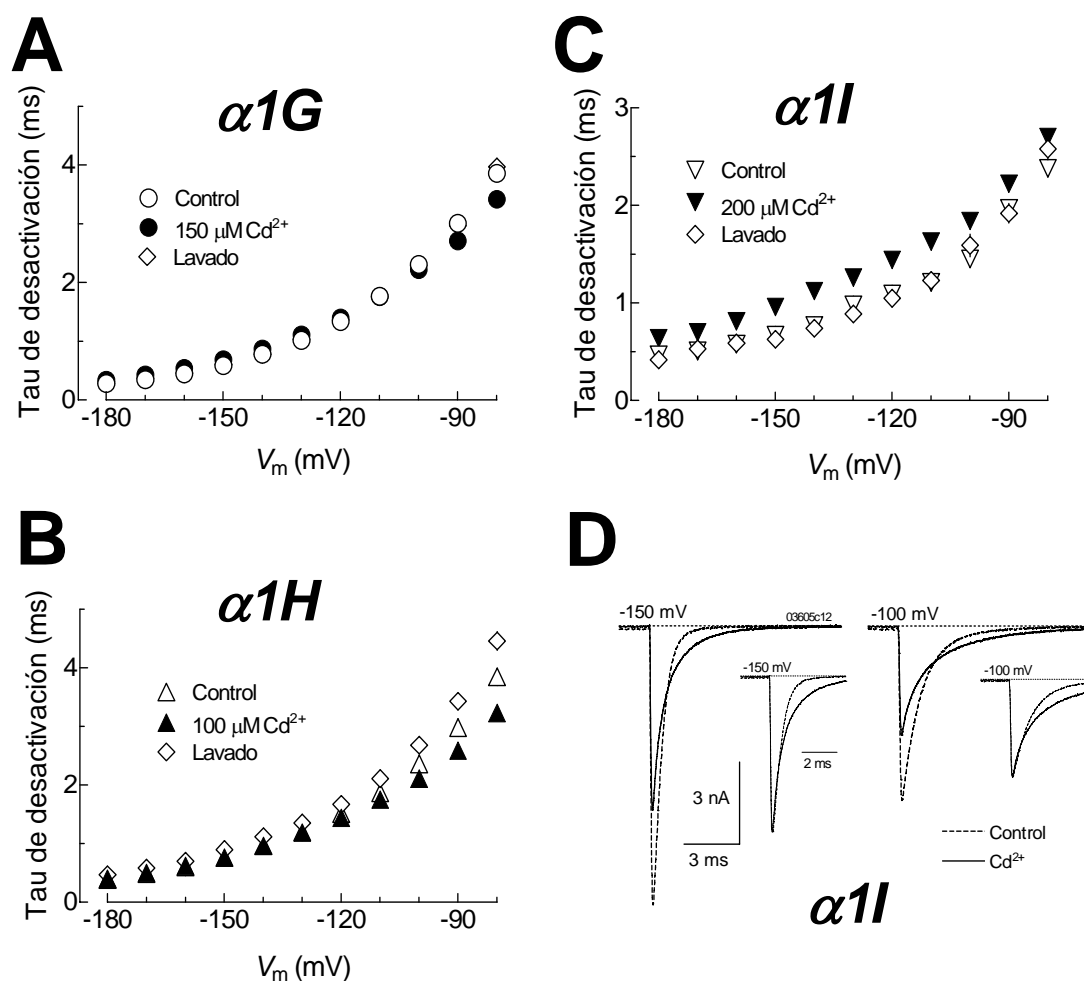


Figura 18. En presencia de  $Cd^{2+}$  los canales  $\alpha1I$  se cierran lentamente.

Dependencia de las constantes de tiempo al  $V_m$  para los canales  $\alpha1G$  (A),  $\alpha1H$  (B) y  $\alpha1I$  (C) antes (Control), durante ( $Cd^{2+}$ ) y después (Lavado) de la exposición a las concentraciones indicadas de  $Cd^{2+}$ . Las colas de corriente fueron registradas y ajustadas con funciones exponenciales como se describe en la Figura 17. Los puntos experimentales expresan el promedio  $\pm$  SEM de 5-9 células para cada canal. (D) Colas de corriente a -150 y -100 mV, obtenidas de una célula HEK-293 que expresa de manera estable canales  $\alpha1I$  en ausencia (Control, línea punteada) y en presencia ( $Cd^{2+}$ , línea continua) de 200  $\mu M$   $Cd^{2+}$ . Las colas de corriente fueron inducidas con el mismo protocolo ilustrado en la Fig. 12. Con la finalidad de permitir una comparación directa del curso temporal de apertura y cierre de los canales, los insertos muestran las colas de corriente en presencia de  $Cd^{2+}$  normalizadas con respecto a la amplitud de las colas Control. Nótese que las colas de corriente registradas en presencia de  $Cd^{2+}$  cruzan sobre los registros control, sugiriendo que el cierre de los canales se retrasa hasta que  $Cd^{2+}$  abandona la vía de permeabilidad del canal.

## VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo significa el primer estudio sobre las propiedades farmacológicas de los cationes divalentes  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  en la actividad de los tres canales  $\text{Ca}_v3$  clonados de humano ( $\alpha1\text{G}$ ,  $\alpha1\text{H}$  y  $\alpha1\text{I}$ ). Aquí se reporta que de los tres canales tipo T recombinantes, los  $\alpha1\text{H}$  son los más sensibles al bloqueo por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . Además, los resultados muestran que el mecanismo de acción del  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , en la actividad de los canales  $\text{Ca}_v3$  involucra un bloqueo dependiente de voltaje, el cual es más evidente en las corrientes de los canales  $\alpha1\text{G}$  y  $\alpha1\text{I}$  (Fig. 10 y 11). Sobresalientemente, el  $\text{Co}^{2+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  comparten algunas características de bloqueo, como inhibición más fuerte de la  $I_{\text{Ca}}$  a voltajes negativos y aceleración de la transición del canal del estado abierto al estado cerrado (desactivación), mientras que el  $\text{Cd}^{2+}$  ejerce los efectos contrarios. Por último, nuestros hallazgos también indican que a diferencia de  $\alpha1\text{G}$  y  $\alpha1\text{H}$ , los canales  $\alpha1\text{I}$  no se pueden cerrar mientras que el  $\text{Cd}^{2+}$  se encuentra en la ruta de permeación del canal. A continuación se discute la relevancia de los resultados obtenidos.

### A. Los Metales Divalentes Bloquean con Mayor Especificidad a los Canales $\alpha1\text{H}$

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados durante el presente trabajo de investigación, permiten proponer que entre los canales  $\text{Ca}_v3$ , los  $\alpha1\text{H}$  son los más sensibles al bloqueo por los metales divalentes  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . Ambos iones inorgánicos bloquean la  $I_{\text{Ca}}$  de los canales tipo T recombinantes de una forma dependiente de la concentración, con una relación estequiométrica aparente de 1:1 entre el bloqueador y su sitio de unión (Fig. 8 y Tabla 2). La observación de que las corrientes entrantes son fuertemente bloqueadas mientras que las corrientes salientes no son modificadas en su amplitud (Fig. 9 y 10), coincide con los resultados de otros grupos de investigación, los cuales sugieren que los iones inorgánicos actúan como bloqueadores del poro de canales de calcio

dependientes de voltaje (Lee et al., 1999b; Mlinar & Enyeart, 1993; Swandulla & Armstrong, 1989). Estudios previos también han mostrado un bloqueo preferencial de canales  $\alpha 1H$  por otros cationes divalentes como  $Ni^{2+}$  (Lee et al., 1999b),  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  (Jeong et al., 2003). No obstante, la especificidad del bloqueo descrita en el presente trabajo, no resultó ser tan marcada como se ha observado para el caso de  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , mismos que hasta ahora son los bloqueadores que con mayor especificidad discriminan entre los diferentes tipos de canales  $Ca_v3$ . Combinando nuestros resultados con los encontrados en la literatura, el orden de potencia para la inhibición de los canales tipo T por iones inorgánicos queda como sigue:  $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}$ ; dicha secuencia se cumple para los tres tipos de canales  $Ca_v3$ , siendo los canales  $\alpha 1H$  más sensibles al bloqueo, en comparación con los  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ . Como consecuencia indirecta de nuestros resultados, el ion  $La^{3+}$  y los de la serie de los lantánidos se mantienen como los bloqueadores inorgánicos más potentes de los canales tipo T, pues sus valores de  $IC_{50}$  se encuentran en el orden de decenas de nanomolar (Beedle et al., 2002; Biagi & Enyeart, 1990; Mlinar & Enyeart, 1993; Obejero-Paz et al., 2004).

Los valores de  $IC_{50}$  (Tabla 2) indican que el  $Ni^{2+}$  es un mejor bloqueador que el  $Cd^{2+}$  para los canales LVA, pero sólo cuando las corrientes son transportadas principalmente a través de los canales  $\alpha 1H$ , en los otros dos miembros de la subfamilia LVA, el  $Cd^{2+}$  parece ser ligeramente más potente que el  $Ni^{2+}$ . Varias preparaciones neuronales y no neuronales (células GH3, por ejemplo) muestran un orden de potencia similar ( $Cd^{2+} > Ni^{2+}$ ; Akaike et al., 1989b; Akaike et al., 1989a; Herrington & Lingle, 1992; Takahashi & Akaike, 1991). Sin embargo, otros estudios (que incluyen neuronas, células cardiacas y endocrinas) han encontrado que las corrientes LVA son bloqueadas más potentemente por  $Ni^{2+}$  que por  $Cd^{2+}$ , en tales preparaciones los canales  $\alpha 1H$  podrían estar contribuyendo de manera sustancial a la corriente total tipo T (Akaike et al., 1989a; Arnoult et al., 1998; Kaneda & Akaike, 1989; Perchenet et al., 2000a; Schrier et al., 2001; Wu & Lipsius, 1990). Esto también ha sido confirmado por un par de trabajos previos en los que se han empleado canales clonados. En uno de ellos, se encontró que los valores de  $IC_{50}$  con los que  $Cd^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  bloquean las corrientes del canal  $\alpha 1G$  de

ratón fueron  $658 \pm 23 \mu\text{M}$  y  $1130 \pm 60 \mu\text{M}$ , respectivamente (Lacinova et al., 2000). Mientras que en el segundo trabajo, utilizando el mismo canal  $\alpha 1\text{H}$  que aquí se utilizó, se reportó que los valores correspondientes fueron de  $\sim 218$  y  $\sim 10 \mu\text{M}$ , respectivamente para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  (Perchenet et al., 2000b).

## **B. Bloqueo Dependiente de Voltaje de los Canales $\text{Ca}_v3$**

La mayoría de los trabajos acerca del bloqueo de canales de calcio HVA por cationes divalentes (p. ej.,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) indican que el efecto es dependiente de voltaje (Hagiwara & Byerly, 1981; McFarlane & Gilly, 1998; Thevenod & Jones, 1992; Zamponi et al., 1996). En el caso concreto del  $\text{Ni}^{2+}$  existe la controversia sobre el número de sitios de unión en los que podría estar actuando, pues además de actuar como bloqueador de canal abierto, también modifica la cinética de activación, por lo que se propone que podría estar estabilizando al canal en el estado cerrado, mediante la unión a un sitio diferente (adicional) al poro de conducción del canal (McFarlane & Gilly, 1998). Además, los efectos dependientes de voltaje producidos por  $\text{Ni}^{2+}$  (reducción de la conductancia máxima y corrimiento de la curva  $I-V$  hacia voltajes más positivos) varían cuantitativa y cualitativamente dependiendo del subtipo de canal HVA (Zamponi et al., 1996). En el caso de los canales LVA, los posibles efectos dependientes de voltaje sólo han sido explorados por Mlinar & Enyeart (1993) en canales tipo T de células secretoras, y por Lee et al. (1999b) en canales recombinantes. Ambos trabajos coinciden en que el  $\text{Ni}^{2+}$  tiene un efecto ligeramente dependiente de voltaje específicamente en los canales  $\alpha 1\text{H}$ . El presente trabajo aporta evidencias adicionales de que el bloqueo de canales  $\alpha 1\text{H}$  por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , además de  $\text{Ni}^{2+}$ , es prácticamente independiente de voltaje. Coincidentemente, el mismo tipo de canales resultaron ser los más sensibles al bloqueo por los metales inorgánicos. Con fundamento en tales resultados, se puede sugerir que el poro de los canales  $\alpha 1\text{H}$  incluye un sitio de unión a los cationes inorgánicos de mayor afinidad, pero que no modifica la actividad dependiente del voltaje del mismo. En este contexto, la secuencia de aminoácidos de los canales  $\text{Ca}_v3$  no son muy diferentes entre si

(Perez-Reyes, 2003). Por ejemplo, las cuatro asas del poro que forman los canales  $\alpha 1H$  son 96% idénticas a las de  $\alpha 1G$ , razón por la cual se vuelve difícil deducir un sitio de unión a los bloqueadores inorgánicos “diferente” en los canales  $\alpha 1H$ . Por lo anterior, es probable que diferencias adicionales a la similitud del poro entre los canales  $Ca_v3$  (probablemente cambios en la estructura o divergencias en regiones aledañas al poro del canal), determinen la diferente sensibilidad a los bloqueadores inorgánicos en estas proteínas.

Por el contrario, los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$  mostraron un bloqueo dependiente de voltaje con los tres antagonistas inorgánicos, caracterizado por un mayor bloqueo de la corriente a voltajes negativos y corrimiento del  $V_{1/2}$  de activación de la corriente hacía voltajes más positivos cuando el bloqueador fue  $Co^{2+}$  ó  $Ni^{2+}$ ; y en el caso del  $Cd^{2+}$ , por un bloqueo predominante a voltajes positivos (Fig. 11 y Tabla 3). Estos resultados reafirman observaciones previas en el mismo sentido cuando se utilizó  $Ni^{2+}$  como bloqueador de dichos canales recombinantes (Lee et al., 1999b). Asimismo, el grupo de Hofmann (Lacinova et al., 2000) reportó también un corrimiento en el  $V_{1/2}$  de la curva de activación del canal  $\alpha 1G$  clonado de ratón en presencia de  $Ni^{2+}$ , mientras que el  $Cd^{2+}$  no modificó dicho parámetro.

## C. Efectos en las Colas de Corriente

### 1. *Desbloqueo inducido por potenciales extremos positivos y negativos*

El desbloqueo de canales HVA a potenciales extremos tanto positivos como negativos en la presencia de  $Cd^{2+}$  ha sido descrito en neuronas simpáticas (Jones & Marks, 1989; Thevenod & Jones, 1992) y sensoriales (Swandulla & Armstrong, 1989). Sin embargo, el fenómeno de desbloqueo en los canales LVA no se ha explorado lo suficiente. En un estudio previo, Mlinar & Enyeart (1993) usaron células C de rata y de humano, en las que la corriente de calcio LVA (la cual representa  $\sim 90\%$  de la  $I_{Ca}$  total) parece ser transportada principalmente por canales  $\alpha 1H$  (con base a su sensibilidad a  $Ni^{2+}$ , por ejemplo). Los autores no encontraron un desbloqueo de canales a potenciales muy despolarizados en presencia de  $Ni^{2+}$ , ni tampoco cuando usaron otros cationes trivalentes. En un trabajo más reciente,

usando canales  $\alpha 1I$  y  $Ni^{2+}$  como antagonista de la  $I_{Ca}$ , se reportó el desbloqueo de una fracción de estos canales en respuesta a despolarizaciones a voltajes positivos (Lee et al., 1999b). En el presente trabajo se analizó por primera vez el efecto de potenciales extremos en el bloqueo por  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  de los tres tipos de canales  $Ca_v3$  clonados de humano. Los resultados permiten sugerir que el mecanismo de bloqueo de los iones inorgánicos involucra su radio iónico y las diferencias entre las subunidades de los canales  $Ca_v3$ .

En primer lugar, los efectos observados con el  $Co^{2+}$  y el  $Ni^{2+}$  sobre los canales fueron muy similares; por ejemplo, el bloqueo fue dependiente de voltaje caracterizado por una inhibición de la  $I_{Ca}$  más pronunciada a voltajes negativos (Fig. 11), lo cual resulta en un corrimiento de la relación I-V hacia voltajes más positivos (Tabla 3). Además, la repolarización a voltajes negativos extremos (hasta -180 mV) incrementa agudamente la fracción de canales bloqueados (Fig. 13). Estos efectos fueron restringidos a los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ , con la única excepción de un ligero desbloqueo de canales  $\alpha 1H$  en presencia de  $Co^{2+}$  (limitado a un tercio de lo observado en los otros dos canales  $Ca_v3$ ; Fig. 13B). En segundo lugar, los efectos inducidos por el  $Cd^{2+}$  fueron totalmente opuestos a los descritos para  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . El bloqueo debido a  $Cd^{2+}$  se incrementó significativamente con las despolarizaciones a voltajes fisiológicos (-60 a +20 mV, principalmente en canales  $\alpha 1G$ ; Fig. 11A), y los canales fueron parcialmente liberados del bloqueo por  $Cd^{2+}$  mediante hiperpolarizaciones a voltajes muy negativos (más negativos que -100 mV). Evidencias de efectos opuestos entre  $Co^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  se han obtenido en canales HVA de neuronas del caracol, en las que una liberación del bloqueo debido a  $Cd^{2+}$  dependiente de voltaje se observó en colas de corriente, pero al reemplazar el  $Cd^{2+}$  con  $Co^{2+}$ , la amplitud de las colas de corriente fue disminuida drásticamente (Brown et al., 1983). Aunado a ello, los efectos de  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$  han sido descritos como independientes de voltaje en las corrientes de canales HVA de neuronas (Castelli et al., 2003; Magistretti et al., 2001; McFarlane & Gilly, 1998), aunque los resultados obtenidos con canales HVA recombinantes mostraron efectos dependientes de voltaje cuando el  $Ba^{2+}$  se utilizó como acarreador de la carga (Zamponi et al., 1996). Las bases moleculares de los distintos mecanismos de



bloqueo debido a la acción de los iones inorgánicos en canales LVA y HVA, permanece por ser aclarado.

No obstante, para los fines del presente trabajo se pueden hacer las siguientes consideraciones. El  $\text{Co}^{2+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  tienen un radio iónico muy similar (0.74 y 0.72 Å, respectivamente), mismos que son considerablemente más pequeños que el de los iones  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (0.97 y 0.99 Å, en el mismo orden). Entonces, se puede sugerir que los cationes pequeños (como los dos primeros) bloquean los canales  $\text{Ca}_v3$  en una forma dependiente de voltaje porque ellos son “atraídos” con más fuerza al interior del canal (pero sin atravesar el canal completo) a potenciales negativos extremos, y por consiguiente se incrementa la fracción de canales bloqueados. La liberación transitoria del bloqueo es promovida a voltajes positivos, como resultado del incremento de cargas positivas en la cara intracelular del canal, lo cual repele al catión antagonista hacia el espacio extracelular. A la luz de ésta interpretación, podemos predecir que los cationes divalentes como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  (cuyos radios iónicos son 0.73 y 0.74 Å, respectivamente) que bloquean a los canales  $\text{Ca}_v3$  con gran potencia a bajas concentraciones micromolares (Jeong et al., 2003), mostrarán efectos similares a los descritos aquí para  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . Así, el mayor bloqueo inducido por  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , e incluso por  $\text{Cd}^{2+}$ , en los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$  comparado con aquel observado en canales  $\alpha1H$ , sugiere importantes diferencias estructurales en la unión de estos metales divalentes en el poro de los canales  $\text{Ca}_v3$ .

En contraste, el bloqueo de los canales  $\text{Ca}_v3$  por cationes divalentes con radios iónicos más grandes (como es el caso del  $\text{Cd}^{2+}$ ), puede ser disminuido transitoriamente mediante la aplicación de voltajes negativos extremos (más negativos que -100 mV), aunque el bloqueo a voltajes intermedios muestra una débil dependencia al voltaje (Fig. 11). Despolarizaciones a voltajes más positivos que +50 mV, no indujeron ningún desbloqueo de canales en la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 15 y 16). En la literatura no existe información en canales tipo T para comparar nuestros resultados de  $\text{Cd}^{2+}$  en las colas de corriente, aunque en los canales HVA se ha reportado un fuerte desbloqueo a potenciales extremos negativos y positivos (Jones & Marks, 1989; Swandulla & Armstrong, 1989;

Thevenod & Jones, 1992; Wakamori et al., 1998). Ello sugiere que el mecanismo básico de bloqueo por  $\text{Cd}^{2+}$  pudiera estar conservado en todos los canales de calcio activados por voltaje. Varios trabajos previos han establecido que los bloqueadores inorgánicos de canales de calcio compiten con los iones permeantes ( $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$ , por ejemplo) por un sitio común de alta afinidad en el poro del canal (Chow, 1991; Hagiwara et al., 1974; Kim et al., 1993; Tang et al., 1993; Yang et al., 1993). En tal contexto, las tasas de asociación bimolecular determinadas en el presente trabajo sugieren que los iones inorgánicos pueden alcanzar fácilmente el sitio de alta afinidad desde la cara extracelular de la membrana, lo cual implica que dicho sitio de unión debe estar localizado en la apertura externa del poro de los canales  $\text{Ca}_v3$ .

## **2. *Modificaciones en la cinética de desactivación.***

Aunque los cationes divalentes tienen un efecto discreto sobre las constantes de tiempo de la activación e inactivación de los canales, sus efectos son más acentuados en la cinética con que los canales se cierran (desactivación). En un estudio realizado por Lacinova et al. (2000) con los canales  $\alpha1G$  de ratón y utilizando  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  como bloqueadores de la  $I_{\text{Ca}}$ , reportaron que ambos cationes aceleraron la tau de desactivación de estos canales, de forma dependiente de la concentración y con  $\text{Ca}^{2+}$  como acarreador de carga. En cambio, cuando la corriente fue transportada por  $\text{Ba}^{2+}$ , sólo el  $\text{Ni}^{2+}$  (pero no el  $\text{Cd}^{2+}$ ) logró ejercer el mismo efecto en la cinética de las colas de corriente. En el presente estudio,  $\text{Cd}^{2+}$  no aceleró las colas de corriente de los canales  $\alpha1G$  (ni las de  $\alpha1H$ ). Las tau de desactivación en ausencia y presencia del bloqueador inorgánico fueron prácticamente las mismas en el intervalo de voltajes entre -180 y -100 mV (Fig. 18). Es decir, en los voltajes en los que las colas de corriente son generadas exclusivamente por el cierre de los canales, el  $\text{Cd}^{2+}$  no modifica la cinética de desactivación de los mismos. Es probable que la diferencia entre nuestros resultados y los del grupo de Lacinova, se deban a que ellos evaluaron los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  en colas de corriente registradas a -40 mV, mientras que nosotros lo hicimos a voltajes desde -180 hasta -60 mV. Los registros de colas de corriente a -40 mV reflejan mayoritariamente la inactivación de los canales que fueron activados

durante el pulso despolarizante, mientras que el cierre de canales *per se* influye en menor medida a la amplitud y cinética de tales corrientes. Como ya se mencionó anteriormente, los resultados del presente trabajo mostraron que la cinética de inactivación de la  $I_{Ca}$  en presencia de  $Cd^{2+}$  se aceleró modesta pero significativamente a voltajes entre -30 y +20 mV (datos no mostrados). Por lo anterior, es posible observar este efecto reflejado en las colas de corriente registradas a -40 mV, tal como lo reporta el grupo de Lacinova. De hecho, en la Fig. 18A se puede observar que las colas de corriente registradas a potenciales menos negativos que -100 mV tienden a ser ligeramente más rápidas en la presencia de  $Cd^{2+}$ , lo cual es más evidente en canales  $\alpha 1H$  (Fig. 18B).

Otro hallazgo muy importante del presente estudio se observó en la cinética de desactivación de los canales  $\alpha 1I$  en presencia del  $Cd^{2+}$ . Bajo tales condiciones, las colas de corriente cruzan por encima de los registros obtenidos en condiciones control, lo cual significa que el curso temporal de cierre de los canales  $\alpha 1I$  se hizo más lento (Fig. 18D). El efecto de retardo de la cola de corriente fue dependiente de la concentración de  $Cd^{2+}$ , lo cual sugiere que el sitio de unión del  $Cd^{2+}$  se encuentra en la vía de permeación del canal, de tal manera que el canal no se puede cerrar mientras el  $Cd^{2+}$  se encuentre ocupando el sitio de unión. La consecuencia última es que las colas de corriente se hacen más lentas.

Existen suficientes evidencias en la literatura de que los canales de calcio HVA se pueden cerrar cuando el sitio de unión del filtro de selectividad se encuentra ocupado por cationes divalentes (Chow, 1991; Sather & McCleskey, 2003; Swandulla & Armstrong, 1989). Este conocimiento sugiere el hecho de que los canales se encuentren ocupados por un catión divalente es una parte esencial del mecanismo de apertura y cierre del canal, tal y como sucede en los canales de potasio. Con base en tal aseveración y haciendo una analogía con los canales de  $Ca_v3$ , entonces es razonable pensar que cuando un canal se cierra normalmente lo hace con un catión divalente en su interior, siendo  $Ca^{2+}$  el mejor candidato en condiciones fisiológicas. Lo anterior tiene lugar en canales HVA y, de acuerdo con los resultados del presente trabajo, en los canales  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1H$ , pero no así en los canales  $\alpha 1I$ . En estos últimos, al parecer la presencia de otro catión divalente,

como el  $\text{Cd}^{2+}$ , provoca que el cierre del canal se lleve a cabo más lentamente debido a la competencia por el sitio de unión entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Cd}^{2+}$ , similar a lo reportado en canales de potasio con cationes monovalentes (Armstrong & Matteson, 1986). Resulta muy interesante que esto suceda únicamente en los canales  $\alpha 1\text{I}$  y sólo cuando el  $\text{Cd}^{2+}$  es el antagonista inorgánico. Como ya se ha mencionado, los canales  $\text{Ca}_v3$  presentan un alto porcentaje de similitud en las asas del poro (Perez-Reyes, 2003), aunado al hecho de que el tamaño del filtro de selectividad tampoco difiere de manera significativa entre ellos, aunque es 1.1 Å más pequeño que el de los canales tipo L (Cataldi et al., 2002). Es posible, no obstante, que los cambios estructurales asociados a divergencias puntuales en la secuencia de los canales  $\text{Ca}_v3$ , pudieran explicar los efectos diferenciales del  $\text{Cd}^{2+}$  en las colas de corriente de los canales tipo T. De hecho, la sensibilidad diferencial mostrada por los canales  $\text{Ca}_v3$  en el bloqueo por  $\text{Ni}^{2+}$  (Lee et al., 1999b), también pudiera ser debida en parte a tales disparidades estructurales.

## D. Conclusiones

El presente estudio proporciona información nueva sobre las propiedades biofísicas y farmacológicas del bloqueo de los canales  $Ca_v3$  clonados de humano por diferentes cationes divalentes como el  $Cd^{2+}$ , el  $Co^{2+}$  y el  $Ni^{2+}$ . Las observaciones más importantes permiten concluir que: (1) los canales  $\alpha1H$  los más sensibles a la acción de los iones inorgánicos; (2) el bloqueo de la corriente de los canales  $\alpha1H$  fue prácticamente independiente del voltaje; (3) los otros dos miembros de la subfamilia,  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$ , exhiben menor sensibilidad al bloqueo por los iones inorgánicos, pero la inhibición de la corriente se acompaña de cambios en su dependencia al voltaje; (4)  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  inhiben la actividad de los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$  con las mismas características, mayor bloqueo a potenciales negativos, corrimiento de la curva  $I-V$  hacia voltajes más positivos y aceleración de la desactivación de los canales; (5) por su parte, el  $Cd^{2+}$  bloquea en mayor proporción la  $I_{Ca}$  a voltajes positivos y no modifica la relación  $I-V$  de los canales  $\alpha1G$  y  $\alpha1I$ ; (6) finalmente, los canales  $\alpha1I$  no pueden cerrarse mientras el  $Cd^{2+}$  se encuentra en la ruta de permeación del canal.

## VIII. REFERENCIAS

- Abernethy, D.R. & N.M.Soldatov.** 2002. Structure-functional diversity of human L-type Ca<sub>2+</sub> channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther* 300:724-728.
- Ahmad, S.N. & G.P.Miljanich.** 1988. The calcium channel antagonist, omega-conotoxin, and electric organ nerve terminals: binding and inhibition of transmitter release and calcium influx. *Brain Res* 453:247-256.
- Aidley, D.J.** 1989. *The Physiology of Excitable Cells*. 3 ed. Cambridge University Press, New York. 1-508 pp.
- Akaike, N., H.Kanaide, T.Kuga, M.Nakamura, J.Sadoshima, & H.Tomoike.** 1989a. Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol* 416:141-160.
- Akaike, N., P.G.Kostyuk, & Y.V.Osipchuk.** 1989b. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 412:181-195.
- Arikath, J. & K.P.Campbell.** 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Armstrong, C.M. & B.Hille.** 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20; 4:371-380.
- Armstrong, C.M. & D.R.Matteson.** 1986. The role of calcium ions in the closing of K channels. *J Gen Physiol* 87:817-832.
- Arnoult, C., M.Villaz, & H.M.Florman.** 1998. Pharmacological properties of the T-type Ca<sub>2+</sub> current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* 53:1104-1111.
- Bean, B.P.** 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Bean, B.P. & S.I.McDonough.** 1998. Two for T. *Neuron* 20:825-828.
- Beedle, A.M., J.Hamid, & G.W.Zamponi.** 2002. Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *J Membr Biol* 187:225-238.
- Benardeau, A., J.Weissenburger, L.Hondeghem, & E.A.Ertel.** 2000. Effects of the T-type Ca(2+) channel blocker mibefradil on repolarization of guinea pig, rabbit, dog, monkey, and human cardiac tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 292:561-575.
- Biagi, B.A. & J.J.Enyeart.** 1990. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am J Physiol* 259:C515-C520.
- Birnbaumer, L., N.Qin, R.Olcese, E.Tareilus, D.Platano, J.Costantin, & E.Stefani.** 1998. Structures and Functions of Ca<sup>2+</sup> β subunits. *J Bioenerg Biomembr* 30:357-375.
- Black, J.L., III.** 2003. The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr* 35:649-660.
- Brown, A.M., Y.Tsuda, & D.L.Wilson.** 1983. A description of activation and conduction in calcium channels based on tail and turn-on current measurements in the snail. *J Physiol* 344:549-583.
- Carbone, E. & H.D.Lux.** 1984. A low voltage-activated, fully inactivating calcium channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310:501-502.
- Castelli, L., F.Tanzi, V.Taglietti, & J.Magistretti.** 2003. Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> modify the gating kinetics of high-voltage-activated Ca<sub>2+</sub> channels in rat palaeocortical neurons. *J Membr Biol* 195:121-136.
- Cataldi, M., E.Perez-Reyes, & R.W.Tsien.** 2002. Differences in apparent pore sizes of low and high voltage-activated Ca<sub>2+</sub> channels. *J Biol Chem* 277:45969-45976.
- Catterall, W.A.** 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.

- Chemin, J., J. Nargeot, & P. Lory.** 2002. Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuriteogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* 22:6856-6862.
- Chen, Y., J. Lu, H. Pan, Y. Zhang, H. Wu, K. Xu, X. Liu, Y. Jiang, X. Bao, Z. Yao, K. Ding, W. H. Lo, B. Qiang, P. Chan, Y. Shen, & X. Wu.** 2003. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 54:239-243.
- Chow, R. H.** 1991. Cadmium block of squid calcium currents. Macroscopic data and a kinetic model. *J Gen Physiol* 98:751-770.
- Cribbs, L. L., J. C. Gomora, A. N. Daud, J. H. Lee, & E. Perez-Reyes.** 2000. Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1c, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett* 466:54-58.
- Cribbs, L. L., J. H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees, & E. Perez-Reyes.** 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Cuello, L. G., D. M. Cortes, & E. Perozo.** 2004. Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid bilayer. *Science* 306:491-495.
- Curtis, B. M. & W. A. Catterall.** 1984. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23:2113-2118.
- De Jongh, K. S., C. Warner, & W. A. Catterall.** 1990. Subunits of purified calcium channels,  $\alpha_2$  and  $\delta$  are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 265:14738-14741.
- Doering, C. J. & G. W. Zamponi.** 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.
- Dolphin, A. C.** 2003. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:599-620.
- Dolphin, A. C., C. N. Wyatt, J. Richards, R. E. Beattie, P. Craig, J. H. Lee, L. L. Cribbs, S. G. Volsen, & E. Perez-Reyes.** 1999. The effect of  $\alpha_2\delta$  and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel  $\alpha_1G$ . *J Physiol* 519 Pt 1:35-45.
- Elinder, F. & P. Arhem.** 2003. Metal ion effects on ion channel gating. *Q Rev Biophys* 36:373-427.
- Elmslie, K. S.** 2004. Calcium channel blockers in the treatment of disease. *J Neurosci Res* 75:733-741.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien, & W. A. Catterall.** 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Ertel, S. I., E. A. Ertel, & J. P. Clozel.** 1997. T-type Ca<sup>2+</sup> channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* 11:723-739.
- Fernández de Miguel, F.** 1998. Excitabilidad. In *Biología Funcional de los Animales*. M. L. Fanjul, F. Fernández de Miguel, and M. Hiriart, editors. Siglo Veintiuno Editores, México. 63-112.
- Frazier, C. J., J. R. Serrano, E. G. George, X. Yu, A. Viswanathan, E. Perez-Reyes, & S. W. Jones.** 2001. Gating kinetics of the alpha1H T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 118:457-470.
- Frishman, W. H., S. Charlap, S. Ocken, & C. Spivack.** 1985. Calcium-channel blockers and systemic hypertension. *J Clin Hypertens* 1:107-122.
- Goldin, A. L., R. L. Barchi, J. H. Caldwell, F. Hofmann, J. R. Howe, J. C. Hunter, R. G. Kallen, G. Mandel, M. H. Meisler, Y. B. Netter, M. Noda, M. M. Tamkun, S. G. Waxman, J. N. Wood, & W. A. Catterall.** 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368.

- Gomora, J.C., A.N.Daud, M.Weiergraber, & E.Perez-Reyes.** 2001. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol* 60:1121-1132.
- Gomora, J.C., J.Murbartian, J.M.Arias, J.H.Lee, & E.Perez-Reyes.** 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83:229-241.
- Hagiwara, S. & L.Byerly.** 1981. Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 4:69-125.
- Hagiwara, S., J.Fukuda, & D.C.Eaton.** 1974. Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. *J Gen Physiol* 63:565-578.
- Hagiwara, S., S.Ozawa, & O.Sand.** 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65:617-644.
- Hamill, O.P., A.Marty, E.Neher, B.Sakmann, & F.J.Sigworth.** 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hanlon, M.R. & B.A.Wallace.** 2002. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* 41:2886-2894.
- Heady, T.N., J.C.Gomora, T.L.Macdonald, & E.Perez-Reyes.** 2001. Molecular pharmacology of T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Jpn J Pharmacol* 85:339-350.
- Herrington, J. & C.J.Lingle.** 1992. Kinetic and pharmacological properties of Low Voltage-Activated Ca<sup>2+</sup> current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J Neurophysiol* 68:213-232.
- Hess, P., J.B.Lansman, B.Nilius, & R.W.Tsien.** 1986. Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 8 Suppl 9:S11-S21.
- Hille, B.** 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hirooka, K., G.E.Bertolesi, M.E.Kelly, E.M.Denovan-Wright, X.Sun, J.Hamid, G.W.Zamponi, A.E.Juhasz, L.W.Haynes, & S.Barnes.** 2002. T-Type calcium channel alpha1G and alpha1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J Neurophysiol* 88:196-205.
- Huguenard, J.R.** 1996. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58:329-348.
- Huguenard, J.R., M.J.Gutnick, & D.A.Prince.** 1993. Transient Ca<sup>2+</sup> Currents in Neurons Isolated From Rat Lateral Habenula. *Journal of Neurophysiology* 70:158-166.
- Huguenard, J.R. & D.A.Prince.** 1992. A Novel T-type Currents Prolongued Ca<sup>2+</sup>-dependent Burst Firing in GABAergic Neurons of Rat Thalamic Reticular Nucleus. *Journal of Neuroscience* 12:3804-3817.
- Jan, L.Y. & Y.N.Jan.** 1990. A superfamily of ion channels. *Nature* 345:672.
- Jeanmonod, D., A.Morel, R.Cancro, U.Ribary, & R.Llinas.** 2001. Thalamocortical dysrhythmia. Clinical and surgical aspects. *Thalamus Related Syst* 1:245-254.
- Jeong, S.W., B.G.Park, J.Y.Park, J.W.Lee, & J.H.Lee.** 2003. Divalent metals differentially block cloned T-type calcium channels. *Neuroreport* 14:1537-1540.
- Jiang, Y., A.Lee, J.Chen, V.Ruta, M.Cadene, B.T.Chait, & R.MacKinnon.** 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423:33-41.
- Jiang, Y., V.Ruta, J.Chen, A.Lee, & R.MacKinnon.** 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423:42-48.
- Jones, S.W. & T.N.Marks.** 1989. Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. Activation kinetics and pharmacology. *J Gen Physiol* 94:151-167.
- Kaneda, M. & N.Akaike.** 1989. The low-threshold Ca current in isolated amygdaloid neurons in the rat. *Brain Res* 497:187-190.



- Kaneda, M., M. Wakamori, C. Ito, & N. Akaike.** 1990. Low-threshold calcium current in isolated Purkinje cell bodies of rat cerebellum. *J Neurophysiol* 63:1046-1051.
- Kim, M.S., T. Morii, L.X. Sun, K. Imoto, & Y. Mori.** 1993. Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett* 318:145-148.
- Klugbauer, N., E. Marais, & F. Hofmann.** 2003. Calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* 35:639-647.
- Lacinova, L., N. Klugbauer, & F. Hofmann.** 2000. Regulation of the calcium channel  $\alpha_1G$  subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* 39:1254-1266.
- Lambert, R.C., Y. Maulet, J. Mouton, R. Beattie, S. Volsen, M. De Waard, & A. Feltz.** 1997. T-type  $Ca^{2+}$  current properties are not modified by  $Ca^{2+}$  channel beta subunit depletion in nodose ganglion neurons. *J Neurosci* 17:6621-6628.
- Lansman, J.B., P. Hess, & R.W. Tsien.** 1986. Blockade of current through single calcium channels by  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and  $Ca^{2+}$ . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol* 88:321-347.
- Lee, J.H., A.N. Daud, L.L. Cribbs, A.E. Lacerda, A. Pereverzev, U. Klockner, T. Schneider, & E. Perez-Reyes.** 1999a. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912-1921.
- Lee, J.H., J.C. Gomora, L.L. Cribbs, & E. Perez-Reyes.** 1999b. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block  $\alpha_1H$ . *Biophys J* 77:3034-3042.
- Leuranguer, V., E. Bourinet, P. Lory, & J. Nargeot.** 1998. Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* 37:701-708.
- Lievano, A., C.M. Santi, C.J. Serrano, C.L. Trevino, A.R. Bellve, A. Hernandez-Cruz, & A. Darszon.** 1996. T-type  $Ca^{2+}$  channels and  $\alpha_1E$  expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 388:150-154.
- Lin, J.W., B. Rudy, & R. Llinas.** 1990. Funnel-web spider venom and a toxin fraction block calcium current expressed from rat brain mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4538-4542.
- Lipscombe, D., J.Q. Pan, & A.C. Gray.** 2002. Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of  $Cav \alpha_1$ . *Mol Neurobiol* 26:21-44.
- Llinas, R., U. Ribary, D. Jeanmonod, R. Cancro, & A. Morel.** 2001. Thalamocortical dysrhythmia. Functional and imaging aspects. *Thalamus Related Syst* 1:237-244.
- Llinas, R., M. Sugimori, & B. Cherskey.** 1989. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann NY Acad Sci* 560:103-111.
- MacKinnon, R.** 2004. Structural biology. Voltage sensor meets lipid membrane. *Science* 306:1304-1305.
- Magistretti, J., S. Brevi, & M. de Curtis.** 2001.  $Ni^{2+}$  slows the activation kinetics of high-voltage-activated  $Ca^{2+}$  currents in cortical neurons: evidence for a mechanism of action independent of channel-pore block. *J Membr Biol* 179:243-262.
- Mariot, P., K. Vanoverberghe, N. Lalevee, M.F. Rossier, & N. Prevarskaya.** 2002. Overexpression of an  $\alpha_1H$  ( $Cav3.2$ ) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:10824-10833.
- Marty, A. and E. Neher.** 1995. Tight-seal whole-cell recording. In *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, editors. Plenum Press, New York. 31-52.
- Matteson, D.R. & C.M. Armstrong.** 1986. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol* 87:161-182.
- McFarlane, M.B. & W.F. Gilly.** 1998. State-dependent nickel block of a high-voltage-activated neuronal calcium channel. *J Neurophysiol* 80:1678-1685.

- Miljanich,G.P. & J.Ramachandran.** 1995. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:707-734.
- Mishra,S.K. & K.Hermsmeyer.** 1994. Selective inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels by Ro 40-5967. *Circ Res* 75:144-148.
- Mitterdorfer,J., M.Grabner, R.L.Kraus, S.Hering, H.Prinz, H.Glossmann, & J.Striessnig.** 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:319-334.
- Mlinar,B. & J.J.Enyeart.** 1993. Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J Physiol* 469:639-652.
- Noda,M. & S.Numa.** 1987. Structure and function of sodium channel. *J Recept Res* 7:467-497.
- Nowycky,M.C., A.P.Fox, & R.W.Tsien.** 1985. Three types of neuronal calcium channel with different agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Obejero-Paz,C.A., I.P.Gray, & S.W.Jones.** 2004. Y3+ block demonstrates an intracellular activation gate for the alpha1G T-type Ca<sup>2+</sup> channel. *J Gen Physiol* 124:631-640.
- Perchenet,L., A.Benardeau, & E.A.Ertel.** 2000b. Pharmacological properties of Ca(V)<sub>3.2</sub>, a low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361:590-599.
- Perchenet,L., A.Benardeau, & E.A.Ertel.** 2000a. Pharmacological properties of Ca(V)<sub>3.2</sub>, a low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361:590-599.
- Perez-Reyes,E.** 1999. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci* 56:660-669.
- Perez-Reyes,E.** 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Perez-Reyes,E., L.L.Cribbs, A.Daud, A.E.Lacerda, J.Barclay, M.P.Williamson, M.Fox, M.Rees, & J.H.Lee.** 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Perez-Reyes,E. & T.Schneider.** 1995. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* 48:1111-1124.
- Randall,A. & R.W.Tsien.** 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995-3012.
- Randall,A.D. & C.D.Benham.** 1999. Recent Advances in the Molecular Understanding of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-273.
- Sather,W.A. & E.W.McCleskey.** 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annual Review of Physiology* 65:133-159.
- Schrier,A.D., H.Wang, E.M.Talley, E.Perez-Reyes, & P.Q.Barrett.** 2001. alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C265-C272.
- Serrano,J.R., S.R.Dashti, E.Perez-Reyes, & S.W.Jones.** 2000. Mg(2+) block unmasks Ca(2+)/Ba(2+) selectivity of alpha1G T-type calcium channels. *Biophys J* 79:3052-3062.
- Sperelakis,N.** 1995. Electrogenesis of Membrane Excitability. In Cell Physiology Source book. N.Sperelakis, editor. Academic Press, New York. 255-278.
- Stuhmer,W., F.Conti, H.Suzuki, X.D.Wang, M.Noda, N.Yahagi, H.Kubo, & S.Numa.** 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339:597-603.
- Suzuki,S. & M.A.Rogawski.** 1989. T-type calcium channels mediate the transition between tonic and phasic firing in thalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7228-7232.

- Swandulla, D. & C.M. Armstrong.** 1989. Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1736-1740.
- Takahashi, H., M.J. Seagar, J.F. Jones, B.F. Reber, & W.A. Catterall.** 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482.
- Takahashi, K. & N. Akaike.** 1991. Calcium antagonist effects on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 256:169-175.
- Talley, E.M., L.L. Cribbs, J.H. Lee, A. Daud, E. Perez-Reyes, & D.A. Bayliss.** 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895-1911.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, & H. Takahashi.** 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Tang, S., G. Mikala, A. Bahinski, A. Yatani, G. Varadi, & A. Schwartz.** 1993. Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J Biol Chem* 268:13026-13029.
- Thevenod, F. & S.W. Jones.** 1992. Cadmium block of calcium current in frog sympathetic neurons. *Biophys J* 63:162-168.
- Todorovic, S.M. & C.J. Lingle.** 1998. Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agent. *J Neurophysiol* 79:240-252.
- Tsien, R.W., D. Limpscombe, D.V. Madison, K.R. Bley, & A.P. Fox.** 1995. Reflections on calcium channels diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18:52-54.
- Wakamori, M., M. Strobeck, T. Niidome, T. Teramoto, K. Imoto, & Y. Mori.** 1998. Functional characterization of ion permeation pathway in the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *J Neurophysiol* 79:622-634.
- Witcher, D.R., M. De Waard, J. Sakamoto, C. Franzini-Armstrong, M. Pragnell, S.D. Kahl, & K.P. Campbell.** 1993. Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel complex purified from brain. *Science* 261:486-489.
- Wu, J.Y. & S.L. Lipsius.** 1990. Effects of extracellular Mg<sup>2+</sup> on T- and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* 259:H1842-H1850.
- Yamaguchi, H., J.N. Muth, M. Varadi, A. Schwartz, & G. Varadi.** 1999. Critical role of conserved proline residues in the transmembrane segment 4 voltage sensor function and in the gating of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1357-1362.
- Yang, J., P.T. Ellinor, W.A. Sather, J.F. Zhang, & R.W. Tsien.** 1993. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 366:158-161.
- Yunker, A.M.** 2003. Modulation and pharmacology of low voltage-activated ("T-Type") calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:577-598.
- Yunker, A.M. & M.W. McEnery.** 2003. Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr* 35:533-575.
- Zamponi, G.W., E. Bourinet, & T.P. Snutch.** 1996. Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol* 151:77-90.

## Contrasting Effects of $\text{Cd}^{2+}$ and $\text{Co}^{2+}$ on the Blocking/Unblocking of Human $\text{Ca}_v3$ Channels

D. Díaz, R. Bartolo, D.M. Delgadillo, F. Higueldo, J.C. Gomora

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, DF 04510, México

Received: 10 May 2005/Revised: 10 October 2005

**Abstract.** Inorganic ions have been used widely to investigate biophysical properties of high voltage-activated calcium channels (HVA:  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  families). In contrast, such information regarding low voltage-activated calcium channels (LVA:  $\text{Ca}_v3$  family) is less documented. We have studied the blocking effect of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  on T-currents expressed by human  $\text{Ca}_v3$  channels:  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$ , and  $\text{Ca}_v3.3$ . With the use of the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, we have recorded  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) currents from HEK-293 cells stably expressing recombinant T-type channels.  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  block was 2- to 3-fold more potent for  $\text{Ca}_v3.2$  channels ( $EC_{50} = 65$  and  $122 \mu\text{M}$ , respectively) than for the other two LVA channel family members. Current-voltage relationships indicate that  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  shift the voltage dependence of  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.3$  channels activation to more positive potentials. Interestingly, block of those two  $\text{Ca}_v3$  channels by  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  was drastically increased at extreme negative voltages; in contrast, block due to  $\text{Cd}^{2+}$  was significantly decreased. This unblocking effect was slightly voltage-dependent. Tail-current analysis reveals a differential effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on  $\text{Ca}_v3.3$  channels, which can not close while the pore is occupied with this metal cation. The results suggest that metal cations affect differentially T-type channel activity by a mechanism involving the ionic radii of inorganic ions and structural characteristics of the channels pore.

**Key words:**  $\text{Ca}_v3$  — Unblocking — Cadmium — Cobalt — Nickel

### Introduction

Calcium influx through voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels is crucial for many cellular functions, including neuronal excitability, muscle contraction, secretion of hormones and neurotransmitters, cell differentiation and gene expression (Bootman, Lipp & Berridge, 2001). The importance of these channels is also clinically relevant because  $\text{Ca}^{2+}$  channels are important pharmacological targets in the treatment of pain, hypertension, and certain forms of epilepsy (Mitterdorfer et al., 1998; Kim et al., 2001; Todorovic et al., 2001a, 2001b) and have been therefore subjected to intense research. However, such an effort has been focused mainly on high voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (HVA), and just recently the other members of the family, the low voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (LVA or T-type) have been object of such studies. One area that has received considerable interest is the use of inorganic ions (mainly divalent and trivalent metal ions) for analyzing function and structure of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Because metal ions are simple, have well-characterized atomic structures, and show small size differences, all of which are important for probing permeability mechanisms, they are a powerful tool to study the biophysical properties of  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Elinder & Arhem, 2003).

Previous studies of  $\text{Ca}^{2+}$  channel block by metal cations have provided valuable insights into HVA-channel structure and function (Nachshen, 1984; Lansman, Hess & Tsien, 1986; Chow, 1991; Wakamori et al., 1998). Recently, with the cloning of three different  $\alpha_1$  subunits that express T-type calcium currents (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Lee et al., 1999a), there have been considerable advances in the understanding of how inorganic ions interact with LVA channels. With the advantage of having isolated currents (free of contamination by other channels' activity) when using recombinant  $\text{Ca}^{2+}$  channels, several work groups have now reported some important clues about the actions of

Present address for R. Bartolo: Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, 58040, México  
Correspondence to: J.C. Gomora; email: jgomora@ifc.unam.mx

inorganic ions on T-type channels. First, Ca<sub>v</sub>3.2 ( $\alpha_{IH}$ ) has been shown to be selectively blocked by low micromolar concentrations of Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, while Ca<sub>v</sub>3.1 ( $\alpha_{IG}$ ) and Ca<sub>v</sub>3.3 ( $\alpha_{II}$ ) channels require 20- to 200-fold higher concentrations to induce the same effect (Lee et al., 1999b; Jeong et al., 2003). Also, studies with trivalent metal ions have demonstrated that Y<sup>3+</sup> is the most potent inhibitor of Ca<sub>v</sub>3.1 channels (Beedle, Hamid & Zamponi, 2002), although the sensitivity of the other two members of Ca<sub>v</sub>3 channels to these inorganic ions has not been reported. Notably, by using Y<sup>3+</sup> as a tool, it was suggested that the primary activation gate of Ca<sub>v</sub>3.1 must be in the intracellular side of the selectivity filter (Obejero-Paz, Gray & Jones, 2004).

As a further examination for actions of divalent metal ions on Ca<sub>v</sub>3 channel activity, we have used the three members of the human LVA channel family cloned to date (i.e., Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, and Ca<sub>v</sub>3.3), to improve our knowledge about the blocking effects of Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>, with particular interest in the modifications promoted by extreme potentials on the effects of the inorganic antagonists. We found Ca<sub>v</sub>3.2 channels to be the ones most sensitive to block by Cd<sup>+</sup> and Co<sup>2+</sup>, although the voltage-dependent effects were observed mainly in Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 channels. Interestingly, repolarization to extreme negative potentials elicited opposite effects on Ca<sub>v</sub>3 channels blocked by Cd<sup>2+</sup> compared with those blocked by Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>. This result indicates that metal cations affect T-type channel activity by different mechanisms. Additionally, our results about the effect of Cd<sup>2+</sup> on Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents suggest that the channel can not close while the pore is occupied by the divalent cation.

## Materials and Methods

### CELL CULTURE

HEK-293 cells stably transfected with human Ca<sub>v</sub>3.1 ( $\alpha_{IG}$ ; GenBank accession number AF190860; (Cribbs et al., 2000); Ca<sub>v</sub>3.2 ( $\alpha_{IH}$ ; GenBank accession number AF051946, Cribbs et al., 1998); and Ca<sub>v</sub>3.3 ( $\alpha_{II}$ ; GenBank accession number AF393329, Gomora et al., 2002), were kindly provided by Dr. E. Perez-Reyes. Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin, and 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin, and kept in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Selection of cells expressing the channels was maintained by adding 1 mg ml<sup>-1</sup> G-418 to the culture medium. Once every 4–5 days the maintenance cultures were split by using a brief trypsin digestion in a Ca- and Mg-free saline (Trypsin-EDTA) to detach the cells, followed by mechanical trituration, and by replating at 5- to 20-fold lower density. For recording purposes, a fraction of cells (~100–200 µl of the cell suspension) were replated on coverslips and placed in 35-mm plastic Petri dishes. Experiments were carried out on those cells, usually 2–48 h after reseeding. All cell culture reagents were purchased from Gibco-Life Technologies (Grand Island, NY).

### ELECTROPHYSIOLOGY

The macroscopic activity of Ca<sub>v</sub>3 channels in HEK-293 cells was examined using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill et al., 1981; Marty & Neher, 1995). Recordings were obtained at room temperature (21–23°C) using an Axopatch 200B amplifier, a Digidata 1322a A/D converter, and pCLAMP 8.02 software (Axon Instruments, Foster City, CA). Data were usually sampled at 5–10 kHz, following 5 kHz analog filtering, except for tail currents, which were digitized at 50 kHz and filtered at 10 kHz. Whole-cell series resistance (initially 3.7 ± 0.3 MΩ,  $n = 242$ ) was estimated from optimal cancellation of the capacitive transients with the built-in circuitry of the amplifier, and was compensated electrically by 60–70%. The average cell capacitance was 20.8 ± 1.4 pF ( $n = 242$ ). The holding potential was –100 mV. In most of the cases, currents were recorded on two channels, one with on-line leak subtraction using the P/–4 method, and the other to evaluate cell stability and holding current. Only leak-subtracted data are shown.

### SOLUTIONS

Whole-cell Ca<sup>2+</sup> currents were recorded using the following external solution (in mM): 175 tetraethylammonium (TEA) chloride, 2 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES, pH adjusted to 7.4 with TEA-OH. The internal pipette solution contained the following (in mM): 135 CsCl, 10 EGTA, 2 CaCl<sub>2</sub> (free Ca<sup>2+</sup> ~ 28 nM, calculated with the BAD program), 1 MgCl<sub>2</sub>, 4 Mg-ATP, 0.3 Na<sub>3</sub>GTP, and 10 HEPES, pH adjusted to 7.3 with CsOH. The recording chamber (volume ~0.2 ml) was continuously perfused by gravity at a rate of 1.5–2 ml/min. Bath solution exchange was done by a manually controlled six-way rotary valve. Pipettes were made from TW150–3 capillary tubing (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL), using a Model P-97 Flaming-Brown pipette puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA). Under these solution conditions the pipette resistance was typically 2–3 MΩ.

To investigate the effect of inorganic ions on Ca<sub>v</sub>3 channel activity, 100 mM aqueous stock solutions of Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and/or Co<sup>2+</sup> chloride (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) were prepared and then diluted with external solution to the required concentration.

### DATA ANALYSIS

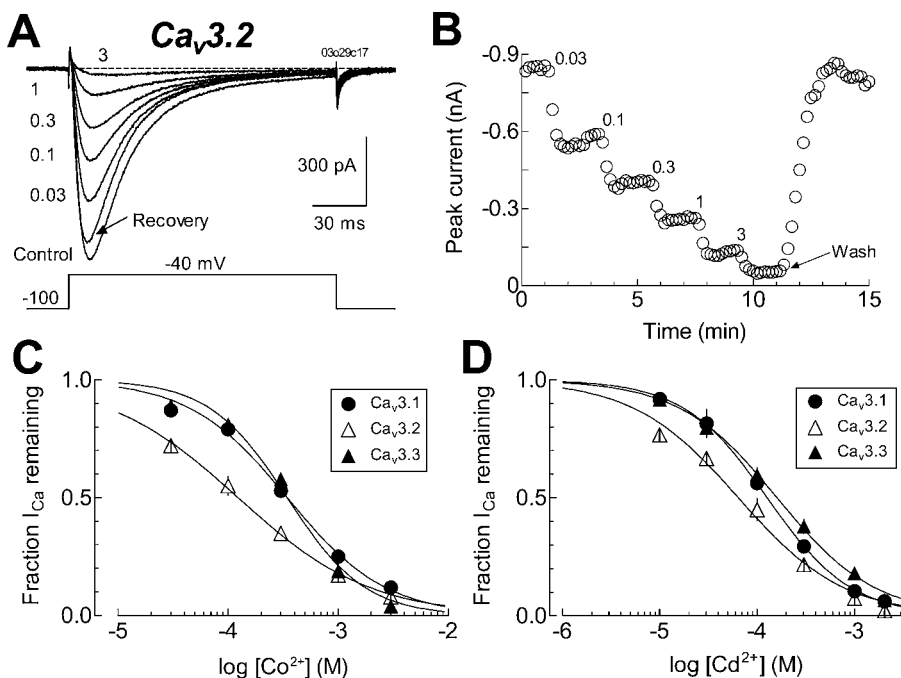
Clampfit 8.0 software (Axon Instruments) was used to obtain peak current values and exponential fits. Dose-response analysis and graphing of the data were done with Prism (GraphPad, San Diego, CA). The following Hill equation was used to fit dose-response data:

$$Y = 1/(1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) \cdot h)}) \quad (1)$$

where  $X$  is the logarithm of concentration,  $Y$  is the fraction of control current remaining after addition of the antagonist,  $IC_{50}$  is the concentration causing 50% inhibition of currents, and  $h$  is the Hill slope and gives a measure of steepness of the curve. For this analysis, current in control external solution was normalized to 1, and we assumed complete block of current with sufficient concentration of the antagonist. The voltage dependence of activation was estimated using a modified Boltzmann function to fit  $I$ - $V$  data:

$$I = I_{\text{max}}(V_m - V_{\text{rev}})/(1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k)) \quad (2)$$

where  $I$  is current,  $V_m$  is the test potential,  $V_{\text{rev}}$  is the apparent reversal potential,  $V_{1/2}$  is the mid-point of activation, and  $k$  is the slope factor.



**Fig. 1.** Human Ca<sub>v</sub>3 channel block by the divalents Co<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. Representative traces (A) and time course of inhibition (B) of Ca<sub>v</sub>3.2 currents by increasing Cd<sup>2+</sup> concentrations. Ca<sup>2+</sup> currents were recorded from an HEK-293 cell stably expressing Ca<sub>v</sub>3.2 channels in response to depolarizing steps at -40 mV, applied every 10 s. Dose-response relationships of Ca<sub>v</sub>3.1 (circles), Ca<sub>v</sub>3.2 (empty triangles), and Ca<sub>v</sub>3.3 (filled triangles) current block induced by Co<sup>2+</sup> (C) and Cd<sup>2+</sup> (D). The fraction  $I_{Ca}$  remaining was calculated considering peak values of control currents and residual currents recorded in the presence of each blocking cation. Data shown ( $n = 4-7$  at each concentration) were fitted with the Hill function (continuous lines Eq. 1, see Materials and Methods), the parameter obtained are shown in Table 1.

Instantaneous  $I-V$  relations were analyzed by fitting exponentials to the tail currents generated by repolarization after brief (2–10 ms; see Fig. 4) steps to +60 mV, or longer steps to different potentials (see Fig. 6). The fit region began once the tail currents reached a peak, usually 0.15–0.35 ms after repolarization, and extended to 15 ms. The amplitude and time constant ( $\tau$ , tau) obtained with the fittings were used to plot the instantaneous  $I-V$  relationships and to calculate the percent block of tail amplitude, and to plot the deactivation time constant channels versus the repolarization potential. Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 tail currents were well fitted by single exponentials. Only when the blocker accelerated tail currents (e.g., Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>), they were fitted with two exponentials, where the first tau was fixed to that observed in control conditions and the second tau was not constrained. It has been previously reported that Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents are fit better to two exponentials (Frazier et al., 2001; Gomora et al., 2002). Throughout the present study, Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents were also fitted with the sum of two exponentials. However, in order to simplify the analysis of the inorganic blockers' effects on Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents, here we use the weighted tau ( $A_1\tau_1 + A_2\tau_2$ ; where,  $A_1$  and  $A_2$ , are the normalized amplitude of the fast and slow component), which we have previously shown to accurately reflect the voltage dependence of the fast and slow components of Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents (Gomora et al., 2002).

All quantitative results are given as the mean  $\pm$  SEM. Differences in means were tested with unpaired two-tailed Student's  $t$ -test and were accepted as significant if  $P < 0.5$ .

## Results

### Ca<sub>v</sub>3.2 IS MORE SENSITIVE TO BLOCK BY DIVALENT METALS

In this study we investigate the ability of the inorganic ions Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> to block the cloned human T-type channels: Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, and Ca<sub>v</sub>3.3, stably expressed in HEK-293 cells. Using 2 mM Ca<sup>2+</sup>

as charge carrier, the concentration-dependent block by the divalents on T-type channel activity was determined by applying test pulses to -40 mV from a holding potential of -100 mV. Figure 1 shows a typical experiment using an HEK-293 cell expressing Ca<sub>v</sub>3.2 channels. Representative traces of Ca<sup>2+</sup> currents obtained in response to increasing concentrations of Co<sup>2+</sup> are shown in panel A, and the time course of block for the same cell is illustrated in panel B. Block by Co<sup>2+</sup>, as well as by Cd<sup>2+</sup>, was fast and fully reversible. To quantitate the relative potency of these inorganic ions, dose response curves were constructed for both divalents (Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>) and for each of the T-type channels, after measuring the cumulative block at different concentrations. The respective curves for Co<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> are shown in Fig. 1C and D, and the parameters obtained by fitting the experimental data with the Hill equation are listed in Table 1. As shown previously for Ni<sup>2+</sup> (Lee et al., 1999b), Ca<sub>v</sub>3.2 was also more sensitive to the divalents tested in this study. The concentration at which 50% of Ca<sub>v</sub>3.2 Ca<sup>2+</sup> current was blocked ( $IC_{50}$ ) was 65 and 122  $\mu$ M for Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>, respectively (Table 1). The corresponding values for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 were 2–3 times larger for the same divalent metals. Inhibition curves for Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> had Hill coefficients close to -1 (-0.7 to -1.2), with the smallest values belonging to Ca<sub>v</sub>3.2 again. Taken together, these results suggest that Ca<sub>v</sub>3.2 is the most sensitive of the cloned T-type subunits to Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>.

We next examined the voltage dependence of block for each of the divalents used in this study. To reach this goal, we applied typical  $I-V$  protocols in

**Table 1.** Summary of the dose-dependent block by inorganic ions deduced from test pulses to -40 mV

	Ca <sub>v</sub> 3.1		Ca <sub>v</sub> 3.2		Ca <sub>v</sub> 3.3	
	IC <sub>50</sub>	<i>h</i>	IC <sub>50</sub>	<i>h</i>	IC <sub>50</sub>	<i>h</i>
Cd <sup>2+</sup>	128	-1.0	65	-0.8	157	-0.9
Co <sup>2+</sup>	335	-0.9	122	-0.7	345	-1.2
Ni <sup>2+</sup>	250	-1.0	12	-0.8	216	-0.9

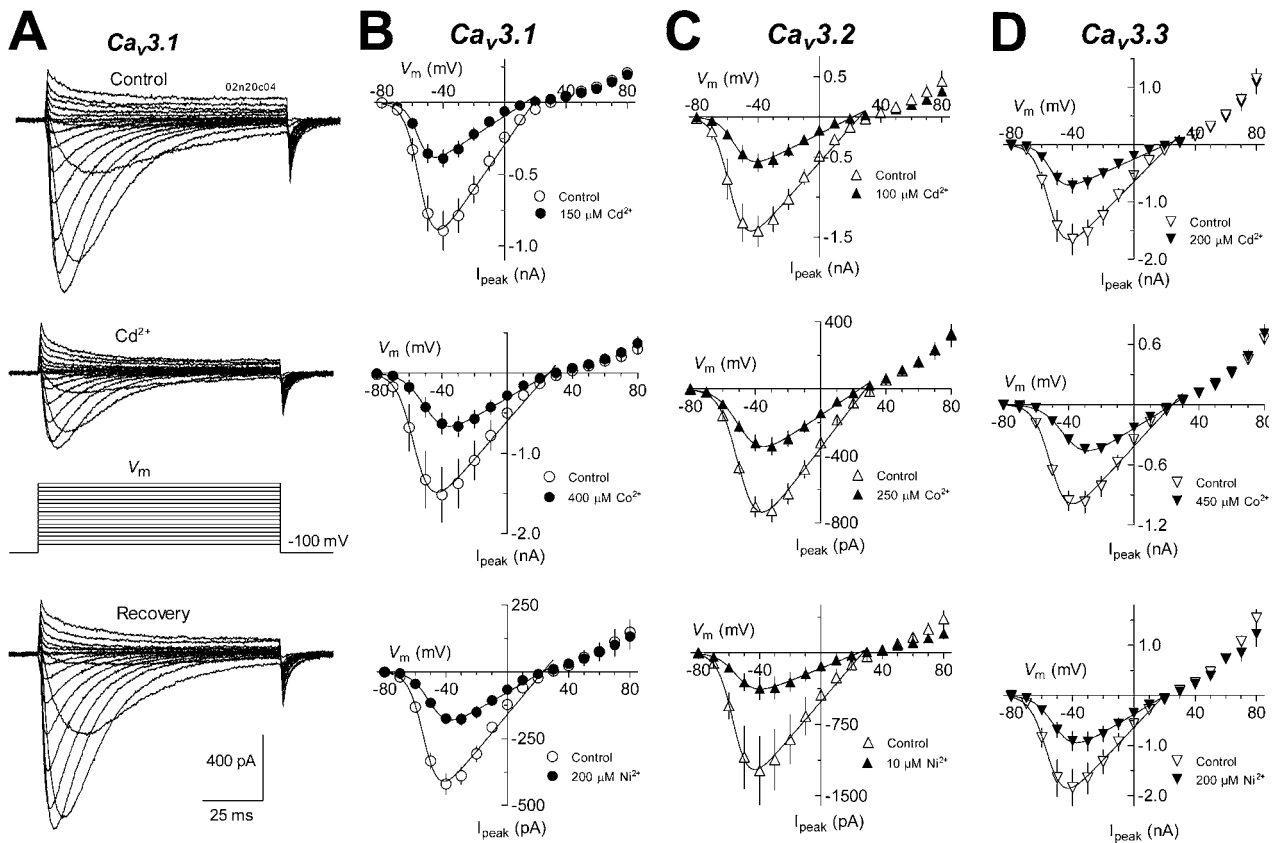
<sup>a</sup>Data from Lee et al., 1999b. IC<sub>50</sub> values are in μM.

the absence, in the presence, and after washout of antagonist concentrations that inhibit the currents by at least 50% (usually slightly above IC<sub>50</sub> values, *see* Table 1). Figure 2A shows current families obtained from an HEK-293 cell expressing Ca<sub>v</sub>3.1 channels in response to the indicated *I-V* protocol recorded under control, 150 μM Cd<sup>2+</sup>, and wash-out conditions. Peak current amplitudes were averaged for each experimental condition and plotted as a function of the membrane potential (*V<sub>m</sub>*) for the three Ca<sub>v</sub>3 subfamily members (Fig. 2B, C and D, respectively). Inward currents generated from all three recombinant channels started to be detectable at -70 mV, and reached peak near -40. The apparent reversal potential for all channels was ~ +30 mV. The inward currents were carried by Ca<sup>2+</sup> (2 mM), while the outward currents were carried by Cs<sup>+</sup> (135 mM). Experimental data were fitted with a modified Boltzmann function (*see* Materials and Methods) and the obtained parameters for the different conditions and antagonists of the three α<sub>1</sub> subunits are presented in Table 2. Figure 2A shows that Cd<sup>2+</sup> strongly blocks inward currents, but outward currents were practically unaffected in all three channels (Fig. 2B, C and D). Such behavior was observed also when using Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> (the latter was used for comparison in some experiments), suggesting that these inorganic ions may be acting as pore-channel blockers. Analysis of results shows that Cd<sup>2+</sup> did not modify the voltage dependence of current activation of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 channels, but there was a small shift of 3.6 mV to less negative voltages in the *V*<sub>1/2</sub> of Ca<sub>v</sub>3.2. On the contrary, the apparent reversal potential (*V*<sub>rev</sub>) was 5.6 and 4.2 mV less positive in the presence of Cd<sup>2+</sup> with respect to the control condition for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2, respectively (Table 2). While for Ca<sub>v</sub>3.3 channels, a smaller change (2.6 mV) was observed in *V*<sub>rev</sub> due to the Cd<sup>2+</sup> effect. These results suggest that the Cd<sup>2+</sup> binding site in Ca<sub>v</sub>3.3 channels might have a slower dissociation rate compared with that of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 channels.

#### BLOCK BY CO<sup>2+</sup> AND NI<sup>2+</sup> IS STRONGER AT NEGATIVE POTENTIALS

The blocking effect of Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> was clearly different from the one induced by Cd<sup>2+</sup> on Ca<sub>v</sub>3

channels. As can be concluded from Table 2, the voltage dependence of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 activation was shifted to more depolarized potentials. The changes in the *V*<sub>1/2</sub> values were between 4 and 9 mV, and the biggest shift was observed for Ca<sub>v</sub>3.3 channels in the presence of Co<sup>2+</sup> (*V*<sub>1/2</sub> -50.0 ± 0.3 mV and -41.2 ± 0.2 mV, for control and Co<sup>2+</sup> conditions, respectively). Smaller changes, but statistically significant, were observed for Ca<sub>v</sub>3.2 channels in the presence of Cd<sup>2+</sup> (3.6 mV shift) and Ni<sup>2+</sup> (2.6 mV shift) (Table 2). To analyze with more detail these effects, we calculated the percentage block of the peak current at potentials between -60 and +10 mV for each inorganic ion and for the three T-type channels. The results are summarized in Fig. 3, which also illustrates the blocking effect of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> on Ca<sub>v</sub>3 channel currents recorded at -60 and -20 mV (Fig. 3A-C). Generally speaking, Ca<sub>v</sub>3.2 channel behavior was practically voltage independent in response to the blocking effect of any of the inorganic ions tested in this study (Fig. 3E). In addition, unblocking at extreme potentials was practically absent in Ca<sub>v</sub>3.2 channels (*see* Fig. 5 and 6). On the contrary, Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 channels showed a pronounced voltage-dependent block in the presence of Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>, characterized by stronger block at negative potentials (Fig. 3D and F). In both channels, block by Co<sup>2+</sup> inhibited approximately twice the amount of current at -60 mV than at 0 mV. A weaker voltage-dependent effect was also observed for the blocking of Ca<sub>v</sub>3.1 channels by Cd<sup>2+</sup> (Fig. 3D), however, in this case, the block increases as the membrane potential is more depolarized. The percentage of Ca<sub>v</sub>3.1 current inhibited goes from 56 ± 3 at -60 mV to 81 ± 6 at +10 mV. These results are consistent with previous reports about the absence of voltage dependence of block of Ni<sup>2+</sup> on Ca<sub>v</sub>3.2 currents (Mlinar & Enyeart, 1993c; Lee et al., 1999b), and also with the shift to more positive potentials of the voltage-dependent activation curve of Ca<sub>v</sub>3.1 channels in the presence of 1 mM Ni<sup>2+</sup>, but not with 1 mM Cd<sup>2+</sup> (Lacinova, Klugbauer & Hofmann, 2000). The voltage-dependent block of the current by Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> was accompanied by modest but significant alterations in current kinetics, mainly for the inactivation and in the range of voltages between -60 to -30 mV. The inactivation time constant was slowed



**Fig. 2.** Effect of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  on  $\text{Ca}_v3$  channels' current-voltage relationship. (A) Typical family of  $\text{Ca}_v3.1$  currents shown before (Control), in the presence of ( $\text{Cd}^{2+}$ ) and after exposure (Recovery) to  $150 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . In this cell, such a concentration inhibited peak current at  $-40$  mV by 56%. Currents were activated from  $-100$  mV by voltage steps applied at 0.1 Hz to various test potentials between  $-80$  and  $+80$  mV. Averaged peak currents were plotted against test potential under the indicated experimental conditions and blockers for  $\text{Ca}_v3.1$  (B),  $\text{Ca}_v3.2$  (C) and  $\text{Ca}_v3.3$  (D) channels ( $n = 4-5$ ).  $I-V$  data was fitted with a modified Boltzmann function (continuous lines; Eq. 2, see Materials and Methods); the parameters obtained are shown in Table 2. Note that outward currents are poorly affected by the action of the inorganic blocker.

**Table 2.** Summary of  $V_{\text{rev}}$  and  $V_{1/2}$  data from peak  $I-V$  fitted curves

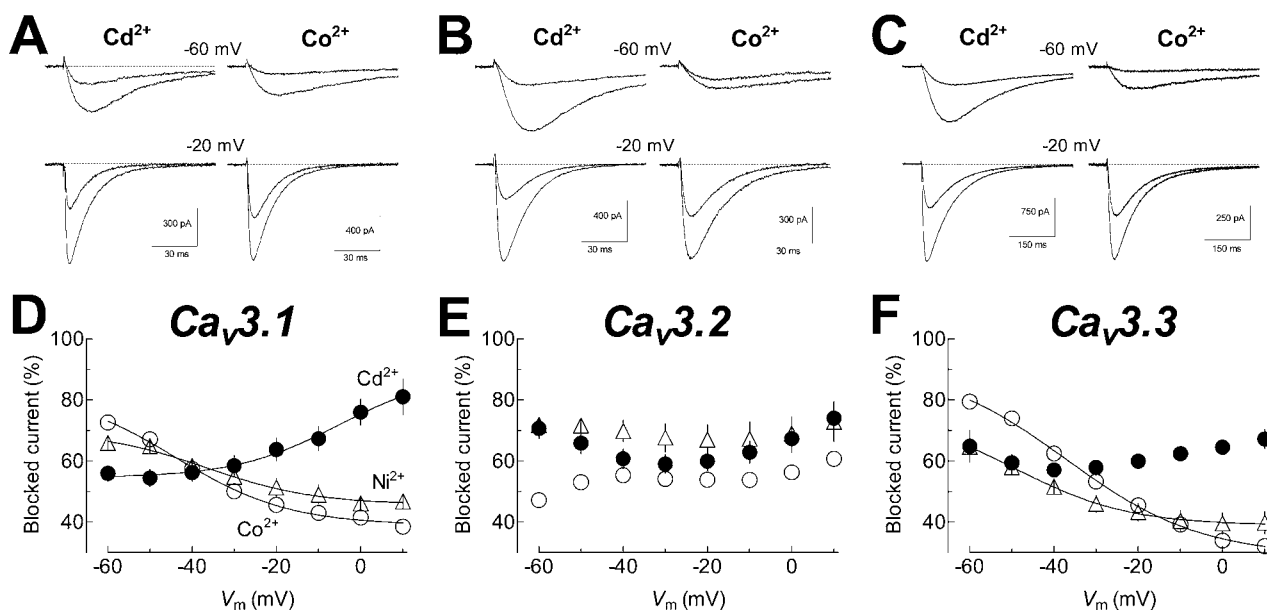
		Control		Inorganic blocker		Recovery	
		$V_{\text{rev}}$	$V_{1/2}$	$V_{\text{rev}}$	$V_{1/2}$	$V_{\text{rev}}$	$V_{1/2}$
$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Ca}_v3.1$	$19.0 \pm 0.6$	$-55.0 \pm 0.3$	$13.4 \pm 0.8^*$	$-56.1 \pm 0.4$	$18.8 \pm 0.7$	$-57.8 \pm 0.3$
	$\text{Ca}_v3.2$	$26.3 \pm 0.8$	$-57.9 \pm 0.4$	$22.1 \pm 0.8^*$	$-54.3 \pm 0.5^*$	$25.9 \pm 0.8$	$-59.6 \pm 0.3$
	$\text{Ca}_v3.3$	$23.8 \pm 0.6$	$-54.7 \pm 0.3$	$21.2 \pm 0.7^*$	$-53.9 \pm 0.4$	$23.0 \pm 0.6$	$-56.6 \pm 0.4$
$\text{Co}^{2+}$	$\text{Ca}_v3.1$	$25.7 \pm 0.7$	$-56.3 \pm 0.3$	$26.3 \pm 0.5$	$-49.3 \pm 0.3^*$	$23.5 \pm 0.8$	$-59.5 \pm 0.4$
	$\text{Ca}_v3.2$	$27.7 \pm 0.5$	$-49.4 \pm 0.2$	$24.3 \pm 0.4^*$	$-48.9 \pm 0.3$	$24.2 \pm 0.5$	$-53.6 \pm 0.3$
	$\text{Ca}_v3.3$	$23.7 \pm 0.6$	$-50.0 \pm 0.3$	$23.9 \pm 0.3$	$-41.2 \pm 0.2^*$	$22.7 \pm 0.7$	$-52.2 \pm 0.4$
$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Ca}_v3.1$	$23.2 \pm 1.1$	$-53.7 \pm 0.6$	$23.0 \pm 0.8$	$-49.7 \pm 0.5^*$	$19.7 \pm 0.9$	$-55.1 \pm 0.5$
	$\text{Ca}_v3.2$	$27.3 \pm 0.7$	$-56.3 \pm 0.3$	$24.9 \pm 0.6^*$	$-53.7 \pm 0.4^*$	$25.7 \pm 0.8$	$-61.2 \pm 0.4$
	$\text{Ca}_v3.3$	$19.9 \pm 0.6$	$-55.7 \pm 0.3$	$20.9 \pm 0.5$	$-50.7 \pm 0.3^*$	$22.0 \pm 0.9$	$-58.1 \pm 0.5$

Values are in mV. Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between control and inorganic blocker conditions are noted if the  $P$  value was  $< 0.01$  (\*). The number of cells varies from 3 to 7 for each condition.

down by 25–50% in both channels  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.3$ ; such effect was not observed in  $\text{Ca}_v3.2$  channels. This effect on current kinetics agrees with the observation that  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  block was weaker at positive

potentials compared with negative voltages (Fig. 3D and F). Blockers that unblock at positive potentials (e.g.,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ) would unblock during the test pulse, leading to slower apparent inactivation. On the





**Fig. 3.** Voltage-dependent block of  $\text{Ca}_v3$  currents by  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ . Representative  $\text{Ca}^{2+}$  currents at  $-60$  (top traces) and  $-20$  mV (bottom traces) recorded in the absence (larger currents) and the presence (smaller currents) of  $\text{Cd}^{2+}$  (left traces) and  $\text{Co}^{2+}$  (right traces) for  $\text{Ca}_v3.1$  (A),  $\text{Ca}_v3.2$  (B), and  $\text{Ca}_v3.3$  (C) channels. (D)–(F). Current recordings obtained under  $\text{Ni}^{2+}$  conditions showed similar effects to these illustrated for  $\text{Co}^{2+}$ . Percent block of peak current induced by  $\text{Cd}^{2+}$  (filled circles),  $\text{Co}^{2+}$  (empty circles) and  $\text{Ni}^{2+}$  (empty triangles) as a function of test potential for  $\text{Ca}_v3.1$  (D),  $\text{Ca}_v3.2$  (E) and  $\text{Ca}_v3.3$  (F) channels. Data were obtained from the same cells as in Fig. 2. Continuous lines are spline curves fit to the averaged data to indicate the tendencies of voltage-dependent block.

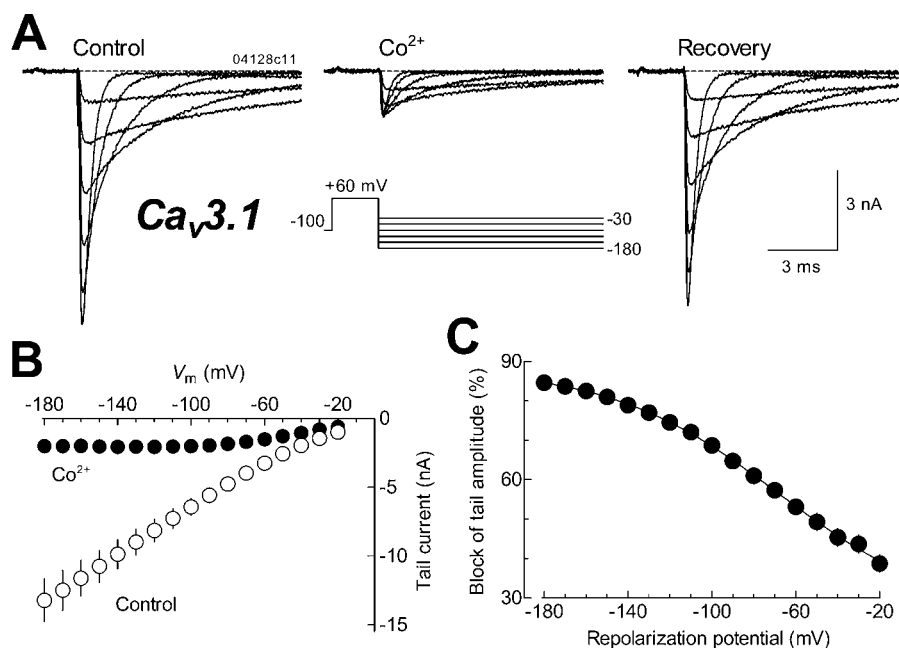
other hand,  $\text{Cd}^{2+}$  slightly speeds up the inactivation time constant of  $\text{Ca}_v3.1$  channels at voltages between  $-30$  to  $+20$  mV (data not shown). In this case, because  $\text{Cd}^{2+}$  block was more potent at positive potentials (Fig. 3A and D), then the block would occur during the test pulse, leading to faster inactivation rates (Gomora et al., 2001).

#### UNBLOCKING OF T-TYPE CALCIUM CHANNELS AT EXTREME NEGATIVE POTENTIALS

In order to further investigate the blocking effect of inorganic ions on T-type cloned channels, we used tail-current protocols to explore the possibility that extreme potentials might relieve channels from block exerted by the antagonists. We first applied a voltage protocol designed to record tail currents at different potentials (repolarization potential) after an activating pulse to  $+60$  mV for a short period of time (2 ms for  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$ , and 10 ms for  $\text{Ca}_v3.3$ ) to minimize inactivation of the channels (Fig. 4A). Fig. 4 shows a typical experiment for investigating unblock of  $\text{Ca}_v3.1$  channels at extreme negative potentials in the presence of  $\text{Co}^{2+}$ . Representative tail currents recorded at  $-180$ ,  $-150$ ,  $-120$ ,  $-90$ ,  $-60$  and  $-30$  mV under control,  $150 \mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$  and recovery conditions are illustrated in Fig. 4A. Tail current amplitudes for each condition were measured and plotted against the respective repolarization potentials (Fig. 4B). Inhibition of the currents by

$\text{Co}^{2+}$  (or any other inorganic ion) was assessed by applying test pulses to  $-40$  mV for 150 ms (for  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$ ) or 500 ms (for  $\text{Ca}_v3.3$ ) of duration. As with the  $I$ - $V$  experiments, we routinely used blocker concentrations slightly above the  $IC_{50}$  values to reach a stationary block of  $\sim 60$ – $70\%$ . The percentage of block caused by  $\text{Co}^{2+}$  on  $\text{Ca}_v3.1$  tail current amplitudes increases sharply with the repolarization at negative potentials (Fig. 4C). Data in Fig. 4C indicate that the fraction of blocked channels was significantly higher at  $-180$  mV than at  $-40$  mV ( $85 \pm 1\%$  at  $-180$  mV compared with  $45 \pm 2\%$  at  $-40$  mV). In other words, repolarization at  $-180$  mV induced an additional 40% block of  $\text{Ca}_v3.1$  channels that were not blocked during the repolarization to  $-40$  mV. Blocking of the channels at negative potentials in the presence of  $\text{Co}^{2+}$  showed strong voltage dependence in the range of  $-160$  to  $-20$  mV. This effect was also observed with  $\text{Ca}_v3.3$  and  $\text{Ca}_v3.2$ , although the latter channels were less sensitive to the repolarization effect (Fig. 5). In the presence of  $\text{Co}^{2+}$ , block of  $\text{Ca}_v3.2$  channels increased from  $51 \pm 4\%$  at  $-20$  mV to  $67 \pm 4\%$  at  $-180$  mV; and for  $\text{Ca}_v3.3$ , from  $41 \pm 3\%$  to  $75 \pm 1\%$  at the same voltages.

We repeated the same experiments described for  $\text{Co}^{2+}$ , to explore the possible unblocking of T-type channels in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ . The results are presented in Fig. 5. Panels A, B and C show the data obtained from  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  and  $\text{Ca}_v3.2$ ,



**Fig. 4.** Extreme negative voltages induce stronger  $\text{Co}^{2+}$  block on  $\text{Ca}_v3.1$  channels. (A) Representative  $\text{Ca}_v3.1$  tail currents recorded after repolarization to various membrane potentials before (*Control*), in the presence of ( $\text{Co}^{2+}$ ) and after exposure (*Recovery*) to  $500 \mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ . In this cell, such a concentration inhibited peak current at  $-40$  mV by 59%. Shown are tail currents recorded following repolarization to  $-180$ ,  $-150$ ,  $-120$ ,  $-90$ ,  $-60$  and  $-30$  mV at each experimental condition. A 2-ms step to  $+60$  mV was used to activate channels. Recordings were filtered at 10 kHz and digitally sampled every  $20 \mu\text{s}$ . (B) Averaged  $\text{Ca}_v3.1$  tail current amplitudes ( $n = 6$ ) are plotted versus repolarization potential in the absence (*Control*, empty circles) and in the presence ( $\text{Co}^{2+}$ , filled circles) of  $500 \mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ . (C) Voltage dependence of block by  $\text{Co}^{2+}$  of tail currents. Percent block of tail amplitudes was calculated from the same data shown in (B). Note that block increases as membrane is repolarized to more negative potentials.

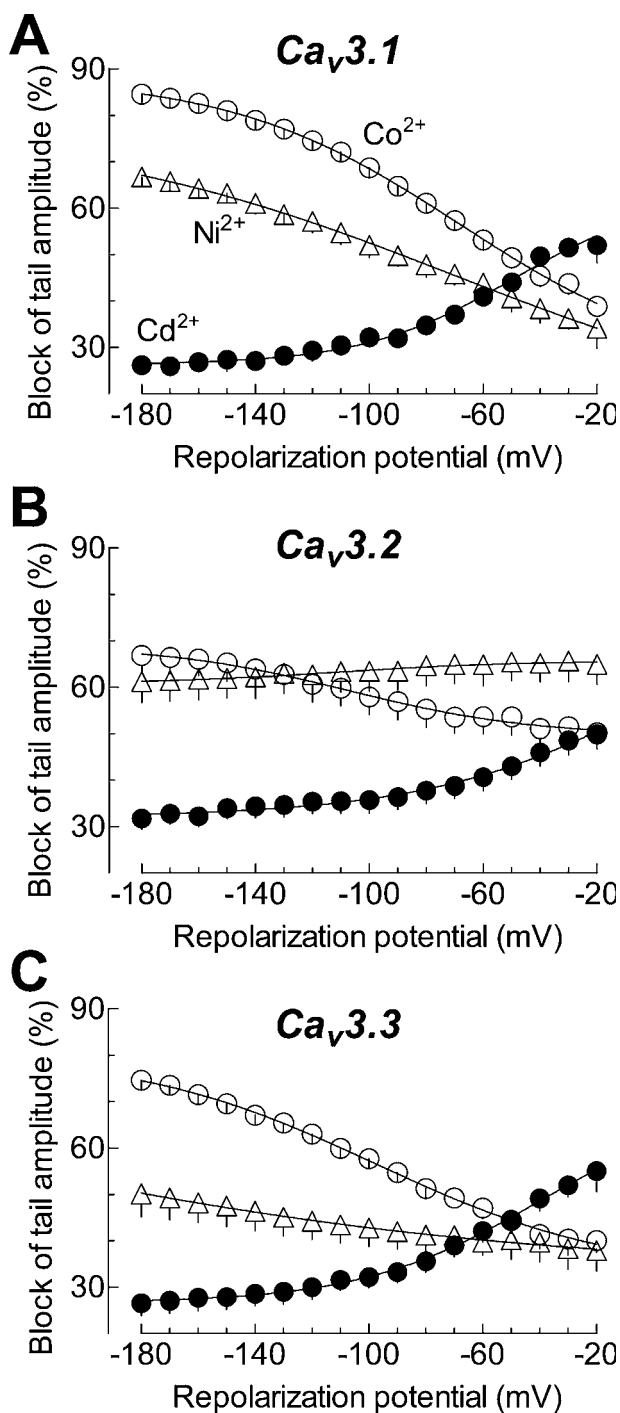
respectively. Compared with  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  had a similar but weaker effect on  $\text{Ca}_v3$  channels. However, in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$ , the repolarization to negative potentials evoked a totally distinct behavior of the blocked channels.  $\text{Cd}^{2+}$  block of  $\text{Ca}_v3.1$  tail currents decreased considerably at more negative repolarizing steps (Fig. 5A). Block of tail currents was always less than that observed during test pulses to  $-40$  mV, however in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$ , this difference was more evident at negative potentials (compare Figs. 3 and 5). Data in Fig. 5A indicates that the fraction of blocked channels diminished from  $50 \pm 1\%$  at  $-40$  mV to  $26 \pm 2\%$  at  $-180$  mV. In other words, repolarization at  $-180$  mV induced the unblocking of 52% of the channels that were blocked at  $-40$  mV. Unblocking of the channels in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  showed strong voltage dependence in the range of  $-100$  to  $-20$  mV, but at more negative potentials the unblock was almost voltage-independent ( $26 \pm 2\%$  at  $-180$  mV versus  $32 \pm 2\%$  at  $-100$  mV). Unblock of  $\text{Ca}_v3.2$  and  $\text{Ca}_v3.3$  channels under  $\text{Cd}^{2+}$  conditions had a behavior similar to  $\text{Ca}_v3.1$ , although  $\text{Ca}_v3.2$  channels showed smaller percentages of unblocking at all the potentials explored (Fig. 5).

Taken together, these results suggest that extreme hyperpolarization appears to attract  $\text{Cd}^{2+}$  into the cell, allowing  $\text{Ca}^{2+}$  ions to go through the

channel and, therefore, decreasing the percentage of block at negative potentials. In contrast, the binding of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  to the blocking site is drastically favored at negative potentials, which results in a higher fraction of blocked channels at those voltages.

#### EFFECT OF EXTREME DEPOLARIZATIONS ON $\text{Ca}_v3$ CHANNEL BLOCK BY INORGANIC CATIONS

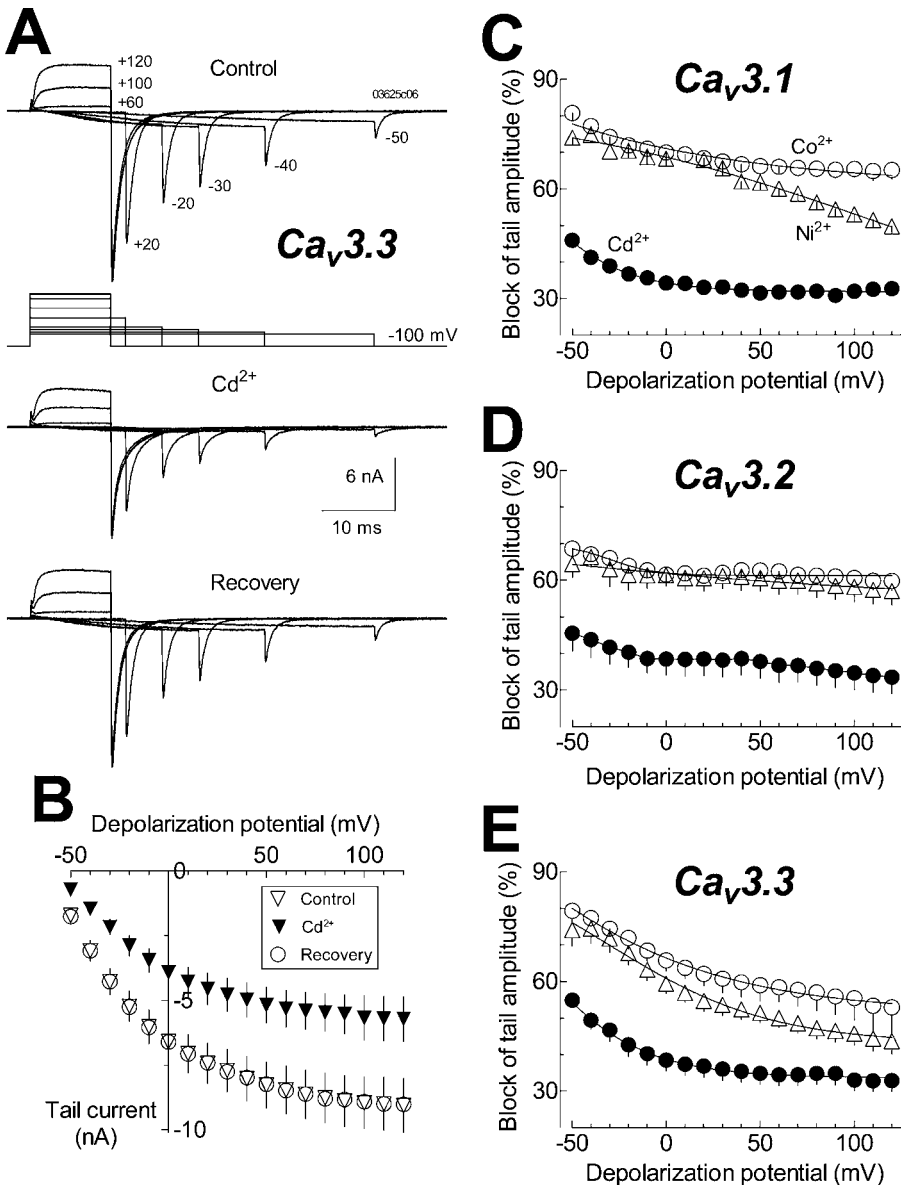
In sympathetic neurons, applying extreme positive potentials transiently relieves block of HVA  $\text{Ca}^{2+}$  channels by  $\text{Cd}^{2+}$  (Brown, Tsuda & Wilson, 1983; Thevenod & Jones, 1992). To determine whether block of recombinant human  $\text{Ca}_v3$  channels by any of the inorganic ions used in this study may be transiently relieved at positive potentials, we measured tail currents at  $-100$  mV after depolarizing steps to potentials as positive as  $+120$  mV (see protocol in Fig. 6A). The results are summarized in Fig. 6. Representative recordings obtained from an HEK-293 cell expressing  $\text{Ca}_v3.3$  channels before, during, and after exposure to  $200 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , are shown in panel A. Tail currents were generated by repolarization to  $-100$  mV when peak current was reached at each depolarizing potential; as a consequence the duration of each depolarizing step is shorter as it becomes more positive. For clarity, only



**Fig. 5.** Effect of extreme negative voltages on blocked  $\text{Ca}_v3$  channels by blocking cations. Percent block of tail amplitudes induced by repolarizing to the indicated  $V_{ms}$  in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  (filled circles),  $\text{Co}^{2+}$  (empty circles) and  $\text{Ni}^{2+}$  (empty triangles) for  $\text{Ca}_v3.1$  (A),  $\text{Ca}_v3.2$  (B) and  $\text{Ca}_v3.3$  (C) channels ( $n = 4-9$ ). Note that extreme negative voltages induced unblocking of  $\text{Cd}^{2+}$ -blocked channels, while the same voltage protocol increased the amount of channels blocked by  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ . It can also be observed that the effects on  $\text{Ca}_v3.2$  channels are much weaker compared with those on  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.3$ .

8 out of 18 current traces obtained in each condition are shown. Amplitudes of each tail current versus depolarization potential are plotted in Fig. 6B. Tail-current amplitudes keep increasing at potentials as positive as +100 mV, which indicates that more  $\text{Ca}_v3.3$  channels are activated at very positive potentials (Frazier et al., 2001; Gomora et al., 2002). Block by  $\text{Cd}^{2+}$  did not prevent this peculiarity of  $\text{Ca}_v3.3$  channels (Fig. 6B). Block of tail currents, expressed as percentage, induced by each of the inorganic ions tested for  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  and  $\text{Ca}_v3.3$ , is shown in Fig. 6C, D and E, respectively. Among the three T-type channels,  $\text{Ca}_v3.2$  exhibited practically no unblocking at positive potentials. In the presence of  $\text{Cd}^{2+}$ , all  $\text{Ca}_v3$  channels showed 12–19% of unblock after repolarization from negative voltages (–50 to 0 mV); when repolarization was made from positive potentials (from 0 to +120 mV) there was no additional unblocking of the channels (Fig. 6C–E). This observation is in agreement with the relief of  $\text{Cd}^{2+}$  promoted at negative potentials and the observation that outward currents were practically not affected by  $\text{Cd}^{2+}$ . For instance, in the case of  $\text{Ca}_v3.3$  channels, while the percentage of current inhibited during test potentials from –50 to 0 mV was very similar ( $63 \pm 3\%$ , data not shown), the percentage of inhibition of tail currents did decrease from  $57 \pm 3$  to  $42 \pm 2\%$  in the same voltage range (Fig. 6E). This could be explained by the fact that  $\text{Cd}^{2+}$  inhibition of outward currents was very weak (Fig. 2), as a consequence tail currents generated after repolarizations from potentials above  $V_{rev}$  did not show additional unblocking of  $\text{Ca}_v3$  channels. Furthermore, the percentage of blocked current was the same during the pulse (from  $18 \pm 5\%$  at +60 mV to  $20 \pm 3\%$  at +120 mV, data not shown) as that exhibited by the tail currents (from  $34 \pm 3\%$  at +60 mV to  $33 \pm 3\%$  at +120 mV; Fig. 6E). Taken together, these results indicated that block of  $\text{Ca}_v3$  channels by  $\text{Cd}^{2+}$  can be transiently relieved at negative potentials, while outward currents are poorly blocked by the divalent.

In contrast, unblocking of  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.3$  channels at positive potentials was clearly observed in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$ . Unblocking of these channels in the presence of  $\text{Co}^{2+}$  was also promoted by extreme depolarizations but the effect was much smaller (Fig. 6C, and E). Relief of  $\text{Ni}^{2+}$  block by extreme positive voltages of  $\text{Ca}_v3.3$  channels has been already documented by Lee et al. (1999b). The results obtained in the present study show that  $\text{Ca}_v3.1$  channels, but not  $\text{Ca}_v3.2$ , can also be relieved from  $\text{Ni}^{2+}$  block at positive potentials. The percentages of block of tail amplitudes for  $\text{Ca}_v3.3$  channels in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  after repolarizing from –50 and +120 mV were  $74 \pm 4\%$  and  $44 \pm 4\%$ , respectively (Fig. 6E), which indicates that 40% of the channels blocked at –50 mV were unblocked at +120 mV. The corre-



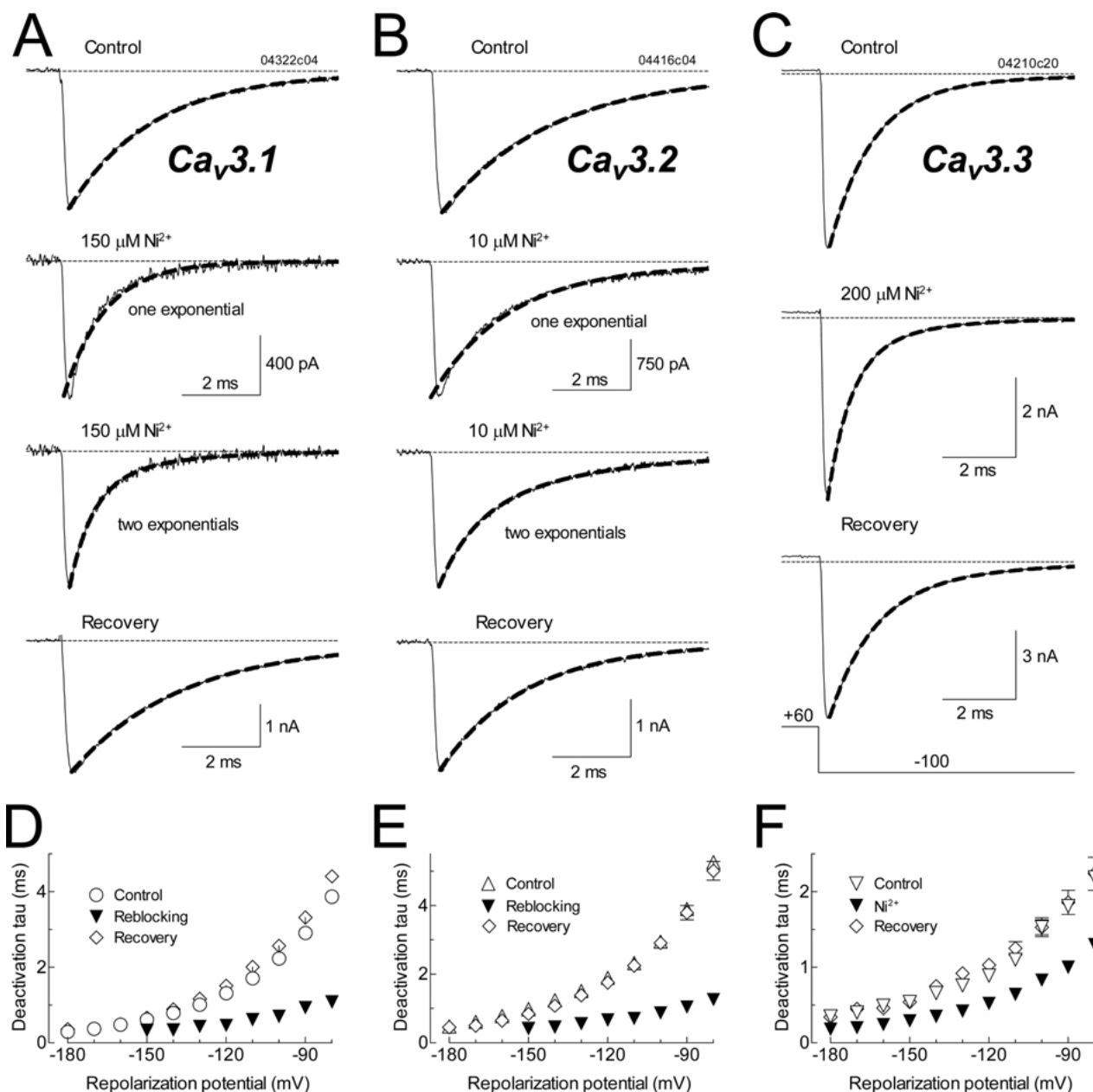
**Fig. 6.** Strong depolarizations induce partial unblocking in  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.3$  channels. (*A*) Representative  $Ca_v3.3$  tail currents recorded before (*Control*), in the presence ( $Cd^{2+}$ ) and after exposure (*Recovery*) to  $200 \mu M$   $Cd^{2+}$ . In this cell,  $200 \mu M$   $Cd$  inhibited peak currents evoked at  $-40$  mV by 69%. Tail currents were obtained in response to repolarizations to  $-100$  mV after depolarizing pulses to the indicated potentials. Duration of the depolarizing pulse for each particular voltage was such that the tail current is elicited at the peak of the inward current. Recordings were filtered at 10 kHz and digitally sampled every 20  $\mu s$ . (*B*) Average  $Ca_v3.3$  tail current amplitudes ( $n = 14$ ) obtained with the voltage protocol shown in (*A*) under the indicated experimental conditions. (*C*), (*D*), and (*E*) Percent block of tail current amplitudes for  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$ , and  $Ca_v3.3$ , respectively, induced by the exposure to  $\sim IC_{50}$  concentrations of the indicated inorganic blockers. Experimental data points were fitted with spline curves (smooth lines). Note that, again, effects on  $Ca_v3.2$  channels are much weaker compared with those on  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.3$ .

sponding value for  $Ca_v3.1$  channels was 30%. In summary, extreme positive potentials are very effective to induce relief of block by  $Ni^{2+}$  in  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.3$  channels, but much less effective when  $Co^{2+}$  or  $Cd^{2+}$  is the blocking agent.

#### EFFECTS ON TAIL-CURRENT KINETICS

The effect of  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  on the deactivation kinetics of T-type channels are summarized in Fig. 7.  $Ca^{2+}$  tail currents were recorded in response to the protocol already described in Fig. 4*A*. Representative tail currents recorded in control,  $Ni^{2+}$  and recovery conditions are illustrated for the three  $Ca_v3$  channels in Fig. 7*A–C*. In the three conditions, tail currents recorded at  $-100$  mV are shown with the exponentials fitted (*dashed thick line*).  $Ca_v3.1$  and

$Ca_v3.2$  tail currents obtained before and after exposure to  $Ni^{2+}$  were well fitted with a single exponential (*Control* and *Recovery* traces), but when tail currents were recorded in the presence of the inorganic blocker were fitted with one exponential, a fast component was missed by the fit ( $Ni^{2+}$ , upper traces). In order to properly adjust these tails, they were fit better to two exponentials, where the first time constant was constrained to that observed in control ( $Ni^{2+}$ , lower traces). The second tau (the faster one) would accurately reflect the (re)blocking of open channels by  $Ni^{2+}$ . Re-blocking time constants, together with those of control and recovery conditions, are plotted versus the repolarization potential at which they were recorded for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  channels in Fig. 7*D* and *E*. As can be seen, re-blocking taus were not detectably voltage-dependent for potentials where tail



**Fig. 7.** Acceleration of  $\text{Ca}_v3.1$  tail currents by  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ , but not by  $\text{Cd}^{2+}$ . Representative tail currents obtained from HEK-293 cells stably transfected with  $\text{Ca}_v3.1$  (A),  $\text{Ca}_v3.2$  (B), and  $\text{Ca}_v3.3$  (C)  $\alpha 1$  subunits. Shown are tail currents recorded following repolarization to  $-100$  mV after brief depolarization steps to  $+60$  mV in the absence (Control), in the presence ( $\text{Ni}^{2+}$ ), and after application (Recovery) of the indicated  $\text{NiCl}_2$  concentrations. In A and B, thick dashed lines are fits to a single exponential (Control,  $\text{Ni}^{2+}$  upper traces, and Recovery), or the sum of two exponentials ( $\text{Ni}^{2+}$ , lower traces). In C, all thick dashed lines are two exponential fits. For clarity, the protocol (illustrated at the bottom in C) and recordings show only 0.8 out of 2 ms (for  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.2$ ), and 1 out of 10 ms (for  $\text{Ca}_v3.3$ ) of the depolarization at  $+60$  mV, and 8 out of 18 ms of the repolarization. Time constants (tau) for the closing of  $\text{Ca}_v3.1$  (D),  $\text{Ca}_v3.2$  (E), and  $\text{Ca}_v3.3$  (F) channels obtained from exponential fits to tail currents, as explained in A–C, recorded at the indicated voltages. In D and E, reblocking tau values correspond to the second tau fitted to tail currents in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  (see Text). This tau reflects the time course of open channel (re)block by  $\text{Ni}^{2+}$ . In F, all tau values are time constants of the weighted tau (see Materials and Methods) calculated from biexponential fits of tail currents recorded under the indicated experimental conditions.

currents reflect mainly closing of the channels (i.e., between  $-150$  and  $-100$  mV). More negative than  $-150$  mV, re-blocking taus are not shown because  $\text{Ni}^{2+}$  tail currents were fit better with one exponen-

tial, as closing-channel and re-blocking taus tend to reach the same value.

Deactivation of  $\text{Ca}_v3.3$  channels is more complex than in the other two members of the  $\text{Ca}_v3$  subfamily.

**Table 3.** Time constant ( $\tau$ ) values obtained from fitted tail currents

	Ca <sub>v</sub> 3.1			Ca <sub>v</sub> 3.2			Ca <sub>v</sub> 3.3		
	Control	Block	Recovery	Control	Block	Recovery	Control	Block	Recovery
<b>Cd<sup>2+</sup></b>									
-120 mV	1.3 ± 0.07 (5)	1.4 ± 0.05	1.4 ± 0.09	1.5 ± 0.08 (7)	1.4 ± 0.04	1.7 ± 0.12	1.0 ± 0.07 (7)	1.6 ± 0.08	1.2 ± 0.05
-100 mV	2.3 ± 0.11	2.2 ± 0.11	2.3 ± 0.17	2.4 ± 0.13	2.1 ± 0.07	2.7 ± 0.09	1.5 ± 0.18	2.1 ± 0.10	1.5 ± 0.20
<b>Co<sup>2+</sup></b>									
-120 mV	1.7 ± 0.13 (6)	0.8 ± 0.04	1.7 ± 0.06	1.9 ± 0.32 (5)	0.6 ± 0.11	2.1 ± 0.33	1.2 ± 0.04 (5)	0.7 ± 0.03	1.1 ± 0.07
-100 mV	2.9 ± 0.25	1.3 ± 0.07	2.9 ± 0.08	2.9 ± 0.49	0.7 ± 0.10	3.2 ± 0.46	1.7 ± 0.10	1.1 ± 0.03	1.5 ± 0.11
<b>Ni<sup>2+</sup></b>									
-120 mV	1.3 ± 0.11 (6)	0.5 ± 0.04	1.5 ± 0.13	1.9 ± 0.09 (5)	0.7 ± 0.08	1.8 ± 0.17	0.9 ± 0.05 (5)	0.5 ± 0.03	1.1 ± 0.12
-100 mV	2.2 ± 0.21	0.7 ± 0.11	2.6 ± 0.20	2.9 ± 0.22	0.9 ± 0.13	2.9 ± 0.30	1.5 ± 0.22	0.9 ± 0.07	1.6 ± 0.23

Tail currents were fitted with one exponential for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 control and recovery conditions at -120 and -100 mV. For the same channels, values shown in the *Block* columns correspond to the second  $\tau$  obtained from two exponential fits of tail currents recorded in the presence of the blocker, where the first  $\tau$  was fixed to that observed in control. Ca<sub>v</sub>3.3 figures are weighted  $\tau$  (see Materials and Methods) values for each experimental condition. Data are expressed as mean ± SEM. The number of cells is reported in parentheses.

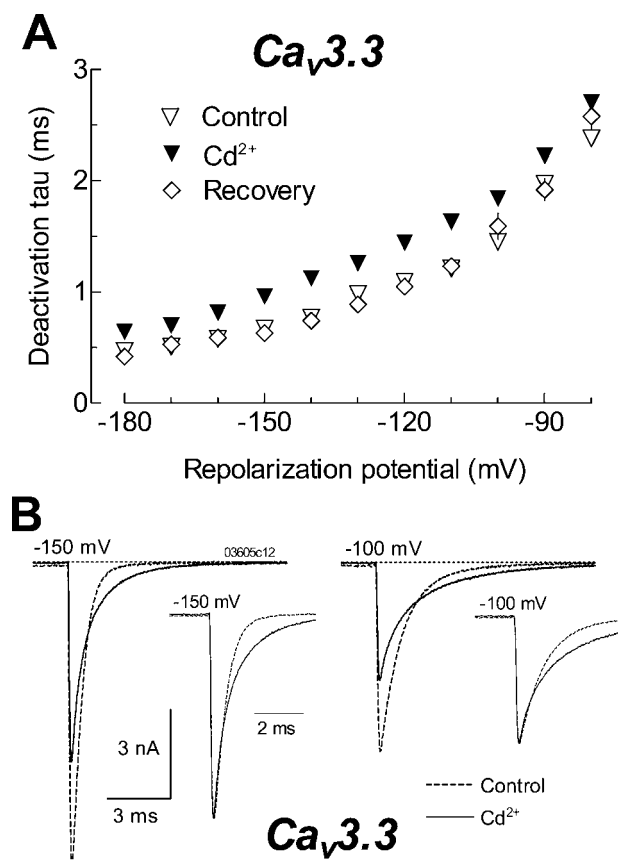
It usually requires two exponentials to properly fit tail currents (Frazier et al., 2001; Gomora et al., 2002). In this study, Ca<sub>v</sub>3.3 tail current analysis was simplified by fitting two exponentials in the absence and the presence of the inorganic blocker (Fig. 7C). For example, at -100 mV, control tail currents decayed with a fast  $\tau$  of  $1.3 \pm 0.1$  and a slow  $\tau$  of  $6.2 \pm 0.9$  ms ( $n = 5$ ). The fast component ( $A_1$ ) predominates at potentials between -100 and -180 mV, and the slow component ( $A_2$ ) increases as the repolarizing steps progress to less negative potentials. The  $A_1$  amplitude at -100 mV decreases from  $98 \pm 2$  to  $83 \pm 3\%$  in the presence of Ni<sup>2+</sup>, with a consequent increase in  $A_1$ . The effects of inorganic blockers on Ca<sub>v</sub>3.3 tail current kinetics were analyzed by using a weighted  $\tau$ , which involves the taus and amplitudes of both fitted exponentials to tail currents (see Materials and Methods). Figure 7F shows weighted  $\tau$  values obtained from Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents before (*Control*), in the presence (*Ni<sup>2+</sup>*), and after exposure to 200  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> (*Recovery*). The effect of Ni<sup>2+</sup> on Ca<sub>v</sub>3.3 deactivation kinetics was very similar to that observed for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 channels (Fig. 7D–F). Tail currents were sped up in the presence of the blocker at the whole range of voltages investigated, which suggests that Ni<sup>2+</sup> re-blocking is similar among all three Ca<sub>v</sub>3 channels.

Analysis of all three Ca<sub>v</sub>3 tail currents recorded in the presence of Co<sup>2+</sup>, but not with Cd<sup>2+</sup>, produced similar results to those described for Ni<sup>2+</sup>. This is illustrated with the data in Table 3, which shows tau values of fitted tail currents recorded at -120 and -100 mV of all three Ca<sub>v</sub>3 channels in the presence and the absence of Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Ni<sup>2+</sup>. It can be observed that Cd<sup>2+</sup> did not change significantly the kinetics of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 tail currents; on the contrary, in the presence of Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>, deactivation was clearly accelerated at both voltages (*Block*

column). As mentioned above, the re-blocking tau reflects the time course of open-channel block by the inorganic blocker. For instance, at -100 mV the time constant for Ni<sup>2+</sup> re-blocking of Ca<sub>v</sub>3.1 channels was  $0.7 \pm 0.1$  ms ( $n = 6$ ), which at this concentration would correspond to a bimolecular association constant of  $9.5 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. The corresponding values for Co<sup>2+</sup> were  $1.3 \pm 0.07$  ms ( $n = 6$ ), and  $1.6 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. The acceleration in the closing time constant observed in tail currents recorded in the presence of Co<sup>2+</sup> and/or Ni<sup>2+</sup>, could be reflecting the block of additional channels that were opened, but not blocked, during the test pulse.

As can be seen in Table 3, time constants for the closing of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 channels were practically the same in control and Cd<sup>2+</sup> conditions. This observation suggests that Cd<sup>2+</sup> (re)blocking of these channels is instantaneous relative to the speed of our voltage-clamp system (time constant < 60  $\mu$ s). So, it means that the time constant for reblocking by 150  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> is faster than 0.3 ms. This would correspond to a bimolecular blocking rate of  $\sim 2.2 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, which is slightly lower than the one reported in N-type Ca<sup>2+</sup> channels ( $10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; Thevenod & Jones, 1992), and closer to that obtained from single-channel data of L-type Ca<sup>2+</sup> channels ( $4 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; Lansman et al., 1986). To our knowledge, there is no Cd<sup>2+</sup> data for T-type channels, however, a bimolecular blocking rate of  $\sim 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> has been reported for Mg<sup>2+</sup> in Ca<sub>v</sub>3.1 channels (Serrano et al., 2000), and  $3.7 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> for Ni<sup>2+</sup> in Ca<sub>v</sub>3.3 (Lee et al., 1999b). All these data suggest that this group of metal divalents binds to Ca<sup>2+</sup> channels very rapidly (especially Cd<sup>2+</sup>), essentially diffusion limited.

A totally different Cd<sup>2+</sup> effect was observed in Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents; in fact, this divalent slowed down the time course of Ca<sub>v</sub>3.3 channel deactivation (Table 3 and Fig. 8A). Interestingly, the effect was



**Fig. 8.**  $\text{Ca}_v3.3$  channels close more slowly in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$ . (A) Dependence of deactivation time constants on repolarization potential for  $\text{Ca}_v3.3$  channels before (Control, empty inverted triangles), during ( $\text{Cd}^{2+}$ , filled inverted triangles) and after (Recovery, open diamonds) exposure to  $200 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . Tail currents (recorded as shown in Fig. 7) were fitted with two exponentials beginning 0.35 ms after repolarization from +60 mV. Data points are weighted tau averages of 9 cells. (B) Representative tail currents at -150 and -100 mV obtained from a HEK-293 cell stably expressing  $\text{Ca}_v3.3$  channels in the absence (Control dashed tail) and the presence ( $\text{Cd}^{2+}$ , continuous tail) of  $200 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . In this cell, such a concentration inhibited peak current at -40 mV by 63%. For clarity, protocol shows only 1.5 out of 10 ms of the depolarization at +60 mV, and 10.5 out of 50 ms of the repolarization. The insets show  $\text{Cd}^{2+}$  tail currents normalized with respect control tail amplitudes, to allow direct comparison of closing time course. Note that tail currents recorded in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  cross above the control recordings, suggesting that closing of the average channel is delayed until  $\text{Cd}^{2+}$  leaves the pore of the channel.

limited to the range of voltages where tail currents reflect basically the closing of channels, and the contribution to the tail current from inactivation of channels is practically absent (-180 to -90 mV). The slowing of the time constants shown by  $\text{Ca}_v3.3$  tail currents indicates quite a different  $\text{Cd}^{2+}$  effect on the channels. As can be seen in Fig. 8B,  $\text{Ca}_v3.3$  tail currents recorded in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  cross over with those of control, which suggests that this divalent actually slows down the closing of the channel

(confirmed when tails were normalized in amplitude, Fig. 8B, insets). We further investigated the slowing of  $\text{Ca}_v3.3$  channel tail currents in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  by testing the effect of different concentrations of the divalent. Slowing of channel closing was not detected with  $30 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , but with  $100 \mu\text{M}$  the effect was already present and it reached saturation with  $500$ – $1000 \mu\text{M}$  of the inorganic ion. For example, time-constant values for closing of  $\text{Ca}_v3.3$  channels at -120 mV were (in ms):  $1.1 \pm 0.06$  ( $n = 15$ ), control;  $1.0 \pm 0.09$  ( $n = 8$ ),  $30 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ;  $1.4 \pm 0.12$  ( $n = 7$ ),  $100 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ;  $1.6 \pm 0.07$  ( $n = 6$ ),  $250 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ;  $1.8 \pm 0.10$  ( $n = 8$ ),  $500 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ; and  $1.8 \pm 0.14$  ( $n = 4$ ),  $1000 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . Crossing of tail currents was observed at all voltages between -180 to -80 mV. This result indicates that  $\text{Cd}^{2+}$  in fact slows down the closing of  $\text{Ca}_v3.3$  channels and suggests that the divalent has to leave the permeation pathway in order for  $\text{Ca}_v3.3$  channels to close.

## Discussion

### BLOCK OF $\text{Ca}_v3$ CHANNELS BY $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , AND $\text{Ni}^{2+}$

In this study we show that among the three members of T-type channels,  $\text{Ca}_v3.2$  is the most sensitive to block by the divalents  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ . Both of these inorganic ions blocked the current through the recombinant T-type channels in a concentration-dependent manner, with a characteristic of 1:1 ligand:receptor binding (Fig. 1 and Table 1). Our observation that inward currents are strongly blocked while outward currents are poorly affected (Fig. 2), agrees with previous results, suggesting that inorganic ions act as pore channel blockers of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Swandulla & Armstrong, 1989; Mlinar & Enyeart, 1993; Lee et al., 1999b). In addition, our results show that the mechanism of action of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  on T-type channels also includes a voltage dependence of block, which is more prominent in  $\text{Ca}_v3.1$  and  $\text{Ca}_v3.3$  currents (Figs. 3 and 5). More interestingly,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  share some block properties, stronger inhibition of currents at negative voltages and speeding up of tail currents, while  $\text{Cd}^{2+}$  block is characterized by exerting the opposite effects. Our findings also show that  $\text{Ca}_v3.3$  channels can not close when  $\text{Cd}^{2+}$  is in the permeation pathway.

Previous studies have also shown a preferential block of other divalents on  $\text{Ca}_v3.2$  channels (Lee et al., 1999b; Jeong et al., 2003). The differential selectivity found in the present study among the T-type channels is not as has been described for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , so far the antagonists with the best blocking potency for discriminating among T-type channels. Combining our results with those of previous studies, the inhibitory effect of divalent

inorganic cations on recombinant T-type channels is as follows: Cu<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup>; this sequence applies to the three members of T-type channels, with Ca<sub>v</sub>3.2 channels more sensitive than Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3. As a consequence of our results, La<sup>3+</sup> and the lanthanides remain the most potent blockers of T-type channels at nanomolar concentrations (Biagi & Enyeart, 1990; Mlinar & Enyeart, 1993; Beedle et al., 2002; Obejero-Paz et al., 2004).

The IC<sub>50</sub> values (Table 1) indicate that Ni<sup>2+</sup> is a better blocker than Cd<sup>2+</sup> for LVA channels, but only when currents are carried by Ca<sub>v</sub>3.2 channels; in the other two members of the LVA subfamily, Cd<sup>2+</sup> seems to be slightly more potent than Ni<sup>2+</sup>. Several neuronal and non-neuronal preparations show similar order of potency (Cd<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup>; Akaike et al., 1989; Akaike, Kostyuk & Osipchuk, 1989; Takahashi & Akaike, 1991; Herrington & Lingle, 1992; Lacinova et al., 2000). However, other studies (that include neurons, cardiac and endocrine cells) have found that LVA currents are blocked more potently by Ni<sup>2+</sup> than by Cd<sup>2+</sup>; in such preparations, Ca<sub>v</sub>3.2 channels may contribute significantly to the total T-type current (Kaneda & Akaike, 1989; Wu & Lipsius, 1990; Arnoult, Villaz & Florman, 1998; Talley et al., 1999; Perchenet, Benardeau & Ertel, 2000; Schrier et al., 2001).

#### UNBLOCKING AT EXTREME POTENTIALS

Unblocking of HVA Ca<sup>2+</sup> channels at extreme positive and negative voltages in the presence of Cd<sup>2+</sup> has been reported in sympathetic and sensory neurons (Jones & Marks, 1989; Swandulla & Armstrong, 1989; Thevenod & Jones, 1992). LVA channel unblock by inorganic ions has been less explored. In one study, Mlinar & Enyeart (1993) used human and rat C cells, where LVA Ca<sup>2+</sup> current (~90% of total I<sub>Ca</sub>) seems to be carried by Ca<sub>v</sub>3.2 channels based on its sensitivity to Ni<sup>2+</sup>. They did not find any significant unblocking at extreme positive potentials when using La<sup>3+</sup>, Y<sup>3+</sup> or Ni<sup>2+</sup> to block T-type tail currents. In a more recent study, using recombinant Ca<sub>v</sub>3.3 channels and Ni<sup>2+</sup> as antagonist, a fractional unblocking of these channels after depolarizations to positive voltages was reported (Lee et al., 1999b). In the present work, we analyzed for the first time the effects of extreme potentials on the block of all three Ca<sub>v</sub>3 channels by Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>, and we found that the blocking mechanism of these inorganic ions is related to their ionic radii and also to the specific T-type channel isoform. First, we found Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> effects to be very similar, i.e., block was voltage-dependent with stronger inhibition of the current at negative potentials (Fig. 3), which results in a shift of the *I-V* relationship to more negative potentials (Table 2). In addition, repolarization to extreme negative voltages (up to -180 mV) increases sharply

the fraction of blocked channels (Fig. 5). These effects were selective for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 channels; the only exception was a small fractional unblocking of Ca<sub>v</sub>3.2 channels observed in the presence of Co<sup>2+</sup> (about one third of that observed for the other two T-type channels, Fig. 5B). Second, the voltage-dependent effects of Cd<sup>2+</sup> were opposite to those shown by Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>. Cadmium block was slightly enhanced with increasing depolarizations in the physiological range (-60 to +20 mV, mainly for Ca<sub>v</sub>3.1 channels; Fig. 3A), and blocked channels were partially cleared from Cd<sup>2+</sup> with extreme hyperpolarizations (more negative than -100 mV). Evidence for opposite effects of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> on HVA Ca<sup>2+</sup> channels were shown previously on snail neurons, where a voltage-dependent relief of Cd<sup>2+</sup> block was seen in tail currents, but after Co<sup>2+</sup> replacement for Cd<sup>2+</sup>, the tail currents were practically abolished (Brown et al., 1983). Furthermore, a voltage-independent effect of Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> has been described in neuronal HVA Ca<sup>2+</sup> currents (McFarlane & Gilly, 1998; Magistretti, Brevi & de Curtis, 2001; Castelli et al., 2003), although results obtained with recombinant HVA channels showed voltage-dependent effects when Ba<sup>2+</sup> was the charge carrier (Zamponi, Bourinet & Snutch, 1996). The molecular basis of the distinct mechanism of block by these inorganic ions on HVA and LVA channels remains to be determined.

Cobalt and nickel have very similar ionic radii (0.74 and 0.72 Å, respectively), which is considerably smaller than Cd<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> itself (0.97 and 0.99 Å, respectively). So, it can be suggested that small cations (e.g., Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>) block Ca<sub>v</sub>3 channels in a voltage-dependent manner because they are driven deep into the channel pore (without escaping into the cell) at extreme negative potentials, increasing the fraction of channels blocked. The relief of channel block is promoted at positive voltages, as a result of increasing positive charges in the intracellular side of the channel, which expels the positively charged blocker to the extracellular space. On the basis of this interpretation, we can predict that divalent cations like Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (with ionic radii of 0.73 and 0.74 Å, respectively), which strongly block recombinant T-type channels at low micromolar concentrations (Jeong et al., 2003), will show effects similar to those described for Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> in this work. In brief, the stronger block induced by Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>, and even by Cd<sup>2+</sup>, on Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 than in Ca<sub>v</sub>3.2 channel activity, suggests important structural differences in the binding site of these divalents in the pore of T-type channels.

In contrast, block of T-type channels by bigger divalent cations like Cd<sup>2+</sup> (Fig. 5), can be relieved with repolarizations to extreme negative potentials (more negative than -100 mV), although the block at intermediate voltages shows weak voltage depen-



dence (Fig. 2). Depolarizations to potentials more positive than +50 mV did not produce any relief of Ca<sub>v</sub>3 channel block by Cd<sup>2+</sup> (Fig. 6). There is no data on T-type channels to compare our Cd<sup>2+</sup> results with, although in HVA channels strong unblocking at extreme positive and negative potentials has been reported (Jones & Marks, 1989; Swandulla & Armstrong, 1989; Thevenod & Jones, 1992; Wakamori et al., 1998). This suggests that the basic mechanism of Cd<sup>2+</sup> block might be conserved among calcium channels. Several previous studies have established that inorganic Ca<sup>2+</sup> channel blockers compete with permeant ions for a common high-affinity binding site in the channel pore (Hagiwara & Takahashi, 1967; Swandulla & Armstrong, 1989; Chow, 1991; Kim et al., 1993; Tang et al., 1993; Yang et al., 1993). In this context, the bimolecular blocking rates determined in the present study for Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> (essentially diffusion-limited) suggest that the blocking ions can easily reach the high-affinity site from the extracellular side of the membrane. This implies that the high-affinity site is located at the external mouth of the Ca<sub>v</sub>3 channel's pore.

Despite similarities between HVA and T-type channels regarding the mechanism of block by divalents, especially for Cd<sup>2+</sup>, we found an intriguing difference between the two major subfamilies of Ca<sup>2+</sup> channels, and even more among T-type channels themselves. Tail current analysis showed that in Ca<sub>v</sub>3.3 channels, Cd<sup>2+</sup> tail currents cross above the control, which is usually interpreted as a significant slowing down of channel closing by the blocker (Chow, 1991; Swandulla & Armstrong, 1989). We found that crossing of tail currents was dependent on Cd<sup>2+</sup> concentration, requiring 30 μM to be detectable and reaching saturation at 250–500 μM. This suggests that Cd<sup>2+</sup> is binding to a site within the ion permeation pathway, causing the closing of the channel to be delayed until Cd<sup>2+</sup> leaves the permeation pathway. It is particularly noteworthy that despite the high level of sequence conservation among Ca<sub>v</sub>3 channels in their pore regions (Perez-Reyes, 2003), only Ca<sub>v</sub>3.3 channel closing was delayed by Cd<sup>2+</sup>. It is possible, however, that structural differences due to small changes in the sequences might explain the Cd<sup>2+</sup> effects on Ca<sub>v</sub>3.3 tail currents. In fact, the differential sensitivity shown by T-type channels to the block by Ni<sup>2+</sup> (Lee et al., 1999b), might be due to such structural differences as well.

We are deeply grateful to Dr. Edward Perez-Reyes (University of Virginia, Charlottesville, VA) for his enormous contribution providing cell lines stably expressing Ca<sub>v</sub>3 channels, and his comments on the manuscript. This work was supported by the following grants: CONACyT (Mexico) I37976-B and J-40693-Q to J.C. Gomora, and DGAPA-UNAM (Mexico) IN201602 to J.C. Gomora.

## References

- Akaike, N., Kanaide, H., Kuga, T., Nakamura, M., Sadoshima, J., Tomoike, H. 1989. Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J. Physiol.* **416**:141–160
- Akaike, N., Kostyuk, P.O., Osipchuk, Y.V. 1989. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J. Physiol.* **412**:181–195
- Arnoult, C., Villaz, M., Florman, H.M. 1998. Pharmacological properties of the T-type Ca<sup>2+</sup> current of mouse spermatogenic cells. *Mol. Pharmacol.* **53**:1104–1111
- Beedle, A.M., Hamid, J., Zamponi, G.W. 2002. Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *J. Membrane Biol.* **187**:225–238
- Biagi, B.A., Enyeart, J.J. 1990. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am. J. Physiol.* **259**:C515–C520
- Bootman, M.D., Lipp, P., Berridge, M.J. 2001. The organisation and functions of local Ca<sup>2+</sup> signals. *J. Cell Sci.* **114**:2213–2222
- Brown, A.M., Tsuda, Y., Wilson, D.L. 1983. A description of activation and conduction in calcium channels based on tail and turn-on current measurements in the snail. *J. Physiol.* **344**:549–583
- Castelli, L., Tanzi, F., Taglietti, V., Magistretti, J. 2003. Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> modify the gating kinetics of high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat palaeocortical neurones. *J. Membrane Biol.* **195**:121–136
- Chow, R.H. 1991. Cadmium block of squid calcium currents. Macroscopic data and a kinetic model. *J. Gen. Physiol.* **98**:751–770
- Cribbs, L.L., Gomora, J.C., Daud, A.N., Lee, J.H., Perez-Reyes, E. 2000. Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1c, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett.* **466**:54–58
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Perez-Reyes, E. 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ. Res.* **83**:103–109
- Elinder, F., Arhem, P. 2003. Metal ion effects on ion channel gating. *Q. Rev. Biophys.* **36**:373–427
- Frazier, C.J., Serrano, J.R., George, E.G., Yu, X., Viswanathan, A., Perez-Reyes, E., Jones, S.W. 2001. Gating kinetics of the alpha1I T-type calcium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**:457–470
- Gomora, J.C., Daud, A.N., Weiergraber, M., Perez-Reyes, E. 2001. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol. Pharmacol.* **60**:1121–1132
- Gomora, J.C., Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.H., Perez-Reyes, E. 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys. J.* **83**:229–241
- Hagiwara, S., Takahashi, K. 1967. Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. Gen. Physiol.* **50**:583–601
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* **391**:85–100
- Herrington, J., Lingle, C.J. 1992. Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J. Neurophysiol.* **68**:213–232
- Jeong, S.W., Park, E.G., Park, J.Y., Lee, J.W., Lee, J.H. 2003. Divalent metals differentially block cloned T-type calcium channels. *Neuroreport* **14**:1537–1540

- Jones, S.W., Marks, T.N. 1989. Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. Activation kinetics and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* **94**:151–167
- Kaneda, M., Akaike, N. 1989. The low-threshold Ca current in isolated amygdaloid neurons in the rat. *Brain Res.* **497**:187–190
- Kim, M.S., Morii, T., Sun, L.X., Imoto, K., Mori, Y. 1993. Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett.* **318**:145–148
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.J., Kim, S.S., McEnery, M.W., Shin, H.S. 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha (1G) T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* **31**:35–45
- Lacinova, L., Klugbauer, N., Hofmann, F. 2000. Regulation of the calcium channel alpha (1G) subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* **39**:1254–1266
- Lansman, J.B., Hess, P., Tsien, R.W. 1986. Blockade of current through single Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J. Gen. Physiol.* **88**:321–347
- Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., Perez-Reyes, E. 1999a. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.* **19**:1912–1921
- Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L., Perez-Reyes, E. 1999b. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys. J.* **77**:3034–3042
- Magistretti, J., Brevi, S., de Curtis, M. 2001. Ni<sup>2+</sup> slows the activation kinetics of high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in cortical neurons: evidence for a mechanism of action independent of channel-pore block. *J. Membrane Biol.* **179**:243–262
- Marty, A., Neher, E. 1995. Tight-seal whole-cell recording. In: Sakmann, B., Neher, E., (eds) Single Channel Recording. Plenum Press, New York
- McFarlane, M.B., Gilly, W.F. 1998. State-dependent nickel block of a high-voltage-activated neuronal calcium channel. *J. Neurophysiol.* **80**:1678–1685
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H., Striessnig, J. 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type-Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**:319–334
- Mlinar, B., Enyeart, J.J. 1993a. Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J. Physiol.* **469**:639–652
- Nachshen, D.A. 1984. Selectivity of the Ca binding site in synaptosome Ca channels. Inhibition of Ca influx by multivalent metal cations. *J. Gen. Physiol.* **83**:941–967
- Obejero-Paz, C.A., Gray, I.P., Jones, S.W. 2004. Y<sup>3+</sup> Block demonstrates an intracellular activation gate for the {alpha} 1G T-type Ca<sup>2+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* **124**:631–640
- Perchenet, L., Benardeau, A., Ertel, E.A. 2000. Pharmacological properties of Ca(V)3.2, a low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **361**:590–599
- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.* **83**:117–161
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Lee, J.H. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**:896–900
- Schrier, A.D., Wang, H., Talley, E.M., Perez-Reyes, E., Barrett, P.Q. 2001. alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am. J. Physiol.* **280**:C265–C272
- Serrano, J.R., Dashti, S.R., Perez-Reyes, E., Jones, S.W. 2000. Mg<sup>2+</sup> block unmasks Ca<sup>2+</sup>/Ba<sup>2+</sup> selectively of alpha1G T-type calcium channels. *Biophys. J.* **79**:3052–3062
- Swandulla, D., Armstrong, C.M. 1989. Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:1736–1740
- Takahashi, K., Akaike, N. 1991. Calcium antagonist effects on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**:169–175
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A. 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci.* **19**:1895–1911
- Tang, S., Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Varadi, G., Schwartz, A. 1993. Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J. Biol. Chem.* **268**:13026–13029
- Thevenod, F., Jones, S.W. 1992. Cadmium block of calcium current in frog sympathetic neurons. *Biophys. J.* **63**:162–168
- Todorovic, S.M., Jevtovic-Todorovic, V., Mennerick, S., Perez-Reyes, E., Zorumski, C.F. 2001a. Ca(v)3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide. *Mol. Pharmacol.* **60**:603–610
- Todorovic, S.M., Jevtovic-Todorovic, V., Meyenburg, A., Mennerick, S., Perez-Reyes, E., Romano, C., Olney, J.W., Zorumski, C.F. 2001b. Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* **31**:75–85
- Wakamori, M., Strobeck, M., Niidome, T., Teramoto, T., Imoto, K., Mori, Y. 1998. Functional characterization of ion permeation pathway in the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *J. Neurophysiol.* **79**:622–634
- Wu, J.Y., Lipsius, S.L. 1990. Effects of extracellular Mg<sup>2+</sup> on T- and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in single atrial myocytes. *Am. J. Physiol.* **259**:H1842–H1850
- Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.F., Tsien, R.W. 1993. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* **366**:158–161
- Zamponi, G.W., Bourinet, E., Snutch, T.P. 1996. Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J. Membrane Biol.* **151**:77–90