



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL FÁRMACO ANTIEPILÉPTICO
ZONISAMIDA EN CANALES DE CALCIO TIPO T**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANGELA NAVA BOLAÑOS

TUTOR:

Dr. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Amo el canto del cenizote, pájaro de cuatrocientas voces.
Amo el color del jade y el exquisito perfume de las flores. Pero
amo más a mi hermano el hombre.

Netzahualcóyotl

Se puede ver que el contenido de las leyes de la naturaleza corresponde únicamente a la posibilidad de encontrar lo invariable. Sin embargo porque cada tipo de invariancia es solo relativa a un dominio aprobado, se puede esperar que la ciencia prosiga hacia el descubrimiento de relaciones invariantes siempre nuevas, cada una de las cuales contribuye al entendimiento de algún nuevo dominio de fenómenos.

David Bohm

Que el hombre pueda interrogar, así como observar la naturaleza, han sido lecciones lentamente aprendidas en su evolución.

William Oster

De las regiones del cuerpo, es la cabeza la que recibe las más variadas atribuciones, destacan la correspondencia cósmica, la capacidad de raciocinio, la región de la comunicación, el centro de relación de la sociedad y con el cosmos, y el punto en el que aflora la vida interna.

Pensamiento de los antiguos nahuas.

López-Austín A.

DEDICADO A

Isalia Bolaños y Jesús Nava
... fuente inagotable de amor.

Isa y Beto
...por hacer de mi vida un festín en el que se
abren los corazones y se derraman las
alegrías.

A mi dulce abuelita Angela Nava

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mi padres Isalia Bolaños Nava y Jesús Nava Salgado (Chuchito) por todo lo que representan en mi vida, por el amor que siempre me brindan, por sus consejos, por ser un apoyo incondicional, por que me han enseñado las cosas más importantes de la vida, por su ejemplo constante, por su gran paciencia, siempre serán mis mejores maestros, son la pieza clave de todos mis logros y nunca dejarán de ser mis héroes, finalmente por que nada de esto sería posible sin ellos.

A mi director de tesis Juan Carlos Gómora Martínez por la formación integral que he recibido de su parte, por encausarme en la investigación científica, por la tolerancia, el tiempo, el espacio, la confianza, por avanzar conmigo paso a paso.

A la Dra. Dulce María del Carmen Delgadillo Álvarez por el valioso apoyo técnico en la realización de mis experimentos, por su revisión en mi escrito, y por sus aportaciones en mi formación académica pero sobre todo personal.

Al Dr. Manuel Miranda Anaya, por la revisión de mi trabajo de tesis, pero principalmente por que ha dejado huella académica encausándome en el maravilloso mundo de la neurobiología.

Al Dr. Mario Vázquez García y al M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagrado por su tiempo y dedicación en la revisión del presente trabajo de tesis.

A mis hermanitos Isalia y Alberto Nava quienes han sido los mejores amigos y cómplices durante todos estos años en la senda de la vida.

A Mariana por su valiosa amistad, por que vive mis sueños, compartiendo triunfos y fracasos.

A Dulce por ser una amiga tan especial, por sus sabios consejos, por su apoyo en todos los ámbitos.

A Diego por estar presente en muchas facetas durante todos estos años, por ayudarme a no dejar de soñar despierta, por el apoyo y la confianza, por ser parte de mi quimera.

A mis grandes amigos Adrián, Carlitos, Chris, Daniel, Diego, Dulce, Eve, Fer, Hob, James, Joubel, Lai, Mariana, Martín, Meli, Miri, Paulo, Roger, Saraí, Verito, por enseñarme lo valioso de la amistad, por tolerarme e impulsarme en los tiempos de caos, por todos los grandes momentos compartidos, por su infinito cariño.

A todas las personas que me ayudaron a navegar contracorriente.

A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me ha brindado, es sin duda un pilar en mi formación.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT proyecto J50250-Q/24994) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA; proyecto IN201602) de la UNAM.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
EPILEPSIA	4
CANALES IÓNICOS	6
Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.....	8
Clasificación de los Canales Ca_v	9
Estructura de los Canales Ca_v	11
Canales de Calcio Tipo T y Crisis Epilépticas.....	12
ZONISAMIDA	16
Mecanismo de Acción de la ZNS.....	17
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
MÉTODOS.....	21
CULTIVO CELULAR	21
Células HEK-293	21
Neuronas DRG	22
ELECTROFISIOLOGÍA.....	23
Soluciones de Registro	25
Electrodos.....	25
Protocolos de Registro.....	26
ANÁLISIS DE DATOS.....	27
RESULTADOS	29
EFECTO DE LA ZNS SOBRE LA CORRIENTE DE LOS CANALES Ca_v3 A DIFERENTES POTENCIALES DE MANTENIMIENTO	29
CAMBIOS EN LA RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE DE LOS CANALES Ca_v3 INDUCIDOS POR LA ZNS.....	33
ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE LA I_{Ca} EN PRESENCIA DE ZNS	41
MODIFICACIÓN DE LA INACTIVACIÓN EN EL ESTADO ESTACIONARIO DE LOS CANALES Ca_v3 POR ZNS.....	41
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS.....	56

RESUMEN

La epilepsia es una de las patologías cerebrales más comunes del mundo, afectando a 50 millones de personas. La investigación básica acerca de la biología de la epilepsia ha demostrado que el sustrato central en el que convergen todas las epilepsias son los canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas integrales de la membrana plasmática que se encuentran en prácticamente todos los tipos celulares, incluyendo las neuronas. La excitabilidad neuronal está determinada por la presencia de varios tipos de canales iónicos, entre los que se encuentran los canales de calcio activados por voltaje. Uno de los fármacos empleados en el tratamiento de la epilepsia es la zonisamida (ZNS), la cual tiene una actividad antiepiléptica de amplio espectro, es decir, se utiliza en el tratamiento de crisis parciales y generalizadas. Estudios previos muestran que la ZNS actúa inhibiendo la descarga en ráfagas de potenciales de acción, lo cual se debe en parte a la modulación de canales de sodio e inhibición de corrientes de calcio transportadas por canales tipo T. En el presente estudio se investigó si la ZNS ejerce un bloqueo diferencial sobre los canales de calcio tipo T ó Ca_v3 ($\alpha1G$, $\alpha1H$ y $\alpha1I$), y el posible mecanismo por el cual la ZNS modifica la actividad de dichos canales. El efecto de la ZNS sobre las corrientes tipo T se estudió en células HEK-293 que expresan de manera estable cada uno de los canales Ca_v3 , así como en neuronas provenientes de ganglios de la raíz dorsal de rata, utilizando para ello la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa. Los resultados indican que los canales $\alpha1G$ y $\alpha1H$ son más sensibles al bloqueo por ZNS, mientras que el canal $\alpha1I$ fue el menos afectado. El mecanismo de acción de este fármaco en la actividad de los canales Ca_v3 involucra un bloqueo dependiente de estado, de manera que hay mayor intensidad de bloqueo cuando el canal se encuentra parcialmente inactivado, este efecto se acompaña de una modificación de la inactivación en el estado estacionario del canal. Los resultados aportan nuevas evidencias del papel de los canales de calcio tipo T en la acción antiepiléptica de la ZNS.

INTRODUCCIÓN

México cuenta con más de un millón de personas que padecen epilepsia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el 2005, que en el mundo eran aproximadamente 50 millones las personas que tenían la enfermedad y que cada año se agregaban más de 2 millones de casos. Si bien es cierto que la epilepsia no hace discriminaciones geográficas, raciales ni sociales, también es verdad que aproximadamente el 85% de los casos se presentan en países en vías de desarrollo ya que es en estos países donde hay una mayor prevalencia de condiciones que favorecen la enfermedad, como lo son la desnutrición o enfermedades infecciosas que resultan en un daño permanente al cerebro. Se calcula que entre un 60 a 90% de los pacientes con epilepsia no reciben atención médica, por difícil acceso a los medicamentos y por estigmas sociales. La incidencia a la enfermedad ocurre más frecuentemente en la infancia, adolescencia y en adultos de la tercera edad (Dua et al., 2005). Aunque existe una gran cantidad de grupos de investigación interesados en la génesis y tratamiento de esta enfermedad, aún hace falta un mayor esfuerzo para entender del todo las diferentes causas que dan lugar a la aparición y desarrollo de este padecimiento. Teniendo un mejor conocimiento de esta enfermedad se podrán diseñar fármacos más específicos y tratamientos más adecuados para la atención de los diferentes tipos de epilepsias e incluso para encontrar una posible cura.

Epilepsia

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes que afecta aproximadamente el 2% de la población mundial (Mizielinska, 2007). Se caracteriza por una predisposición recurrente a presentar crisis epilépticas y por las consecuencias que estas generan a nivel neurobiológico, cognitivo, psicológico y social. Una crisis epiléptica es un evento transitorio de signos y/o síntomas debido a una actividad neuronal sincrónica

acrecentada o excesivamente anormal que interrumpe temporalmente la transmisión normal de las señales neuronales (Khosravani & Zamponi, 2006; Perrig & Jallon, 2008). La epilepsia puede resultar de un daño cerebral causado por un trauma craneal, derrame cerebral o infecciones, pero en 6 de cada 10 casos, las crisis no tienen una causa conocida (Mizielinska, 2007).

Existen muchas formas clínicas de epilepsia y su clasificación se encuentra en constante cambio, sin embargo, la Comisión de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAP) ha clasificado las crisis en dos amplias categorías, las crisis parciales (focales) y las crisis generalizadas (ILAP, 1989; Engel, Jr., 2001). Las crisis parciales se originan en un pequeño grupo de neuronas, denominado foco epileptogénico y se dividen en simples cuando no hay una alteración de la conciencia y generalizadas cuando se altera la conciencia. Las crisis generalizadas afectan a ambos hemisferios cerebrales desde el principio y suelen clasificarse en convulsivas y no convulsivas. Dentro de las crisis generalizadas no convulsivas encontramos las de ausencia, mismas que se observan sobre todo en niños, se inician de forma repentina, duran menos de 10 segundos, van acompañadas del cese de toda actividad motora y provocan pérdida de conciencia. Desde el punto de vista de su etiología, las epilepsias se han dividido en dos clases, las cuales aplican tanto para los síndromes epilépticos focales y generalizados: las idiopáticas, que se asocian comúnmente con el término genéticas, cuyas causas del síndrome epiléptico no son evidentes y presentan antecedentes familiares de crisis epilépticas; y las sintomáticas, cuando las causas son adquiridas y/o cuando son asociadas a deficiencias neurológicas (ILAP, 1989; Berkovic et al., 2006). Se calcula que las epilepsias idiopáticas constituyen entre un 15 y 20% de la población general de epilepsias (Jallon & Latour, 2005), de los cuales la epilepsia tipo ausencia constituye de 3 a 4% de todas las crisis epilépticas (Khosravani & Zamponi, 2006). La actividad eléctrica neuronal durante las crisis epilépticas puede ser registrada mediante un

electroencefalograma (EEG); en las epilepsias de tipo ausencia, por ejemplo, se observan descargas en forma de onda-espiga (SWDs) con una frecuencia de 3 a 4 Hz, que al igual que varias epilepsias generalizadas, dichas SWDs son generadas principalmente por las interacciones entre redes neuronales entre el tálamo y la corteza cerebral (Blumenfeld, 2005). De las epilepsias generalizadas idiopáticas, la epilepsia tipo ausencia es una de las más estudiadas a nivel genético, existen estudios de pacientes con epilepsia tipo ausencia infantil, en donde al revisar su historia familiar se observa que la epilepsia se hereda de una manera autosómica dominante, con proporción de más de un 85%, reportada en gemelos monocigotos (Berkovic et al., 1998; Blumenfeld, 2005).

Independientemente de los múltiples orígenes posibles que dan lugar a la epileptogénesis y a la manifestación epiléptica *per se*, existe una gran cantidad de evidencias en la literatura que abarcan estudios clínicos y básicos, que demuestran que el sustrato común en el que convergen todas las epilepsias, son los canales iónicos (Armijo et al., 2005; Berkovic et al., 2006; Mizielinska, 2007). La comunicación que se lleva a cabo entre las neuronas es controlada por señales eléctricas generadas por el flujo de iones a través de la membrana plasmática (Fig. 1). Éste flujo de iones es mediado, precisamente, por los canales iónicos. En la siguiente sección se abundará sobre las generalidades de los canales iónicos y su relevancia para la epilepsia.

Canales Iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros hidrofílicos en las membranas biológicas a través de los cuales pueden ser transportados diferentes tipos de iones de una forma rápida y pasiva. Se expresan tanto en células excitables como en otros tipos de células animales y vegetales. Los canales iónicos responden de manera específica ante diversos estímulos, que pueden ser mecánicos (deformaciones de la membrana celular),

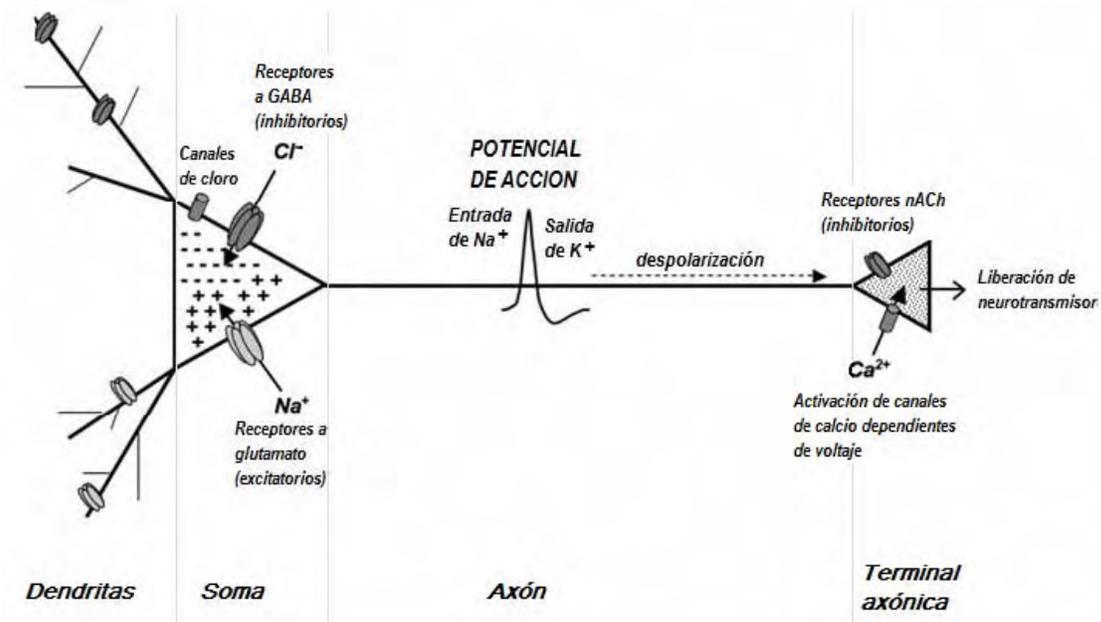


Figura 1. El papel de los canales iónicos en la actividad eléctrica neuronal. La transmisión de la información entre las neuronas está controlada por señales eléctricas que se generan por el movimiento de iones a través de la membrana plasmática. La activación de receptores excitatorios (despolarización) permite la entrada de iones con carga positiva (Ca^{2+} ó Na^+) que compiten con la entrada de iones con carga negativa (Cl^-) a través de receptores inhibitorios (hiperpolarización). Si la despolarización es suficiente los canales de sodio presentes en el cono axonal se activarán dando lugar a una despolarización transitoria (2-3 ms) terminada por la activación de canales de potasio. La despolarización activa canales de sodio cercanos y se propaga a lo largo del axón hacia las terminales axónicas. Aquí, la despolarización activa canales de calcio que promueven la liberación del neurotransmisor, el cual activará la siguiente neurona en la red, permitiendo así el flujo de información en el cerebro. Disfunciones en cualquiera de los canales iónicos involucrados en este flujo de información son, por lo tanto, considerados como agentes causales potenciales o posibles blancos para futuras drogas antiepilépticas (Modificada de Mizielinska, 2007). El receptor presináptico a la acetilcolina sensible a la nicotina (nACh), fue el primer ejemplo de un canal iónico con una mutación asociado directamente con un tipo de epilepsia (Steinlein, 2004)

químicos (moléculas, como neurotransmisores u hormonas) o eléctricos (cambios en el potencial de membrana). Los canales iónicos desempeñan un papel importante para diversos procesos fisiológicos, como lo son la regulación de la excitabilidad en los nervios cuya alteración genera desordenes como la epilepsia, también regulan la excitabilidad en los músculos y la modulación de la secreción de hormonas y neurotransmisores entre otras funciones (Aidley, 1989; Strong et al., 1993; Hille, 2001). En los últimos años, la importancia de

los canales iónicos se ha visto acentuada debido al descubrimiento de que el origen de varias enfermedades, entre ellas la epilepsia, es debido a mutaciones en genes que codifican para diversos tipos de canales iónicos, tales enfermedades reciben el nombre de canalopatías (Lagae, 2008; Wilde, 2008).

A pesar de que algunos canales activados por ligando (como aquellos que unen el ácido gama-aminobutírico, mejor conocido como GABA) tienen una clara participación en la disminución de la excitabilidad neuronal, para los fines del presente trabajo de tesis, en adelante se presentará información relacionada únicamente a los canales iónicos que responden a cambios en el potencial de membrana (V_m), es decir, canales iónicos dependientes o activados por voltaje, pues estos tienen mayor relevancia sobre la epilepsia, entre otras razones, por la rapidez con que generan cambios en el potencial de membrana de las neuronas. Los canales iónicos dependientes de voltaje se caracterizan por transportar iones a una gran velocidad (en el orden de 10^7 iones por segundo), además de presentar una alta selectividad por determinado ión (Catterall, 1988; Strong et al., 1993). Así, existen canales activados por voltaje que permiten el flujo selectivo de iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ó Cl^- (Hille, 2001), de estos los que nos interesan son los que permiten el paso de iones Ca^{2+} , es decir, los canales de calcio dependientes de voltaje.

Canales de Calcio Dependientes de Voltaje

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV o canales Ca_v , de acuerdo a su más reciente nomenclatura –véase más adelante) son elementos clave en la entrada de iones Ca^{2+} a las células, incluyendo neuronas. El influjo de calcio a través de estos canales, regula un gran número de respuestas celulares esenciales como la activación de enzimas dependientes de calcio, la contracción muscular, la liberación de hormonas y neurotransmisores, y la regulación de la expresión genética y de la excitabilidad neuronal (Berridge et al., 2003).

Además del papel canónico de estos canales en la generación de señales eléctricas para la comunicación intercelular en células eléctricamente excitables, sus funciones también son importantes en células consideradas tradicionalmente como no excitables (p. ej., espermatozoides). La importancia de estos canales se ejemplifica también por el uso en la clínica de los llamados “bloqueadores de canales de calcio”, fármacos que se utilizan desde hace varias décadas en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión (Mitterdorfer et al., 1998). Más recientemente, también se han empleado en el tratamiento del dolor y algunos tipos de epilepsia (Gomora et al., 2001; Todorovic et al., 2001; Kim et al., 2001; Todorovic et al., 2002; Prommer, 2006; McGivern, 2006). Por tales razones, los canales Ca_v han sido objeto de una gran cantidad de estudios científicos a nivel básico y clínico. No obstante, aspectos críticos de sus propiedades biofísicas y farmacológicas, así como de su participación en enfermedades como la epilepsia, entre otras, no han sido suficientemente estudiados. A continuación se presenta la clasificación de los canales Ca_v , así como las funciones principales de cada uno de los miembros de esta familia.

Clasificación de los Canales Ca_v

La clasificación más gruesa de los canales Ca_v considera dos grandes categorías: los canales activados a bajo voltaje y los canales activados por alto voltaje (LVA y HVA respectivamente, por sus siglas en inglés). Los canales HVA requieren grandes despolarizaciones de la membrana para ser activados (apertura del canal), es decir despolarizaciones del V_m a -30 y -20 mV, se caracterizan, además, por presentar una inactivación (el canal no conduce corriente a pesar de que este abierto) muy lenta, una desactivación (cierre del canal) muy rápida, conductancia unitaria de aproximadamente 24 pS y son altamente sensibles a fármacos como las dihidropiridinas (DHPs), fenilalquilaminas y benzodiazepinas. Por su parte, los canales LVA (también conocidos como canales tipo T) se activan a potenciales cercanos al V_m en reposo de

las neuronas, es decir, alrededor de -60 mV; se inactivan rápidamente durante una despolarización sostenida, se desactivan lentamente al repolarizar la membrana y presentan una conductancia unitaria pequeña de alrededor de 8 pS (Armstrong & Matteson, 1985; Bean, 1989; Catterall, 2000; Burgess et al., 2002).

A su vez, los canales HVA se han subdividido en canales que generan corrientes tipo L, N, P, Q y R, dependiendo de sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Mientras que los tres canales LVA descritos a la fecha sólo presentan corrientes tipo T. Para cada tipo de canal Ca_v existe un sustrato molecular, es decir, cada uno de ellos es codificado por un gen diferente. La clasificación más actual de los canales Ca_v se basa precisamente en el nombre del gen que codifica para cada uno de dichos canales (Ertel et al., 2000). Dicha clasificación se esquematiza en la Fig. 2. El nombre de cada canal (columna izquierda) esta dado por el nombre del ion que transportan (Ca), seguido del subíndice v, en alusión al estímulo que los activa (voltaje), después el numero de la familia (1, 2 ó 3) y por último, separado por un punto el número del miembro de la familia. Así el canal $Ca_v2.3$, corresponde al canal codificado por la subunidad $\alpha1E$. Los nombres de las subunidades $\alpha1$ (columna derecha) obedece al nombre con el que se designo originalmente dicha subunidad al momento de ser clonada (las propiedades moleculares de los canales Ca_v se describen en el siguiente apartado). La corriente HVA tipo L o familia Ca_v1 (sensibles a las DHPs) puede ser generada por cuatro diferentes genes, las subunidades $\alpha1S$, $\alpha1C$, $\alpha1D$ y $\alpha1F$. Los canales HVA insensibles a las DHPs conforman la familia Ca_v2 y están representados por las subunidades $\alpha1A$, $\alpha1B$ y $\alpha1E$.

Finalmente, la familia Ca_v3 constituida por los canales tipo T o LVA, están codificados por los genes que dan lugar a las subunidades $\alpha1G$, $\alpha1H$ y $\alpha1I$. Debido a que éstas fueron las últimas en ser clonadas (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Gomora et al., 2002), el conocimiento acerca de dichos canales es todavía incipiente en comparación con el de los canales HVA, los cuales fueron clonados desde hace ya más de dos décadas (revisado en

Perez-Reyes & Schneider, 1995). Las propiedades biofísicas y farmacológicas de los canales Ca_v no serán revisadas con detalle en este trabajo (Higueldo García, 2007; para ello se pueden consultar las tesis de Arteaga, 2007), la revisión se concentrará únicamente en aquellos puntos relevantes para los objetivos del mismo.

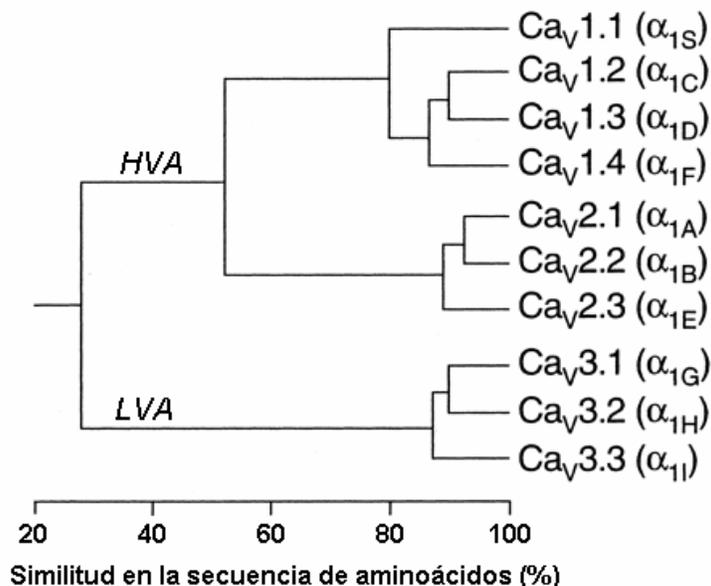


Figura 2. Filogenia de las subunidades α_1 de los CCDV. Árbol filogenético de las subunidades α_1 de los canales de calcio dependientes de voltaje construido a partir de las secuencias de los aminoácidos que comprenden exclusivamente las regiones que atraviesan la membrana y del poro (aproximadamente 350 aminoácidos). La alineación se realizó en el programa DNAsis tomando como base el algoritmo de CLUSTAL. Se pueden distinguir tres familias claramente separadas (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3) con aproximadamente un 80% de identidad intrafamiliar, mientras que la identidad interfamiliar entre Ca_v1 y Ca_v2 es de 52% y menos del 30% entre ambas y Ca_v3 (Modificado de Ertel et al., 2000).

Estructura de los Canales Ca_v

Los canales Ca_v son ensamblajes multiproteicos consistentes de varias subunidades, de las cuales la α_1 es la principal, pues por sí sola forma el poro por el que transitan los iones, contiene la región del canal que detecta los cambios en el voltaje, el filtro de selectividad (que permite el flujo únicamente de iones Ca^{2+}), así como los sitios de regulación por fármacos y

toxinas. Los canales Ca_v presentan, además, subunidades accesorias que regulan la actividad de la subunidad α_1 , a estas se les llama β , $\alpha_2\delta$, y γ (Catterall, 1991). La subunidad α_1 esta compuesta por cuatro dominios homólogos (I al IV), conectados intracelularmente; cada dominio consta de seis segmentos transmembranales (S1 al S6) unidos por asas intra y extracelulares (Fig. 3); los segmentos S5, S6 y el asa que los une (asa del poro) constituyen las paredes internas y el poro de conducción de iones (Randall & Benham, 1999; Catterall, 2000). El segmento S4 de cada dominio presenta cada tres residuos un aminoácido con carga positiva y, con base en una vasta cantidad de evidencias, se le ha designado como sensor de voltaje de dichos canales (revisado en Tombola et al., 2005; Tombola et al., 2006). El mecanismo por el cual el sensor de voltaje responde a cambios en el V_m , su ubicación misma respecto al resto de la proteína del canal, así como su traducción en la apertura del canal, son todavía sujetos de acaloradas discusiones y controversias en el campo, por lo que no se ha llegado a un consenso en este respecto.

Por otro lado, lo que si parece ser claro hoy en día es que las subunidades α_1 que generan corrientes HVA requieren y son moduladas por las subunidades auxiliares ($\alpha_2\delta$, β y γ) para mostrar una corriente como la observada en neuronas y otros tipos celulares (Arikkath & Campbell, 2003; Lacinova, 2005). En contraste, la expresión de las subunidades α_1 de los canales tipo T por si solas generan corrientes muy similares a las corrientes nativas de neuronas y otro tipo de células, por lo que las subunidades accesorias de los canales HVA no regulan la actividad de los canales tipo T ó LVA (Lacinova et al., 1999; Arias et al., 2005).

Canales de Calcio Tipo T y Crisis Epilépticas

Los canales tipo T se expresan en casi todos los tejidos y tipos celulares de los mamíferos, incluyendo tejido nervioso, corazón, riñón, músculo liso, espermatozoides, órganos endocrinos, y otros. Desempeñan un papel importante en la excitabilidad neuronal, secreción

de hormonas, contracción del músculo liso, fertilización, percepción del dolor, etc. Desde el punto de vista electrofisiológico, los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ presentan una cinética de activación e inactivación similar pero se pueden diferenciar por su sensibilidad al bloqueo por níquel y la permeación diferencial a Ca^{2+} (Lee et al., 1999; Shcheglovitov et al., 2007). Mientras que el canal $\alpha 1I$ se distingue por ser el canal LVA que se activa e inactiva más lentamente.

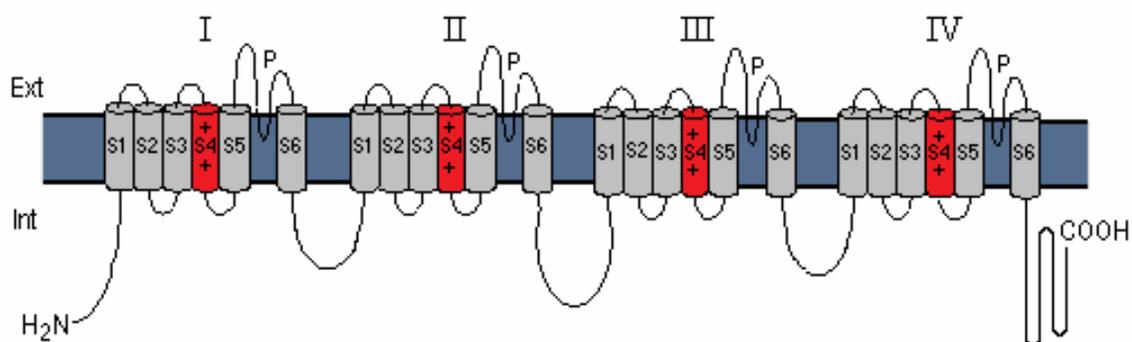


Figura 3. Representación esquemática de la subunidad $\alpha 1$ de los CCDV. Arreglo transmembranal propuesto para las subunidades $\alpha 1$ de los CCDV, la cual consiste de cuatro dominios homólogos (I, II, III, IV) unidos por asas intracelulares, cada dominio contiene a su vez, seis segmentos transmembranales (S1 a S6) y las asas del poro (indicadas con la letra P). El segmento S4 se caracteriza por presentar varios aminoácidos (4-6) con carga neta positiva, por lo que se le conoce como el sensor de voltaje.

No obstante, a diferencia de los canales HVA, los canales tipo T no cuentan con un agonista o antagonista orgánico de alta afinidad que permita aislarlo de manera selectiva del resto de los canales Ca_v . En este sentido, uno de los objetivos del presente estudio es determinar si la zonisamida, un fármaco antiepiléptico, presenta un bloqueo diferencial sobre los canales tipo T. En la literatura existen reportes de algunos agentes como el mibefradil (Martin et al., 2000) y la kurtoxina (Chuang et al., 1998; Sidach & Mintz, 2002), que bloquean a los canales tipo T con cierta especificidad, pero ninguno de ellos ha mostrado ser de alta afinidad. Aunque también se ha reportado que fármacos antiepilépticos, como los derivados de succinimida, bloquean a

los canales tipo T clonados y nativos, y que dicha circunstancia es probablemente la más relevante en el efecto terapéutico de este tipo de fármacos para controlar las crisis epilépticas de tipo ausencia (Gomora et al., 2001; Huguenard, 2002; Rogawski, 2002).

Las características biofísicas de los canales de calcio tipo T varían dependiendo del subtipo y pueden ser alteradas dramáticamente por procesamiento alternativo de los genes que codifican para cada uno de ellos (Murbartian et al., 2002). Es por esto que el estudio de la participación de los diferentes subtipos de canales tipo T es de gran importancia para entender sus posibles implicaciones en la etiología de la epilepsia, así como en dilucidar mecanismos que regulen la actividad epileptiforme y mejorar tratamientos farmacológicos que restauren la actividad neuronal normal.

Las estructuras cerebrales más estudiadas en la epilepsia son el tálamo y la neocorteza. El circuito talamocortical es el primer enlace entre la corteza cerebral y sistemas sensoriales periféricos. Este circuito es también uno de los más estudiados en el contexto de la generación de ritmos neurofisiológicos (Steriade, 2005). Desde una perspectiva anatómica este circuito consta de una red de neuronas reticulares, talamocorticales y neocorticales. Las neuronas corticales inervan directamente neuronas reticulares y talamocorticales, mientras que las neuronas reticulares proveen proyecciones GABAérgicas hacia las neuronas talamocorticales, las cuales a su vez realizan sinapsis con neuronas neocorticales. El tálamo recibe numerosos impulsos sensoriales, las señales excitadoras vienen de la corteza, tanto las neuronas talamocorticales como las neocorticales tienen proyecciones excitadoras hacia neuronas reticulares, y la actividad del circuito es fuertemente regulada a través de interneuronas neocorticales y por la vía talámica (Wallace et al., 2001; Markram et al., 2004). La actividad rítmica que es observada en los registros electroencefalográficos durante una crisis epiléptica es un reflejo de las interacciones de redes talámicas y corticales.

Los potenciales de acción (despolarización rápida en forma de espiga del V_m que constituye la señal eléctrica individual con la que se comunican las neuronas) de las neuronas reticulares son regulados por canales de calcio LVA (Huguenard & Prince, 1992), y son precedidos por potenciales hiperpolarizantes prolongados (Steriade, 2005), que se activan por proteínas G acopladas a canales de potasio (Fuentealba et al., 2004) y permiten la activación de canales de calcio tipo T en dendritas de neuronas reticulares (Huguenard & Prince, 1992). La corriente de calcio LVA regula la actividad de disparo particularmente en neuronas talámicas, la hiperactividad de estos canales contribuye a la disritmia talamocortical generando epilepsia tipo ausencia.

Los tres genes de canales de calcio tipo T se expresan en el sistema nervioso central de manera conjunta y complementaria, por ejemplo en el tálamo, se coexpresan $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ en neuronas del núcleo reticular, mientras que $\alpha 1G$ se expresa abundantemente en los núcleos difusores (Talley et al., 1999). Estudios previos han demostrado que la expresión de los canales de calcio tipo T puede alterar la actividad eléctrica neuronal, de tal forma que si se aumenta la expresión se induce el desarrollo de la actividad de las crisis. Debido a la función que juegan los canales tipo T en el disparo de neuronas del tálamo, un aumento en la corriente tipo T, predice el disparo de oscilaciones talámicas como las observadas en la epilepsia tipo ausencia (McCormick & Huguenard, 1992) en apoyo a este argumento se ha visto en modelos animales de epilepsia tipo ausencia que todos presentan un aumento en la densidad de corriente tipo T (Zhang et al., 2004).

Los defectos en la actividad de los canales iónicos se han considerado una de las causas primarias de las epilepsias idiopáticas generalizadas (Scheffer & Berkovic, 2003), y los canales tipo T son fuertes candidatos, debido a su eminente presencia en estructuras talámicas y corticales, además de su participación en la modulación del disparo neuronal y por ser blanco de fármacos antiepilépticos clínicamente activos, y finalmente, por la reciente

descripción de varias mutaciones en el gen que codifica para el canal $\alpha 1H$ en pacientes con epilepsia tipo ausencia (Chen et al., 2003a; Chen et al., 2003b). Las propiedades biofísicas de tales canales mutados fueron investigadas en células HEK-293 y se mostró que tales polimorfismos resultan en un aumento del 20–50% en la expresión del canal en la membrana celular (Vitko et al., 2005; Vitko et al., 2007), sin embargo, la mayoría de las mutaciones no afectan de manera significativa las propiedades biofísicas del canal (Khosravani et al., 2005).

Zonisamida

La zonisamida (ZNS, 1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) es un fármaco antiepiléptico de nueva generación comercializado como “zonegran” o “excegran” (Fig. 4), es efectivo en el tratamiento de crisis parciales simples y complejas, incluyendo las secundariamente generalizadas, crisis tónico-clónicas, crisis tónicas, crisis de tipo ausencia, así como la combinación de estas (Kito et al., 1996). Aunque su uso y aprobación en México es relativamente reciente (se introdujo al mercado en el 2002), es un fármaco que cuenta con una amplia historia clínica en Japón, donde se comercializa desde 1989 (Biton, 2004).

La absorción de ZNS en el tracto gastrointestinal es rápida y completa tras la administración oral. En un estudio de diseño cruzado con tres tomas de ZNS en dosis únicas de 200, 400 y 800 mg en voluntarios sanos, se comprobó que el tiempo en alcanzar la concentración máxima osciló entre 2 y 6 horas independientemente de la dosis (Mimaki, 1998). La concentración máxima en plasma aumentó en función de la dosis y oscila entre 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$, lo que equivale a una concentración de 70-95 μM (Rock et al., 1989). La ZNS se une a las proteínas plasmáticas en aproximadamente un 40-60%, principalmente a la albúmina. La eliminación es vía renal en un 30% y hepática en un 70%. Tiene una vida media de 63 horas, cruza la barrera hematoencefálica y la concentración en el líquido cefalorraquídeo es similar a la fracción libre en suero (revisado en Sobieszek et al., 2003).

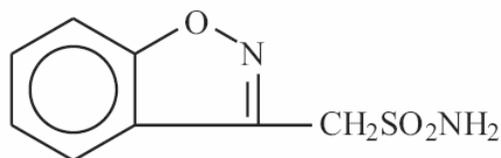


Figura 4. Estructura química del antiepiléptico ZNS. La ZNS es una sulfonamida desarrollada y comercializada originalmente en Japón. Su peso molecular es de 212.23. Es un polvo blanquizco a amarillo pálido, sin olor y un sabor ligeramente amargo. Poco soluble en agua, ligeramente soluble en metanol y etanol, y muy soluble en solventes como acetona.

Mecanismo de Acción de la ZNS

La ZNS inhibe las descargas durante una crisis epiléptica y suprime los focos epileptogénicos, y su estructura (Fig. 4) le permite tener varios mecanismos de acción que incluye la modulación de diferentes canales iónicos, los cuales a su vez modifican el sistema de neurotransmisores facilitando la inhibición neuronal y atenuando la transmisión excitadora (Rogawski & Porter, 1990; Seino et al., 1991; Macdonald & Kelly, 1995).

La ZNS modula la inhibición mediada por el GABA mejorando la unión a su receptor o bien su liberación en el hipocampo (Ueda et al., 2003). Asimismo, facilita la transmisión dopaminérgica y serotoninérgica y aumenta los niveles extracelulares de estas monoaminas. La ZNS también inhibe, en menor grado, la monoaminoxidasa de tipo B y, de esta forma, potencia la función dopaminérgica y serotoninérgica de las neuronas (Kawata et al., 1999). En otro trabajo sobre el papel de la ZNS en la liberación de acetilcolina (ACh) en la corteza frontal de la rata se reporta que a concentraciones “terapéuticas” de 1 mM (la cual es 10 veces más alta que la concentración terapéutica clínicamente aceptada), la ZNS aumenta la liberación del neurotransmisor y concentraciones supraterapéuticas (5 mM) disminuyen la liberación del mismo. Los autores sugieren la posibilidad de que tales efectos sean mediados por una combinación de la activación e inhibición de los canales de calcio tipo N y P/Q, respectivamente (Zhu et al., 2002). Debido a que las concentraciones de ZNS empleadas en

estos trabajos están muy por arriba de las clínicamente relevantes, cualquier interpretación de dichos resultados resulta irrelevante para los propósitos del presente trabajo.

Por otro lado, se ha observado que la ZNS reduce la actividad sináptica bloqueando potenciales de acción en neuronas de mamífero a concentraciones similares a las observadas en el cerebro durante un tratamiento anticonvulsivo, es decir, aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$ de ZNS (Rock et al., 1989). Este bloqueo podría ser el resultado de la inhibición de la actividad de canales iónicos dependientes de voltaje como canales de sodio o canales de calcio, o por el aumento en la actividad de canales de potasio, o bien una combinación de estas posibilidades. De hecho, un trabajo reciente mostró que la ZNS aumenta la actividad de los canales de potasio dependientes de calcio, sin afectar la conductancia de canal unitario. El efecto de la ZNS parece ser debido a un aumento en la probabilidad de apertura de los canales de potasio (Huang et al., 2007). Interesantemente, en este trabajo reportan que los canales de calcio HVA no son afectados mayormente por el antiepiléptico. El primer trabajo sobre los efectos de ZNS en canales iónicos fue realizado por Schauf (1987) en los axones gigantes del poliqueto *Myxicola infundibulum*. Schauf encontró que con una concentración de 12 μM de ZNS se modificaba el funcionamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje de estos axones, de tal manera que la dependencia al voltaje de su inactivación sucedía a 20 mV más negativos que en condiciones control.

En cuanto a los canales de calcio, Suzuki y colaboradores (1992) demostraron que la ZNS bloquea la corriente de calcio tipo T de manera dosis-dependiente en neuronas cultivadas de la corteza cerebral de rata, mientras que la corriente HVA no es afectada. La aplicación de 50 μM de ZNS bloquea la corriente de calcio LVA en un 30%, mientras que con 500 μM se alcanza un máximo bloqueo de $59.5 \pm 7.2\%$. Sin embargo, en este trabajo el efecto de la ZNS sobre la corriente tipo T se investigó utilizando un HP de -60 mV, lo cual implica que una proporción importante de canales se encuentran inactivados a dicho valor de V_m (Cribbs et al.,

2000; Perez-Reyes, 2003). En un par de trabajos adicionales realizados por el grupo de Watanabe (Kito et al., 1994; Kito et al., 1996) utilizando células de neuroblastoma humano, reportaron que la ZNS bloqueó los canales de calcio tipo T y tipo L prácticamente en la misma proporción (~40% con 50 μ M de ZNS). Además, los autores muestran que en presencia de la ZNS la curva de inactivación en el estado estacionario de los canales tipo T se desplaza aproximadamente 20 mV hacia voltajes más negativos. Una fuerte crítica a este par de trabajos es la amplitud de las corrientes de calcio tipo T registradas, las cuales no fueron más grandes que 25 pA. Aunado al hecho de que los registros mostrados en sus figuras se acompañan de un ruido eléctrico significativo, lo que disminuye la calidad de los mismos. Por ello, en el presente trabajo de tesis, los resultados de dichos estudios no son considerados como antecedentes sólidos en lo que se refiere a la acción de la ZNS sobre los canales de calcio.

Por lo hasta ahora expuesto, resulta claro que no existen evidencias contundentes en el posible mecanismo de acción del antiepiléptico ZNS en el bloqueo de los canales tipo T, y aún más relevante, no se sabe si el bloqueo de la ZNS es específico sobre alguno de los canales tipo T clonados a la fecha (α 1G ó $Ca_v3.1$, α 1H ó $Ca_v3.2$ y α 1I ó $Ca_v3.3$). Aprovechando la oportunidad que significa contar con los canales tipo T de humano clonados y expresados de manera estable en células HEK-293, en este trabajo se investigó el efecto de la ZNS sobre la corriente aislada de cada uno de los canales tipo T y se estudió el posible mecanismo de acción de la ZNS sobre estos canales. Además, el efecto de la ZNS sobre la corriente de calcio tipo T se estudió también en los canales nativos de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata (DRG). Los resultados obtenidos permitieron explicar en parte el efecto terapéutico de la ZNS en la epilepsia.

HIPÓTESIS

1. La ZNS bloquea de manera diferencial los canales de calcio tipo T clonados de humano.
2. El bloqueo de la ZNS es dependiente del estado en que se encuentra los canales de calcio tipo T.
3. La corriente de calcio tipo T es más sensible al bloqueo por ZNS que la corriente de calcio HVA de las neuronas DRG.

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio consiste en caracterizar el efecto del fármaco antiepiléptico ZNS en la actividad de los canales de calcio tipo T clonados de humano, y en los canales endógenos tipo T de neuronas DRG.

Objetivos Particulares

1. Determinar la intensidad del bloqueo de la corriente de calcio inducido por el antiepiléptico ZNS, para cada uno de los canales tipo T clonados ($\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$) y expresados de forma estable en células HEK-293 y en la corriente de calcio nativa de neuronas DRG.
2. Estudiar las modificaciones en la dependencia al voltaje de la activación e inactivación, así como en la cinética de ambos parámetros, de cada uno de los canales de calcio tipo T (clonados y nativos de neuronas DRG).

MÉTODOS

Cultivo Celular

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo, los experimentos de electrofisiología se realizaron empleando células HEK-293 establemente transfectadas con los canales tipo T clonados, y neuronas DRG para estudiar las corrientes nativas.

Células HEK-293

Las células HEK-293 son una línea celular inmortalizada establecida a partir de un tumor renal de embrión humano y no presentan corrientes de calcio endógenas, por lo que son un modelo idóneo para el estudio de los canales Ca_v3 clonados. En el presente estudio se utilizaron células HEK-293 transfectadas establemente con las subunidades $\alpha1G$ ó $Ca_v3.1$ (Número de acceso del GeneBank: AF190860; Cribbs et al., 2000), $\alpha1H$ ó $Ca_v3.2$ (AF051946; Cribbs et al., 1998) y $\alpha1I$ ó $Ca_v3.3$ (AF393329; Gomora et al., 2002), mismas que fueron donadas por el Dr. Edward Pérez-Reyes de la Universidad de Virginia de los Estados Unidos de América. Las células se crecieron en monocapas sobre cajas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro en una atmósfera saturada de agua y con una composición de 95% de O_2 y 5% de CO_2 a 37°C. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Una vez suplementado el medio se denominó DMEM completo. Todos los productos químicos empleados en el cultivo y mantenimiento de los cultivos celulares fueron obtenidos de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para las resiembras (dos veces por semana), cuando las monocapas tenían una confluencia de aproximada de 90 a 95%, el medio de cultivo fue retirado por aspiración con una pipeta Pasteur; las células se lavaron una vez con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; en mM: 154 NaCl, 3 Na_2HPO_4 y 1.06 KH_2PO_4 , pH 7.2). El PBS se retiró

y las células se despegaron con 0.5 ml de una solución que contenía 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA en una solución balanceada de Hanks libre de calcio. La disociación de las células se realizó de manera mecánica al adicionar 9.5 ml de medio DMEM completo y utilizando pipetas serológicas de 10 ml. Las células se resembraron a una densidad 20 veces menor en una caja Petri nueva en un volumen final de 10 ml de DMEM completo. Para la realización de los registros electrofisiológicos, a partir de la misma suspensión celular se tomó una alícuota de 200 μ l y se sembró en una caja Petri de plástico de 35 mm de diámetro en cuyo fondo se colocaron previamente varios cubreobjetos de vidrio (de aproximadamente 25 mm² de área) y 2 ml de medio DMEM completo. Las células sembradas sobre los cubreobjetos se mantuvieron al menos dos horas en las condiciones de incubación señaladas anteriormente.

Neuronas DRG

Para analizar el efecto de la ZNS en los canales de calcio endógenos se realizaron cultivos de neuronas provenientes del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de la rata. Dichas neuronas constituyen una preparación muy socorrida para registrar corrientes de Ca²⁺ tipo T por la abundante expresión de éstos canales (Scroggs & Fox, 1992; Nelson et al., 2005). Para la disección del DRG se utilizaron ratas Wistar macho de 8 a 15 días de edad con un peso de 25 a 40 g. Las ratas se decapitaron con tijeras, siendo previamente anestesiadas con éter; posteriormente se humedeció con etanol la parte dorsal de la rata, desde la nuca hasta la cola, para evitar la dispersión de pelos en los tejidos internos durante la disección, se retiró la piel y el exceso de grasa de la zona, se extrajo la parte lumbar de la columna vertebral y se colocó en solución de Krebs-Ringer en una caja Petri de 35 mm. Acto seguido, la preparación se observó con un microscopio estereoscópico (Nikon, Japón) para extraer los ganglios de la parte lumbar de la columna vertebral que se identificaron como dos bolsitas blancas hacia

los lados del cordón central. Los ganglios se colocaron en 2 ml de solución Hanks lavados (Hanks suplementada con 1% de penicilina-estreptomicina y 0.075% de albúmina). Luego de enjuagar se extrajo el sobrenadante con una pipeta Pasteur, dejando únicamente el medio necesario para que los ganglios no se secaran. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de una solución Hanks enzimas (Hanks suplementada con 1% de penicilina-estreptomicina y 0.05% de tripsina) con la que se realizó el proceso de disgregación mecánica de los ganglios durante 5 min con la ayuda de una pipeta Pasteur. En cada paso de disgregación la punta de la pipeta se flamea para disminuir su diámetro. Luego de la disgregación, la suspensión celular se centrifugó a 1200 revoluciones por minuto (rpm), a 37°C durante 10 min, y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 7 ml de solución Hanks lavados, agregando 5 mg de colagenasa y se continuó con el proceso de disgregación por 5 min. Nuevamente, la suspensión se centrifugó por 10 min a 1200 rpm y 37°C, y se extrajo el sobrenadante. El paso anterior se repitió dos veces pero sin agregar enzimas y realizando las centrifugaciones a 28°C. Por último, la pastilla se resuspendió con 400 μ l de solución Hanks enzimas. A partir de esta suspensión celular se tomaron 15 μ l y se colocaron en el fondo de una caja Petri de 35 mm, que contenía cubreobjetos de vidrio de 25 mm² de área, previamente cubiertos con poli-L-lisina. Las células fueron alimentadas con 2 ml de DMEM completo y la caja se incubó en una atmósfera saturada de agua y con una composición de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37°C al menos durante 2 h, antes de iniciar los registros electrofisiológicos. Todas las soluciones empleados se pasaron por un filtro de 0.22 μ m de diámetro de poro.

Electrofisiología

Una vez transcurrido el período de incubación de las células, un cubreobjetos se trasladó a la cámara de registro que está colocada sobre la platina de un microscopio óptico invertido (modelo Eclipse TE300, Nikon). Las células fueron visualizadas con un aumento de 400X y a partir de este momento se activó el flujo de la solución externa y se procedió con los registros electrofisiológicos. Los cubreobjetos se reemplazaron aproximadamente cada hora. El registro de las corrientes iónicas transportadas a través de los canales de calcio se llevó a cabo mediante la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981; Marty & Neher, 1995). Para realizarla, una vez que se tiene a la célula seleccionada bajo el microscopio y al electrodo con las características adecuadas, éste se acerca cuidadosamente a la célula para realizar un sello entre la punta del electrodo y la membrana. El valor de resistencia adecuado debe estar en el orden de giga ohmios ($1 \times 10^9 \Omega$). Una vez logrado dicho valor, se fijó el voltaje o potencial de mantenimiento (HP) de la membrana y se aplicó presión negativa para romper el área de la membrana que abarcaba la punta del electrodo; de este modo se logra la configuración de célula completa ya que se tiene acceso directo al interior celular, lo que permite registrar la actividad de todos los canales que se encuentran en la membrana plasmática de la célula en cuestión. La capacitancia debida a la adhesión de la membrana celular a la señal de registro, así como la capacitancia parasita (aquella asociada a todas las conexiones eléctricas) se cancelaron de forma analógica con el amplificador de patch clamp (Axopatch 200B; Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). En algunos casos las corrientes fueron registradas en dos canales, uno de ellos habilitado para realizar 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. Las corrientes registradas fueron filtradas a 5 kHz y digitalizadas a intervalos de tiempo de 10-100 μ s por medio del convertidor analógico-

digital de la interfase. En la Fig. 5 se esquematiza el sistema de registro utilizado en el presente trabajo de tesis. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 21 a 23°C.

Con la finalidad de asegurar una buena resolución temporal en el registro de las corrientes iónicas de interés, en los experimentos electrofisiológicos se tuvo especial cuidado en que el producto de C_m (capacitancia membranal) y R_s (la resistencia en serie del electrodo y la de acceso a la célula) no excediera los 60 μ s. El producto de $C_m R_s$ determina la constante de tiempo (τ) con la que se instalan los cambios en el potencial de membrana (V_m) inducidos por los pulsos comando generados por una computadora que tiene instalado el programa para la adquisición de datos electrofisiológicos (Clampex del paquete pClamp 9.2).

Soluciones de Registro

La composición de las soluciones de registro fue (en mM): *Solución externa*: 172 TEA-Cl, 10 HEPES, 5 CaCl₂ y 1 MgCl₂, pH 7.3, ajustado con TEA-OH. Para los registros de neuronas DRG, la solución externa se suplementó con 300 nM de TTX. La solución externa se mantuvo bañando constantemente las células contenidas en la cámara de registro con un flujo de 1 ml/min, mediante un sistema impulsado por gravedad y controlado por una válvula de seis vías. *Solución interna*: 135 CsF, 20 CsCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3, ajustado con CsOH. En estas condiciones las corrientes salientes a través de los canales de calcio son acarreadas mayoritariamente por el ion Cs⁺. A las concentraciones indicadas, la combinación del quelador EGTA y el CaCl₂ resulta en una concentración de Ca²⁺ libre aproximada de 50 nM de acuerdo al programa BAD (Brooks & Storey, 1992). La solución interna se suplementó con ATP (4 mM) y GTP (0.3 mM) para evitar el posible *rundown* (disminución de la amplitud de la corriente en función del tiempo en la configuración de célula completa) de los

canales de Ca^{2+} . Todos los químicos, incluyendo la ZNS de sodio se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los experimentos iniciales se realizaron con ZNS obtenida a manera de donación de la farmacéutica Dainippon de Japón.

Electrodos

Los electrodos se construyeron con capilares de borosilicato (TW150-3, WPI Inc., Sarasota, FL, EUA) que se cortaron con un estirador horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, EUA). Las puntas de los electrodos así generados se pulieron al calor con una microforja (MF-830; Narishigue Co., Japón). Para los registros electrofisiológicos sólo se utilizaron electrodos con resistencia de 2 a 3.5 M Ω después de haber sido llenados con la solución interna de registro.

Protocolos de Registro

Una vez que se obtuvo un buen sello y una célula con los valores de $C_m R_s$ adecuados se procedió a realizar los registros electrofisiológicos. En primer lugar se aplicó un protocolo de voltaje que consistió en un pulso de voltaje que despolarizó el potencial de membrana hasta -30 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV (en la mayoría de los casos) o de -70 mV (en algunos experimentos). La duración de la despolarización a -30 mV se mantuvo por 150 ms en el caso de $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ ó 500 ms cuando se estudió $\alpha 1I$. Este protocolo tuvo la finalidad de proporcionar información acerca de la estabilidad y magnitud de la corriente bajo estudio. Para obtener información acerca de la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de calcio (relación corriente-voltaje, $I-V$) se utilizó un protocolo que denominamos IV y que despolarizó a la célula a diferentes voltajes desde -80 hasta +80 mV en pasos de 10 mV. De igual manera, a partir de un HP de -100 ó de -70 mV según fuera el caso. La duración de los pulsos despolarizantes fue la misma que el protocolo anterior. El tercer

protocolo de voltaje empleado en el presente trabajo se diseñó para estudiar la inactivación de los canales de Ca^{2+} en el estado estacionario (denominado I_{hinf}). Éste consistió de un pulso de prueba despolarizante a -30 mV de corta duración (100 ms) precedido por un prepulso de larga duración (10 ó 15 s) a diferentes valores de voltaje comprendidos entre -110 y -40 mV. La amplitud de corriente registrada durante el pulso de prueba a -30 mV es una medida de la proporción de canales que no fueron inactivados durante el prepulso a determinado voltaje.

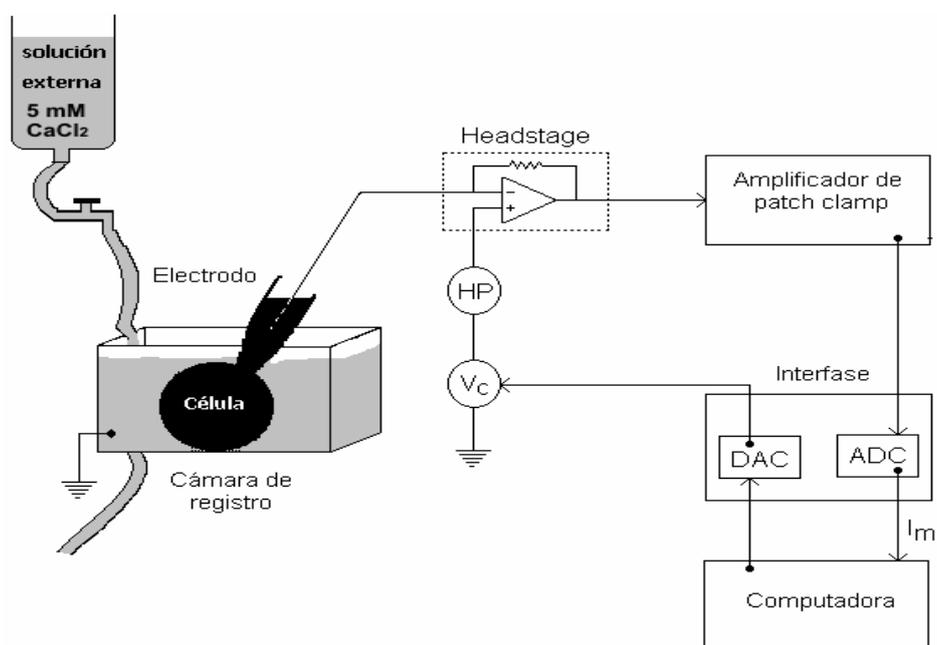


Figura 5. Sistema de registro empleado para los experimentos electrofisiológicos. El registro de la I_{Ca} se lleva a cabo mediante la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa. El transductor (*headstage*) regula el voltaje del electrodo y mide al mismo tiempo la corriente membranar (I_m). Los pulsos comando (V_c) y el potencial de mantenimiento (HP) entre cada pulso son dictados por la computadora y los genera el convertidor digital-analógico (DAC) de la interfase. A su vez, el amplificador permite reducir las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de los pulsos. La señal de corriente evocada 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 análisis posterior. 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. La célula bajo estudio, y el resto de las células contenidas en la cámara de registro fueron perfundidas continuamente con la solución externa de registro mediante un sistema de perfusión impulsado por

gravedad. El circuito eléctrico se cerró mediante un electrodo de tierra que conectó la cámara de registro con la entrada de tierra del transductor.

Análisis de Datos

Los datos electrofisiológicos se analizaron usando el programa Clampfit del paquete pClamp 9.2 (Axon Instruments) y Microsoft Office Excel. Las gráficas y las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Prism 4 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). Los datos se presentan como la media \pm error estándar (SEM). La comparación entre las medias se realizó con la t de Student para muestras no pareadas a un nivel de significancia de $P < 0.05$. Cuando fue necesario, la resta de la corriente de fuga (aquella que se escapa a través del sello entre la punta del electrodo de registro y la membrana celular) se realizó *off line*, es decir, al momento de analizar los datos en la computadora y por medio de un algoritmo de resistencia pasiva incluido en el programa Clampfit. Para determinar el efecto del fármaco antiepiléptico ZNS en los canales Ca_v3 , se midió el pico máximo de la corriente registrada a cada uno de los voltajes estudiados. Las mediciones se hicieron en condiciones control y en presencia del fármaco. La amplitud máxima de la corriente, se dividió entre la C_m para obtener el valor de corriente por unidad de área de membrana y descartar así el tamaño celular como una fuente de variación. El porcentaje de bloqueo de la densidad de corriente se calculó para cada uno de los canales clonados y de la corriente nativa en las neuronas DRG, en las condiciones estudiadas. Para determinar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente tipo T, los datos de las curvas $I-V$ se ajustaron con una ecuación de Boltzmann modificada: $I = I_{max}(V_m - V_{inv}) / (1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k))$, donde I es corriente, V_m es el potencial de membrana, V_{inv} es el potencial de inversión, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se alcanza el 50% de la activación y k es la pendiente. Los valores de la constante de tiempo (τ ó tau) que nos permiten estudiar la cinética de la corriente expresada por los diferentes canales estudiados se obtuvieron a partir del ajuste de

una ecuación biexponencial a los trazos de corriente obtenidos con el mismo protocolo que se construyó la curva I - V . Con la primera exponencial se obtuvo el valor de τ de activación y con la segunda el valor de τ de inactivación. Para construir la curva de inactivación en el estado estacionario, los datos experimentales se ajustaron con una función Boltzmann de la siguiente forma: $I_{Ca} = I_{max} / (1 + \exp((V_m - V_{1/2}) / k))$, donde I_{Ca} es la fracción de la corriente inactivada al voltaje en cuestión, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se inactiva la mitad de los canales disponibles, V_m es el potencial de membrana y k es una medida de la tasa de cambio con la que los canales se inactivan en función del voltaje.

RESULTADOS

Efecto de la ZNS Sobre la Corriente de los Canales Ca_v3 a Diferentes Potenciales de Mantenimiento

Debido a las diferencias en los porcentajes de bloqueo reportados previamente para el efecto de la ZNS sobre los canales de calcio tipo T endógenos de neuronas y células de neuroblastoma (Suzuki et al., 1992; Kito et al., 1994), en la primera serie de experimentos del presente trabajo exploramos el efecto de 50 y 500 μM de ZNS en los tres tipos de canales Ca_v3 a un potencial de membrana (V_m) de -30 mV a partir de dos diferentes potenciales de mantenimiento: -100 y -70 mV. Experimentos previos realizados en el laboratorio (Higueldo García, 2007; Arteaga, 2007) han mostrado que utilizando 5 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga, el valor máximo de corriente entrante se obtiene precisamente a -30 mV, por lo que se empleó dicho voltaje para monitorear el efecto de la ZNS sobre la actividad de los canales Ca_v3 . Además, empleamos dos diferentes potenciales de mantenimiento para explorar si el efecto de la ZNS presentaba un componente dependiente del estado del canal, como se ha insinuado previamente por Suzuki y colaboradores (1992).

La Fig. 6 muestra registros representativos de la corriente de calcio (I_{Ca}) a -30 mV obtenidos de células HEK-293 que expresan de manera estable canales $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ ó $\alpha 1I$, respectivamente. En cada panel se muestra la corriente en condiciones control y en presencia de 500 μM de ZNS. Antes de describir propiamente los resultados de la Fig. 6, es importante hacer hincapié que en experimentos similares, pero utilizando una concentración de 50 μM de ZNS, el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} fue de 20.6 ± 2.7 ($n = 8$ células) a partir de un HP de -100 mV, y de 48.4 ± 9.3 ($n = 5$ células) cuando se fijó el HP a -70 mV. En vista del bajo porcentaje de bloqueo a tal concentración del antiepiléptico, decidimos investigar el efecto de

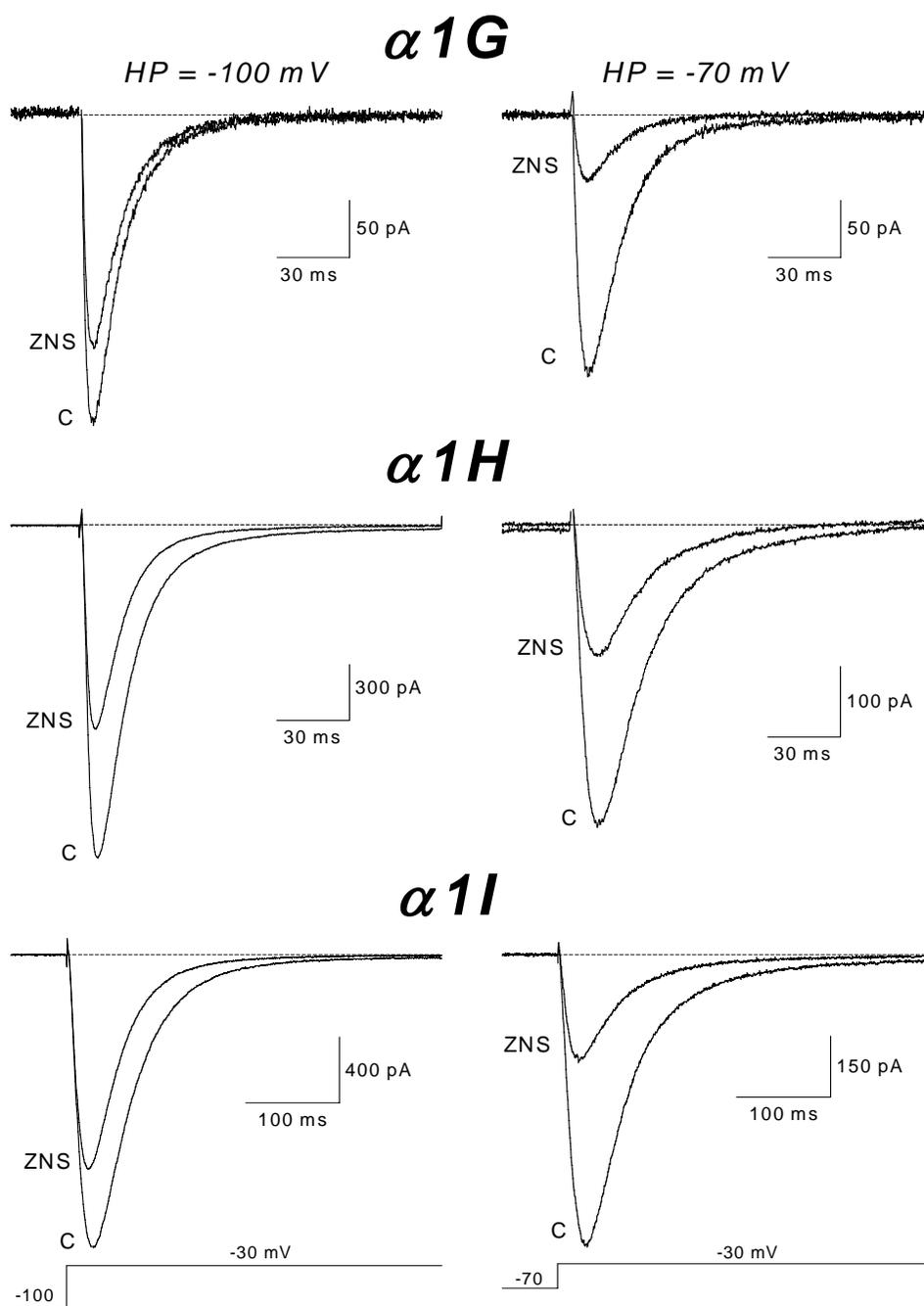


Figura 6. Bloqueo de la I_{Ca} inducido por ZNS. Trazos representativos de la I_{Ca} registrada a -30 mV en células HEK-293 que expresan de manera estable los canales $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ ó $\alpha 1I$, en condiciones control (C) y en presencia de $500 \mu\text{M}$ de ZNS (ZNS); fijando el HP a -100 mV (izquierda) y -70 mV (derecha). Los registros se obtuvieron al aplicar los protocolos de voltaje ilustrados en la parte inferior de la figura.

la ZNS sobre los canales Ca_v3 a una concentración de $500 \mu\text{M}$ con el propósito de tener un mayor bloqueo y poder analizar mejor los efectos producidos por el fármaco sobre las propiedades biofísicas de los canales Ca_v3 . Así, en los registros de la Fig. 6 se observa que la aplicación del pulso a -30 mV generó una corriente transitoria de activación e inactivación rápida, características propias de la corriente tipo T. Lo anterior se observa como una rápida deflexión de la señal de corriente hacia valores negativos de la misma (activación de la corriente). La línea punteada en cada panel indica el valor cero de corriente, referencia que se obtiene a partir de la ausencia de corriente cuando el valor de V_m esta determinada por el HP. Después de alcanzar un valor de corriente máximo (corriente al pico), la señal de corriente decae en función del tiempo (inactivación). Posteriormente, el pulso a -30 mV se corta y el V_m de la célula se regresa al HP (repolarización) durante 10 s con el fin de permitir la recuperación de los canales que fueron inactivados durante el pulso despolarizante. Terminado el período de 10 s , se repite el mismo protocolo de voltaje. Una vez que se alcanza un valor de corriente estacionario (es decir, que la amplitud de la misma no varía entre un registro y el siguiente), las células fueron perfundidas con $500 \mu\text{M}$ de ZNS y el bloqueo estacionario provocado por el antiepiléptico se indica por el registro de corriente de menor amplitud en cada panel de la Fig. 6. A primera vista resulta evidente que la ZNS bloquea un mayor porcentaje de la I_{Ca} en los tres tipos de canales cuando se aplica el pulso despolarizante a partir de un HP de -70 mV (Fig. 6, paneles a la derecha). Para realizar comparaciones cuantitativas adecuadas entre las diferentes condiciones experimentales recurrimos a la densidad de corriente expresada por cada célula. Debido a que las membranas celulares se comportan como capacitores eléctricos con una capacidad específica de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Hille, 2001), se puede obtener una estimación del tamaño de la célula con base en su valor de C_m . Así, al obtener el cociente de la amplitud de la corriente entre el valor de C_m se obtiene el valor de la densidad de corriente para cada célula y de esta manera se elimina la variable del tamaño celular. El resumen de dichas mediciones

para los tres tipos de canales Ca_v3 en ausencia y presencia de ZNS se presentan en la Tabla 1. En primer lugar, se puede apreciar que la densidad de I_{Ca} registrada para cada uno de los canales en la condición control es muy diferente entre ellos. Esto se debe a diferencias inherentes al proceso de transfección de las células HEK-293 con los plásmidos que contienen las secuencias codificantes de los diferentes canales y con la forma en que se regula la transcripción de cada uno de ellos. En todo caso, para los fines del presente trabajo, el valor de la densidad de I_{Ca} total es irrelevante.

Tabla 1. Densidad de I_{Ca} a -30 mV y porcentaje de bloqueo con 500 μ M de ZNS en los canales Ca_v3

	$\alpha 1G$		$\alpha 1H$		$\alpha 1I$	
	C	ZNS	C	ZNS	C	ZNS
-100 mV						
I_{Ca} (pA/pF)	-63.8 \pm 16.7	-28.8 \pm 6.8	-109.9 \pm 19.9	-72.8 \pm 22.1	-98.7 \pm 22.3	-61 \pm 10.1
% bloqueo		48 \pm 3 (7)		49 \pm 12 (6)		31 \pm 8 (6)
-70 mV						
I_{Ca} (pA/pF)	-24.8 \pm 4.4	-5.8 \pm 1.8*	-44.4 \pm 5.8	-9.8 \pm 2.1*	-51.8 \pm 4.4	-26.5 \pm 2.9*
% bloqueo		78 \pm 4 (6)*		81 \pm 3 (5)*		51 \pm 1 (5)*

Los valores son la media \pm error estándar obtenidos en la condición control (C) y en presencia de 500 μ M de ZNS (ZNS) de los tres canales tipo T con los potenciales de mantenimiento indicados. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con (*), $p < 0.05$. Los porcentajes de bloqueo se comparan entre el HP de -100 y -70 mV. El número de células para cada condición se muestra entre paréntesis.

Los datos más sustanciales de la Tabla 1 son los porcentajes de bloqueo de la I_{Ca} a -30 mV. Nótese que con ambos HPs (-100 y -70 mV), $\alpha 1I$ es el menos sensible de los canales Ca_v3 al bloqueo por ZNS. El bloqueo máximo fue de 51% con el HP de -70 mV. Por su parte, la corriente de $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ fue bloqueada alrededor de 50% con un HP de -100, mientras que con el HP de -70 mV, el bloqueo aumento en un 60% respecto al observado con el HP de -100 mV. Estos resultados fueron el primer indicio de que el efecto de la ZNS sobre los canales tipo T pudiera ser dependiente del estado del canal, ya que manteniendo a la célula a -70 mV

antes de que se aplique el pulso despolarizante a -30 mV, la ZNS induce un mayor bloqueo que cuando el canal se mantiene a un potencial más hiperpolarizado (HP = -100 mV). Es bien sabido que a potenciales relativamente despolarizados (como puede ser -70 mV) los canales de calcio (HVA y LVA, e incluso otros como los de sodio) se encuentran parcialmente inactivados (Hille, 2001), por lo cual los resultados sugieren que la unión de ZNS a los canales Ca_v3 es más probable cuando éstos se encuentran en el estado inactivado que en el estado de reposo.

Cambios en la Relación Corriente-Voltaje de los Canales Ca_v3 inducidos por la ZNS

El siguiente paso fue investigar si el bloqueo de los canales Ca_v3 por ZNS presentaba una dependencia al voltaje, para ello aplicamos el protocolo I-V (véase Métodos), el cual nos permitió explorar el bloqueo de la ZNS a voltajes entre -80 y $+60$ mV en pasos de 10 mV. Nuevamente, los pulsos de voltaje se aplican cada 10 s y la duración de cada uno de ellos es de 150 ms cuando se evoca la actividad de los canales $\alpha1G$ y $\alpha1H$ y de 500 ms cuando se trata de los canales $\alpha1I$. Esta diferencia se debe a que como se puede observar en los trazos de corriente de la Fig. 6, la cinética de la corriente generada por estos últimos canales es considerablemente más lenta que la de los primeros. Para fines comparativos nótese que las escalas de tiempo son 3.3 veces más grandes en el caso de los canales $\alpha1I$, lo cual implica que la cinética de éstos es cuando menos 3.3 veces más lenta. La anterior es una de varias diferencias reportadas previamente que caracterizan a los canales $\alpha1I$ respecto de los otros dos miembros de la familia de los Ca_v3 (para una revisión véase Perez-Reyes, 2003).

En la Fig. 7 se presentan familias de corrientes representativas generadas por la subunidad $\alpha1H$ antes y durante su exposición a 500 μ M de ZNS a los dos diferentes potenciales de mantenimiento utilizados. En cada una de las familias de corrientes se puede

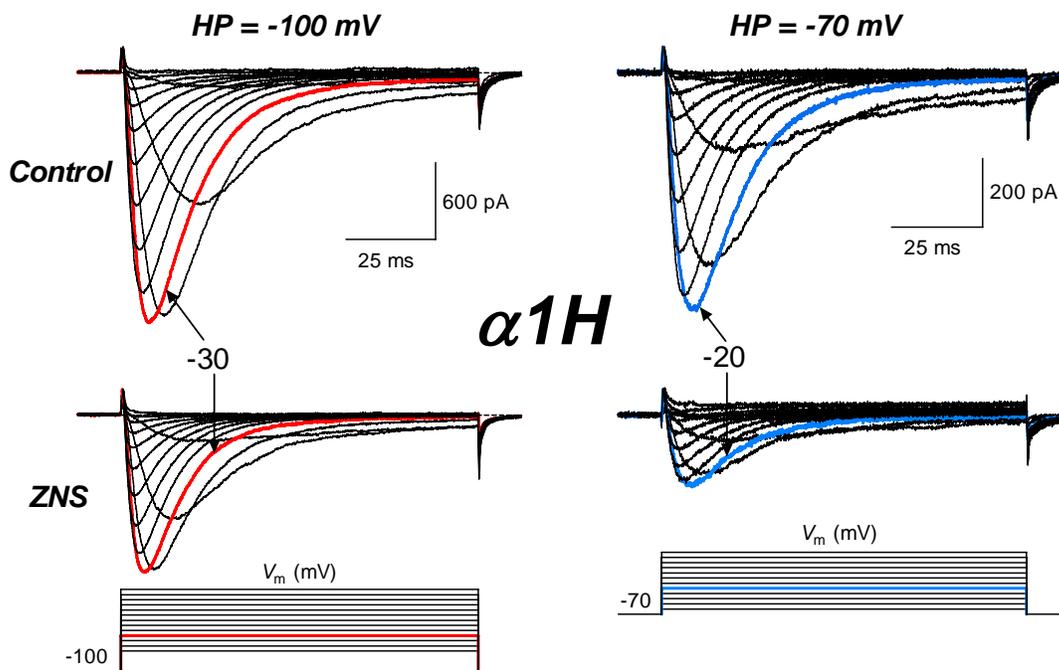


Figura 7. Efecto de ZNS en las familias de I_{Ca} . Familias de trazos representativos de la I_{Ca} generados por canales $\alpha 1H$. Se presentan las corrientes en condiciones control (trazos superiores) y su bloqueo en presencia de $500 \mu M$ de ZNS (trazos inferiores). Los registros se obtuvieron al aplicar el protocolo de voltaje ilustrado en la parte inferior de la figura; para mayor claridad, solo se muestran los trazos de corriente obtenidos a $-60, -50, -40, -20, 0, 20, 40$ y 60 mV. Nótese que en los trazos de la izquierda se fijó el HP a -100 mV, mientras que en los de la derecha en los cuales es más acentuado el efecto, el HP se fijó a -70 mV. En ambos casos, se remarcan los trazos de voltaje y de corriente al cual se alcanzó el pico máximo de corriente.

observar que la cinética de activación e inactivación se acelera conforme la despolarización es más positiva (comparar los trazos a -10 y -30 mV, por ejemplo), lo cual provoca un entrecruzamiento de los trazos de corriente característico de los canales Ca_v3 . Utilizando un HP de -100 mV, la máxima amplitud de la corriente se obtuvo con el pulso a -30 mV, tanto en ausencia como en la presencia de ZNS (Fig. 7, trazos de la izquierda). El efecto más evidente de la presencia de ZNS es una disminución en la amplitud de la corriente a cada voltaje, sin que al parecer haya cambios en la cinética de la corriente. El mismo efecto, aunque más acentuado sobre la amplitud de la corriente, se obtuvo cuando se utilizó un HP de -70 mV (Fig.

7, trazos de la derecha). Adicionalmente, con este último HP la corriente máxima se registro a -20 mV en ambas condiciones experimentales. Resultados cualitativamente similares se obtuvieron con los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1I$ (ver Fig. 8 y 9). Una forma de analizar con más detalle los registros de corriente que se presentan en la Fig. 7 es medir la amplitud máxima de la corriente de cada uno de los trazos mostrados y graficar dicho valor (expresado como densidad de corriente) en función del voltaje que la generó. Tal relación (curva corriente voltaje, $I-V$), para cada uno de los canales Ca_v3 y con los dos potenciales de mantenimiento explorados, se presenta en la Fig. 8. Los datos experimentales (promedio \pm SEM de la densidad de corriente) obtenidos en condiciones control se presentan con símbolos rellenos y aquellos en presencia de 500 μM de ZNS con símbolos vacíos. Empleando un HP de -100 mV, se puede apreciar que la I_{Ca} generada por los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ en condiciones control comienza a ser detectada a -60 mV, alcanza un máximo alrededor de -30 mV, después disminuye en amplitud y cambia de dirección, de entrante a saliente, a voltajes cercanos a +40 mV. La corriente de los canales $\alpha 1I$ sigue un comportamiento semejante excepto que éste sucede a voltajes más positivos (~ 10 mV) respecto de $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$. Con el HP a -70 mV, las curvas $I-V$ se comportan de manera similar, pero las corrientes son detectadas a partir de -50 mV (-40, en el caso de $\alpha 1I$) y el pico de la curva ocurre a -20 mV. El efecto global de la ZNS sobre las curvas $I-V$ se observó como una disminución en la amplitud de la corriente, sin cambios evidentes en la dependencia al voltaje de la activación de la corriente. Otro efecto visible inducido por la presencia de la ZNS fue el cambio en el potencial al cual la corriente invierte su dirección (potencial de inversión, V_{inv}), lo cual se observa claramente en $\alpha 1G$, a ambos HPs, y en $\alpha 1H$ únicamente con el HP de -70 mV. Este resultado se revisará con más detalle en el siguiente párrafo.

Las líneas continuas en cada uno de las relaciones $I-V$ de la Fig. 8 indican el ajuste de los datos con la ecuación modificada de Boltzmann (ver métodos), la cual proporciona

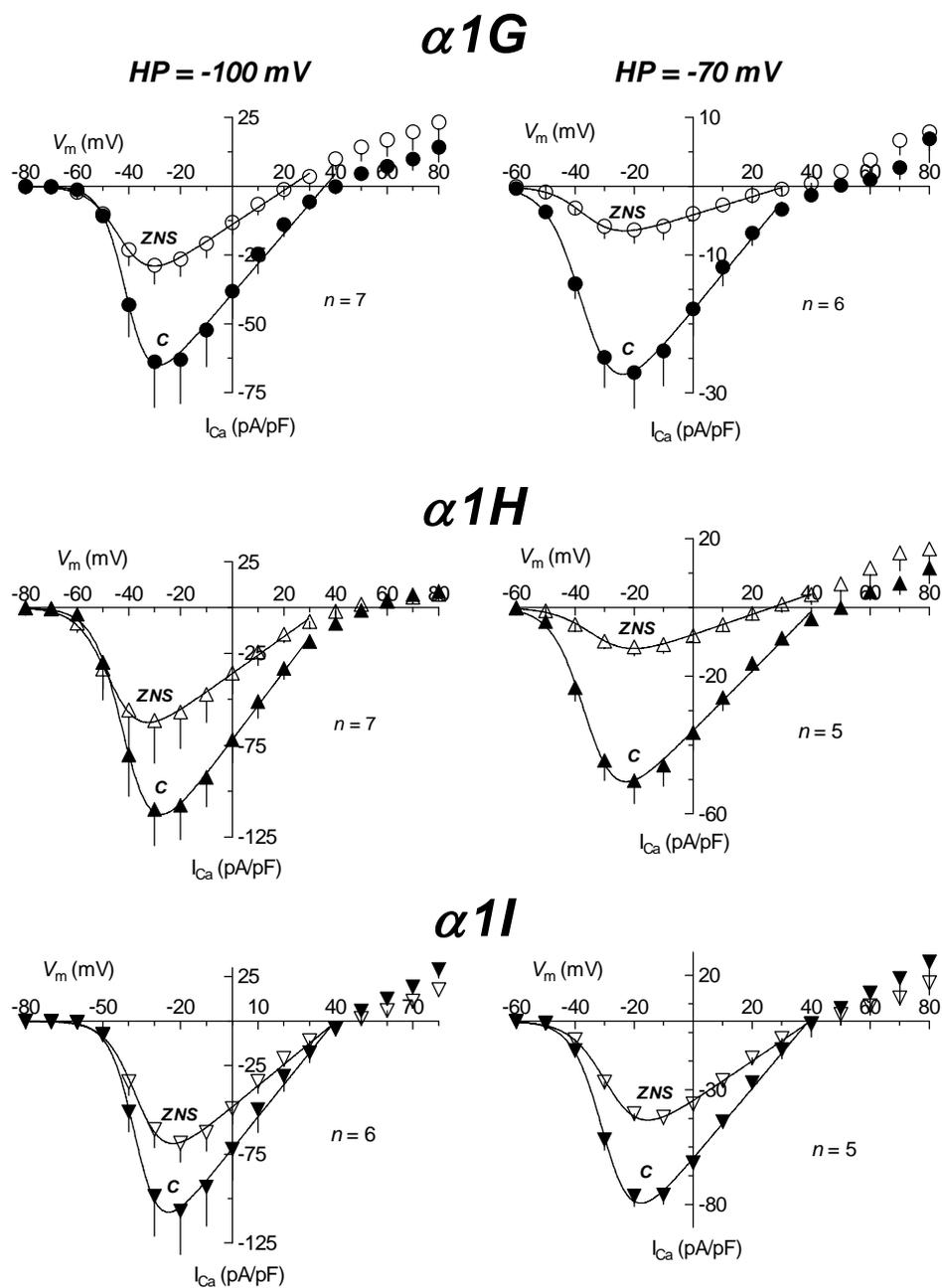


Figura 8. Efecto de ZNS en la relación I - V de los canales de calcio tipo T. Relación corriente-voltaje de los canales $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ en la condición control y en presencia de 500 μM de ZNS. Los puntos experimentales corresponden al promedio \pm SEM de la densidad de corriente calculada a partir de la corriente al pico entre el valor de C_m . Las líneas continuas indican el ajuste de los datos con la ecuación de Boltzmann modificada (ver Métodos), los parámetros ajustados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la ZNS en las propiedades biofísicas de los canales Ca_v3

	$\alpha 1G$		$\alpha 1H$		$\alpha 1I$	
	C	ZNS	C	ZNS	C	ZNS
-100 mV						
Activación						
$V_{1/2}$	-40.1 ± 1.3	-41.7 ± 2.0	-40.9 ± 2.2	-43.1 ± 2.4	-37.5 ± 1.7	-36.8 ± 2.1
k	4.9 ± 0.2	5.6 ± 0.2*	4.8 ± 0.4	6.0 ± 0.3*	4.4 ± 0.2	5.2 ± 0.3
V_{inv} (mV)	33.5 ± 1.4	20.9 ± 4.2*	36.8 ± 2	31.9 ± 4.3	38.4 ± 2.1	39.3 ± 2
τ_{act} (ms)	3.4 ± 0.4	2.5 ± 0.3	6.1 ± 0.9	5.1 ± 1.0	17.8 ± 2.0	12 ± 1.2*
τ_{inact} (ms)	15.1 ± 1.2	15.1 ± 1.1	11.6 ± 0.7	12.2 ± 1.0	50.1 ± 2.8	41.8 ± 3.5
Inactivación						
$V_{1/2}$	-76.5 ± 1.5	-84.6 ± 1.9*	-76.7 ± 3.9	-85.2 ± 4.1	-69.6 ± 1.5	-74.5 ± 2.3
k	5.4 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.8 ± 0.3	6.0 ± 0.4
-70 mV						
Activación						
$V_{1/2}$	-37.1 ± 1.1	-36.3 ± 1.0	-35.8 ± 0.7	-32.2 ± 1.0*	29.5 ± 0.9	-28.2 ± 1.8
k	5.5 ± 0.2	6.0 ± 0.4	5.4 ± 0.2	6.8 ± 0.5*	5.0 ± 0.2	5.7 ± 0.3
V_{inv} (mV)	33.8 ± 0.9	29.0 ± 1.6*	41.4 ± 0.4	29.5 ± 4.6*	40.3 ± 2.9	42.2 ± 3.1
τ_{act} (ms)	3.8 ± 0.3	3.0 ± 0.4	7.3 ± 0.6	5.5 ± 0.5*	14.8 ± 0.6	11.7 ± 1.5
τ_{inact} (ms)	17.2 ± 1.5	17.1 ± 2.7	13.6 ± 0.6	17.2 ± 0.8*	51.6 ± 5.3	48.9 ± 4.7

Los valores son la media ± error estándar obtenidos en la condición control (C) y en presencia de 500 μ M de ZNS (ZNS) de los tres canales tipo T con los potenciales de mantenimiento indicados. Los parámetros de activación (en mV), así como el V_{inv} son el promedio de los ajustes individuales de la relación $I-V$ de cada célula con una función Boltzmann modificada (ver Métodos). Las constantes de tiempo (τ) de activación e inactivación se obtuvieron a partir del ajuste con dos exponenciales de los trazos de corriente obtenidos a diferentes voltajes (protocolo IV); sólo se presentan los datos obtenidos a -30 mV. El $V_{1/2}$ y la k (también en mV) de la inactivación en estado estacionario provienen del ajuste de los datos experimentales obtenidos al aplicar el protocolo Hinf con la ecuación de Boltzmann (ver Métodos). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con (*), $p < 0.05$. Los datos se obtuvieron de las mismas células de la Tabla 1, excepto los de inactivación, en cuyo caso fueron 5 células de $\alpha 1G$, 4 de $\alpha 1H$ y 4 de $\alpha 1I$.

parámetros que permiten analizar y comparar las características de cada una de las curvas. Los parámetros más importantes de dichos ajustes son el $V_{1/2}$, el valor de k y el V_{inv} , mismos que se muestran en la Tabla 2. En general, los promedios de los valores $V_{1/2}$ y k no presentaron diferencias sustanciales entre la condición control y en presencia de ZNS a ambos

potenciales de mantenimiento. No obstante el $V_{1/2}$ de la curva $I-V$ de $\alpha 1H$ obtenida con el HP a -70 mV se desplazó 3.6 mV hacia voltajes más positivos y el valor de k fue más grande en 1.6 mV en presencia de ZNS. Ambas diferencias fueron significativas al aplicar la prueba t de Student ($p < 0.05$). Como ya se había anticipado, los efectos más evidentes de la ZNS sobre los parámetros de las curvas $I-V$ se presentaron en el V_{inv} , aunque esto fue sólo para los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$, pues la corriente de los canales $\alpha 1I$ no fue afectada en este sentido (Fig. 8 y Tabla 2). Las diferencias observadas en los dos primeros canales fueron desde 5 hasta casi 15 mV, provocando siempre que la corriente cambiara de dirección a voltajes más negativos en presencia de la ZNS. Los cambios en el V_{inv} indican cambios en la selectividad del canal por el ión permeante, es decir, al parecer la unión de la ZNS a su sitio de acción (donde quiera que este se encuentre; ver Discusión más adelante) altera de una manera alostérica la selectividad de los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$, provocando que el flujo de iones que da lugar a la corriente saliente (Cs^+ en nuestras condiciones experimentales) tenga lugar a voltajes más negativos que en condiciones control. Es probable que la ZNS se una a más de un sitio en la proteína de los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$, pues el bloqueo del flujo de corriente es independiente del efecto sobre el V_{inv} . Este aspecto se revisará con mayor detalle en la sección de Discusión.

El análisis de las curvas $I-V$ mostró que los canales más afectados por la ZNS fueron $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$, mientras que el efecto del antiepiléptico sobre los canales $\alpha 1I$ fue más discreto. Sin embargo, el bloqueo de la ZNS no fue dependiente del voltaje. La primera evidencia en este sentido lo constituye la ausencia de diferencias sustanciales en los valores de $V_{1/2}$ y del valor de k ; y la segunda evidencia se muestra en la Fig. 9 en la que se grafica el porcentaje de bloqueo por ZNS de la densidad de corriente a cada voltaje estudiado para cada canal en las condiciones experimentales indicadas. Para analizar dichos gráficos tómese como ejemplo el panel superior de la izquierda ($\alpha 1G$ con un HP de -100 mV), como lo indica la Tabla 1 el

porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} para $\alpha 1G$ fue de $48 \pm 3 \%$ a -30 mV, mientras que con la despolarización a $+10$ mV la ZNS bloqueo $61 \pm 8 \%$ de la I_{Ca} . La diferencia en los porcentajes de bloqueo a dichos voltajes no fue significativa ($p < 0.05$), tampoco lo fue para ningún otro par de voltajes en dicha condición experimental, es decir, el porcentaje de bloqueo fue estadísticamente el mismo a todos los voltajes mostrados en el panel en cuestión de la Fig. 9. Lo anterior sugiere fuertemente que el bloqueo por ZNS sobre los canales $\alpha 1G$ partiendo de un HP de -100 mV es independiente del voltaje. Haciendo el mismo tipo de análisis para el resto de los gráficos de la Fig. 9 se llega a la misma conclusión, independientemente del tipo de canal Ca_v3 y del HP que se utilice, bajo las presentes condiciones experimentales, el bloqueo inducido por ZNS no presenta un componente dependiente de voltaje.

Por otra parte, la Fig. 9 confirma también la observación preliminar de que el efecto de la ZNS es dependiente del estado del canal, esto se observa al comparar los porcentajes de bloqueo a un determinado V_m con ambos potenciales de mantenimiento. Tanto para $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ dicho valor se incremento casi al doble con el HP de -70 mV a casi todos los valores de V_m explorados (Fig. 9). Nuevamente en los canales $\alpha 1I$ el aumento del bloqueo al despolarizar el HP fue más discreto, por ejemplo a -30 y -20 mV el incremento en el bloqueo fue de 61 y 57% , respectivamente. De hecho, tales voltajes fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre ambos potenciales de mantenimiento para $\alpha 1I$ (Fig. 9). En resumen, los resultados de esta sección indican que el bloqueo inducido por la ZNS no es dependiente de voltaje, es más potente a potenciales de mantenimiento que inactivan parcialmente a los canales (efecto dependiente del estado), y afecta mayormente a los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$, mientras el efecto es más discreto sobre los canales $\alpha 1I$.

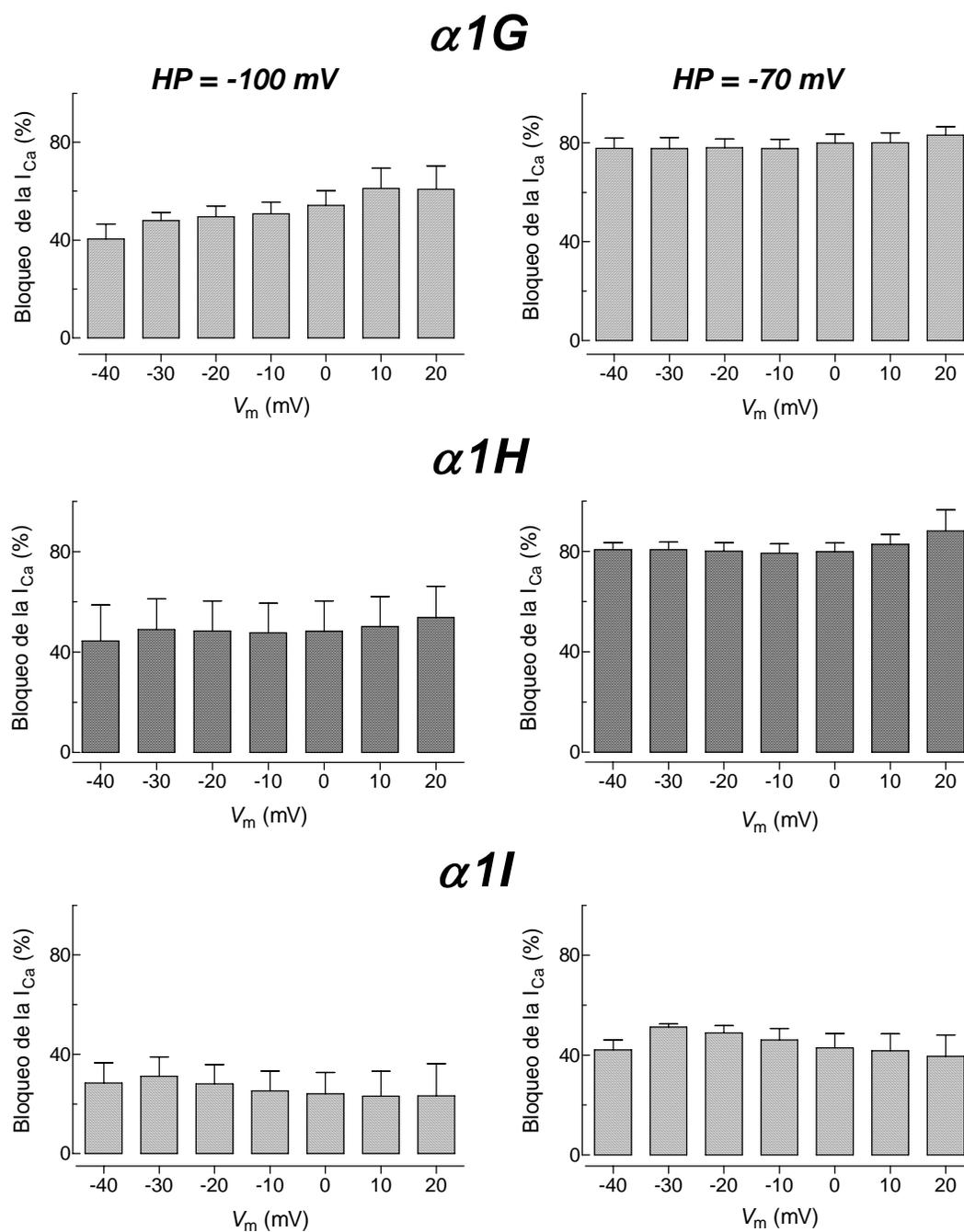


Figura 9. Bloqueo de la I_{Ca} tipo T inducido por ZNS a diferentes valores de V_m . Las barras representan el porcentaje de bloqueo (promedio \pm SEM) de la densidad de I_{Ca} en $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ inducido por ZNS en función de los valores de voltaje indicados. Las gráficas de la izquierda corresponden a los experimentos realizados con el HP a -100 mV y en la derecha se presentan los correspondientes al HP de -70 mV. Los datos experimentales corresponden a las mismas células de la Fig. 8.

Análisis de la cinética de la I_{Ca} en presencia de ZNS

El estudio del efecto de la ZNS en la cinética de activación e inactivación de los canales se realizó al analizar los trazos de corriente como se ilustra en la Fig. 10A y D. Para el análisis de la cinética en la corriente, los trazos de corriente fueron ajustados con una función biexponencial, la primera exponencial se ajustó al curso temporal de activación y la segunda al de la inactivación. Los ajustes proporcionan la constante de tiempo o tau (τ) de cada una de las fases, dicho valor es un índice del curso temporal con el que se desarrolla la activación y la inactivación y se puede utilizar para realizar comparaciones entre diferentes condiciones experimentales en las que se estudia al mismo canal. En el caso de la Fig. 10 se presentan únicamente los datos correspondientes al canal $\alpha 1H$ con ambos potenciales de mantenimiento (-100 mV, paneles B y C; -70 mV, paneles E y F). A simple vista, se puede observar que los datos experimentales de los valores de tau fueron muy parecidos en ausencia y en presencia de la ZNS. Discretas diferencias se observaron a voltajes entre -50 y -30 mV, aunque la mayoría de ellas no fueron significativas a un valor de $p < 0.05$. Estos resultados fueron respaldados al sobreponer los registros de corriente obtenidos a -30 mV en ausencia y en presencia del antiepiléptico, tal y como se muestra en la Fig. 10A y D. Para poder realizar dicha comparación los trazos de corriente en presencia de ZNS se amplificaron por un factor de 1.6 y 5.6 (HP de -100 y -70 mV, respectivamente). Se puede ver que ambos trazos, control y ZNS (trazos rojos), siguen un curso temporal muy parecido, con una ligera aceleración de la fase de inactivación con el HP a -100 mV, sin que esto sea un efecto considerable.

Modificación de la Inactivación en el Estado Estacionario de los Canales Ca_v3 por ZNS

La inactivación en el estado estacionario se puede estudiar induciendo el estado inactivado en los canales aplicando prepulsos de larga duración. En el presente trabajo se utilizaron prepulsos de 10 s de duración a diferentes voltajes en el rango comprendido entre -110 y -40

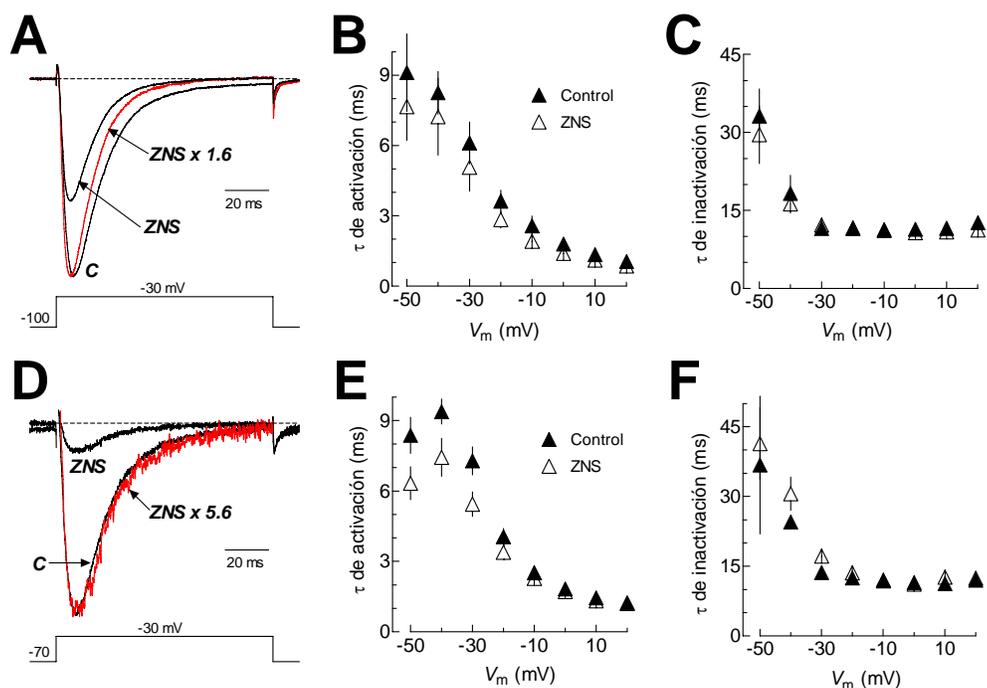


Figura 10. Efecto de la ZNS en la cinética de activación e inactivación de la I_{Ca} de los canales $\alpha 1H$. En **A** y **D** se muestran trazos representativos de la I_{Ca} a -30 mV generada por canales $\alpha 1H$, en la condición control y con ZNS, a partir de un HP de -100 mV (**A**) y de -70 mV (**D**). Para fines comparativos, los trazos de corriente obtenidos en presencia de ZNS se multiplicaron por los valores indicados en cada caso (trazos rojos), para igualar la amplitud de los picos de corriente en ambas condiciones. Las constantes de tiempo (τ) de la activación e inactivación se obtuvieron de los ajustes de ambas fases con funciones exponenciales, y el promedio de varias células se gráfica en función del voltaje del pulso de prueba. Se presentan los datos obtenidos en la condición control y en la presencia de 500 μM de ZNS a los dos HPs explorados: -100 mV, paneles **B** y **C**; y -70 mV, paneles **E** y **F**. Los datos corresponden a las mismas células de la Fig. 8.

mV (ver leyenda de Fig. 11). Inmediatamente después del prepulso se aplica un pulso de prueba a -30 mV de 200 ms de duración con el cual se registra la corriente generada por los canales que no fueron inactivados por el prepulso. En Fig. 11A se presenta el protocolo de voltaje mencionado, así como trazos representativos de la corriente de calcio del canal $\alpha 1H$ registrada en una célula HEK-293 bajo las condiciones experimentales indicadas. Es visible como en la condición control la corriente disponible para ser activada después del prepulso a -

75 mV (trazos rojos) es de mayor amplitud que la que se logra activar en presencia de ZNS. La I_{Ca} registrada después de dicho prepulso representó el 41% de la máxima corriente (prepulso a -110 mV) en la condición control, mientras que en presencia de ZNS sólo se generó un 7% de la corriente máxima. Esto es indicativo de que la presencia de ZNS provoca que los canales $\alpha 1H$ transiten al estado inactivado a voltajes más negativos en comparación a como lo hacen en la condición control. Esta observación se confirma al construir las curvas de inactivación en el estado estacionario de los canales $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ que se presentan en los paneles B, C y D de la Fig. 11. Los datos experimentales mostrados en los gráficos son el promedio de la corriente al pico registrada durante el pulso de prueba en función del voltaje del prepulso. Nuevamente, los puntos llenos son los datos en la condición control y los puntos vacíos en la presencia de ZNS. Los datos de cada condición experimental se ajustaron con una función Boltzmann y el mejor ajuste se indica con las líneas continuas. Los parámetros utilizados en dichos ajustes se presentan también en la Tabla 2. Es importante mencionar que los datos mostrados en la Tabla 2, son el promedio (\pm error estándar) de cada uno de los ajustes individuales de cada célula, lo cual es más representativo que mostrar los parámetros ajustados a los datos promediados que se presentan en las curvas de la Fig. 11.

Así, en las curvas de la Fig. 11 se puede apreciar que en los tres canales Ca_v3 la inactivación ocurre a voltajes más negativos en presencia de ZNS con respecto a la condición control, es decir existe un corrimiento de la curva de inactivación hacia voltajes más negativos. La forma de cuantificar dicho corrimiento se hace comparando los valores $V_{1/2}$ de cada curva. En el caso de $\alpha 1G$ el desplazamiento fue de 8.1 mV, 8.5 en $\alpha 1H$ y solamente 4.9 en $\alpha 1I$. No obstante, el análisis estadístico mostró que la diferencia solo fue significativa en el caso de $\alpha 1G$ (Tabla 2). Por su parte, los valores del parámetro k no sufrieron cambios significativos en ningún caso, lo que sugiere que la tasa de cambio que determina la inactivación de los canales en función del voltaje fue la misma en ausencia y en presencia de ZNS.

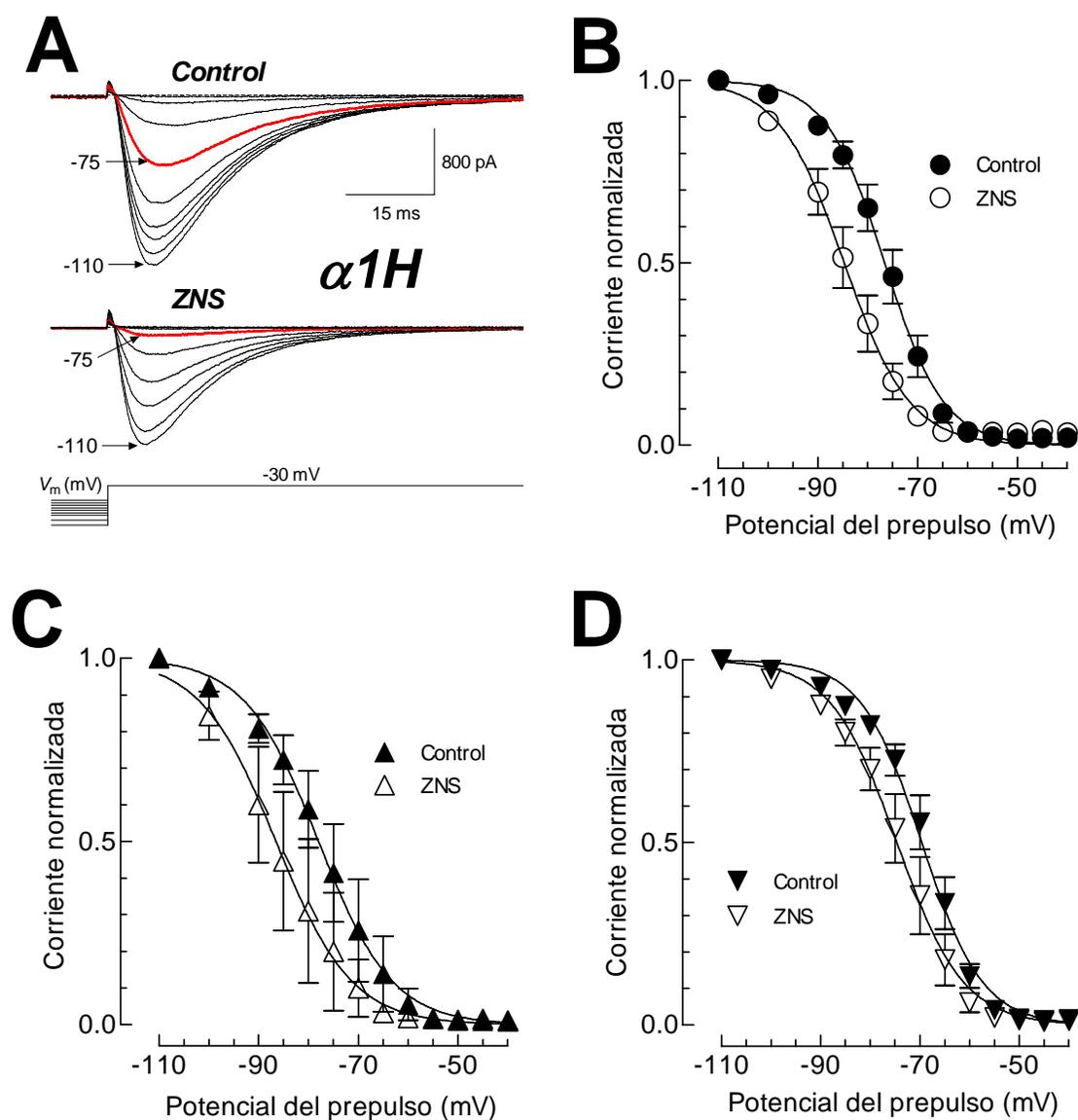


Figura 11. Efecto de ZNS en la inactivación en el estado estacionario en los canales Cav3. En **A** se presentan trazos representativos de la I_{Ca} registrada a -30 mV después de prepulsos de 10 s de duración a diferentes valores de V_m comprendidos entre -110 y -40 mV. Los registros se obtuvieron de una célula HEK-293 que expresa de manera estable canales $\alpha 1H$ en la condición control y en presencia de ZNS. El protocolo de voltaje y los trazos de corriente sólo muestran los últimos 10 s de los prepulsos. Nótese la diferencia en la fracción de corriente que se activa después del prepulso a -75 mV en ambas condiciones experimentales. En **B**, **C** y **D** se presentan las curvas de inactivación en el estado estacionario de los canales $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$, respectivamente, en condiciones control y en presencia del antiepiléptico ZNS. Los datos experimentales corresponden al promedio de las corrientes al pico normalizadas respecto a la corriente máxima, en función del voltaje del prepulso. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos con una función de Boltzmann, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 2.

Acciones de la ZNS en la Corriente de Calcio Tipo T de Neuronas DRG

Con el objetivo de estudiar el papel del antiepiléptico ZNS en corrientes de calcio tipo T nativas, se utilizaron neuronas DRG como una primera aproximación para analizar si los efectos de la ZNS en canales tipo T clonados también se observaban en los canales tipo T endógenos de estas neuronas. La ventaja de utilizar neuronas DRG es la relativa accesibilidad en su preparación y que presentan corrientes tipo T muy prominentes en comparación con otro tipo de neuronas. Además, estudios previos de hibridación *in situ* y farmacológicos han mostrado que las corrientes tipo T de dichas neuronas son principalmente debidas a la actividad de canales $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ (Talley et al., 1999; Todorovic et al., 2001), los cuales, de acuerdo a los resultados presentados en los párrafos previos, son los canales que representan los extremos en cuanto a sensibilidad a la ZNS. Al igual que en el caso de los canales clonados, primero se estudió el efecto de 500 μM de ZNS al voltaje donde se registra la máxima amplitud de la corriente tipo T sin que haya una contribución significativa de los canales de calcio HVA. Bajo las presentes condiciones de registro, dicho voltaje resultó ser -30 mV. En este punto es importante hacer notar que las neuronas DRG contienen, además de corrientes tipo T, una amplia batería de canales de calcio HVA, es decir, aquellos que se activan con despolarizaciones más positivas que -20 mV (Mintz et al., 1992; Rusin & Moises, 1995; Murakami et al., 2001). Por tal circunstancia, el estudio de la corriente tipo T requiere de ser separada del resto de las corrientes de calcio presentes en estas neuronas. En el presente estudio logramos tal objetivo registrando la corriente a -30 mV a partir de un HP de -100 mV. Como se puede observar en los trazos de la Fig. 12A, la I_{Ca} registrada a -30 mV presenta la cinética clásica de los canales tipo T, es decir, activación e inactivación rápida. Para fines comparativos, también se muestra la I_{Ca} evocada por un pulso a +10 mV en la misma neurona. Nótese que esta última no se inactiva en la misma proporción que la corriente a -30 mV,

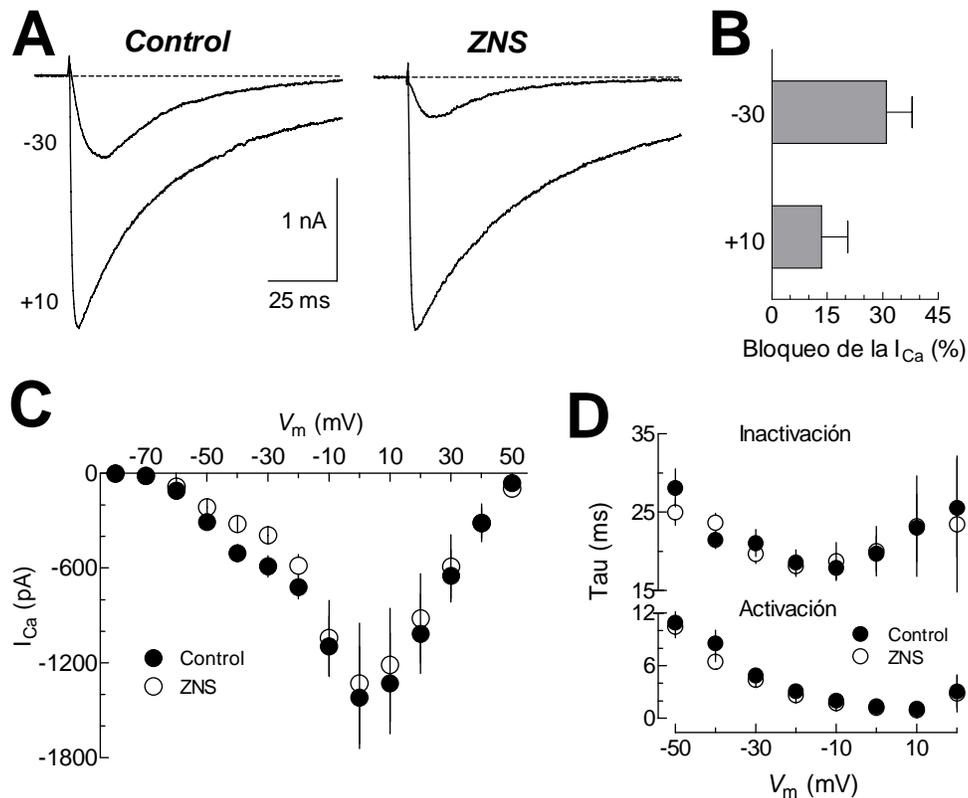


Figura 12. Efecto de la ZNS en la I_{Ca} de neuronas DRG. En **A** se presentan trazos representativos de la I_{Ca} a -30 y +10 mV en una neurona DRG en ausencia (control) y presencia de 500 μ M de ZNS. En todos los experimentos con neuronas DRG el HP utilizado fue de -100 mV. En **B** se presenta el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} inducido por ZNS: $31 \pm 7\%$ a -30 mV y $13.5 \pm 7\%$ a +10 mV. En **C** se ilustra la relación I - V de la I_{Ca} de 5 neuronas DRG en la condición control y en presencia de ZNS. Los puntos experimentales corresponden al promedio \pm SEM de la densidad de corriente a cada uno de los voltajes investigados. Nótese que el bloqueo de la ZNS es más acentuado a voltajes donde la actividad de los canales tipo T es predominante, esto es entre -50 y -20 mV. En **D** se muestran los valores de tau para la activación y la inactivación de la I_{Ca} en función del voltaje para ambas condiciones experimentales. Mismas células que en **C**.

además la activación de la corriente es más rápida, ambos cambios se deben a la participación de los canales HVA en la generación de dicha corriente, un tercer efecto notorio es que la I_{Ca} a +10 mV es de una amplitud considerablemente mayor. La adición de 500 μ M de ZNS a la solución que baña la neurona bajo estudio indujo un bloqueo considerable de la corriente a -30 mV sin afectar mayormente la registrada a +10 mV (comparar registros Control vs ZNS). En un total de 5 neuronas estudiadas, la ZNS bloqueo 31% la amplitud de la I_{Ca} a -30

mV y sólo 13.5% a +10 mV (Fig. 12B y Tabla 3). Un panorama más amplio del efecto de ZNS sobre la I_{Ca} de las neuronas DRG se muestra en la Fig. 12C que ilustra las curvas $I-V$ obtenidas de las mismas 5 células mencionadas anteriormente en ausencia y presencia de 500 μ M de ZNS. En ellas se puede observar el bloqueo preferencial de la I_{Ca} a voltajes negativos (entre -50 y -30 mV), donde la contribución a la corriente de calcio esta dada casi en su totalidad por los canales tipo T. El bloqueo a voltajes más positivos (donde predomina la actividad de los canales HVA) fue menos evidente. Debido a la presencia de más de un componente en la corriente de calcio en la relación $I-V$, estas curvas no fueron ajustadas como las de los canales clonados, pues la interpretación de dichos ajustes no permitiría discernir adecuadamente entre la contribución de los canales tipo T y la de los HVA.

Por otra parte, la Fig. 12D muestra que, al igual que los canales tipo T clonados, la ZNS no afecta de manera significativa la cinética de activación ni de inactivación de las corrientes de calcio registradas a diferentes voltajes en las neuronas DRG.

La última serie de experimentos consistió en determinar el efecto de la ZNS sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales tipo T de las neuronas DRG, utilizando para ello el mismo protocolo que se describe en la Fig. 11. Los resultados se resumen en la Fig. 13. En el panel A se gráfica la amplitud de la I_{Ca} registrada con el pulso de prueba a -30 mV en función del voltaje del prepulso, para ambas condiciones experimentales. Se puede observar nuevamente que el bloqueo de la I_{Ca} por ZNS fue de aproximadamente un tercio de la amplitud total. Al normalizar los datos del panel A se obtienen las curvas de inactivación mostradas en el panel B. Los datos experimentales se ajustaron con funciones Boltzmann y los parámetros correspondientes se presentan en la Tabla 3. El desplazamiento en la curva de inactivación en este caso fue de 4.6 mV, mismo que resulto ser estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

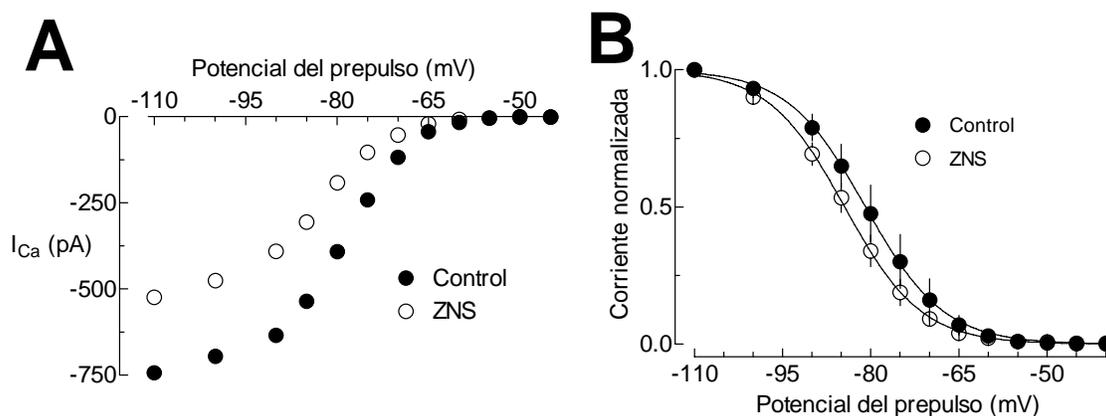


Figura 13. Modificación de la inactivación en el estado estacionario de los canales tipo T de neuronas DRG inducida por ZNS. En **A** se presenta la amplitud de la I_{Ca} registrada a -30 mV en función del voltaje del prepulso de 10 s de duración (ver protocolo de Fig. 11.4). Los datos se obtuvieron de una neurona DRG antes y durante su exposición a $500 \mu\text{M}$ de ZNS. En **B** se muestra la curva de inactivación en el estado estacionario en la condición control y en presencia de ZNS. Las curvas se construyeron como se indica en la Fig. 11. Los parámetros de las funciones Boltzmann ajustadas (líneas continuas) a los datos experimentales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de ZNS en la densidad de corriente y las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo T en neuronas DRG

	C	ZNS
I_{Ca} (pA/pF)	-33.3 ± 1.9	$-24.3 \pm 1.2^*$
% bloqueo		31 ± 7
τ_{act} (ms)	4.9 ± 0.5	4.4 ± 0.4
τ_{inact} (ms)	21.1 ± 1.7	19.7 ± 1.3
Inactivación		
$V_{1/2}$	-77.1 ± 1.8	-82.2 ± 0.7
k	5.9 ± 0.3	6.2 ± 0.4

Los valores se obtuvieron de la misma manera como se indica en las Tablas 1 y 2. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con (*), $p < 0.05$. El número de células investigadas fue 5 en la condición control y 5 en presencia de ZNS, excepto para los datos de inactivación, donde el número de células estudiadas fue de 3 en cada caso.

DISCUSIÓN

No obstante la existencia de múltiples factores que pueden provocar la epilepsia, e independientemente del entendimiento creciente de las bases moleculares y genéticas que originan un desorden epileptiforme, un avance sustancial y ahora generalizado en el campo de estudio, lo representa el concepto de que los canales iónicos encarnan el sustrato central de toda epilepsia. Más específicamente se habla de modificaciones en el funcionamiento de canales iónicos dependientes de voltaje que permiten el flujo selectivo de iones como el potasio, el sodio y el calcio, iones cuyo flujo a través de la membrana plasmática de neuronas determinan la excitabilidad eléctrica de las mismas (Berkovic et al., 2006). De manera particular, los canales de calcio activados por voltaje y más concretamente, los tipo T (Ca_v3 ó LVA) han sido señalados como los responsables de generar la epilepsia de tipo ausencia, muy frecuente en niños y jóvenes. A pesar de una cantidad abrumadora de evidencias clínicas y experimentales (electrofisiológicas, farmacológicas, moleculares y genéticas) que han demostrado la participación de dichos canales de calcio tipo T en la epileptogénesis y la generación de descargas epilépticas, aún existe cierta controversia en el grado de contribución de dichos canales al cuadro epiléptico global (Huguenard, 2002; Crunelli & Leresche, 2002; Rogawski, 2002). Por tales razones, los canales tipo T son considerados como blancos terapéuticos muy relevantes en el mecanismo de acción de drogas antiepilépticas clínicamente activas (Sobieszek et al., 2003; Armijo et al., 2005). En particular, existen antecedentes en la literatura que indican que el antiepiléptico ZNS bloquea la corriente de calcio LVA de neuronas corticales de rata y de células de neuroblastoma humano (Suzuki et al., 1992; Kito et al., 1994), lo cual podría redituarse en una disminución en la frecuencia de disparo y excitabilidad neuronal (Rock et al., 1989). Sin embargo, no hay estudios sobre la posible especificidad de la ZNS sobre alguno de los tres tipos de canales Ca_v3 que generan la corriente LVA, tampoco se tiene idea de cuáles son las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo T que son

afectadas por la ZNS. Es por ello que en el presente trabajo se estudió por primera vez el efecto del antiepiléptico ZNS en la corriente de cada uno de los canales de calcio tipo T clonados de humano ($\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$) y se comparó con el efecto sobre la I_{Ca} nativa de neuronas DRG.

Estudios previos han demostrado que 500 μM de ZNS bloquea la I_{Ca} tipo LVA de neuronas de rata alrededor de un 60% (mientras que 50 μM la disminuyó en un 30%; Suzuki et al., 1992), y en células de neuroblastoma humano 50 μM de ZNS inhibió el 38% del mismo tipo de corriente (Kito et al., 1996). Debido a que en el trabajo de Suzuki y cols. (1992) se utilizó un HP de -60 mV para investigar el bloqueo por ZNS, en el presente estudio exploramos el efecto de dicho fármaco a dos diferentes valores de HP para determinar si con alguno de ellos se acentuaba la intensidad del bloqueo por ZNS. Así, encontramos que el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} generada por los canales Ca_v3 por 500 μM de ZNS fue de 48% para $\alpha 1G$, 49% para $\alpha 1H$ y 31% para $\alpha 1I$ con un HP de -100 mV, pero al utilizar un HP de -70 mV (es decir, más despolarizado), la intensidad de bloqueo aumentó a 78, 81 y 51% respectivamente (Tabla 1). A partir de estos resultados se pueden hacer dos aseveraciones: una, que los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ son más sensibles que los canales $\alpha 1I$ al bloqueo por ZNS; y dos, que el bloqueo del antiepiléptico es dependiente del estado de los canales de calcio tipo T, es decir, el fármaco presenta una mayor afinidad por el canal cuando este se encuentra parcialmente inactivado (lo cual es provocado por el HP a -70 mV). A continuación se discutirán ambos hallazgos y más adelante se abordarán otros que también son aportados por el presente trabajo de tesis.

El estudio que aquí se presenta es el primero en investigar si la ZNS bloquea de manera preferencial alguno de los canales tipo T descritos a la fecha. Los reportes previos se han centrado en la corriente de calcio tipo T total nativa de neuronas y células de

neuroblastoma. De hecho no es posible descartar el hecho de que tal corriente tipo T presente alguna contaminación por canales HVA (particularmente de canales tipo N y R; véase Fig. 4 de Suzuki et al., 1992). Además, en el trabajo de Kito y cols. (1994) las corrientes tipo T son muy pequeñas (< 25 pA) y se registraron a -10 mV, donde la actividad de los canales HVA ya es considerable. Tales inconveniencias experimentales podrían también explicar las aparentes diferencias en los porcentajes de bloqueo reportados aquí con los de los grupos de Suzuki (1992) y Kito (1994; 1996). Bajo nuestras condiciones experimentales obtuvimos un mayor bloqueo (33% más, considerando únicamente los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$) con $500 \mu M$ de ZNS con un HP de -70 mV, que el primero de los dos grupos mencionados. Por otro lado, tomando en cuenta la calidad y magnitud de los registros presentados por el grupo de Kito (1994), resulta difícil considerar creíble el porcentaje de bloqueo que ellos reportan. En consecuencia, el presente estudio es el primero en trabajar con corrientes de calcio tipo T completamente aisladas de otro tipo de corrientes de calcio y demuestra que el efecto diferencial sobre los canales Ca_v3 del bloqueo por ZNS.

El bloqueo dependiente de estado de algunos fármacos antiepilépticos, e incluso fármacos antihipertensivos, sobre canales de calcio dependientes de voltaje (LVA y HVA) ya ha sido descrito previamente (Bean, 1984; Gomora et al., 2001) y es uno de los mecanismos comunes para explicar el efecto de tales fármacos sobre la actividad de los canales iónicos en cuestión. En el caso particular de las neuronas talamocorticales asociadas con la generación de crisis epilépticas de tipo ausencia, cuyo potencial de membrana de reposo (V_{rest}) se encuentra entre -70 y -60 mV (Kim et al., 2001), resulta claro que el efecto antiepiléptico de la ZNS podría ser debido a su bloqueo preferencial sobre los canales Ca_v3 parcialmente inactivados. No obstante que la ZNS se emplea en el tratamiento de crisis epilépticas generalizadas, las cuales involucran diversos tipos de neuronas, algunas de ellas con V_{rest} ligeramente más negativos que -70 mV, la importancia de los canales tipo T en el mecanismo

de acción de este antiepiléptico no se limita exclusivamente a su efecto dependiente del estado del canal. Las observaciones del presente estudio, así como el conocimiento sólido existente sobre las propiedades de activación de los canales tipo T (Huguenard, 1996; Perez-Reyes, 2003), muestran que estos canales se activan a valores de V_m cercanos al V_{rest} de muchas neuronas, lo cual interfiere directamente sobre la excitabilidad de las mismas, por lo que aún bajos porcentajes de bloqueo (o estimulación) de los canales tipo T podrían dar lugar a cambios sustanciales en la excitabilidad neuronal (Gomora et al., 2001; Nelson et al., 2005; Nelson et al., 2006; Nelson et al., 2007).

Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que el bloqueo por ZNS, además del efecto dependiente del estado del canal, se caracteriza por la ausencia de un componente dependiente de voltaje (resumido en Fig. 9), modificaciones mínimas a la cinética de la corriente y alteración de la inactivación dependiente de voltaje de los canales $\alpha 1G$ (8 mV hacía voltajes más negativos; diferencia significativa, $p < 0.05$) y en menor medida la de los canales $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ (diferencias no significativas; Tabla 2). Previamente, Kito y cols. (1996) reportaron también un efecto de la ZNS sobre la curva de inactivación en el estado estacionario de los canales tipo T de las células NB-I. Sin embargo, por las razones ya expuestas en esta sección (ver dos párrafos atrás) acerca de dicha preparación, tal resultado no puede ser considerado del todo contundente. Por otro lado, Schauf (1987) encontró que la ZNS modifica de manera significativa la inactivación de los canales de sodio del anélido marino *Myxicola infundibulum*. Por lo anterior, el efecto sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales tipo T reportada en esta tesis puede ser considerado como el primer resultado contundente en la literatura correspondiente.

Un aspecto adicional sobre el mecanismo por el cual la ZNS bloquea los canales tipo T se puede inferir a partir de las curvas $I-V$ (Fig. 8), en ellas se puede observar que la corriente

saliente no es disminuida en la misma proporción que las corrientes entrantes. Generalmente este resultado es indicativo de que el agente bloqueador actúa como un bloqueador de canal abierto, es decir que su sitio de unión se encuentra en algún lugar de la ruta de permeación del canal, de tal manera que a una determinada fuerza impulsora (voltajes más positivos que +40 mV, en nuestros registros) el ión permeante desplaza de sus sitio de unión al bloqueador, generando entonces corrientes salientes muy parecidas en magnitud a la condición control (McFarlane & Gilly, 1998; Lee et al., 1999; Gomora et al., 2001). Otra evidencia en este sentido, es que el porcentaje de bloqueo inducido por ZNS fue prácticamente el mismo a los diferentes voltajes explorados (Fig. 9), lo que indica que una vez abierto el canal, la ZNS accede a la región del poro del canal y obstruye el flujo de corriente a través de este, sin modificar su dependencia al voltaje. No obstante, no se puede descartar que la ZNS se una a un segundo sitio en algún lugar de la proteína del canal, para aclarar esto se requiere realizar experimentos adicionales.

Los resultados obtenidos con la corriente tipo T de las neuronas DRG confirman algunas observaciones reportadas previamente acerca del efecto de la ZNS sobre los canales tipo T. En primer lugar muestran que la I_{Ca} tipo T es claramente más sensible al antiepiléptico que los canales HVA (Fig. 12), lo cual es consistente con reportes previos de otros grupos de investigación (Suzuki et al., 1992; Huang et al., 2007). No obstante, otro grupo de trabajo ha reportado que la ZNS bloquea con una potencia muy similar los canales tipo T y tipo L de células de la corteza adrenal de bovino (Rossier et al., 1996). Por otro lado, la I_{Ca} tipo T de las neuronas DRG disminuyó en un 31% por la acción de 500 μ M de ZNS, mismo porcentaje de bloqueo exhibido por los canales $\alpha 1I$, pero ligeramente menor al registrado en los canales $\alpha 1H$ (HP = -100 mV; Tabla 1). Como se mencionó anteriormente, estos dos tipos de canales son los más abundantes en las neuronas DRG, por lo que el porcentaje de bloqueo observado puede obedecer al efecto de la ZNS sobre ambas poblaciones de canales. En este sentido,

una pregunta que habrá que responder en futuros experimentos es si utilizando un HP más despolarizado se intensifica el bloqueo por ZNS, tal y como se observó con los canales clonados. Por último, el efecto de la ZNS sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales tipo T clonados también se observó en la corriente tipo T nativa de las neuronas DRG (Fig. 13), aunque las diferencias entre los valores de $V_{1/2}$ no fueron significativas (Tabla 3).

En resumen, el presente estudio demuestra que de los canales recombinantes $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ son más sensibles al bloqueo por ZNS, mientras que $\alpha 1I$ fue menos afectado por el antiepiléptico. Los resultados también muestran que el mecanismo de acción de este antiepiléptico en la actividad de los canales Ca_v3 involucra un bloqueo dependiente de estado (bloquea con mayor intensidad cuando el canal se encuentra parcialmente inactivado), este efecto se acompaña también de una modificación de la inactivación en el estado estacionario del canal. La dependencia al voltaje de la activación de la corriente, así como su cinética no sufren modificaciones a consecuencia de la presencia de ZNS.

CONCLUSIONES

En este estudio se demuestra por primera vez que el fármaco antiepiléptico ZNS bloquea de manera diferencial los canales Ca_v3 clonados de humano, siendo $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ los más sensibles al bloqueo. Asimismo, los resultados permiten proponer que el mecanismo de acción de este antiepiléptico en la actividad de los canales Ca_v3 involucra un bloqueo dependiente de estado, el cual es más evidente en las corrientes de los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$. Los experimentos en neuronas DRG indican que el efecto de ZNS es más acentuado sobre la corriente tipo T en comparación con la corriente HVA y que los efectos observados en los canales recombinantes se reproducen de manera similar en las corrientes tipo T endógenas de estas neuronas. Teniendo en cuenta las propiedades biofísicas que caracterizan a los

canales tipo T y las evidencias mostradas en este trabajo, resulta plausible proponer que el efecto antiepiléptico de la ZNS se puede explicar, al menos en parte, por un bloqueo de la actividad de los canales de calcio tipo T, el cual tiene como mecanismo principal un efecto dependiente del estado del canal.

REFERENCIAS

- Aidley, D.J. 1989. *The Physiology of Excitable Cells*. 3 ed. Cambridge University Press, New York. 1-508 pp.
- Arias, J.M., Murbartian, J., Vitko, I. et al. 2005. Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 579:3907-3912.
- Arikkath, J. & Campbell, K.P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Armijo, J.A., Shushtarian, M., Valdizan, E.M. et al. 2005. Ion channels and epilepsy. *Curr Pharm Des* 11:1975-2003.
- Armstrong, C.M. & Matteson, D.R. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65-67.
- Arteaga, R. Papel del triptófano en la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa1G por subunidades beta. 2007. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Bean, B.P. 1984. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6388-6392.
- Bean, B.P. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Berkovic, S.F., Howell, R.A., Hay, D.A. et al. 1998. Epilepsies in twins: Genetics of the major epilepsy syndromes. *Annals of Neurology* 43:435-445.
- Berkovic, S.F., Mulley, J.C., Scheffer, I.E. et al. 2006. Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci* 29:391-397.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., & Roderick, H.L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Biton, V. 2004. Zonisamide is effective and well tolerated in adults and children with primary generalised epilepsy. *Epilepsia* 45:155.
- Blumenfeld, H. 2005. Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 46:21-33.
- Brooks, S.P. & Storey, K.B. 1992. Bound and determined: a computer program for making buffers of defined ion concentrations. *Anal Biochem* 201:119-126.
- Burgess, D.E., Crawford, O., Delisle, B.P. et al. 2002. Mechanism of inactivation gating of human T-type (low-voltage activated) calcium channels. *Biophys J* 82:1894-1906.
- Catterall, W.A. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242:50-61.
- Catterall, W.A. 1991. Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels. *Science* 253:1499-1500.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Chen, Y., Lu, J., Pan, H. et al. 2003a. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 54:239-243.
- Chen, Y., Lu, J., Zhang, Y. et al. 2003b. T-type calcium channel gene alpha (1G) is not associated with childhood absence epilepsy in the Chinese Han population. *Neurosci Lett* 341:29-32.
- Chuang, R.S., Jaffe, H., Cribbs, L. et al. 1998. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1:668-674.
- Cribbs, L.L., Gomora, J.C., Daud, A.N. et al. 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. et al. 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Crunelli, V. & Leresche, N. 2002. Block of Thalamic T-Type Ca (2+) Channels by Ethosuximide Is Not the Whole Story. *Epilepsy Curr* 2:53-56.
- Dua, T., De Boer, H.M., & Prilipko, L.L. 2005. Atlas: Epilepsy care in the world. *Epilepsia* 46:28.
- Engel, J., Jr. 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 42:796-803.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M. et al. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Fuentealba, P., Timofeev, I., & Steriade, M. 2004. Prolonged hyperpolarizing potentials precede spindle oscillations in the thalamic reticular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:9816-9821.
- Gomora, J.C., Daud, A.N., Weiergraber, M. et al. 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. et al. 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca (v) 3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83:229-241.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E. et al. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Higueldo García, J.F. Efecto de las subunidades beta de los canales HVA sobre el canal Cav3.3. 2007. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM. México.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Huang, C.W., Huang, C.C., & Wu, S.N. 2007. Activation by zonisamide, a newer antiepileptic drug, of large-conductance calcium-activated potassium channel in differentiated hippocampal neuron-derived H19-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321:98-106.
- Huguenard, J.R. 1996. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58:329-348.
- Huguenard, J.R. 2002. Block of T-Type Ca (2+) Channels Is an Important Action of Succinimide Antiabsence Drugs. *Epilepsy Curr* 2:49-52.
- Huguenard, J.R. & Prince, D.A. 1992. A novel T-type current underlies prolonged Ca (2+) -dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 12:3804-3817.
- ILAP. 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30:389-399.
- Jallon, P. & Latour, P. 2005. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* 46:10-14.
- Kawata, Y., Okada, M., Murakami, T. et al. 1999. Effects of zonisamide on K⁺ and Ca²⁺ evoked release of monoamine as well as K⁺ evoked intracellular Ca²⁺ mobilization in rat hippocampus. *Epilepsy Res* 35:173-182.
- Khosravani, H., Bladen, C., Parker, D.B. et al. 2005. Effects of Ca (v) 3.2 channel mutations linked to idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol* 57:745-749.
- Khosravani, H. & Zamponi, G.W. 2006. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 86:941-966.
- Kim, D., Song, I., Keum, S. et al. 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha (1G) T-type Ca (2+) channels. *Neuron* 31:35-45.

- Kito, M., Maehara, M., & Watanabe, K. 1994. Antiepileptic drugs--calcium current interaction in cultured human neuroblastoma cells. *Seizure* 3:141-149.
- Kito, M., Maehara, M., & Watanabe, K. 1996. Mechanisms of T-type calcium channel blockade by zonisamide. *Seizure* 5:115-119.
- Lacinova, L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *General Physiology and Biophysics* 24:3-78.
- Lacinova, L., Klugbauer, N., & Hofmann, F. 1999. Absence of modulation of the expressed calcium channel alpha1G subunit by alpha2delta subunits. *J Physiol* 516 (Pt 3) :639-645.
- Lagae, L. 2008. What's new in: "Genetics in childhood epilepsy". *Eur J Pediatr*.
- Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. et al. 1999. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* 77:3034-3042.
- Macdonald, R.L. & Kelly, K.M. 1995. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia* 36 Suppl 2:S2-12.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y. et al. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience* 5:793-807.
- Martin, R.L., Lee, J.H., Cribbs, L.L. et al. 2000. Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 295:302-308.
- 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.
- McCormick, D.A. & Huguenard, J.R. 1992. A Model of the Electrophysiological Properties of Thalamocortical Relay Neurons. *Journal of Neurophysiology* 68:1384-1400.
- McFarlane, M.B. & Gilly, W.F. 1998. State-dependent nickel block of a high-voltage-activated neuronal calcium channel. *J Neurophysiol* 80:1678-1685.
- McGivern, J.G. 2006. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today* 11:245-253.
- Mimaki, T. 1998. Clinical pharmacology and therapeutic drug monitoring of zonisamide. *Ther Drug Monit* 20:593-597.
- Mintz, I.M., Adams, M.E., & Bean, B.P. 1992. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85-95.
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L. et al. 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:319-334.
- Mizielinska, S.M. 2007. Ion channels in epilepsy. *Biochem Soc Trans* 35:1077-1079.
- Murakami, M., Suzuki, T., Nakagawasai, O. et al. 2001. Distribution of various calcium channel alpha (1) subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of omega-conotoxin SVIB in mice. *Brain Res* 903:231-236.
- Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.H. et al. 2002. Alternative splicing of the rat Ca (v) 3.3 T-type calcium channel gene produces variants with distinct functional properties (1) . *FEBS Lett* 528:272-278.
- Nelson, M.T., Joksovic, P.M., Perez-Reyes, E. et al. 2005. The endogenous redox agent L-cysteine induces T-type Ca²⁺ channel-dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptors. *J Neurosci* 25:8766-8775.
- Nelson, M.T., Joksovic, P.M., Su, P. et al. 2007. Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *J Neurosci* 27:12577-12583.
- Nelson, M.T., Todorovic, S.M., & Perez-Reyes, E. 2006. The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr Pharm Des* 12:2189-2197.

- 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. et al. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Perez-Reyes, E. & Schneider, T. 1995. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* 48:1111-1124.
- Perrig, S. & Jallon, P. 2008. Is the first seizure truly epileptic? *Epilepsia* 49 Suppl 1:2-7.
- Prommer, E. 2006. Ziconotide: a new option for refractory pain. *Drugs Today (Barc)* 42:369-378.
- Randall, A. & Benham, C.D. 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-272.
- Rock, D.M., Macdonald, R.L., & Taylor, C.P. 1989. Blockade of sustained repetitive action potentials in cultured spinal cord neurons by zonisamide (AD 810, CI 912), a novel anticonvulsant. *Epilepsy Res* 3:138-143.
- Rogawski, M.A. 2002. New Evidence Supporting a Role for T-Type Ca (2+) Channels in Absence Epilepsy and in the Action of Ethosuximide. *Epilepsy Curr* 2:57.
- Rogawski, M.A. & Porter, R.J. 1990. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev* 42:223-286.
- Rossier, M.F., Burnay, M.M., Vallotton, M.B. et al. 1996. Distinct functions of T- and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 137:4817-4826.
- Rusin, K.I. & Moises, H.C. 1995. mu-Opioid receptor activation reduces multiple components of high-threshold calcium current in rat sensory neurons. *J Neurosci* 15:4315-4327.
- Schauf, C.L. 1987. Zonisamide enhances slow sodium inactivation in Myxicola. *Brain Res* 413:185-188.
- Scheffer, I.E. & Berkovic, S.F. 2003. The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 24:428-433.
- Scroggs, R.S. & Fox, A.P. 1992. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol* 445:639-658.
- Seino, M., Miyazaki, H., & Ito, T. 1991. Zonisamide. *Epilepsy Res Suppl* 3:169-174.
- Shcheglovitov, A., Kostyuk, P., & Shuba, Y. 2007. Selectivity signatures of three isoforms of recombinant T-type Ca (2+) channels. *Biochim Biophys Acta*.
- Sidach, S.S. & Mintz, I.M. 2002. Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold ca channels. *J Neurosci* 22:2023-2034.
- Sobieszek, G., Borowicz, K.K., Kimber-Trojnar, Z. et al. 2003. Zonisamide: a new antiepileptic drug. *Pol J Pharmacol* 55:683-689.
- Steinlein, O.K. 2004. Nicotinic receptor mutations in human epilepsy. *Prog Brain Res* 145:275-285.
- Steriade, M. 2005. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci* 28:317-324.
- Strong, M., Chandy, K.G., & Gutman, G.A. 1993. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol* 10:221-242.
- Suzuki, S., Kawakami, K., Nishimura, S. et al. 1992. Zonisamide blocks T-type calcium channel in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res* 12:21-27.
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H. et al. 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895-1911.
- Todorovic, S.M., Jevtovic-Todorovic, V., Mennerick, S. et al. 2001. 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., Meyenburg, A., & Jevtovic-Todorovic, V. 2002. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res* 951:336-340.
- Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. 2005. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 48:719-725.
- Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52.
- Ueda, Y., Doi, T., Tokumaru, J. et al. 2003. Effect of zonisamide on molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins during epileptogenesis in rats with hippocampal seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 116:1-6.
- Vitko, I., Bidaud, I., Arias, J.M. et al. 2007. The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca (v) 3.2 T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* 27:322-330.
- Vitko, I., Chen, Y., Arias, J.M. et al. 2005. Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel. *J Neurosci* 25:4844-4855.
- Wallace, R.H., Marini, C., Petrou, S. et al. 2001. Mutant GABA (A) receptor gamma 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature Genetics* 28:49-52.
- Wilde, A.A. 2008. Channelopathies in children and adults. *Pacing Clin Electrophysiol* 31 Suppl 1:S41-S45.
- Zhang, Y., Vilaythong, A.P., Yoshor, D. et al. 2004. Elevated thalamic low-voltage-activated currents precede the onset of absence epilepsy in the SNAP25-deficient mouse mutant coloboma. *J Neurosci* 24:5239-5248.
- Zhu, G., Okada, M., Murakami, T. et al. 2002. Interaction between carbamazepine, zonisamide and voltage-sensitive Ca²⁺ channel on acetylcholine release in rat frontal cortex. *Epilepsy Res* 49:49-60.