



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS CANALES
DE CALCIO TIPO T CLONADOS DE HUMANO:
BLOQUEO POR IONES LANTÁNIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICA

P R E S E N T A :

SARAHÍ ROSAS GONZÁLEZ

T U T O R :

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Rosas
González
Sarahí
52 11 03 75
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Física
406043649
2. Datos del tutor
Dr.
Juan Carlos
Gómora
Martínez
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Rosalía
Ridaura
Sanz
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Gertrudis Hortensia
González
Gómez
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Arturo
Hernández
Cruz
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Fernando
Ángeles
Uribe
7. Datos del trabajo escrito
Caracterización biofísica de los canales de calcio tipo T clonados de humano: Bloqueo por iones lantánidos
66 p.
2012

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, por formarme académicamente y personalmente, por ser una institución de libres pensadores.

A la Facultad de Ciencias, porque en tus aulas se contempla y admira el conocimiento inspirador que nunca sacia la sed y hambre de los que nada sabemos.

Al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, por su confianza, apoyo y asesoría invaluable para la realización del presente trabajo de tesis pero sobre todo por adentrarme con paciencia y dedicación en el mundo de la investigación, experiencia que nunca olvidaré.

A Osbaldo López Charcas, por su apoyo incondicional, su paciencia al transmitir su conocimiento, por sus consejos y experiencia.

A Daniel Díaz y a Dulce María del Carmen Delgadillo por iniciar éste proyecto.

A Clara Díaz, por su apoyo en el laboratorio.

A mis sinodales por su amable atención y gentil apoyo, por el interés que mostraron en el presente trabajo y el tiempo que le dedicaron a su revisión.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (J50250Q), y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICDS08-28) mismo que me proporcionó una beca de licenciatura.

DEDICATORIAS

A mis padres Rosa Isela y Sergio Arturo, fuentes de amor inagotable, les agradezco enseñarme a vivir sin miedo, por su sabiduría, sus consejos, por nunca rendirse, por mostrarme la vida, por permitirme tener gatos en casa, por su amor incondicional. Toda mi fe, seguridad y confianza se las debo a ustedes.

A mi hermano Saúl por enseñarme a compartir, por su nobleza, por la compañía durante estos años, por su amor, por su perdón.

A mis abuelos Ernestina, Martín, Micha, Margarito, por sus regañones, por sus consejos, por su cariño y por sus juegos y bromas.

A mis tíos que son muchos y a todos los quiero igual, gracias por los buenos ratos, por las bromas y la convivencia, por sus consejos y por su apoyo a lo largo de mi vida.

A mis primos por ser mis cómplices, por los años de juego y pleito, por estar siempre conmigo y con mi hermano, en especial a mi primo Güero por sus bromas ojalá recuperásemos esa complicidad que nos podía aliar en contra de la abuelita dinamita y a mis primitas Chelo y Chuy mis niñas favoritas, también a mis sobrinos que aún no conozco y al pequeño Iskander.

A mis amigos de la Secundaria Técnica No. 1, Cindy por tu bondad y paciencia, Nachiomen por escucharme, por compartir tu poesía, Azeneth, Clarita, Payo, Micol, Huevito, Abraham, Carlos, Gaby, Vianey, Nataly, Eve, Efrén, Max, Esvit y al teacher Eduardo, por todas las experiencias vividas juntos, por nuestro viaje a Filadelfia, por acompañarme durante todos estos años.

Al profesor Millacatl por enseñarme a pintar y a descubrir nuevos colores en el cielo diferentes al azul, por nuestras pláticas, a Florita por nuestras escapadas a los bailes, a papá Mark por su gran corazón, por brindarme una familia y su cariño.

A la teacher Miriam y al teacher Héctor por ser excelentes personas, por enseñarme otro idioma con pasión, por las becas, por ofrecerme mi primer trabajo como profesora.

A mis amigos del CBTis 03 que son los mismos que en la secundaria más Josh, Amaranta, Pao, Heriberto, Arlete, Ely, Kerbing, Claus y Nallely, por sus ocurrencias, por las pintas, por los campamentos, por las posadas, por las risas, por sus locuras, por los sueños con los ojos abiertos, por las tardes de ardillas, por nuestro club ultra secreto, arriba las Madames, Inc.!!!

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: a la parte no viril del equipo de cálculo: a Dulce por su calidez humana, por su confianza, Mariana por su excelente humor, Gissi e Ivi por sus locuras y a la parte viril: Mity por su infinita paciencia, Lugo por su cinismo sin igual, Compaye, Juan, Lú, Daniel y Pavel, por las interminables tareas de cálculo y los exámenes de tres horas, porque nadie me cree que a nuestros 20 años jugáramos a las escondidillas en casa de Pavel, a Talía por ser una excelente persona, amiga, bondadosa como nadie, a Erick por sus bromas, por su nobleza, a Tomás tu yo nos parecemos mucho, a Abelardo por sus bromas, por su gran corazón, admiro tu lucha, sé que lo lograrás, gracias por confiar en mí, a Mau (joven anciano), a Mau M. siempre tienes un buen consejo, Bere, Luis, Omar, Sandra, Iorch, Alex, Giovis, Joss, Rafa, Miguel, Nadia, Efras, Javier, Karlillé. Sin ustedes mi camino hubiese sido más largo, gracias a ustedes por hacerlo agradable, divertido, emocionante, seguimos en el camino, juntos a pesar de la distancia.

A los habitantes de la HHH Casa Nacional del Estudiante, por cambiar profundamente mi forma de ver la sociedad, por transformar mi manera de pensar, a mis hermanos Came, Cayo, Saúl, Jácome, a los amigos que conocí en el comedor Nicho, Yuca, Mau, Roberto, Vivi, Liz, Yad, Bati, Vane, Vanaquen, Kari, Aidee, Lau, Lau Gil, Mané, Cris, Génico, Jorge, Oliver, Blanca y Nick, gracias por las experiencias compartidas en la central de abastos, en nuestros viajes a Oaxaca y a Hidalgo, por las discusiones, por los debrayes, por las fiestas, por las asambleas, por las marchas, por las risas, por las lágrimas, por los partidos de futbol y por todos los desayunos y cenas en familia, por nunca olvidar mi caldo de pollo con plumas. Y a las siguientes generaciones que también conocí Marisol, Beny, Gerson, Oti, Cristian, Oni, Emilio, Horacio por nuestro viaje de aventura a Puerto Vallarta, ¿cómo olvidarlo?, quiero agradecer especialmente a Rosaura excelente persona, por brindarme su confianza aunque no la merecía, a Ángela a través de ti aprendí un poco más de mí. Que la casa tenga muchos años más de aniversarios y de lucha. ¡¡¡Cámara, pivote y rin, en Tepito y en la lucha la casa estudiantil!!!

A la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias y en especial a mi jefe de área Nachito por brindarme la oportunidad de pertenecer a tan unido grupo, por confiar en mí y alentarme a estudiar la maestría en Física Médica, por sus consejos profesionales y por todo su apoyo, agradezco la calidez de mis amigos y compañeros de trabajo: Estelita, Diana, Pao, Carlitos, Hugo, Mau, Gali, Oscar, Leti, Lulú, Rubén, Gabriel, Ara, Pati, Rafa, Mut, Rodrigo, Alegría, Luis, Barba, Ángel, Rulas, Chío y muy en especial a mis amiguitas Yesi y Angélica por hacer de las comidas risa y diversión, son geniales y me alegra haberlas conocido, nuestras charlas es lo que más extrañaré de la Comisión pero sé que nuestra amistad será para toda la vida.

A mis compañeros y familia del laboratorio BL-203: A mi tutor Juan Carlos por la oportunidad de pertenecer a un gran equipo multidisciplinario, por su confianza, apoyo y paciencia, a Roger, Manolo, Kiyoshi, Lau, Clarita, Luci, Zazil, Yendi, por sus consejos, por nuestras charlas en la serpiente y por su apoyo y compañía en estos años, en especial quiero agradecer a Ever padrino de mis gatos y a Osbaldo padre de nuestros gatos, por su amistad, consejos de vida, y porque con ustedes aprendí una técnica de electrofisiología, un poco de cultivo celular pero sobre todo que la paciencia es la madre de todas las ciencias, sin ustedes nunca hubiese terminado.

A Joy por tu amistad, por tus ocurrencias, porque siempre podemos reírnos de las simplezas de la vida, por ser el mejor amigo de mi gansito y por estar siempre para nosotros y para tus ahijados.

A Leny después de soportarme durante más de cinco años sigues siendo mi pareja más estable jaja, te aprendí mucho hermanaja, la vida nos volverá a reunir me lo dice la experiencia.

A Osbaldo, mi gansito, porque eres mi amor, mi cómplice y todo..., porque le brindas mucha felicidad a mi vida, porque juntos construimos un futuro y sé que nuestros sueños se harán realidad.

Hay personas que se irán y otras que llegarán pero la amistad, la amistad es para siempre, se conserva por el principio de conservación de la alegría que se rumora es más general que el de la conservación de la energía.

CONTENIDO

I. RESUMEN	IX
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1. CANALES IÓNICOS.....	3
2.2. CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE	4
A. CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	5
B. COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES MOLECULARES DE LOS CANALES CA_V	6
C. MODELO CINÉTICO DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS CANALES CA_V3	9
D. ANTAGONISTAS DE LOS CANALES CA_V3	11
E. BLOQUEADORES INORGÁNICOS.....	12
2.3. GENERALIDADES ACERCA DEL MODELO ELÉCTRICO DE LAS MEMBRANAS CELULARES	14
A. POTENCIAL DE MEMBRANA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
B. POTENCIAL DE EQUILIBRIO	15
C. LA FUERZA IMPULSORA	15
D. LEY DE OHM	16
F. RESISTENCIA DE MEMBRANA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
G. EL CIRCUITO $R_M C_M$	18
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. CULTIVO CELULAR	21
4.2. ELECTROFISIOLOGÍA	22
A. SOLUCIONES DE REGISTRO.....	22
B. ELECTRODOS DE REGISTRO	22
C. EXPERIMENTOS DE FIJACIÓN DE VOLTAJE	23
D. PROTOCOLOS DE VOLTAJE	25
E. ANÁLISIS DE DATOS	28
V. RESULTADOS	31
5.1. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	31
5.2. EFECTO DE LOS IONES LA^{3+}, CE^{3+} E Y^{3+} EN LA RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE.....	34
5.3. EFECTO DE LOS LANTÁNIDOS TRIVALENTES EN LA SELECTIVIDAD DE LOS CANALES CA_V3....	38
5.4. RELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE BLOQUEO DE LOS CANALES CA_V3 Y EL VOLTAJE	38
5.5. EFECTO DE POTENCIALES EXTREMOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN EL BLOQUEO POR LANTÁNIDOS DE LOS CANALES CA_V3	40
5.6. LA HIPERPOLARIZACIÓN A VOLTAJES EXTREMOS PROMUEVE EL DESBLOQUEO DE LOS CANALES CA_V3 EN PRESENCIA DE LA^{3+} Y CE^{3+}	40
5.7. EFECTO DE POTENCIALES EXTREMOS POSITIVOS EN EL BLOQUEO DE LOS CANALES CA_V3 POR LOS IONES LA^{3+}, CE^{3+} E Y^{3+}	42
5.8. EFECTO DE LOS IONES LANTÁNIDOS SOBRE LA CINÉTICA DE ACTIVACIÓN, INACTIVACIÓN Y DESACTIVACIÓN DE LOS CANALES CA_V3.....	47
5.9. EL BLOQUEO POR CE^{3+} INCLUYE UNA INTERACCIÓN CON EL ESTADO CERRADO DE LOS CANALES CA_V3.....	52

<u>VI. DISCUSIÓN.....</u>	<u>54</u>
6.1. LOS IONES TRIVALENTES La^{3+}, Ce^{3+} E Y^{3+} BLOQUEAN POTENTEMENTE LOS CANALES Ca_v3 .	54
6.2. EFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS CANALES Ca_v3 POR La^{3+}, Ce^{3+} E Y^{3+} EN LA RELACIÓN I-V..	55
6.3. DESBLOQUEO INDUCIDO A POTENCIALES EXTREMOS NEGATIVOS Y POSITIVOS	56
6.4. EL ION La^{3+} INTRODUCE UN “GANCHO” EN LAS COLAS DE CORRIENTE DE LOS CANALES $Ca_v3.1$	59
6.5. INTERACCIÓN DEL ION Ce^{3+} CON EL ESTADO CERRADO DE LOS CANALES $Ca_v3.3$.....	60
<u>VII. CONCLUSIONES</u>	<u>61</u>
<u>VIII. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>62</u>

ABREVIATURAS

CIAV: Canales iónicos activados por voltaje

CCAV: Canales de calcio activados por voltaje

c_m : Capacitancia de membrana

C_m : Capacitancia de membrana específica

DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético

ESM: Error estándar de la media

HEK-293: Línea celular inmortalizada de células embrionarias de riñón humano

HP: Potencial de mantenimiento

HVA: Canales de calcio de alto umbral de activación

IC₅₀: Concentración de bloqueador necesaria para inhibir el 50% de la corriente inicial de calcio

I_{Ca}: Corriente de calcio

I_{cola}: Corriente de cola

I_{max}: Corriente máxima

I-V: Relación corriente-voltaje

LVA: Canales de calcio de bajo umbral de activación

r_s : Resistencia de membrana

R_s : Resistencia de membrana específica

τ : Constante de tiempo

TEA: Tetraetilamonio

V_{1/2}: Voltaje al cual se activan o inactivan el 50% del total de canales o voltaje al cual se registra el 50% de la corriente máxima

V_m: Potencial de membrana

V_{rev}: Potencial de membrana al cual se invierte el sentido de la corriente

I. RESUMEN

El influjo de iones de calcio a través de los canales de calcio activados por voltaje (canales Ca_v) es crucial en funciones celulares tales como la liberación de hormonas y neurotransmisores, la excitabilidad neuronal, la contracción muscular, la expresión génica, y otras más. Las células expresan diferentes tipos de canales Ca_v , cada uno asociado a funciones fisiológicas específicas. Existen varias enfermedades relacionadas al funcionamiento incorrecto de los canales iónicos, mismas que reciben el nombre de canalopatías, las cuales son generalmente debidas a mutaciones en los genes que codifican dichos canales. Por tal motivo, se han diseñado fármacos que inhiban de manera específica a los canales; en particular los fármacos conocidos como “bloqueadores de canales de calcio” se utilizan en la clínica como agentes antihipertensivos. Hasta hace poco tiempo, la mayor cantidad de información en la literatura acerca de la regulación y estructura molecular de los canales Ca_v provenía de los canales Ca_v de alto umbral de activación o HVA, mientras que de los canales Ca_v de bajo umbral de activación o LVA (es decir, aquellos que se activan a voltajes cercanos al potencial de reposo de neuronas y células excitables), se carece de información crucial sobre su funcionamiento y estructura. Una de las razones para este retraso fue probablemente el hecho de que los canales LVA, fueron los últimos canales Ca_v en ser clonados, lo cual sucedió hasta 1998. A partir de entonces, el estudio de los canales LVA se ha visto favorecido de manera considerable, sin embargo aún no se cuenta con un bloqueador selectivo para estos canales.

El uso de fármacos, toxinas, y compuestos orgánicos e inorgánicos para bloquear las corrientes generadas por los canales Ca_v3 (una de las tres subfamilias de los canales Ca_v) ha sido una herramienta poderosa en el estudio del funcionamiento de estas proteínas, así como para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de algunas enfermedades. En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto de los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , en la actividad de los canales Ca_v3 clonados de humano. Para ello se realizaron experimentos de fijación de voltaje con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa utilizando células HEK-293 que expresan de manera estable a los canales $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} son potentes bloqueadores de los canales Ca_v3 , con valores de IC_{50} del orden nanomolar, sin embargo, no se observó una especificidad marcada de algún ion lantánido por

alguno de los tres tipos de canales Ca_v3 . Por otra parte, el bloqueo de la corriente a potenciales fisiológicos fue prácticamente independiente del voltaje. Los resultados muestran además que los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ exhiben una dependencia al voltaje similar en su desbloqueo a potenciales extremos positivos y negativos en presencia de La^{3+} y Ce^{3+} , por el contrario, en presencia de Y^{3+} no se observó desbloqueo en ninguno de los canales Ca_v3 . Además, el bloqueo de los canales $Ca_v3.2$ a potenciales extremos positivos y negativos no fue modificado significativamente. Por lo tanto, el desbloqueo de los canales Ca_v3 a potenciales extremos es dependiente de voltaje, y el sitio de unión del Y^{3+} en los canales Ca_v3 podría ser diferente al de los iones La^{3+} y Ce^{3+} . Los iones estudiados no afectan el cierre de los canales Ca_v3 , sin embargo, en presencia de La^{3+} , una fracción de canales $Ca_v3.1$ son desbloqueados durante la repolarización de la membrana conduciendo corriente brevemente antes de cerrarse. Por último se demostró que el efecto inducido por el ion Ce^{3+} presenta un componente de bloqueo del canal $Ca_v3.3$ en su conformación cerrada. La información aportada en el presente trabajo de tesis es una contribución importante al entendimiento del mecanismo de bloqueo de los canales Ca_v3 por antagonistas inorgánicos, así como una herramienta farmacológica para discriminar entre estos canales.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Canales iónicos

Todas las células están provistas de una membrana plasmática compuesta por un ensamble de lípidos y proteínas unidos principalmente por enlaces no covalentes, que forman una barrera relativamente impermeable a solutos entre el medio intracelular y el medio externo [1]. La movilización de agua y solutos en respuesta a los cambios en el medio exterior ocurre gracias a la presencia de proteínas especializadas para el intercambio de iones y moléculas entre los espacios extra e intracelulares. Se han descrito dos mecanismos básicos para el transporte a través de las membranas, el primero involucra transportadores, tales como la bomba de Ca^{2+} , el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la bomba Na^+/K^+ , mediante los cuales, los iones son transportados en contra de su gradiente de concentración a costa de un gasto energético. El segundo mecanismo es a través de canales iónicos, complejos proteicos de la membrana celular que permiten el flujo rápido de iones a través de un poro que conecta el espacio extracelular con el intracelular, a favor de su gradiente de concentración, sin ningún tipo de gasto energético. La actividad (transporte de iones) de un canal iónico es debida a la respuesta específica ante algún estímulo: la unión de un ligando específico directamente en el canal, cambios en el voltaje de la membrana, deformación mecánica o estímulos sensoriales [2].

Estas proteínas son indispensables para la generación y propagación de señales eléctricas conocidas como potenciales de acción, las cuales son cruciales en la mayoría de los organismos. Mediante tales señales eléctricas los canales iónicos funcionan como interruptores que encienden o apagan distintos procesos celulares tales como la contracción muscular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, la sensibilidad a estímulos ambientales, la expresión de genes y la división celular [3]. Los canales iónicos se encuentran presentes en prácticamente todos los tipos celulares, desde organismos unicelulares hasta las plantas y animales, en los que están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares esenciales.

Los primeros indicios sobre la existencia de los canales iónicos fue establecida por los trabajos pioneros de Hodgkin & Huxley a principios de los años 50 del siglo pasado [4-7]. No obstante, fue poco más de 25 años después que se conoció la naturaleza proteica de los canales, primero del receptor de acetilcolina [8-9] y subsecuentemente de los canales de sodio

[10] y de calcio [11] dependientes de voltaje. Paralelo a estos descubrimientos, el desarrollo y mejoramiento de la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp* [12], ha permitido la identificación de varios tipos de canales iónicos que difieren en: (i) el ión que mueven a través del poro del canal (p. ej., Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^-), (ii) el estímulo que desencadena la apertura del poro del canal (p. ej., voltaje, ligando o temperatura, etc.), (iii) la composición molecular de los mismos (p. ej. tetrámeros, pentámeros, etc.) [2].

Cada uno de los tipos de canales mencionados cumple funciones específicas en las células que los expresan, desde la generación y propagación de señales eléctricas, hasta el intercambio de metabolitos entre células adyacentes, etc., sin embargo, para los fines del presente trabajo de tesis, el tema central serán los canales iónicos activados por voltaje (CIAV). La superfamilia de CIAV, como también se le conoce, comprende los canales que en respuesta a cambios en el voltaje transmembranal transportan de manera selectiva y a una alta velocidad iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- ; los canales de Ca^{2+} por ejemplo, transportan hasta 10^6 iones s^{-1} [13]. Los CIAV en conjunto son los principales responsables de la generación y regeneración del potencial de acción, de la contracción muscular, de la secreción de hormonas y neurotransmisores, entre otras funciones [3].

2.2. Canales de calcio dependientes de voltaje

Dentro de la superfamilia de los CIAV se encuentran los canales que transportan selectivamente iones Ca^{2+} , llamados canales Ca_V [14]. El ión Ca^{2+} es una señal intracelular clave para muchas funciones celulares como la secreción de hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular, el metabolismo, la expresión de genes, la proliferación, la fertilización, etc. [15-16]. En la mayoría de dichos eventos el calcio requerido entra a la célula a través de los canales Ca_V . Por lo tanto, los canales Ca_V se encuentran presentes en células excitables (aquellas que son capaces de generar y responder a señales eléctricas), tales como neuronas y células cardíacas, musculares y secretoras [17] No obstante, células consideradas como no excitables, como los espermatozoides, también expresan algunos tipos de canales iónicos dependientes de voltaje que son cruciales para funciones indispensables de la célula [18].

Desde hace varias décadas, se han usado los llamados “bloqueadores de canales de calcio” para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y la angina de pecho [19], y más recientemente para el tratamiento del dolor neuropático y la epilepsia de

tipo ausencia [20-24]. Por estas razones, la importancia de los canales Ca_v se acentúa y su utilidad como blancos moleculares para el tratamiento de diversas enfermedades es indiscutible. No obstante, todavía se desconocen muchos aspectos acerca de la estructura y función de estas proteínas, así como aspectos farmacológicos y biofísicos, por ello, resulta importante realizar estudios científicos a nivel básico y clínico que permitan entender mejor el funcionamiento de estos canales y su relevancia en procesos fisiológicos y patofisiológicos.

A. Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje

La nomenclatura actual para los canales de calcio activados por voltaje [14], asigna el nombre de cada canal mediante la abreviación del ión que transportan (Ca), seguido de la inicial, como subíndice, del estímulo que los activa (v de voltaje), después el número de la familia (1, 2 ó 3) y por último, separado por un punto, el número del miembro de la familia. Así el canal $Ca_v1.2$ corresponde al miembro 2 de la familia 1 de los canales de calcio activados por voltaje (**Fig. 1**). Los canales Ca_v se diferencian por sus propiedades biofísicas y farmacológicas, las cuales dependen de la secuencia de la subunidad formadora de poro denominada subunidad $\alpha 1$, mismas que son codificadas por 10 genes distintos (**Fig. 1**).

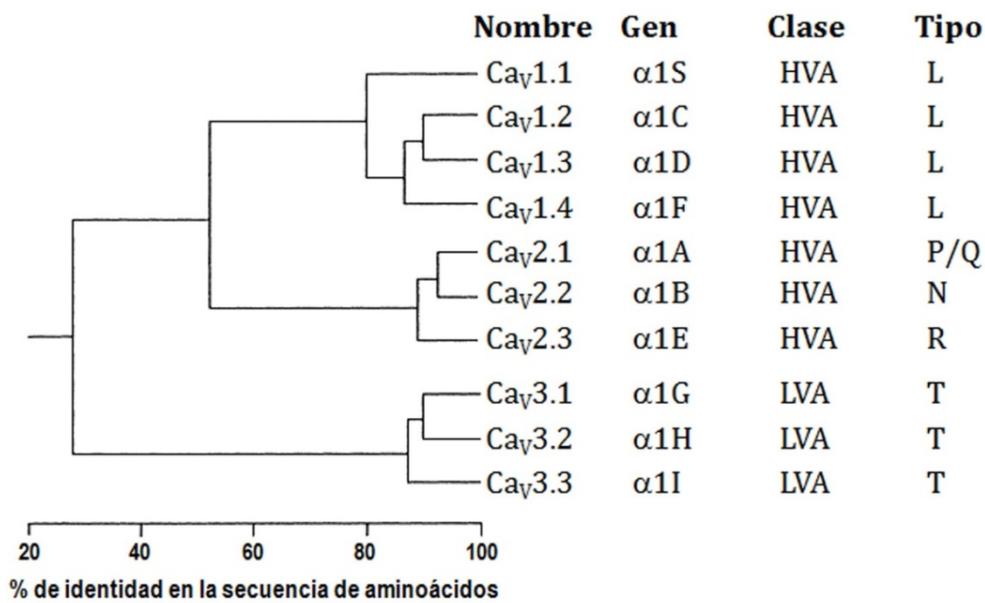


Figura 1. Árbol filogenético de las subunidades $\alpha 1$ de los canales Ca_v . Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio activados por voltaje. Se indica la correspondencia entre el nombre del canal Ca_v , la subunidad $\alpha 1$ que lo codifica, umbral de activación (bajo: LVA, o alto: HVA) y el tipo de corriente que generan. La secuencia completa de cada subunidad $\alpha 1$ fue reducida exclusivamente a las regiones que atraviesan la membrana y las asas del poro, que involucró unos ~ 350 aminoácidos. Posteriormente, dichos archivos fueron alineados utilizando el programa DNAsis tomando como base el algoritmo de CLUSTAL. El alineamiento múltiple de secuencias define tres subfamilias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 , con alrededor de 80% de identidad entre ellas [Modificado de 25].

Los canales Ca_v se subdividen en dos grupos principales, los que son activados por potenciales cercanos al potencial de membrana (V_m) o canales de bajo umbral de activación (LVA), y los que requieren fuertes despolarizaciones o canales de alto umbral de activación (HVA). Estos últimos están constituidos a su vez por dos subfamilias, denominadas Ca_v1 que comprende cuatro miembros ($Ca_v1.1$ a $Ca_v1.4$) y Ca_v2 , formada por tres miembros ($Ca_v2.1$ a $Ca_v2.3$) (**Fig. 1**). Además de requerir fuertes despolarizaciones del V_m (entre -30 y -20 mV) para su activación, los canales HVA tienen la característica de presentar una inactivación (proceso en el cual el canal no conduce corriente a pesar de estar abierto) muy lenta, una desactivación o cierre del canal muy rápida, y una conductancia unitaria de aproximadamente 24 pS. Por su parte, los canales LVA se agrupan en una sola subfamilia, los Ca_v3 , constituida por tres miembros ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$), estos canales se activan con pequeñas despolarizaciones a valores de V_m cercanos al potencial de reposo de las neuronas, es decir, alrededor de los -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 [17, 26-29].

Los canales de la subfamilia Ca_v1 generan corrientes tipo L o de larga duración y son sensibles a fármacos conocidos como dihidropiridinas (**Tabla 1**). Los canales de la subfamilia Ca_v2 generan corrientes tipo N, P/Q, y R, no son sensibles a las dihidropiridinas y son bloqueados selectivamente por toxinas de invertebrados. Por su parte, los tres miembros de la subfamilia Ca_v3 generan corrientes transitorias, y son bloqueados con moderada especificidad por el mibefradil. Los canales Ca_v3 también son conocidos comúnmente como canales tipo T, haciendo alusión a su corriente transitoria y su pequeña (“*tiny*”) conductancia unitaria [26-27].

B. Composición y propiedades moleculares de los canales Ca_v

Los canales de las subfamilias Ca_v1 y Ca_v2 son complejos moleculares compuestos por cuatro unidades proteicas principales [revisado por 30] (**Fig. 2**): (i) la subunidad principal $\alpha 1$, es una proteína integral de membrana que por sí sola forma el poro de conducción iónica, además contiene las regiones del canal que detectan el voltaje (sensor de voltaje) y la sensibilidad a fármacos (**Fig. 2A**); (ii) una subunidad citoplasmática denominada β que modula varias propiedades biofísicas y de tráfico del canal hacia la membrana celular; a la fecha se han descrito cuatro isoformas ($\beta 1$ - $\beta 4$), (iii) una subunidad que consiste de una región

transmembranal y otra extracelular unidas entre sí por enlaces disulfuro, nombrada $\alpha_2\delta$ y de la cual se conocen cuatro variantes ($\alpha_2\delta$ -1 a $\alpha_2\delta$ -4). Esta subunidad también regula la actividad de la subunidad α_1 y recientemente se le ha adjudicado el papel de receptor para algunos fármacos antiepilépticos y analgésicos [31-32]; y (iv) una subunidad de cuatro segmentos transmembranales denominada γ , la cual modifica las propiedades biofísicas del canal, sin afectar el número de canales en la membrana y de la cual se conocen 8 diferentes isoformas [30, 33-34] (**Fig. 2B**).

Tabla 1. Ubicación tisular, funciones fisiológicas y farmacología de los canales Cav.

Nombre del canal	Tipo de corriente	Localización	Antagonistas	Funciones celulares
Cav1.1	L	Músculo esquelético; túbulos transversos	DHPs, PAAs, BZTs	Acoplamiento excitación-contracción
Cav1.2	L	Miocitos cardíacos; células endocrinas; somas y dendritas	DHPs, PAAs, BZTs	Acoplamiento excitación-contracción; liberación de hormonas; regulación de transcripción; integración sináptica
Cav1.3	L	Células endocrinas; somas y dendritas; miocitos auriculares cardíacos y células marcapaso	DHPs, PAAs, BZTs	Liberación de hormonas y neurotransmisores; regulación de transcripción; regulación sináptica; marcapaso cardíaco.
Cav1.4	L	Células bastón y bipolar de la retina; médula espinal; glándula adrenal; células cebadas	DHPs, PAAs, BZTs	Liberación de neurotransmisores a partir de fotorreceptores
Cav2.1	P/Q	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	ω -Agatoxina IVA	Liberación de neurotransmisores; transitorios de Ca^{2+} dendríticos; liberación de hormonas
Cav2.2	N	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	ω -Conotoxina-GVIA	Liberación de neurotransmisores; transitorios de Ca^{2+} dendríticos; liberación de hormonas
Cav2.3	R	Cuerpos celulares neuronales y dendritas	SNX-482	Disparo en ráfaga del potencial de acción; transitorios de Ca^{2+} dendrítico
Cav3.1	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos del músculo liso y cardíaco	Mibefradil	Marcapaso; disparo en ráfaga del potencial de acción
Cav3.2	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos del músculo liso y cardíaco	Mibefradil Amilorida, Ni^{2+}	Marcapaso; disparo en ráfaga del potencial de acción
Cav3.3	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas	Mibefradil	Marcapaso; disparo en ráfaga del potencial de acción

DHPs: dihidropiridinas; PAAs: fenilalquilaminas; BZTs: benzotiazepinas. [Modificada de 17].

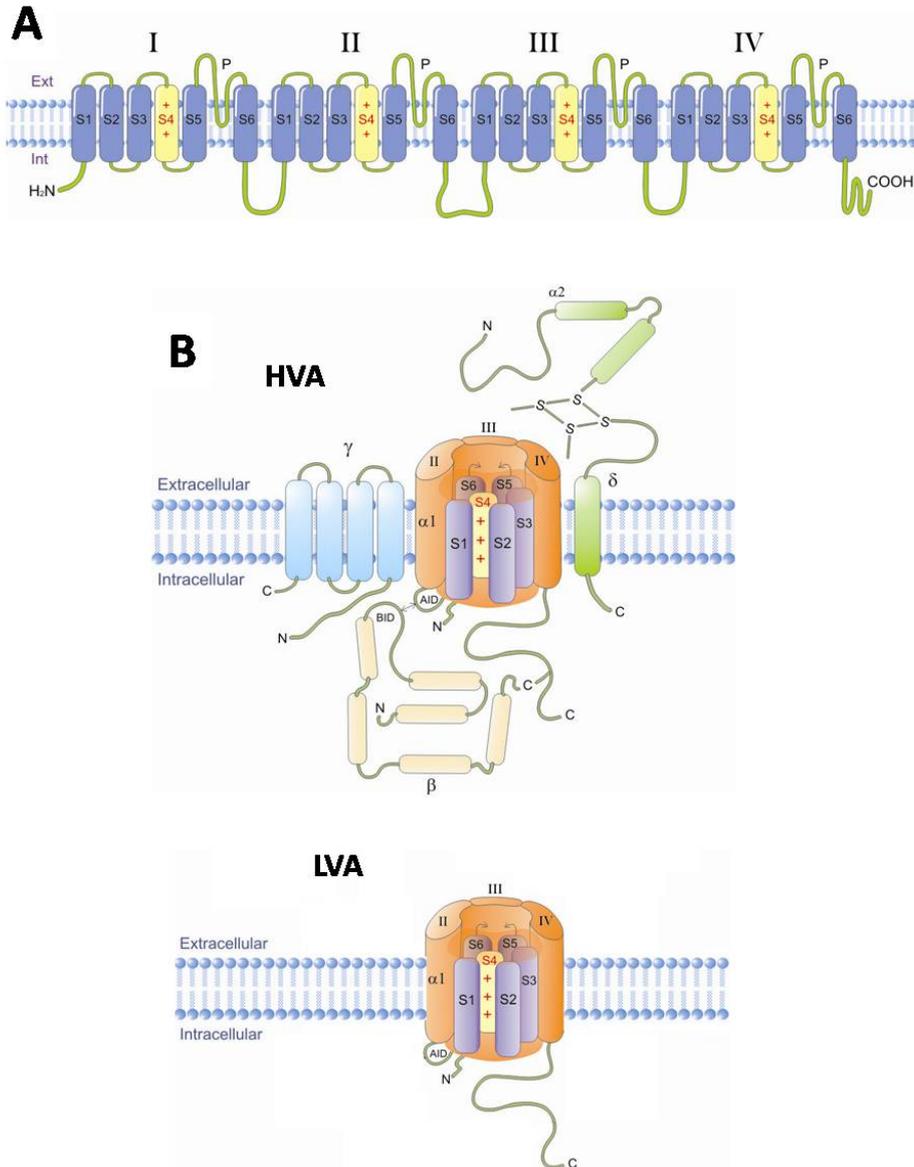


Figura 2. Topología de la subunidad $\alpha 1$ y representación esquemática del ensamble de los canales Ca_v . A) Los canales de calcio HVA y LVA están compuestos por una proteína integral de membrana de aproximadamente 270 kDa denominada subunidad $\alpha 1$, la cual está constituida por cuatro dominios similares (I-IV), cada uno de los cuales con seis regiones transmembranales (S1 a S6) y una asa de poro (P). El segmento S4 presenta aminoácidos con carga positiva cada 3 residuos, característica que le permite detectar cambios en el V_m , por lo que se le conoce como sensor de voltaje. B) Ilustración esquemática de la composición molecular de los canales HVA y LVA. Se muestran los cuatro dominios repetidos de la subunidad $\alpha 1$ formadora de poro (I a IV). En el dominio I se han expuesto los 6 segmentos transmembranales (S1 a S6) como cilindros púrpuras. La subunidad $\alpha 1$ se encuentra asociada con las subunidades accesorias $\alpha 2\delta$ (en color verde), β (en color melón), y γ (en azul) en los canales HVA. En contraste, la subunidad $\alpha 1$ de los canales LVA al parecer no requiere de subunidades accesorias para generar corrientes semejantes a las corrientes de calcio tipo T nativas. La subunidad β es completamente intracelular y se asocia con la subunidad $\alpha 1$ por medio de la interacción entre el BID (dominio de interacción de la subunidad beta) y el AID (dominio de interacción de la subunidad alfa). La subunidad $\alpha 2\delta$ se encuentra anclada a la membrana e interactúa con la parte extracelular de la subunidad $\alpha 1$ [Modificada de 35].

En lo que corresponde a los canales de la subfamilia Ca_v3 , éstos están constituidos únicamente por la subunidad principal $\alpha1$ (**Fig. 2A**), aunque en algunas investigaciones se han mostrado evidencias de que las subunidades accesorias de los canales Ca_v1 y Ca_v2 regulan en menor grado la actividad de los canales Ca_v3 [36-40].

De acuerdo con perfiles de hidrofobicidad, modelos de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad $\alpha1$ de canales Ca_v , estas proteínas son cadenas de aminoácidos que forman cuatro dominios similares (numerados del I al IV), unidos entre sí por asas intracelulares. Cada dominio contiene seis segmentos transmembranales llamados S1 a S6 (del amino hacia el carboxilo terminal) e interconectados por asas intra y extracelulares (**Fig. 2A**). Los segmentos S5 y S6 se encuentran unidos por un asa que se invagina parcialmente en la membrana, y que se conoce como el asa del poro. Con base en estudios de cristalografía de rayos X de canales de K^+ y de Na^+ , los cuales al igual que los canales Ca_v cuentan con una subunidad principal α con sensores de voltaje (S4), así como otras similitudes, se ha propuesto que el extremo intracelular del poro está delineado por los segmentos S5 y S6, y el extremo opuesto (extracelular) está revestido por las asas del poro de cada dominio [41-43]. Asimismo, existen fuertes evidencias experimentales a favor de que las asas del poro de los canales Ca_v forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que su secuencia de aminoácidos es un factor determinante de la conductancia, la selectividad iónica y de su afinidad por diversas toxinas que modifican la actividad de la subunidad $\alpha1$ [para una revisión véase 17].

Una característica molecular distintiva de los canales activados por voltaje y por consiguiente de los canales Ca_v , es el segmento S4, el cual contiene un aminoácido con carga positiva (lisina o arginina) cada tres residuos, y que, con base en una serie de evidencias, se le ha designado como sensor de voltaje [revisado por 44, 45]. Es decir, esta estructura molecular le permite al canal detectar los cambios en el V_m y traducir dicho estímulo eléctrico en un cambio conformacional de la proteína que permite la apertura del poro de conducción iónica y por consiguiente el libre flujo de iones Ca^{2+} al interior de la célula.

C. Modelo cinético del funcionamiento de los canales Ca_v3

El funcionamiento básico de los canales Ca_v3 se ilustra en la **Fig. 3**. A valores de V_m muy negativos (-90, -100 mV, por ejemplo), los canales se encuentran cerrados, es decir se

encuentran en estado de reposo. Cuando el V_m adquiere valores más positivos (despolarización), los canales transitan al estado abierto o activado, como resultado del desplazamiento de los respectivos sensores de voltaje, lo cual permite que los iones sean conducidos a través del poro del canal. Una vez en el estado abierto, el canal puede regresar al estado cerrado, siempre y cuando el V_m adquiera nuevamente el valor de reposo (-90, -100 mV). Dicha transición recibe el nombre de desactivación o cierre del canal. Por el contrario si el valor de V_m se mantiene despolarizado por varias decenas de milisegundos (ms), el canal abierto transitará a otro estado conocido como inactivación y que se caracteriza por el cese del flujo de iones a través del canal, a pesar de que éste se encuentre en el estado abierto. La inactivación de los canales activados por voltaje varía en el tipo de mecanismo que la origina, la proporción de canales que la presentan y la velocidad a la que sucede (cinética de inactivación), por lo que es una característica que permite diferenciar entre tipos de canales. Por ejemplo, la **Fig. 4** ilustra las diferencias en la cinética de activación e inactivación entre los tres miembros de la subfamilia Ca_v3 .

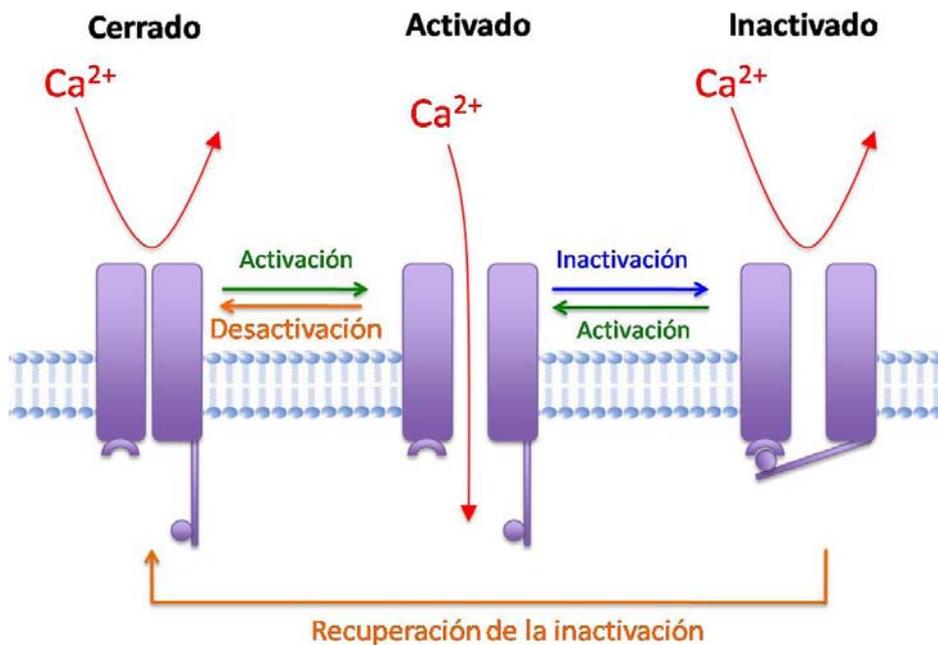


Figura 3. Esquema simplificado de los estados conformacionales que pueden adoptar los canales Ca_v3 . El proceso de activación es la transición del estado cerrado al estado abierto (activado) del canal, en el que sucede el flujo de iones a través del poro del canal. La inactivación es la transición del estado abierto a un estado no conductor de iones, aún y cuando el canal sigue abierto. La desactivación es la transición del estado abierto al estado cerrado, es decir, implica el cierre del canal. Finalmente el proceso por el cual el canal regresa al estado cerrado a partir del estado inactivado mediante la repolarización del V_m se conoce como recuperación de la inactivación [Adaptada de 46].

Posteriormente, el canal puede salir del estado inactivado por dos posibles rutas, ambas inducidas por la repolarización del valor de V_m . La primera es directamente del estado inactivado al cerrado o de reposo después de cierto tiempo de que ocurrió la repolarización (recuperación de la inactivación); y la segunda, indirectamente a través del estado abierto primero para luego cerrarse con la repolarización. La inmensa mayoría de los canales Ca_v3 sigue la primera ruta, mientras que solo una pequeña fracción cubre la ruta a través del canal abierto [47]. La corriente generada durante esta última vía se le conoce como corriente resurgente y fue originalmente descrita en un tipo de canal de sodio presente en las neuronas de Purkinje del cerebelo [48].

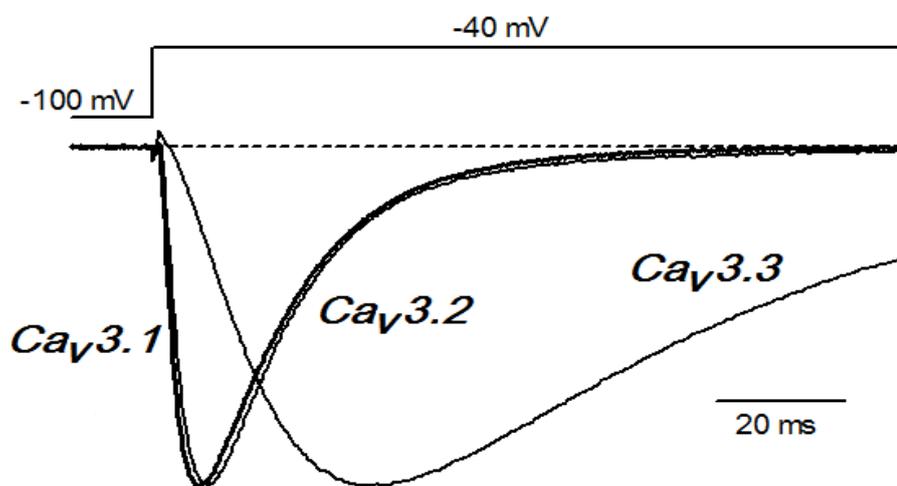


Figura 4. La cinética de la corriente de los canales $Ca_v3.3$ es 6-8 veces más lenta que la de $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$. Trazos normalizados de corrientes de calcio evocadas por pulsos despolarizantes a -40 mV, en presencia de 2 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga. Registros obtenidos de células HEK-293 que expresan establemente las subunidades Ca_v3 que se indican (Datos no publicados del Dr. Gómora).

D. Antagonistas de los canales Ca_v3

En los últimos años, la combinación de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, de biología molecular y bioinformática ha permitido ampliar nuestro entendimiento acerca del funcionamiento de los diferentes tipos de canales Ca_v . El uso de bloqueadores específicos que interactúan con uno o más tipos de canales Ca_v ha permitido asignar un papel fisiológico a cada tipo de canal. La alta especificidad de algunos bloqueadores se ha utilizado en el tratamiento de ciertas enfermedades [49]. Los bloqueadores de calcio más conocidos son las dihidropiridinas (DHP), mismas que se usan en el tratamiento de enfermedades como

hipertensión arterial y angina de pecho [19, 50]. La acción de las DHP es debida a la inhibición de corrientes tipo L que se encuentran abundantemente en el músculo liso de las arterias. De hecho, una de las primeras clasificaciones de los canales Ca_v se realizó con base en su sensibilidad a fármacos, toxinas, e incluso iones inorgánicos [27, 51, 52]. Esto ha sido particularmente útil para los canales HVA, puesto que los múltiples tipos de corrientes de calcio que generan (L, P/Q, N y R), pueden ser diferenciadas por el uso de bloqueadores selectivos tales como dihidropiridinas y toxinas de arañas y caracoles marinos (ω -agatoxina IVA, SNX-482, ω -conotoxina GVIA y MVIIC; **Tabla 1**).

Por otra parte, los canales Ca_v3 han adquirido especial relevancia por estar involucrados en enfermedades como la epilepsia [22, 53], la hipertensión [54] y la percepción del dolor [55], entre otras. No obstante, a pesar de que varios fármacos afectan la actividad de los canales Ca_v3 , tales como, la amilorida, el valproato, la etosuximida, la succinamida, la fenitoína, la lamotrigina, la sipatrigina, así como neurolépticos de la clase de las difenilbutilpiperidinas [22, 56-61], ninguno de ellos muestra una especificidad por los canales tipo T como lo muestran las dihidropiridinas para los canales tipo L. Más aún, tampoco se cuenta con fármacos ni toxinas que antagonicen diferencialmente alguno de los canales Ca_v3 , por lo que considerando las funciones celulares (**Tabla 1**) y las enfermedades a las que han sido asociados estos canales, resulta de particular relevancia ampliar los estudios encaminados a encontrar posibles antagonistas específicos de los canales Ca_v3 , cuya utilidad no se limitaría a su uso clínico sino también como una herramienta en el estudio de los aspectos biofísicos y estructurales de estos canales.

E. Bloqueadores inorgánicos

El uso de iones inorgánicos (particularmente cationes divalentes y trivalentes) como agentes bloqueadores de las corrientes de calcio permitió proponer al Ni^{2+} como un bloqueador selectivo de los canales tipo T respecto a los canales tipo L (HVA) [62] y a la fecha, constituye una herramienta farmacológica para poder discriminar los canales $Ca_v3.2$ de los $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ [63-64]. Debido a que los iones inorgánicos tienen estructuras atómicas bien caracterizadas y muestran pequeñas diferencias en su tamaño, significan una magnífica herramienta para estudiar mecanismos de permeabilidad, así como para establecer una relación entre la estructura y la función de los canales de calcio [65]. Por ejemplo, la cinética

de bloqueo de los canales por iones inorgánicos ha proporcionado información importante sobre el mecanismo de permeación de los iones a través de los canales iónicos [3].

Los iones trivalentes, incluyendo los iones lantánidos comparten propiedades químicas y biológicas importantes con los iones de Ca^{2+} . Sus semejanzas en radio iónico, coordinación química, y preferencia hacia grupos donadores de oxígeno proveen las bases de la fuerte interacción con los sitios de unión del Ca^{2+} [66-67] (**Tabla 2**).

Tabla 2. Algunas propiedades químicas de los lantánidos, calcio e itrio.

Elemento	Símbolo	Número atómico	Peso atómico	Radio iónico (Å)			
				NC6	NC7	NC8	NC9
Calcio	Ca	20	40	1.00	1.06	1.12	1.18
Lantano	La	57	139	1.03	1.10	1.16	1.22
Cerio	Ce	58	140	1.01	1.07	1.14	1.20
Praseodimio	Pr	59	141	0.99	---	1.13	1.18
Neodimio	Nd	60	144	0.98	---	1.11	1.16
Promecio	Pm	61	147	---	---	---	---
Samario	Sm	62	150	0.96	1.02	1.08	1.13
Europio	Eu	63	152	0.95	1.01	1.07	1.12
Gadolinio	Gd	64	157	0.94	1.00	1.05	1.11
Terbio	Tb	65	159	0.92	0.98	1.04	1.10
Disproσιο	Dy	66	162.5	0.91	0.97	1.03	1.08
Holmio	Ho	67	165	0.90	---	1.02	1.07
Erbio	Er	68	167	0.89	0.95	1.00	1.06
Tulio	Tm	69	169	0.88	---	0.99	1.05
Iterbio	Yb	70	173	0.87	0.93	0.99	1.04
Lutecio	Lu	71	175	0.86	---	0.98	1.03
Itrio	Y	39	89	0.96	1.02	1.08	---

NC = Número de coordinación. [Modificada de 67].

Los lantánidos han sido especialmente útiles en el estudio de los canales Ca_v , debido a que bloquean potentemente tanto a los canales HVA como a los LVA, lo que aunado al hecho de que su radio iónico decrece conforme su número atómico aumenta (fenómeno conocido como

“contracción lantánida”; **Tabla 2**), permite comparar el efecto en el bloqueo de ambos tipos de canales. Se ha reportado que las corrientes tipo T de células de la corteza adrenal de bovino fueron bloqueadas por los iones lantánidos con una potencia inversamente proporcional a su radio iónico [68], mientras que en otro trabajo se observó que el bloqueo por lantánidos de corrientes tipo L es directamente proporcional a su radio iónico [69].

Por lo tanto, el empleo de iones inorgánicos incluyendo los lantánidos es una herramienta muy útil en el estudio de las propiedades biofísicas de los canales de calcio. Aunado a ello, la posibilidad de realizar tales estudios en canales recombinantes que permiten analizar los efectos de los iones inorgánicos en corrientes aisladas y robustas aumenta la relevancia de los resultados. En este contexto, el único trabajo previo en el que se reportan los resultados de un estudio sistemático del mecanismo de bloqueo de los canales $Ca_v3.1$ por el trivalente Y^{3+} , demuestra un efecto importante de este ion sobre el estado cerrado del canal [70].

2.3. Generalidades acerca del modelo eléctrico de las membranas celulares **

La capacidad de las células de distribuir iones selectivamente a través de los canales iónicos presentes en la membrana citoplasmática, origina una distribución de cargas eléctricas, permitiendo a las células generar actividad eléctrica espontánea o en respuesta a un estímulo.

A. Potencial de membrana

La distribución asimétrica de cargas entre el ambiente intracelular y extracelular produce una diferencia de potencial eléctrica entre el interior y el exterior de la célula, también conocido como *potencial de membrana* y abreviado como V_m , el cual se mide en el interior celular tomando como referencia el medio extracelular (cero del potencial o tierra). Los potenciales transmembranales de células en reposo son siempre negativos abarcando un intervalo de valores entre -35 y -80 mV de acuerdo al tipo celular. En las neuronas, por ejemplo, el V_m varía entre -60 en las neuronas del tálamo [71] y -75 mV en las neuronas de Purkinge del cerebelo [72]. Otro tipo de células excitables como las que secretan hormonas de la hipófisis tienen valores de V_m mas despolarizados, alrededor de -50 mV [73].

** Esta sección fue tomada y resumida de la referencia [1].

B. Potencial de equilibrio iónico

Las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana tienden a un equilibrio. La apertura de los canales iónicos permite el flujo de iones siguiendo su gradiente electroquímico, el movimiento de iones a través de la membrana (y por tanto de cargas) trae consigo reajustes en el potencial de membrana. El potencial al cual el flujo neto de una especie iónica (por ejemplo del ion “x”) y por tanto la corriente transmembranal debida al ion “x”, es nula se le conoce como *potencial de equilibrio del ion x* (E_x). El potencial de equilibrio de un ion se puede conocer a partir de su concentración a ambos lados de la membrana utilizando la ecuación de Nernst:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[x]_e}{[x]_i} , \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde E_a es el potencial de equilibrio del ion “x”, R es la constante de los gases, T es la temperatura en Kelvins, z es la carga del ion, F es la constante de Faraday, $[x]_e$ es la concentración iónica extracelular e $[x]_i$ es la concentración iónica intracelular.

No obstante, la realidad es que la membrana no es permeable exclusivamente a un solo ion, por lo que el potencial de membrana tendrá que considerar las concentraciones y permeabilidades de otros iones, entre los que destacan el Na^+ , K^+ y Cl^- . Este análisis supone que la diferencia de concentraciones iónicas, y por tanto de voltaje, son constantes en cada punto de la membrana. Por esa razón la ecuación propuesta por Goldman, Hodgkin y Katz se conoce también como la ecuación de campo constante:

$$E_m = 58 \text{ Log} \frac{P_{Na}[Na]_e + P_K[K]_e + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_e} , \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde P es la permeabilidad de cada ion y el resto de los parámetros fueron ya definidos en la ecuación de Nernst. Es importante mencionar que debido a que el Cl^- tiene carga negativa, sus concentraciones se expresan en el orden contrario al de los iones cargados positivamente.

C. La fuerza impulsora

La diferencia de concentraciones de cada especie iónica y por tanto de cargas a ambos lados de la membrana constituye la fuerza impulsora de cada ion, esto es, un índice de la fuerza con la que cada ion tiende a moverse al compartimento opuesto. La fuerza impulsora para los iones es la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio de ese ion.

Desde el punto de vista eléctrico la fuerza impulsora se puede representar como una “batería”. La acumulación de cargas en la “batería” tiene la capacidad de generar corrientes iónicas en la medida en que la membrana permita el flujo de iones, como la membrana opone una resistencia diferente para cada ion (tiene distinta permeabilidad para cada ion), para cada ion existe una resistencia en serie con la batería y puesto que el flujo de cada especie iónica es independiente, cada batería con su resistencia se conecta en paralelo a las restantes (**Fig. 5**).

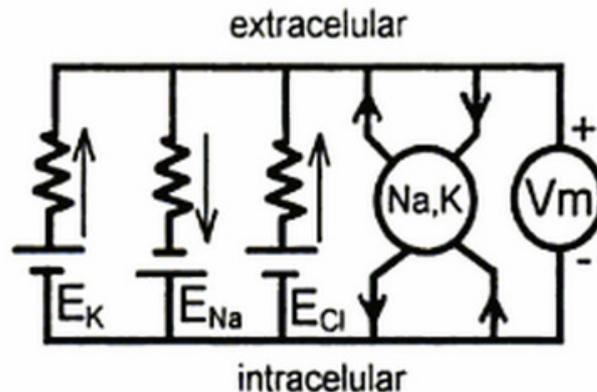


Figura 5. Modelo eléctrico de la membrana en reposo. A cada ion le corresponde una batería conectada en serie a una resistencia eléctrica. Éstas representan la fuerza impulsora y la permeabilidad de la membrana al flujo de cada ion, respectivamente. La bomba de Na y K también se representa conectada en paralelo. El potencial de membrana en reposo está señalado como una fuente de voltaje en el extremo derecho [1].

D. Ley de Ohm

En condiciones ideales la cantidad de corriente que fluye a través de un material resistivo es linealmente proporcional al voltaje:

$$V = RI, \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde V es el voltaje, I la corriente y R la resistencia. Otra manera de expresar la ley de Ohm es en términos de la conductancia (G), la cual se define como el inverso de la resistencia,

$$G = \frac{1}{R} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Y en términos de la fuerza impulsora y permeabilidad de la membrana, se puede generar una expresión para la corriente iónica que fluye en reposo como:

$$I = G (V_m - E_i) \quad (\text{Ecuación 5})$$

E. Resistencia de membrana

A la resistencia global de la membrana debida a su composición lipídica, a su hidrofobicidad, y a las conductancias basales de los diferentes iones, se le llama resistencia de membrana (r_m), la cual también se puede normalizar en función de la superficie obteniéndose la resistencia de membrana específica (R_m). Debido a que el citoplasma no es un conductor perfecto se debe considerar la resistencia del citoplasma, también conocida como resistencia interna (r_i), y a la suma de estas dos resistencias se le llama resistencia de entrada (r_{entrada}).

F. La capacitancia de membrana

Lo antes descrito corresponde a un modelo de la membrana que conduce corrientes iónicas en condiciones de reposo. Sin embargo, en células excitables la estimulación de la membrana mediante la inyección de una corriente da lugar a respuestas que requieren de un modelo en el que la corriente varía en el tiempo. Desde el punto de vista eléctrico, la interfase entre la bicapa lipídica de la membrana celular que separa a dos medios conductores (las soluciones intra y extracelulares), caracteriza a un elemento eléctrico no conductor llamado condensador. Los condensadores son elementos que almacenan energía, su carga y descarga no es instantánea, sino que su curso temporal depende de la resistencia de la membrana R_m a la carga y descarga del condensador. La corriente que fluye a través de un condensador depende de la variación del voltaje en el tiempo, y se expresa como:

$$I_C = C \frac{dV}{dt} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde la corriente se define como,

$$I = \frac{dq}{dt} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Por lo que la capacitancia se puede definir como:

$$C = \frac{q}{V} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Es decir que la capacitancia es un indicativo de la cantidad de carga que se puede almacenar a un cierto voltaje. Las unidades de la capacitancia son los Faradios. La capacitancia de membrana c_m se puede normalizar dividiéndola entre el área de membrana y expresarse como

capacitancia específica (C_m). El valor de C_m se ha medido en distintas células y se ha llegado a determinado que es una constante con un valor cercano a $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

G. El circuito $R_m C_m$

El modelo eléctrico de la membrana puede simplificarse representando todas las resistencias mediante una sola resistencia equivalente, y la interacción entre la membrana y los medios extracelular e intracelular mediante un condensador, ambos conectados en paralelo. Suponiendo que la célula tiene una forma esférica y que el voltaje transmembranal es el mismo en todos los sitios de la célula, y sin considerar fuentes de voltaje, el circuito resultante se puede apreciar como el de la **Fig. 6**. Este circuito será útil para analizar las respuestas pasivas de la membrana al flujo de corriente.

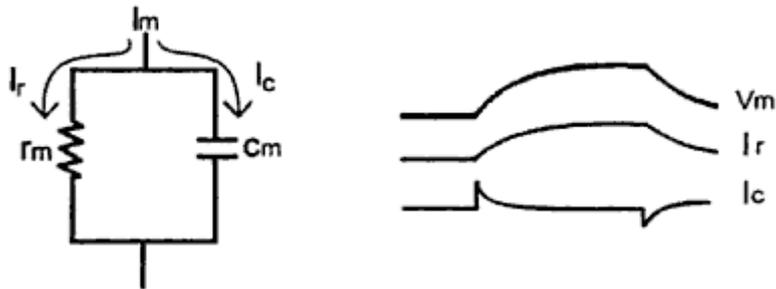


Figura 6. Respuesta de un componente eléctrico de la membrana a la inyección de corriente. Se muestra la inyección de corriente a través de un circuito RC en paralelo, el flujo inicial de la corriente es a través del condensador y más tarde a través de la resistencia. El voltaje llega a ser estacionario en un tiempo que depende del producto de RC. La descarga de la membrana al término del pulso tiene un curso temporal similar al de la carga [Tomada de 1].

La combinación $R_m C_m$ en paralelo adquiere la propiedad de un filtro que elimina las señales eléctricas rápidas, es decir las de alta frecuencia, por lo que se le conoce como filtro “pasa bajos”. Si se inyecta a la membrana un pulso cuadrado de corriente el cambio de voltaje es una función que depende exponencialmente del tiempo. El tiempo que tarda el voltaje en hacerse estacionario depende del producto $R_m C_m$. Podemos expresar entonces la corriente de membrana que fluye a través de los elementos de este circuito como la suma de las corrientes capacitiva (I_C) y resistiva (I_R), obteniendo la siguiente ecuación:

$$I_m = I_C + I_R = C_m \frac{dv}{dt} + \frac{v}{R_m} = 0 \quad (\text{Ecuación 9})$$

que dividida entre C_m resulta en:

$$I_m = \frac{dv}{dt} + \frac{V}{R_m C_m} = 0 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Una ecuación diferencial de primer orden cuya solución nos muestra que, al término del pulso de corriente, el voltaje de membrana decae a lo largo del tiempo en forma exponencial:

$$V(t) = V_o e^{-t/R_m C_m} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde $V(t)$ es el voltaje en función del tiempo, V_o es el voltaje de la membrana antes de aplicar el pulso rectangular de corriente, e es la base de los logaritmos naturales, y t es el tiempo.

Ahora, sabemos que el cambio en el potencial de membrana es debido a cambios en el flujo de iones, y a su vez estos son influidos por cambios en el potencial de membrana, y que existe además un modelo para conocer la variación del voltaje en el tiempo cuando se inyecta una corriente, el siguiente gran avance ocurre con la introducción de un método para medir la corriente iónica de membrana manteniendo el potencial fijo. A esta aproximación experimental se le da el nombre de fijación de voltaje.

La fijación de voltaje mediante la técnica de *patch clamp* empleada en el presente trabajo de tesis consiste en mantener el potencial de membrana a un valor de voltaje determinado por medio de la inyección de corriente, de tal forma que la corriente inyectada es igual a la corriente que fluye a través de la membrana. Esta técnica se describe con mayor detalle en la sección de Materiales y métodos.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

1. La potencia de los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} en el bloqueo de los canales Ca_v3 es inversamente proporcional al radio iónico de estos lantánidos.
2. El bloqueo por La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} de los canales Ca_v3 es revertido (desbloqueo) a potenciales extremos positivos y negativos.
3. El mecanismo de bloqueo de los lantánidos incluye el estado cerrado de los canales Ca_v3 .

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el bloqueo de los canales Ca_v3 clonados de humano por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} .

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la potencia de los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , en el bloqueo de los canales Ca_v3 .
2. Investigar el efecto del bloqueo por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , en la relación corriente-voltaje ($I-V$) de los canales Ca_v3 , así como sus posibles efectos en la activación e inactivación de las corrientes.
3. Caracterizar el efecto de potenciales extremos positivos y negativos en el bloqueo de los canales Ca_v3 inducido por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , así como sus posibles efectos en la desactivación (cierre) de los canales.
4. Estudiar el efecto del Ce^{3+} en el estado cerrado de los canales $\text{Ca}_v3.3$.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo celular

Los experimentos de electrofisiología se realizaron utilizando células HEK-293 las cuales expresan de manera estable corrientes tipo T generadas por los canales $Ca_v3.1$ [Número de acceso en el GenBank AF190860; 74], $Ca_v3.2$ [AF051946; 75] y $Ca_v3.3$ [AF393329; 76], donadas amablemente por el Dr. Edward Pérez-Reyes de la Universidad de Virginia de los EUA. La línea celular HEK-293 proviene de riñón de embrión humano, y debido a que no expresa corrientes de calcio endógenas, representa un modelo excelente para el estudio de los canales Ca_v3 clonados de humano. Las células fueron crecidas en monocapas sobre cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro en condiciones estándar de incubación (atmósfera saturada de agua y compuesta por 95% de O_2 y 5% de CO_2 a $37^\circ C$). El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu g/ml$ de estreptomycin (DMEM completo). Todos los productos químicos para el cultivo y mantenimiento de las células se obtuvieron de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Una o dos veces por semana (cuando la monocapa de células se encontraba entre 90-95% de confluencia), el medio de cultivo fue retirado por aspiración con una pipeta Pasteur, las células se lavaron un 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 se despegaron las células con 0.5 ml de una solución que contiene 0.05 % de tripsina y 0.53 mM de EDTA en una solución balanceada de Hanks libre de calcio. Posteriormente se realizó la disociación de las células 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 10 veces menor en una caja Petri nueva en un volumen final de 10 ml de medio DMEM completo, a su vez esta misma suspensión celular se utilizó para resembrar células en una caja de plástico de 35 mm de diámetro en 2 ml de medio DMEM completo, con la finalidad de tener células disponibles para los experimentos de electrofisiología por toda una semana; de igual manera, tres horas antes de realizar los experimentos electrofisiológicos la monocapa de células de las cajas de 35 mm fueron sujetas al mismo procedimiento descrito anteriormente (de manera proporcional) para sembrar una alícuota de células en una nueva caja de plástico de 35 mm, cuyo fondo contenía pequeños cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 25 mm^2 de área, mantenidos en 2 ml de medio DMEM completo y en las mismas condiciones de incubación, hasta el momento de ser

empleadas para el registro electrofisiológico mínimamente 2 horas después de haber sido sembradas.

4.2. Electrofisiología

A. Soluciones de registro

Las corrientes entrantes de Ca^{2+} fueron registradas utilizando una solución externa con la siguiente composición (en mM): 160 TEA-Cl, 10 HEPES y 2 CaCl_2 , pH 7.4 ajustado con TEA-OH. La composición de la solución interna fue (en mM): 135 CsCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3 ajustado con CsOH. Con las concentraciones indicadas, la combinación del secuestrador de calcio EGTA y el CaCl_2 resulta en una concentración de Ca^{2+} libre aproximada de 50 nM de acuerdo al programa BAD [77]. 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) que se ha observado en algunos canales de calcio.

Con la finalidad de investigar el efecto de los iones inorgánicos trivalentes sobre la actividad de los canales Ca_v3 , se prepararon soluciones stock frescas de 100 mM de cloruro de lantano ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro de cerio ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), y cloruro de itrio ($\text{YCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), mismas que se diluyeron con la solución externa para obtener las concentraciones requeridas, justo al momento de ser utilizadas. Todos los compuestos químicos utilizados para preparar soluciones de registro se obtuvieron de J.T. Baker (Xalostoc, México) y Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

B. Electroodos de registro

Los electrodos o pipetas de registro se construyeron a partir de capilares de borosilicato (TW150-3; WPI Inc., Sarasota, FL, EUA), los cuales inicialmente fueron cortados con un estirador horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, EUA). Las puntas de las pipetas así generadas se pulieron al calor con una microforja (MF-830; Narishigue Co., Japón), obteniéndose puntas con un diámetro aproximado de 1 μm . Para los registros electrofisiológicos solo se utilizaron pipetas con resistencias de 2 a 3 $\text{M}\Omega$ después de haber sido llenados con la solución interna de registro.

C. Experimentos de fijación de voltaje

El registro de las corrientes macroscópicas inducidas por la actividad de los canales Ca_v3 en las células HEK-293 se realizó mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp*, en la configuración de célula completa [12]. La técnica de *patch clamp* es una extensión de la técnica de *voltage clamp* introducida en 1930 y mejorada en 1950 por Cole, Hodgking, Huxley y Katz [78]. El principio básico de funcionamiento de la técnica de *voltage clamp* y de *patch clamp* puede ser descrito por la ley de Ohm (Ecuación 3), donde el experimentador controla el voltaje (V), registra la corriente (I) y la resistencia (R) es una variable que depende de las características de la célula [78]. En este experimento clásico se utilizaban dos electrodos uno para medir el potencial de membrana y otro para inyectar corriente a la célula. El potencial de membrana se obtiene al medir la diferencia de potencial entre un electrodo al interior de la célula y otro al exterior haciendo tierra, este potencial de membrana se compara electrónicamente con el voltaje a probar (voltaje comando) V_c , si éstos son diferentes se inyecta una corriente retrograda a través de un segundo electrodo intracelular.

Este circuito electrónico de retroalimentación mantiene el potencial de membrana deseado, aún frente a cambios en la permeabilidad que en condiciones normales afectarían el potencial de membrana (como los generados durante los potenciales de acción), y lo que es más importante, esta técnica permite la medición simultánea de la corriente necesaria para mantener la membrana a un voltaje dado, corriente que es exactamente igual a la que atraviesa la membrana; por lo tanto esta técnica nos permite identificar como influye el potencial de membrana en el flujo de corrientes iónicas a través de la membrana.

A diferencia de la técnica de *voltage clamp*, en la técnica de *patch clamp* se utiliza un solo electrodo (micropipeta de registro) que realiza ambas funciones, medir el potencial de membrana e inyectar la corriente. La micropipeta de registro es colocada sobre la membrana de una célula aislada y se le aplica presión negativa para realizar un sello de alta resistencia ($\geq 1 \text{ G}\Omega$) entre la membrana celular y la punta de la micropipeta de registro, esta interacción física con la subsecuente ruptura de esa microárea de membrana, forma la conexión entre el interior de la célula y el amplificador de *patch clamp*; en dicha condición se fija un potencial de mantenimiento (HP) de -100 mV al interior de la pipeta. La calidad del sello es importante debido a que la corriente medida es la suma de la corriente iónica a través de los canales y la corriente de fuga (corriente que se escapa entre la membrana celular y la punta de la pipeta

de registro). Finalmente se cancelan de manera analógica las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos breves hiperpolarizantes de 5 mV. Cuando se han cubierto estas etapas se procede a registrar las corrientes de calcio generadas por los canales Ca_v3 .

Los registros se llevaron a cabo a una temperatura de 21 a 23 °C. El sistema de registro electrofisiológico consistió de un amplificador de *patch clamp* modelo Axopatch 200B y una interfase Digidata 1322 A/D. Esta última se encarga de convertir las señales analógicas provenientes de la célula en señales digitales para ser visualizadas y almacenadas en una computadora, la cual tiene instalado el software de pClamp versión 9.02. Este software permite diseñar y aplicar los diferentes protocolos de voltaje utilizados para el registro electrofisiológico, así como fijar el potencial de mantenimiento deseado. El amplificador, la interfase y el software de adquisición de datos se obtuvieron de Molecular Devices Inc. (Sunnyvale, CA, EUA). Todos los componentes anteriores, así como sus conexiones se muestran en la **Fig. 7** y la fotografía de la **Fig. 8**.

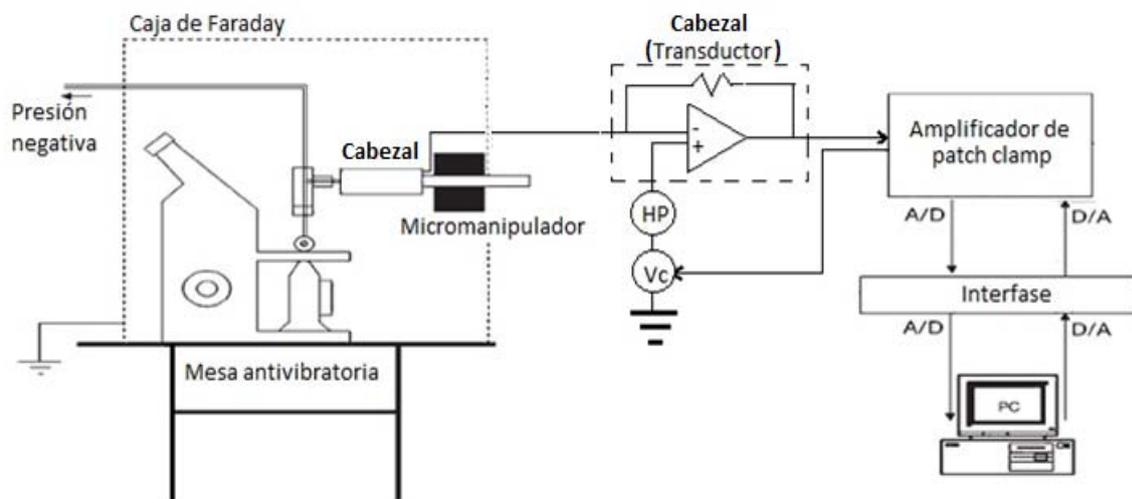


Figura 7. Representación esquemática del sistema de registro electrofisiológico. El amplificador operacional contenido en el cabezal controla el valor de voltaje impuesto por el electrodo de plata y cuantifica al mismo tiempo la corriente iónica que fluye a través de la membrana celular. Los pulsos comando (V_c) y el potencial de mantenimiento (HP) entre cada pulso son generados por el amplificador de *patch clamp*. El amplificador permite reducir manualmente las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos despolarizantes. La señal de corriente iónica inducida por V_c fue digitalizada mediante el convertidor analógico-digital (A/D) de la interfase y almacenada en el disco duro de una computadora para su posterior análisis. Las corrientes iónicas (I_m) son visualizadas en el monitor de la computadora para apreciar la formación del sello de alta resistencia entre la punta del electrodo y la membrana celular, así como para supervisar la cancelación analógica de las espigas capacitivas. Modificada de [78].

El inicio de los experimentos electrofisiológicos consistió en transportar un cubreobjetos con células de la incubadora a la cámara de registro montada sobre la platina de un microscopio óptico invertido (Nikon, Japón). La solución externa se mantuvo en perfusión constante hacia la cámara de registro con un flujo de ~ 1.5 ml/min, mediante un sistema impulsado por gravedad y controlado por una válvula de seis vías. Las células fueron visualizadas con un aumento de 200X y comenzaron a investigarse ~ 5 minutos después de haber sido colocadas en la cámara de registro y se reemplazaron aproximadamente cada hora por un cubreobjetos nuevo. Solo aquellas células visualizadas con una membrana íntegra y ausencia de detritus en su periferia fueron seleccionadas para los registros electrofisiológicos.

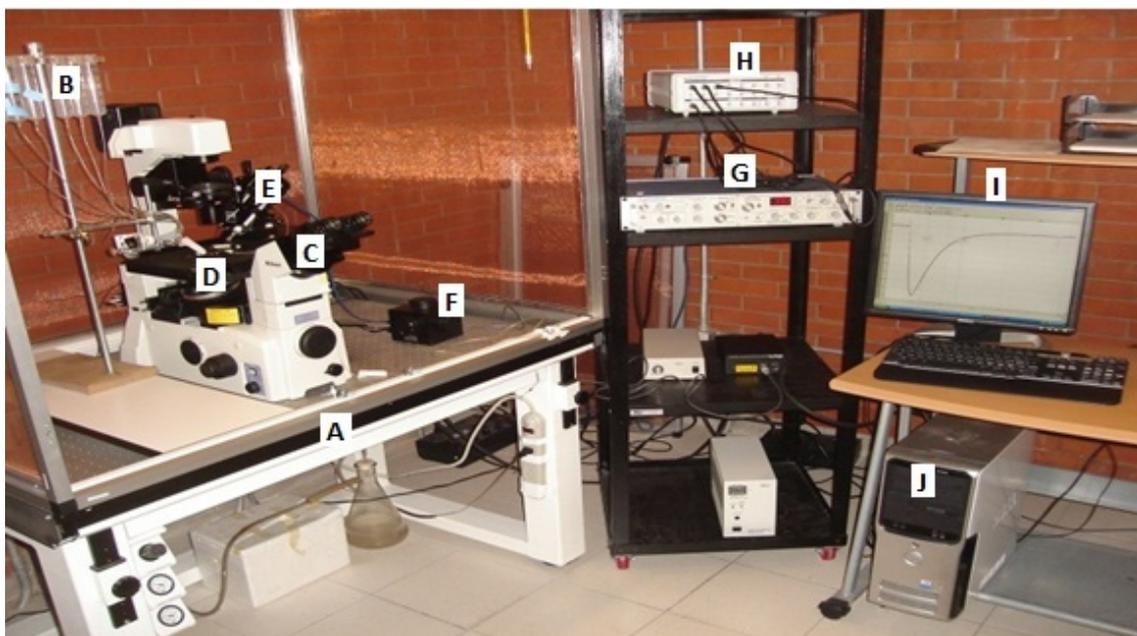


Figura 8. Imagen fotográfica que muestra el equipo donde se realizaron los experimentos de *patch clamp*. Set up de registro electrofisiológico integrado por: mesa antivibratoria (A); sistema de perfusión (B); microscopio óptico invertido (C), cámara de registro (D), transductor (E), micromanipulador eléctrico (F), amplificador de *patch clamp* (G), interfase (H), monitor (I), y unidad central de procesamiento (J).

D. Protocolos de voltaje

Las corrientes generadas por los canales Ca_v3 fueron inducidas mediante pulsos comando (protocolos de voltaje) despolarizantes, de amplitud y duración variable. Los protocolos de voltaje empleados en el presente trabajo fueron básicamente seis, mismos que se enlistan a continuación, y a menos que se indique otra cosa, el HP fue de -100 mV.

- ***sp-40150* y *sp-40500***

Estos protocolos consisten en la aplicación de un pulso único a -40 mV de 150 ms de duración (*sp-40150*) para las células que expresan los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, y de 500 ms

de duración (sp-40500) para las células que expresan los canales $Ca_v3.3$, a partir del potencial de mantenimiento, aplicado cada 10 s (0.1 Hz). Bajo las presentes condiciones experimentales, se ha establecido en el laboratorio que la corriente de calcio (I_{Ca}), alcanza su valor máximo alrededor de -40 mV. Por ello, la aplicación de este protocolo nos permite obtener una aproximación de la amplitud máxima de la corriente, así como de la calidad de los registros de la célula bajo estudio, suficientes para poder monitorear el efecto de los iones trivalentes sobre la amplitud y cinética de la corriente iónica.

- ***IV-100 e IV-500***

El protocolo *IV* consiste en la aplicación de una serie de pulsos despolarizantes desde -80 y hasta +80 mV en incrementos de 10 mV, con una duración de 100 ms para las células que expresan los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, y de 500 ms para las células que expresan los canales $Ca_v3.3$, los cuales fueron aplicados con una frecuencia de 0.1 Hz. Los registros de corrientes así evocadas proporcionan información acerca de la corriente máxima generada por la activación de los canales en función del voltaje, también sirven para analizar la cinética de activación e inactivación de la I_{Ca} a diferentes voltajes, así como encontrar posibles efectos dependientes del voltaje en el bloqueo de los canales Ca_v3 por los iones inorgánicos trivalentes.

- ***iiv2ms+60-180-2ch e iiv10ms+60-180-2ch***

Este protocolo consistió en la aplicación de dos pulsos de voltaje, uno breve, (2 o 10 ms) a un potencial despolarizante de +60 mV para activar prácticamente a todos los canales presentes en la membrana plasmática; el cual es lo suficientemente breve para que los canales no se inactiven; y otro de mayor duración (25-40 ms) que repolariza la membrana a diferentes valores de voltaje, desde -180 hasta -60 mV en incrementos de 10 mV. La repolarización de la membrana justo cuando los canales se encuentran abiertos (al final de los 10 ms del pulso despolarizante), provoca un incremento en la fuerza impulsora para el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula, lo que asociado al hecho de que los canales se cierran a dichos voltajes, generan un incremento súbito y transitorio en la corriente de calcio que se conoce como colas de corriente. Los pulsos de menor duración se aplicaron a las células que expresan los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, mientras que los de mayor duración fueron aplicados a las células que expresan los canales $Ca_v3.3$.

La finalidad de este protocolo fue la de estudiar el efecto de fuertes hiperpolarizaciones sobre los canales que se encuentran bloqueados por iones trivalentes, así como posibles efectos en la cinética de desactivación (cierre) de los mismos, dicha información se obtiene a partir de las colas de corriente, Al relacionar la amplitud de cada una de las colas de corriente en función del potencial de repolarización se construyeron las curvas $I-V$ instantáneas, mientras que su ajuste con funciones exponenciales indica el curso temporal con el que se cierran dichos canales.

- ***iiv-20+120-2ch***

El siguiente protocolo consistió en la aplicación una serie de pulsos despolarizantes de voltaje desde -20 mV hasta +120 mV en incrementos de 10 mV con la peculiaridad de que cada pulso es de diferente duración, esto con la finalidad de cortar el pulso al tiempo justo antes de que inicie la inactivación de los canales, y así registrar las colas de corriente al repolarizar la membrana a un HP de -100 mV. Con este protocolo se obtuvo información sobre el efecto de fuertes despolarizaciones sobre los canales bloqueados por los iones trivalentes.

- ***BCS***

Finalmente, el quinto protocolo consistió en la aplicación de un pulso despolarizante a +200 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV, seguido de una hiperpolarización a -200 mV, ambos potenciales extremos fueron aplicados por un periodo corto de tiempo (2 ms), justo después, el V_m fue repolarizado a -100 mV seguido de un pulso despolarizante de prueba a +80 mV con duración 20 ms aplicado a intervalos de tiempo variable entre 0.1 y 2.5 s. Este protocolo permite explorar si existe interacción de los iones trivalentes con el estado cerrado del canal.

La calidad de los resultados que se obtienen con de la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa, están asociados de manera directa con los parámetros de capacitancia de la membrana, C_m , y la resistencia en serie, R_s ; esta última, resultado de la sumatoria de la resistencia de acceso de la célula y la resistencia del electrodo de registro. El producto $C_m R_s$ determina la constante de tiempo con la que se instalan los cambios en el V_m ocasionados por la aplicación de los pulsos de voltaje en el interior del electrodo, razón por la cual, en todos los experimentos aquí reportados se procuró que el resultado de tal producto no excediera los 50 μ s, para garantizar una excelente resolución temporal en el registro de las corrientes. Ambos parámetros (C_m y R_s) se cancelaron de forma analógica con el

amplificador de *patch clamp* antes de comenzar el registro de la actividad de los canales, y cuando fue necesario, se revisaron y reajustaron a lo largo del experimento. En la mayoría de los registros, la corriente de fuga (corriente que se escapa a través del sello entre la punta de la micropipeta de registro y la membrana de la célula) asociada a la configuración de célula completa se realizó *off-line* (es decir, hasta que se analizaron digitalmente los registros de corriente adquiridos con los diferentes protocolos), y esto se llevó a cabo utilizando el algoritmo de resistencia pasiva que se incluye en el programa de Clampfit del paquete pClamp. En algunos casos (protocolos para obtener la *I-V* instantánea) las corrientes fueron registradas en dos canales, uno para obtener la corriente con la sustracción *on-line* (es decir, el algoritmo realiza la resta de los componentes lineales y de la corriente de fuga al momento de hacer el registro), empleando el método P/-5, y el otro para registrar la corriente sin modificación alguna. La información obtenida con este último canal permite monitorear la estabilidad de la célula en cuestión.

Utilizando el mismo filtro del amplificador de *patch clamp*, las señales de corriente fueron filtradas a 5 kHz, excepto cuando los registros de corriente involucraban colas de corriente, en cuyo caso las señales se filtraron a 10 kHz. Lo anterior es debido a que el cierre de los canales Ca_v3 ocurre a una alta velocidad (constante de tiempo de $\sim 1-3$ ms), por lo que se debe incrementar la frecuencia para obtener una mejor resolución de las colas de corriente y evitar la pérdida de información en la señal de corriente. Finalmente, las señales de corriente fueron digitalizadas cada 10, 100 o 200 μ s (dependiendo del protocolo de voltaje aplicado) con el convertidor analógico-digital de la interfase y almacenadas en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

E. Análisis de datos

Los datos electrofisiológicos fueron analizados y graficados utilizando Clampfit del software de pClamp 8.2 y 9.2 en combinación con los programas Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, EUA) y Prism 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

Para evaluar la potencia del bloqueo por los iones lantánidos sobre cada miembro de los canales Ca_v3 , se determinó el efecto de concentraciones crecientes de dichos iones inorgánicos sobre la amplitud de la I_{Ca} registrada a -40 mV. La fracción de corriente bloqueada con cada concentración evaluada se normalizó respecto a la amplitud inicial y se

construyó un gráfico de porcentaje de I_{Ca} remanente en función del logaritmo de la concentración del lantánido en cuestión. Los datos experimentales así obtenidos se ajustaron con la ecuación de Hill incluida en el programa Prism 5.0:

$$y = \frac{1}{1+10^{(\text{Log } IC_{50}-X)^h}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde X es el logaritmo de la concentración del lantánido, y es la fracción de corriente remanente después de la adición del ion lantánido, IC_{50} es la concentración del lantánido necesaria para abatir el 50 % de la I_{Ca} inicial, y h es el coeficiente de Hill (parámetro que define las proporciones moleculares de interacción entre el receptor o canal y el ligando o trivalente) que indica la pendiente de la curva que ajusta los puntos experimentales. Para determinar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente generada por los canales Ca_v3 , los datos de las curvas $I-V$ se ajustaron con una ecuación de Boltzmann modificada:

$$I = \frac{I_{max}(V_m - V_{rev})}{1 + e^{\left(\frac{V_{1/2} - V_m}{k}\right)}} \quad (\text{Ecuación 13})$$

donde I_{max} es la corriente máxima observada, V_m es el potencial de membrana, V_{rev} el potencial de inversión de la corriente, $V_{1/2}$ el voltaje al cual se alcanza el 50% de la I_{max} y k es la pendiente de la relación. Para estudiar la cinética de activación e inactivación se calcularon constantes de tiempo (τ) de ambos procesos a partir del ajuste de dos funciones exponenciales a los trazos de corriente obtenidos con el protocolo que permitió la construcción de la curva $I-V$. Con el ajuste de la primera función exponencial se obtuvo el valor de τ de activación y con el segundo ajuste se obtuvo el valor de τ de inactivación. Por otro lado, la constante de tiempo de desactivación o cierre del canal se obtuvo con el ajuste de dos funciones exponenciales a las colas de corriente generadas. La región incluida en el ajuste comenzó al pico máximo de la cola de corriente, usualmente a los 0.20 - 0.35 ms después del corte del pulso y se extendió hasta los 15 ms. Con los resultados obtenidos de cada una de los ajustes exponenciales (amplitud y constante de tiempo) se calculó una τ ponderada como se indica en la siguiente ecuación:

$$\tau_{ponderada} = A_1\tau_1 + A_2\tau_2 \quad (\text{Ecuación 14})$$

donde A_1 y A_2 son la amplitud normalizada de los componentes de cada una de las colas de corriente ajustadas, mientras que τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo respectivas.

Todos los resultados se expresan como la media \pm el error estándar (ESM) de los valores obtenidos en diferentes células. La comparación entre los valores promedios para determinar la significancia estadística se llevó a cabo con la t de Student para muestras no pareadas. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de P fue inferior a 0.05.

V. RESULTADOS

5.1. Construcción de curvas concentración-respuesta

Para determinar de forma cuantitativa el efecto de los iones lantánidos trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , como bloqueadores de la corriente transportada por los canales Ca_v3 , se construyeron curvas concentración-respuesta para los tres miembros de la familia, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$, en presencia de cada uno de los bloqueadores inorgánicos.

Los protocolos empleados para la construcción de las curvas concentración-respuesta fueron los sp-40150 y sp-40500 (ver Materiales y Métodos). En la **Fig. 9A** se ilustran trazos de la I_{Ca} registrada a -40 mV en una célula HEK-293 que expresa de manera estable los canales $\text{Ca}_v3.3$, en respuesta a cada despolarización se observa una deflexión de la señal de corriente hacia valores negativos (el valor de cero corriente se indica mediante la línea negra punteada), dicha deflexión es indicativa de una corriente catiónica entrante (los iones de Ca^{2+} están entrando a la célula), este comportamiento en el flujo de la corriente es asociado al proceso de activación de los canales Ca_v3 . Así mismo, algunos milisegundos después del inicio del pulso despolarizante la corriente alcanza una amplitud máxima (corriente al pico, I_{pico}) y a partir de este valor máximo, la amplitud de corriente disminuye tendiendo a cero en un periodo de tiempo más largo, este segundo comportamiento ilustra el proceso de inactivación de estos canales. Finalmente, al repolarizar la célula al HP de -100 mV, aquellos canales que no se inactivaron durante el pulso despolarizante y que permanecen abiertos, conducen corriente transitoriamente antes de cerrarse a -100 mV. En el caso de la **Fig. 9A**, prácticamente todos los canales se inactivan durante la despolarización, por lo que la cola de corriente generada con la repolarización a -100 mV es extremadamente pequeña.

En la condición Control, (es decir, perfundiendo las células con solución externa sin La^{3+}) se aplicaron pulsos depolarizantes a -40 mV cada 10 s hasta que la amplitud de la I_{Ca} permaneció sin cambios en respuesta a varias despolarizaciones consecutivas. Acto seguido, se inició la perfusión con diferentes concentraciones de los iones lantánidos estudiados. En la **Fig. 9A** se muestra el efecto de concentraciones crecientes de La^{3+} (3, 10, 30 y 300 nM) sobre la corriente de calcio generada por el canal $\text{Ca}_v3.3$; como se puede observar, cada una de las concentraciones produjo una disminución en la amplitud de la corriente. Cada concentración

del ion inorgánico se perfundió hasta alcanzar un bloqueo estacionario (sin variaciones en la amplitud de la corriente), antes de probar una concentración más alta, y así sucesivamente

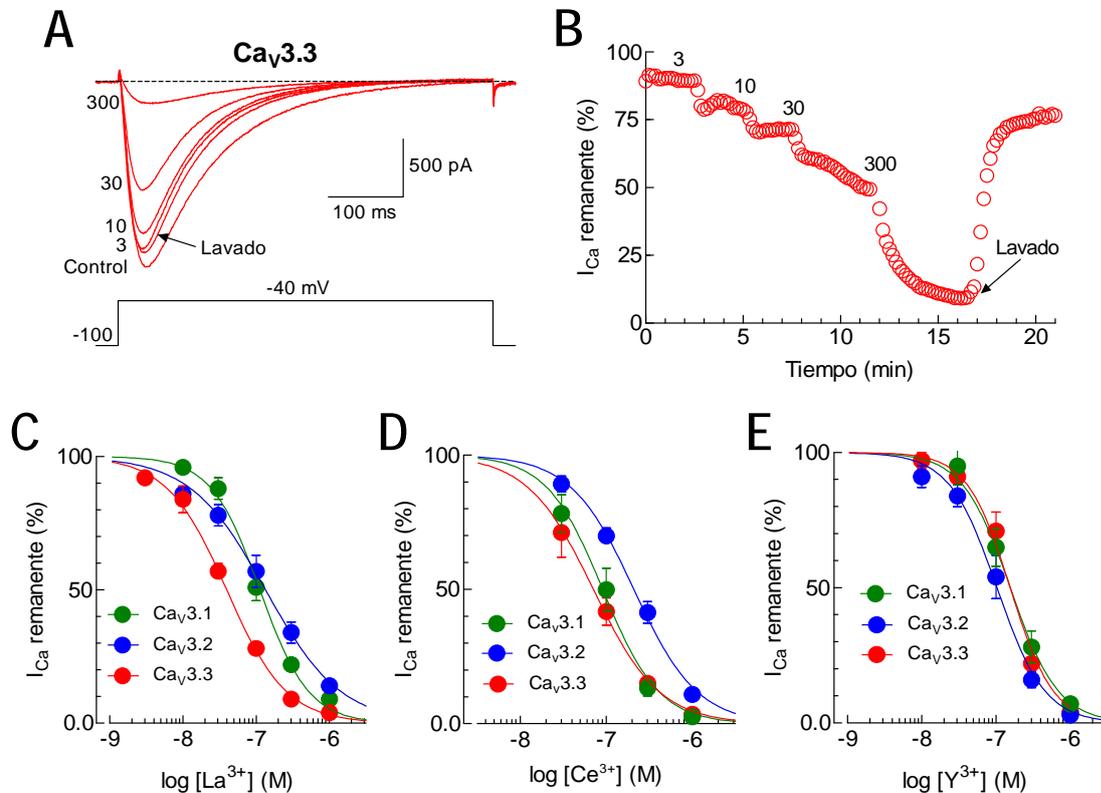


Figura 9. Bloqueo de canales Ca_v3 por los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} . **A)** Trazos representativos de la I_{Ca} de canales $Ca_v3.3$ registrada a -40 mV en ausencia (Control), en presencia de concentraciones de 3, 10, 30 y 300 nM de La^{3+} (Bloqueo), y después de retirar el bloqueador (Lavado) de la cámara de registro. **B)** Curso temporal del bloqueo de la I_{Ca} a -40 mV de la misma célula mostrada en **(A)**. **C), D)** y **E)** Curvas concentración-respuesta de los canales Ca_v3 , obtenidas al graficar el porcentaje de I_{Ca} remanente en función de la concentración de los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} . Las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales ($n = 3-18$, para cada concentración) mediante la ecuación de Hill (Ecuación 12), cuyos parámetros obtenidos se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas dosis-respuesta.

	Radio Iónico (nm)	$Ca_v3.1$		$Ca_v3.2$		$Ca_v3.3$	
		IC_{50}	h	IC_{50}	h	IC_{50}	h
La^{3+}	0.116	112	-1.3	134	-0.8	40	-1.1
Ce^{3+}	0.114	91	-1.3	210	-1.2	71	-1.1
Y^{3+}	0.102	156	-1.4	103	-1.4	153	-1.4

Se presentan los datos de IC_{50} y el coeficiente de Hill obtenidos al ajustar los datos experimentales de la **Fig. 9** con la ecuación de Hill. Los números en negritas indican la subunidad más sensible a cada uno de los antagonistas. Los valores de IC_{50} se expresan en nM. Los valores de radio iónico se obtuvieron de [67].

hasta inhibir casi por completo la I_{Ca} . La disminución de la amplitud de la corriente se puede atribuir a la presencia del lantánido, ya que al realizar el lavado, es decir, perfundir la célula nuevamente con solución externa libre de La^{3+} , la amplitud de corriente tendió a recuperar su valor inicial.

El curso temporal de bloqueo de los canales $Ca_v3.3$ por la adición de concentraciones crecientes de La^{3+} se presenta en la **Fig. 9B**. Como se puede observar en los resultados de este experimento, el efecto del ión lantánido sobre la amplitud de la I_{Ca} de los canales $Ca_v3.3$ muestra un patrón de bloqueo dependiente de la concentración. A partir de experimentos como los mostrados en la **Fig. 9A** se calculó el porcentaje de corriente bloqueada a cada concentración de La^{3+} , se promedió entre grupos de células y se gráfico en función de la concentración respectiva para obtener curvas concentración-respuesta para el bloqueo de los canales Ca_v3 por La^{3+} (**Fig. 9C**). En esta curva se puede apreciar que la actividad de los tres canales Ca_v3 disminuye en función del logaritmo de la concentración del ión lantánido. El mismo tipo de experimentos fueron realizados utilizando Ce^{3+} e Y^{3+} como bloqueadores, obteniéndose resultados cualitativamente similares a los mostrados en presencia de La^{3+} .

Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación de Hill (líneas continuas), para obtener la concentración que bloquea el 50% de la corriente a -40 mV (IC_{50}) y el coeficiente de Hill para cada uno de los lantánidos y para los tres canales Ca_v3 (**Tabla 3**). El La^{3+} presentó la potencia relativa más alta con una IC_{50} de 40 nM para bloquear el 50% de la corriente generada por los canales $Ca_v3.3$, mientras que el valor de IC_{50} más alto se presentó en los canales $Ca_v3.2$ con el Ce^{3+} (210 nM; **Tabla 3**). Asimismo, los canales $Ca_v3.3$ fueron también los más sensibles al bloqueo por Ce^{3+} , mientras que el canal $Ca_v3.2$ fue el más sensible a Y^{3+} ($IC_{50} = 103$ nM), aunque solo se necesita 1.5 veces más de este lantánido para bloquear la misma cantidad de canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$. Por su parte, la IC_{50} de La^{3+} es casi tres veces más grande para bloquear los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ que la de los canales $Ca_v3.3$ (**Tabla 3**). De manera interesante, en estos últimos canales se observa que la potencia del bloqueo (es decir, una menor concentración del bloqueador), es directamente proporcional al radio iónico del lantánido en cuestión. En los otros dos canales tipo T, no existe alguna tendencia entre dichas variables. En todos los casos el coeficiente de Hill (h , parámetro que

define las proporciones moleculares de interacción entre el receptor o canal y el ligando o lantánido), presentó valores entre 0.8 y 1.4 (**Tabla 3**), lo que sugiere una relación de interacción estequiométrica 1:1 entre la molécula bloqueadora y el sitio de unión en el canal.

5.2. Efecto de los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} en la relación corriente-voltaje

La relación corriente-voltaje ($I-V$) de los canales Ca_v3 , se determina aplicando una serie de despolarizaciones graduales, que permiten registrar el valor máximo de la corriente en un amplio intervalo de valores de voltaje, para lo cual se emplearon los protocolos denominados como IV-100 e IV-500 (ver Materiales y Métodos), en ausencia y presencia de los iones lantánidos. Las concentraciones de iones lantánidos usadas en éste y los subsecuentes experimentos fueron las obtenidas a partir de los valores de IC_{50} , ligeramente superiores de tal manera de inducir 55-65% de bloqueo en cada miembro de la familia Ca_v3 y así estudiar con mayor detalle los posibles efectos en las propiedades biofísicas de los canales atribuidas a la interacción con los iones lantánidos.

En la **Fig. 10A** se presentan trazos de corriente que ilustran la corriente generada por los canales $Ca_v3.2$ en respuesta a pulsos despolarizantes desde -80 hasta +80 mV en escalones de 10 mV, a partir de un HP de -100 mV. Los registros se obtuvieron en condiciones Control, en presencia de 250 nM de Ce^{3+} y después de retirar el trivalente de la cámara de registro (Lavado). En las tres condiciones experimentales se observa que conforme los pulsos despolarizantes toman valores más positivos, la cinética de activación e inactivación se hace más rápida, esta característica produce un patrón típico denominado “*criss-crossing*” (entrecruzamiento), en el que la señal de corriente cruza por encima de las anteriores. Este comportamiento se debe a la rápida y casi completa inactivación de los canales $Ca_v3.2$ en el lapso de tiempo ilustrado [79]. También se puede observar que a valores de voltaje cercanos a +80 mV, la deflexión de la señal de corriente es hacia valores positivos, es decir la corriente cambia de dirección y se vuelve saliente (los iones generadores de corriente, ahora transitan del interior al exterior de la célula). En las presentes condiciones de registro las corrientes entrantes son transportadas por iones de Ca^{2+} (2 mM), mientras que las corrientes salientes son generadas por el flujo de iones de Cs^+ (135 mM), ya que estos pueden ser transportados a través de los canales Ca_v3 a determinados valores de voltaje (ver Soluciones de Registro en Materiales y Métodos).

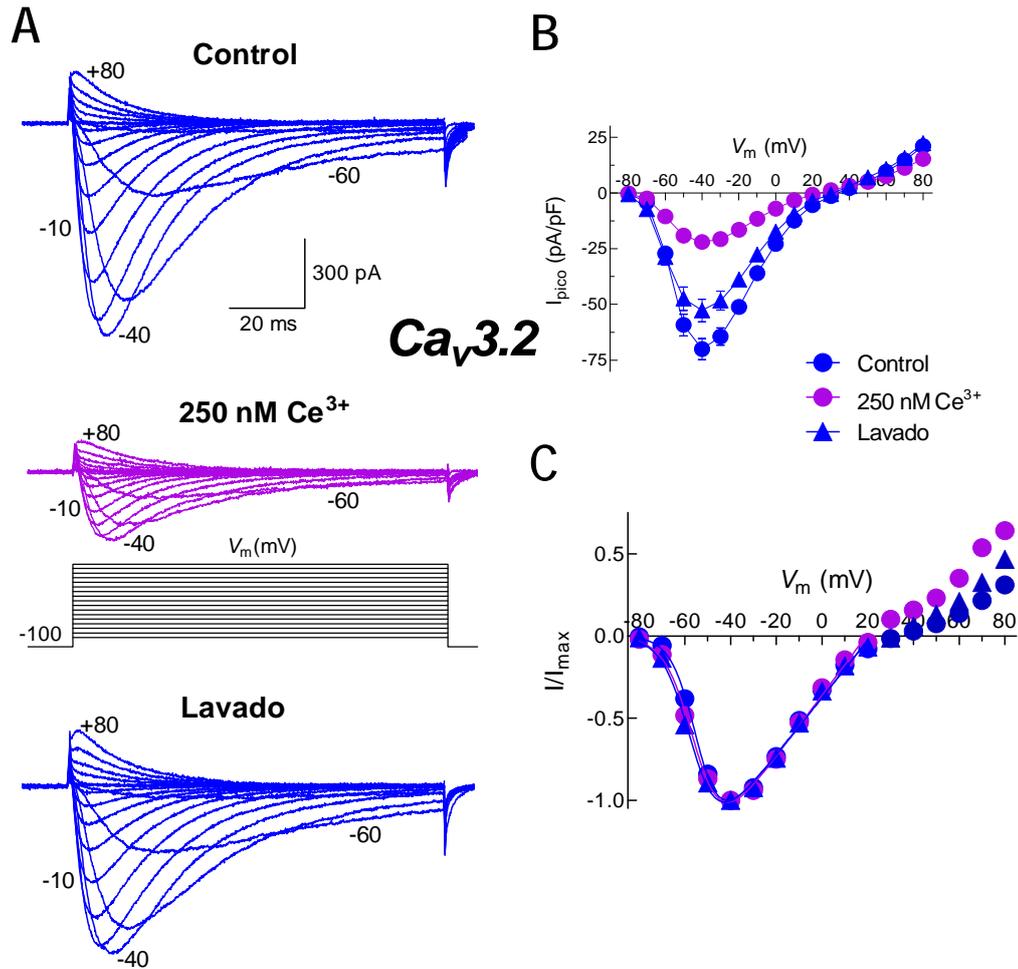


Figura 10. Efecto del Ce³⁺ sobre la relación *I-V* del canal Ca_v3.2. **A)** Familias de trazos representativos de corrientes generadas por los canales Ca_v3.2 en condiciones de Control, en presencia de ion Ce³⁺ (250 nM), y después de retirar éste de la cámara de registro (Lavado). Los registros se obtuvieron en respuesta a pulsos despolarizantes entre -80 y +80 mV, en escalones de 10 mV, a partir de un HP de -100 mV, tal como se ilustra en el protocolo (IV-100) de la parte de en medio. Para fines comparativos se presentan los valores de V_m de algunos trazos. **B)** Variación de la densidad de corriente en función del voltaje (relación *I-V*) de los canales Ca_v3.2 en las mismas condiciones experimentales ilustradas en (A). Los puntos experimentales se obtuvieron dividiendo la amplitud de la corriente al pico a cada uno de los voltajes entre la capacitancia de la célula bajo estudio; estos valores fueron promediados y graficados en función del V_m para cada condición experimental. **C)** Curvas *I-V* normalizadas. La corriente al pico de cada trazo fue normalizada respecto a la corriente al pico máxima de cada célula. Los promedios correspondientes se presentan en función del V_m. Las líneas continuas que unen los valores normalizados (por debajo del voltaje de inversión de la corriente) son el ajuste con la ecuación de Boltzmann modificada, cuyos parámetros se presentan en la **Tabla 4**. Todos los datos se muestran como el promedio ± ESM (*n* = 7).

Por otro lado, el efecto del Ce^{3+} sobre la I_{Ca} de los canales $Ca_v3.2$ se manifiesta como una disminución de la amplitud del pico de corriente a todos los voltajes explorados en comparación con los registros Control (**Fig. 10A**, comparar trazos Control con los de 250 nM Ce^{3+}). No obstante, la amplitud de las corrientes salientes fue claramente menos afectada por la presencia de Ce^{3+} . La amplitud de las corrientes se recuperó casi en su totalidad después de retirar el Ce^{3+} del baño (Lavado). Con la finalidad de realizar un análisis cuantitativo de estas observaciones, la amplitud de corriente máxima registrada a los diferentes potenciales de membrana V_m , se dividió entre el valor de la capacitancia de cada célula para expresar los resultados en términos de densidad de corriente (pF/pA), y evitar de esta manera que el tamaño de las células sea una variable. En la **Fig. 10B**, se grafica el promedio de la densidad de corriente en función del potencial de membrana, en las tres condiciones experimentales exploradas del canal $Ca_v3.2$; en el gráfico se observa que la I_{Ca} comienza a ser detectable a partir de -70 mV, luego aumenta hasta alcanzar una amplitud máxima a -40 mV. Lo anterior refleja la activación gradual de un número de canales cada vez más grande a tales valores de V_m . A potenciales de membrana más despolarizados, la densidad de corriente disminuye gradualmente hasta alcanzar el potencial de inversión V_{rev} (parámetro que se define como el V_m al cual el flujo neto de corriente es igual a cero), a partir del cual la corriente cambia de dirección, de entrante a saliente, por lo que a valores más positivos del V_{rev} la corriente (acarreada por iones Cs^+ , como ya se mencionó) saliente aumenta gradualmente de amplitud. Se puede apreciar en la **Fig. 10B** que, además de la disminución en la densidad de corriente, la relación I-V de los canales $Ca_v3.2$ no se modifica por el efecto del ion Ce^{3+} .

Con la finalidad de obtener parámetros biofísicos que definan las propiedades de activación de los canales $Ca_v3.2$ en las diferentes condiciones experimentales, se construyeron curvas $I-V$ normalizadas a partir de los datos de densidad de corriente y se ajustaron con funciones Boltzmann modificadas (Ecuación 13). Los resultados se resumen en la **Fig. 10C**. En ella se observa que la dependencia al voltaje de la activación de los canales $Ca_v3.2$ no se modifica por la presencia del ión lantánido Ce^{3+} , ya que los datos de la condición control (puntos azules) se traslapan con los obtenidos en presencia del bloqueador Ce^{3+} (puntos color lila). Experimentos como los ilustrados en la **Fig. 10** se repitieron para los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$, y utilizando también como bloqueadores los iones La^{3+} e Y^{3+} ; los parámetros de activación de todos estos experimentos se presentan de manera resumida en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros de activación de los canales Ca_v3 en ausencia y presencia de los iones lantánidos.

		Control			Bloqueador Lantánido			Lavado			<i>n</i>
		<i>V</i> _{1/2}	<i>k</i>	<i>V</i> _{rev}	<i>V</i> _{1/2}	<i>k</i>	<i>V</i> _{rev}	<i>V</i> _{1/2}	<i>k</i>	<i>V</i> _{rev}	
La³⁺	Ca_v3.1	-55.5 ± 1.8	4.5 ± 0.1	22.9 ± 1.0	-55.8 ± 2.2	5.0 ± 0.1*	20.2 ± 1.4	-59.3 ± 1.5	4.7 ± 0.1	21.5 ± 0.8	4
	Ca_v3.2	-53.8 ± 2.0	5.6 ± 0.2	28.4 ± 1.2	-53.3 ± 0.4	6.3 ± 0.2	26.6 ± 1.6	-57.3 ± 0.8	5.9 ± 0.1	26.7 ± 2.2	3
	Ca_v3.3	-54.3 ± 1.3	4.9 ± 0.4	23.9 ± 1.2	-52.8 ± 1.0	6.0 ± 0.2*	24.7 ± 1.1	-54.3 ± 1.7	5.7 ± 0.2	21.2 ± 1.1	4
Ce³⁺	Ca_v3.1	-54.8 ± 0.7	5.0 ± 0.1	24.0 ± 0.4	-53.8 ± 1.1	5.6 ± 0.2*	21.8 ± 0.9*	-54.7 ± 1.5	5.3 ± 0.2	23.4 ± 0.7	6
	Ca_v3.2	-55.0 ± 0.6	5.0 ± 0.1	25.3 ± 0.3	-55.7 ± 0.6	6.0 ± 0.1*	22.2 ± 1.1*	-57.1 ± 0.9	5.8 ± 0.3	25.0 ± 0.6	7
	Ca_v3.3	-50.5 ± 1.0	5.3 ± 0.2	25.5 ± 0.5	-50.6 ± 0.8	6.5 ± 0.3*	23.3 ± 1.4*	-51.7 ± 1.0	6.2 ± 0.2	23.9 ± 0.6	6
Y³⁺	Ca_v3.1	-51.7 ± 1.2	4.9 ± 0.1	26.4 ± 0.6	-54.9 ± 1.3	5.2 ± 0.2	20.1 ± 1.1*	-55.1 ± 1.2	5.4 ± 0.1	24.0 ± 0.5	5
	Ca_v3.2	-54.0 ± 1.0	4.8 ± 0.2	26.3 ± 0.9	-56.1 ± 1.0	5.8 ± 0.2	22.0 ± 2.0	-60.9 ± 1.2	5.3 ± 0.2	24.9 ± 1.2	6
	Ca_v3.3	-47.2 ± 1.2	5.0 ± 0.2	25.6 ± 0.7	-46.9 ± 1.3	6.4 ± 0.3*	21.8 ± 1.6*	-49.3 ± 1.8	5.8 ± 0.2	24.4 ± 1.1	6

Todos los datos están dados en mV y representan el promedio ± ESM. El número de células estudiadas en cada caso se muestra en la columna de la extrema derecha. *Significancia estadística con *t* de Student (*P* < 0.05).

De los tres parámetros de activación de la corriente de los canales Ca_v3 proporcionados por los ajustes de las curvas $I-V$ (**Tabla 4**), el que determina la dependencia al voltaje de la activación es el valor de $V_{1/2}$. Este parámetro no fue modificado significativamente por ninguno de los iones trivalentes, lo que indica que el bloqueo por los lantánidos no interfiere con la activación o *gating* de los canales Ca_v3 . Por otro lado, aunque los tres lantánidos modificaron significativamente el valor del parámetro k , este fenómeno no se presentó en todos los canales y los cambios fueron ciertamente discretos (1.4 mV fue el mayor cambio; Y^{3+} en canales $Ca_v3.3$; **Tabla 4**). Estos cambios pequeños en la pendiente de la curva $I-V$ a consecuencia del bloqueo por los lantánidos, son consistentes con la ausencia de efectos sobre la activación dependientes de voltaje de los canales Ca_v3 .

5.3. Efecto de los lantánidos trivalentes en la selectividad de los canales Ca_v3

El tercer parámetro proporcionado por los ajustes de las curvas $I-V$ es el valor de V_{rev} , que indica el valor de V_m al cual el canal permite el flujo de iones, es decir, en lugar de conducir corriente hacia el interior ahora lo hace hacia el exterior de la célula. Los datos de la **Tabla 4** muestran que tanto el Ce^{3+} como el Y^{3+} indujeron cambios significativos en el valor de V_{rev} , mientras que el La^{3+} no generó diferencias significativas. Los cambios más sustanciales se observaron en los canales $Ca_v3.1$ cuyo valor de V_{rev} cambio 6.3 mV hacia valores más negativos en presencia del bloqueador Y^{3+} , siguió en orden descendente el canal $Ca_v3.3$ con 3.8 mV en la misma dirección. Los cambios en presencia del ion Ce^{3+} fueron menos drásticos.

Debido a que el V_{rev} es un indicador de la interacción entre el ion permeante (en este caso Ca^{2+}) y su sitio de unión en el poro del canal (es decir, el filtro de selectividad) y que dicha interacción puede ser modificada por la acción de un bloqueador (Y^{3+} por ejemplo) al competir por el mismo sitio de unión u otro sitio ubicado en la ruta de permeación del canal, entonces los resultados de la **Tabla 3** sugieren que el canal $Ca_v3.1$ tiene una interacción molecular más débil con el ion Ca^{2+} en presencia del Y^{3+} , de tal suerte que se requiere un menor voltaje ($V_m \sim +20$ mV) para que fluyan iones a través del canal en comparación con el que se requiere en ausencia del bloqueador trivalente ($V_m \sim +26$ mV).

5.4. Relación entre el porcentaje de bloqueo de los canales Ca_v3 y el voltaje

Con la finalidad de conocer si el bloqueo de la corriente de calcio tipo T por los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} es dependiente del voltaje, se calculó el porcentaje de inhibición de la corriente a cada voltaje (a partir de registros como los que se presentan en la **Fig. 10 A**),

se promedió entre grupos de células y se graficó en función del voltaje respectivo para cada condición experimental (**Fig. 11**). Con excepción del efecto de La^{3+} sobre los canales $\text{Ca}_v3.3$ (**Fig. 11A**), los cuales muestra cierta tendencia a experimentar un mayor bloqueo ($56.8 \pm 4.3\%$ a -50 mV) a voltajes negativos con respecto a voltajes más positivos ($45.3 \pm 3.4\%$ a $+10$ mV), en el resto de los resultados indica que no existe una dependencia al voltaje en el bloqueo de los canales Ca_v3 por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} .

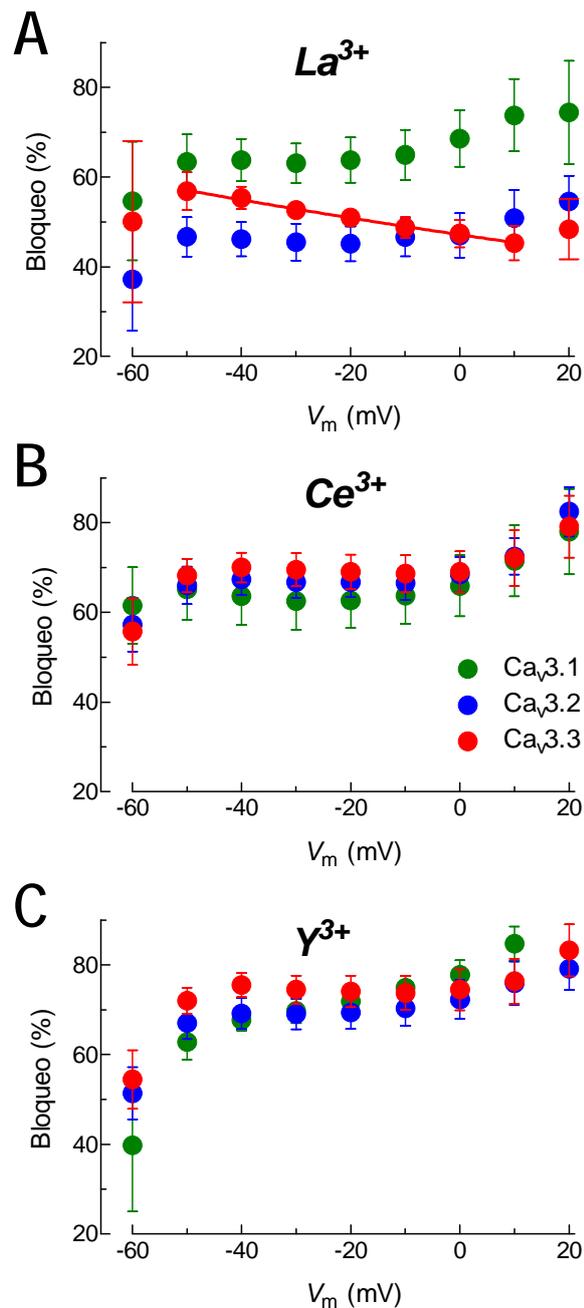


Figura 11. Porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} por iones trivalentes en función del voltaje. Se grafica el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} en función del valor de V_m para cada uno de los canales Ca_v3 , utilizando como bloqueador La^{3+} (A), Ce^{3+} (B), e Y^{3+} (C). Los puntos experimentales se presentan como el promedio \pm ESM ($n = 3-9$).

5.5. Efecto de potenciales extremos positivos y negativos en el bloqueo por lantánidos de los canales Ca_v3

Los canales Ca_v3 presentan la característica de desactivarse (cerrarse) lentamente en respuesta a la repolarización de la membrana, lo que genera colas de corriente debido al incremento en la fuerza impulsora (ver Introducción, apartado 2.3C) para la entrada de Ca^{2+} a través de los canales que se encontraban abiertos al momento de repolarizar el V_m (ver Métodos). Por lo tanto, las colas de corriente representan el cierre de los canales abiertos por la despolarización y que no se inactivaron durante el pulso despolarizante.

Con la finalidad de investigar con mayor detalle el efecto bloqueador de los iones lantánidos sobre la actividad de los canales Ca_v3 , se diseñaron protocolos de voltaje para registrar colas de corrientes generadas a valores extremos del V_m (positivos y negativos) para explorar la posibilidad de que a estos valores de V_m el bloqueo de los canales Ca_v3 por los iones trivalentes sea diferente al observado en las curvas $I-V$ (**Fig. 10**), así como estudiar los posibles efectos en la cinética de desactivación de los canales.

5.6. La hiperpolarización a voltajes extremos promueve el desbloqueo de los canales Ca_v3 en presencia de La^{3+} y Ce^{3+}

En trabajos previos se ha demostrado que la aplicación de potenciales negativos extremos libera a los canales iónicos dependientes de voltaje del bloqueo inducido por diferentes iones inorgánicos [69, 80-84]. En el presente trabajo se exploró esta posibilidad con cada uno de los iones trivalentes y en los tres canales tipo T. Un ejemplo de los experimentos realizados se presenta en la **Fig. 12**, donde se muestran trazos representativos de las colas de corriente generadas a través de los canales $Ca_v3.3$ en ausencia (**Fig. 12 A**), presencia (**Fig. 12 B**) y después de la exposición a 150 nM de Ce^{3+} (**Fig. 12 C**), en respuesta al protocolo que se ilustra en el panel B. Al igual que en el resto de los protocolos utilizados en el presente trabajo de tesis, los protocolos de colas de corriente se aplicaron antes y después de alcanzar un bloqueo estacionario monitoreado mediante la aplicación de pulsos de prueba a -40 mV. Con fines de claridad, en la **Fig. 12** solo se presentan registros de colas de corriente registradas después de repolarizar al membrana a -180, -150, -120, y -90 mV, aunque se obtuvieron registros en el rango de voltajes de -180 a 0 mV cada 10 mV. A simple vista se puede notar el bloqueo inducido por el Ce^{3+} en la amplitud de las colas de corriente a todos

los potenciales ilustrados (**Fig. 12B**). Por el contrario, la cinética del cierre de los canales no presenta cambios perceptibles a primera vista.

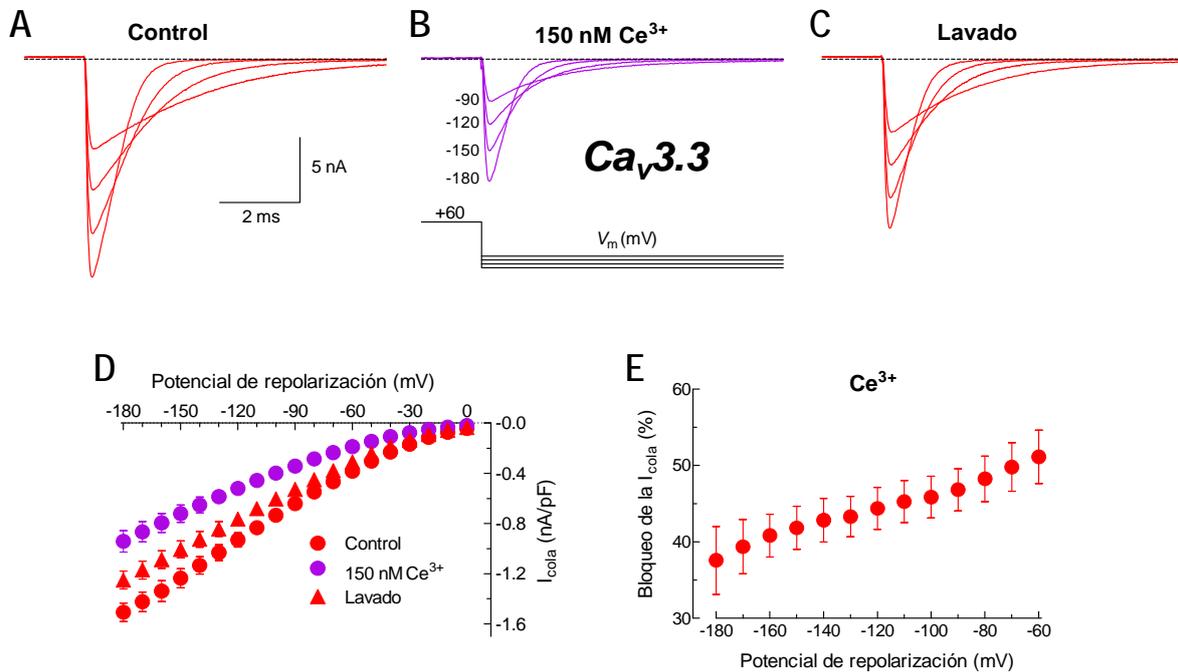


Figura 12. El bloqueo por Ce^{3+} de los canales $\text{Ca}_v3.3$ disminuye a voltajes negativos extremos. Trazos representativos de colas de corriente generadas por canales $\text{Ca}_v3.3$ en ausencia (**A**), presencia (**B**) y después de retirar el ion Ce^{3+} de la cámara de registro (**C**). Las colas de corriente se obtuvieron al aplicar el protocolo iiv+60-180 (ver protocolos de voltaje). Para mayor claridad solo se muestran los últimos 1.5 s del pulso despolarizante a +60 mV y los primeros 7.5 s de la repolarización a -180, -150, -120, y -90 mV. **D**) Amplitud de las colas de corriente (I_{cola} ; en nA/pF) del canal $\text{Ca}_v3.3$ en función del potencial de repolarización al cual fueron evocadas en las condiciones experimentales indicadas. **E**) Porcentaje de bloqueo de la I_{cola} de los canales $\text{Ca}_v3.3$ a cada potencial de repolarización explorado en presencia de Ce^{3+} . El porcentaje de bloqueo se calculó a partir de los datos contenidos en (**D**). Los puntos experimentales se muestran como el promedio \pm ESM ($n = 5$).

En la **Fig. 12D** se muestran los resultados para los canales $\text{Ca}_v3.3$, donde se graficó el valor promedio de la corriente de cola en función del voltaje de repolarización al que ésta fue evocada, bajo las tres condiciones experimentales exploradas (Control, Ce^{3+} y Lavado). Los resultados muestran una disminución de la amplitud de la corriente debida al bloqueo por el ión Ce^{3+} . Para determinar si el bloqueo por Ce^{3+} de los canales $\text{Ca}_v3.3$ se modifica en relación con el voltaje aplicado, se calculó el porcentaje de bloqueo a cada voltaje de repolarización estudiado y se promedió entre grupo de células y se graficó para cada condición experimental (**Fig. 12E**). Los resultados muestran que el bloqueo por Ce^{3+} disminuye conforme se repolariza a voltajes más negativos. El porcentaje de bloqueo

disminuyó de manera significativa de 51.1 ± 3.5 a -60 mV a $37.6 \pm 4.4\%$ a -180 mV ($n = 5$, $P = 0.0435$).

Aplicando el mismo tipo de análisis descrito arriba, se obtuvieron los datos correspondientes a los tres canales Ca_v3 y los tres lantánidos estudiados en la presente disertación; los resultados se presentan de manera resumida en la **Fig. 13**. Se observa que el efecto de desbloqueo a potenciales negativos fue más evidente en los canales $Ca_v3.1$ en presencia de La^{3+} , cuyo bloqueo fue de 67.9 ± 2.0 a -60 mV, pero de solo $38.0 \pm 1.1\%$ a -180 mV ($n = 5$, $P = 0.0001$). El resultado anterior se puede traducir como un desbloqueo del 56% de los canales $Ca_v3.1$ que se encontraban bloqueados por La^{3+} a -60 mV. La diferencia de bloqueo entre tales voltajes fue menos pronunciado para los canales $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ (**Fig. 13A**). Asimismo, para el antagonista Ce^{3+} se observó una tendencia similar a la exhibida con La^{3+} , es decir, un mayor porcentaje de bloqueo a valores de potencial de repolarización más negativos (**Fig. 13B**), particularmente para los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$. Por el contrario, el bloqueo por Y^{3+} de los canales Ca_v3 parece ser independiente del potencial de repolarización (**Fig. 13C**). Estos resultados demuestran que los potenciales extremos negativos son incapaces de desbloquear a los canales Ca_v3 cuando dichos canales son inhibidos por el ion Y^{3+} , ya que, el bloqueo observado con los pulsos de prueba a -40 mV así como el obtenido a potenciales extremos negativos, es prácticamente el mismo. De los tres canales Ca_v3 , la subunidad $Ca_v3.2$ resultó ser la menos afectada por la aplicación de potenciales negativos extremos, mientras que la subunidad $Ca_v3.1$ presentó las mayores modificaciones (un marcado bloqueo dependiente del voltaje de repolarización) efecto que es más evidente en la presencia de La^{3+} (**Fig. 13A**).

5.7. Efecto de potenciales extremos positivos en el bloqueo de los canales Ca_v3 por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+}

Algunos trabajos de investigación han demostrado que la aplicación de potenciales positivos extremos libera transitoriamente a los canales de calcio dependientes de voltaje del bloqueo inducido por varios iones inorgánicos [81, 85-86]. En este sentido, el presente trabajo de tesis abordó el efecto de los potenciales extremos positivos sobre el bloqueo de los canales Ca_v3 por iones lantánidos.

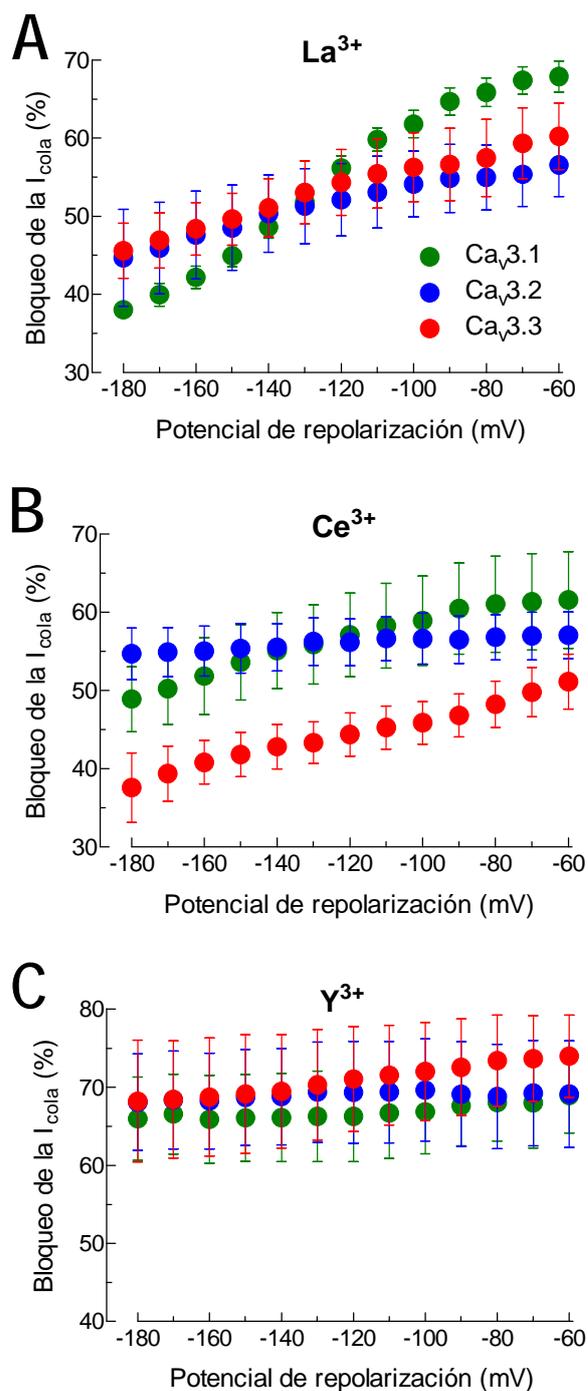


Figura 13. Efecto de potenciales negativos extremos en el bloqueo de los canales Ca_v3 por iones trivalentes. Porcentaje de bloqueo de las corrientes de cola (I_{cola}) de los canales Ca_v3 a cada potencial de repolarización explorado en presencia de La^{3+} (A), Ce^{3+} (B) e Y^{3+} (C). Los valores experimentales se presentan como el promedio \pm ESM ($n = 5-7$).

En estos experimentos las colas de corriente fueron generadas al repolarizar la membrana a -100 mV después de promover la activación de los canales con pulsos despolarizantes a voltajes positivos extremos y repolarizar la membrana justo antes de que se inicie la

inactivación de los canales (ver protocolo iiv-20+160). Un ejemplo de este tipo de experimentos se presenta de manera resumida en la **Fig. 14**. En primer lugar se muestran trazos representativos de corrientes registradas en células que expresan de manera estable los canales $Ca_v3.3$ en condición control (**Fig. 14A**) y en presencia de 50 nM de La^{3+} (**Fig. 14B**). Para fines de claridad solo se muestran 8 trazos de los 15 obtenidos en cada protocolo, mismo que se muestra en la parte inferior de la **Fig. 14B**.

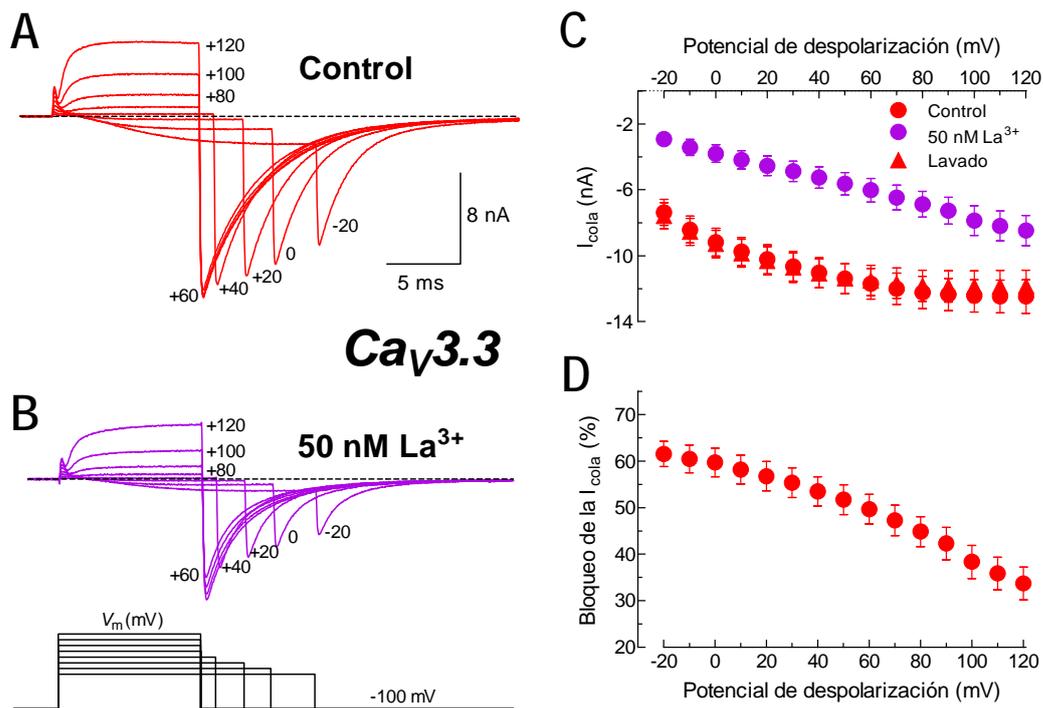


Figura 14. Efecto de potenciales positivos extremos en el bloqueo por La^{3+} de las colas de corriente de los canales $Ca_v3.3$. Trazos representativos de las colas de corriente de los canales $Ca_v3.3$ en ausencia (A) y presencia (B) del ión La^{3+} generadas al aplicar el protocolo que se ilustra en (B). Para mayor claridad solo se muestran los trazos a los potenciales indicados. C) Amplitud de las colas de corriente (I_{cola}) en función del potencial de despolarización, en las condiciones experimentales indicadas. D) Porcentaje de bloqueo de las I_{cola} de los canales $Ca_v3.3$ a cada potencial de despolarización. El porcentaje de bloqueo se calculó a partir de los datos contenidos en (C). Los datos se muestran como el promedio \pm ESM ($n = 3-5$).

La información de mayor interés en este tipo de protocolos se encuentra en la cola de corriente que se genera al repolarizar la membrana a -100 mV, ya que la amplitud de ésta es indicativa del número de canales que se activan a dicho valor de voltaje sin que ocurra la inactivación de los mismos. Los datos muestran que la presencia de La^{3+} provocó una disminución considerable en la amplitud de las colas de corriente de los canales $Ca_v3.3$ a

todos los voltajes explorados (comparar registros de **Fig. 14B** con los de **14A**). Con los valores promedio de la amplitud de las colas de corriente en las tres condiciones experimentales estudiadas: en ausencia (Control), presencia (150 nM La^{3+}), y después de retirar el La^{3+} (Lavado) de la cámara de registro se construyó la **Fig. 14C**; en la que se aprecia un incremento de la amplitud de las colas de corriente conforme el valor del pulso despolarizante es más positivo, lo cual indica que los canales $\text{Ca}_v3.3$ siguen activándose a potenciales muy positivos (al menos hasta +80 mV). El mismo fenómeno se observa en presencia del lantánido, excepto que la amplitud de las colas de corriente es menor; se observa también que con el Lavado se recupera completamente la actividad de los canales $\text{Ca}_v3.3$ que fueron bloqueados por La^{3+} . A partir de estos datos se calculó el porcentaje de bloqueo de la I_{Cola} debido al efecto del La^{3+} sobre los canales Ca_v3 se graficó en función del valor de V_m en la **Fig. 14D**, donde se puede apreciar que el bloqueo de la I_{Cola} disminuye conforme el valor del pulso despolarizante es más positivo, indicando un desbloqueo de canales a voltajes positivos.

Experimentos como los descritos en la **Fig. 14** se realizaron con los tres iones trivalentes (La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+}) en los tres tipos de canales, y el resumen de los resultados se presenta en la **Fig. 15**. En esta figura se observa que en presencia de los iones La^{3+} y Ce^{3+} la subunidad $\text{Ca}_v3.3$ presentó el mayor desbloqueo durante la aplicación de potenciales extremos positivos, reduciendo prácticamente a la mitad el número de canales bloqueados al pasar de un potencial de despolarización de -20 a +120 mV (**Fig. 15 A, y B**). Por otra parte, el efecto sobre las subunidades $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ en presencia de La^{3+} y Ce^{3+} fue más discreto, aunque significativo (con La^{3+}). Curiosamente, la subunidad $\text{Ca}_v3.1$ muestra una clara deflexión a partir de +60 mV, después del cual el desbloqueo de canales es más marcado.

Contrario a lo anterior, no se observó un desbloqueo de los canales Ca_v3 a potenciales extremos positivos cuando el agente antagonista fue el lantánido Y^{3+} (**Fig. 15C**), esta observación es consistente con los resultados obtenidos para este mismo ion cuando se exploran potenciales extremos negativos (**Fig. 13C**). De igual manera, el canal $\text{Ca}_v3.2$ es el que muestra menor desbloqueo dependiente del voltaje. En resumen, los voltajes positivos extremos promueven de manera significativa el desbloqueo de los canales Ca_v3 en presencia de los iones lantánidos La^{3+} y Ce^{3+} pero no tienen efecto cuando el agente bloqueador es el Y^{3+} .

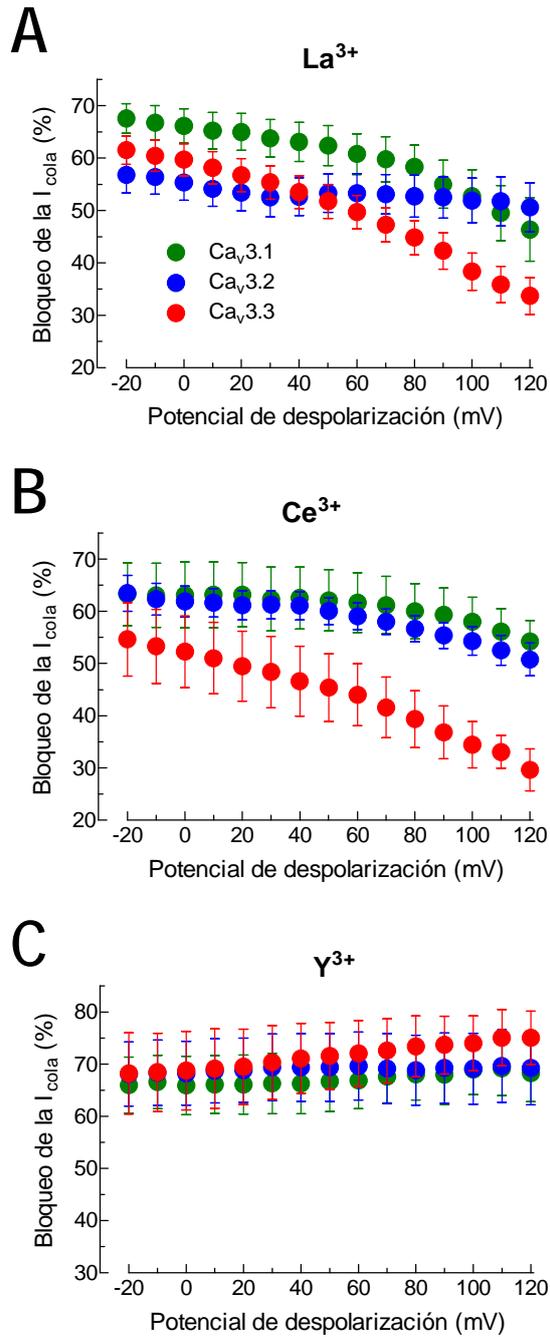


Figura. 15. Efecto de potenciales positivos extremos en el bloqueo de los canales Ca_v3 por lantánidos. Porcentaje de bloqueo de las corrientes de cola (I_{cola}) de los canales Ca_v3 a cada potencial de despolarización explorado en presencia de La^{3+} (**A**), Ce^{3+} (**B**) e Y^{3+} (**C**). Los valores experimentales se presentan como el promedio \pm ESM ($n = 3-9$).

5.8. Efecto de los iones lantánidos sobre la cinética de activación, inactivación y desactivación de los canales Ca_v3

Para determinar el efecto de los iones lantánidos sobre la cinética de activación e inactivación de los canales Ca_v3 se analizaron los registros de corriente como los que se muestran en la **Fig. 10A**. Un resumen de los resultados se presenta en la **Fig. 16A**, donde se presentan trazos representativos de la corriente generada a -50 y -20 mV, en condición Control y en presencia de 150 nM La^{3+} para el canal $Ca_v3.1$. Para fines comparativos los trazos de corriente en presencia de La^{3+} han sido normalizados respecto a la amplitud de los trazos Control. En esta figura se observa que en presencia de La^{3+} , el pico de corriente de calcio a -50 mV se alcanza más rápido que en la condición Control, mientras que a -20 mV la inactivación es la que se observa más rápida. Cada uno de los trazos (señales de corriente) fue ajustado con dos funciones exponenciales, una para la activación (la deflexión de corriente que se aleja de la corriente basal) y otra para la inactivación (la disminución de la corriente que la acerca nuevamente a la basal), a partir de las cuales se obtuvieron las respectivas constantes de tiempo. Un ejemplo de tal ajuste se ilustra con el trazo Control a -50 mV (**Fig. 16A**, puntos verdes y línea negra). Los valores promedio de las constantes de tiempo de activación se graficaron en función del V_m respectivo en la **Fig. 16B**. Los resultados experimentales indican que la corriente de los canales $Ca_v3.1$ se acelera en presencia del La^{3+} (la constante de tiempo es más pequeña que la del Control), aunque dicho efecto se limita a voltajes entre -60 y -40 mV. A voltajes más positivos que -30 mV la constante de tiempo de inactivación se vuelve independiente de voltaje, ya que el valor de la misma se mantuvo constante hasta +20 mV. Por su parte la inactivación de los mismos canales presentó una cinética más rápida a voltajes más positivos que -30 mV (**Fig. 16C**). Lo cual queda ilustrado con los registros de corriente a -20 mV (**Fig. 16A**). El mismo tipo de análisis se realizó para las tres subunidades de los canales Ca_v3 en presencia de La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , sin embargo, las modificaciones más importantes son las mostradas para los canales $Ca_v3.1$ y únicamente en presencia de La^{3+} .

Con el propósito de investigar si el bloqueo por los iones lantánidos modifica la cinética de desactivación (cierre) de los canales Ca_v3 , se analizaron los registros de colas de corriente obtenidos como se ilustra en la **Fig. 12A**. Para medir la cinética de desactivación de los canales Ca_v3 , las colas de corriente evocadas a cada voltaje fueron ajustadas con una función biexponencial, a partir de las cuales se calculó una constante de tiempo ponderada (tau ponderada; ver Materiales y Métodos), la cual considera las componentes rápido y lento del

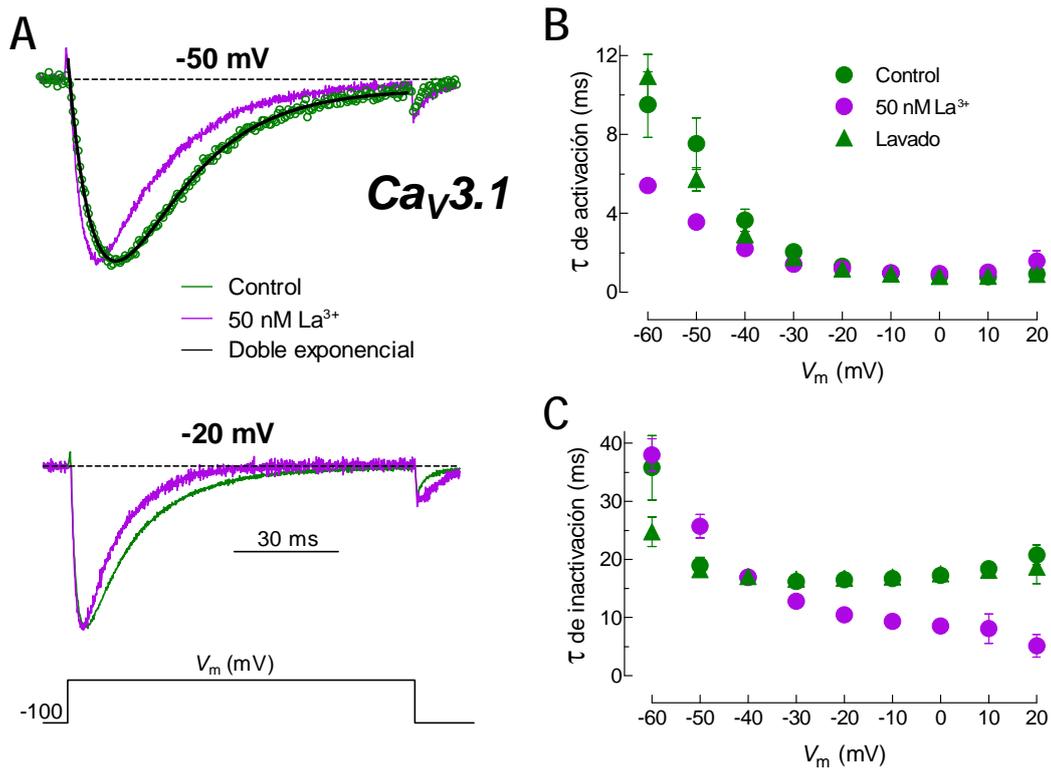


Figura 16. Efecto del bloqueo por La^{3+} en la cinética de activación e inactivación de los canales $Ca_v3.1$. A) Ejemplos de trazos de corriente de los canales $Ca_v3.1$ registrados a -50 y -20 mV en ausencia (puntos y trazos verdes) y presencia de La^{3+} (trazos lila). Las corrientes fueron generadas en respuesta a los V_m indicados partiendo de un HP de -100 mV. El registro Control a -50 mV se representa con puntos (en lugar de una línea continua), para mostrar con mayor claridad el ajuste con dos exponenciales que se hizo de cada trazo (línea negra). Asimismo, los registros obtenidos en presencia de La^{3+} se normalizaron respecto a la amplitud de los trazos Control. A partir de dichos ajustes se obtuvo la constante de tiempo de activación y de inactivación para cada voltaje en ambas condiciones experimentales, mismas que se presentan en función del voltaje en (B) y (C). Los puntos experimentales se presentan como el promedio \pm ESM ($n = 4$).

proceso de cierre de los canales, misma que se graficó en función del V_m (Fig. 17). En la Fig. 17A se muestran corrientes de cola representativas de los canales $Ca_v3.1$ antes (Control), durante (150 nM La^{3+}) y después de exponer la célula al bloqueo por el lantánido referido. Las señales de corriente fueron registradas en respuesta al protocolo iiv+60-180 que se ilustra parcialmente en el panel de en medio. Debido a que la información de interés en este tipo de protocolos se centra en la cola de corriente, solo se muestra la parte del protocolo y de los trazos de corriente donde aquellas tienen lugar. Asimismo, para cada condición experimental solo se presentan las colas de corriente obtenidas al repolarizar la membrana a -180, -150 -120 y -90 mV.

El efecto del La^{3+} sobre las colas de corriente se manifestó en dos aspectos; primero, el más obvio, una reducción de la amplitud de cada una de las colas de corriente; segundo, menos evidente a simple vista, un enlentecimiento que se observa para alcanzar el pico de la cola de corriente. Este efecto se aprecia mejor en el Inserto del panel del protocolo, en el cual se presentan las colas de corriente a -120 mV normalizadas respecto a la amplitud máxima del trazo Control. Se nota que el pico de la cola de corriente en presencia de La^{3+} se alcanza después del Control, este fenómeno sugiere que durante la repolarización de la membrana el La^{3+} es desplazado de su sitio de unión de tal manera que algunos canales originalmente bloqueados pueden conducir corriente transitoriamente antes de cerrarse, lo que se refleja como un aparente enlentecimiento para alcanzar el pico máximo de la cola de corriente. En otras palabras, existe un desbloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.1$ durante el flujo de corriente de Ca^{2+} al interior de la célula, de tal manera que se va incrementando el número de canales que contribuyen a la corriente total. Este efecto únicamente se observó en el canal $\text{Ca}_v3.1$ y cuando el antagonista fue el La^{3+} . En la **Fig. 17B** se grafican las constantes de tiempo promediadas para las condiciones experimentales indicadas en la **Fig. 17A**. Se observa que el ion La^{3+} enlentece el cierre del canal $\text{Ca}_v3.1$ sobre todo a voltajes entre -100 y -60 mV, es decir, en un rango de voltajes ciertamente fisiológico. En las **Figs. 17C y 17D** se muestran los gráficos correspondientes para los canales $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$, en presencia de Y^{3+} y Ce^{3+} , respectivamente. En ambos casos, no hubo efectos de desbloqueo durante la cola de corriente como en el caso del La^{3+} en el canal $\text{Ca}_v3.1$, en estos casos la acción de los trivalentes consistió en acelerar la cinética de cierre, particularmente el Y^{3+} en los canales $\text{Ca}_v3.2$, mientras que los efectos del Ce^{3+} fueron más discretos sobre el canal $\text{Ca}_v3.3$.

En los tres gráficos de la **Fig. 17** se aprecia que los efectos de los lantánidos sobre la cinética del cierre de los canales son más evidentes dentro del intervalo de voltajes de -100 a -60 mV, mientras que a valores de V_m entre -180 y -110, los valores de las tau ponderada prácticamente se traslapan, indicando que el bloqueo por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} no modifican la cinética de desactivación de los canales Ca_v3 en dicho rango de voltajes (**Tabla 5**). Es importante mencionar que aunque con el protocolo de colas de corriente se exploró el intervalo de voltajes desde -180 hasta 0 mV, los datos de los ajustes más positivos que -60 mV no se consideran porque a tales voltajes el cierre de los canales Ca_v3 podría estar acompañado de la inactivación de los canales que se activan a dichos voltajes, por lo tanto solo se presentan las constantes de tiempo de los voltajes donde las colas de corriente representan casi exclusivamente el cierre de los canales.

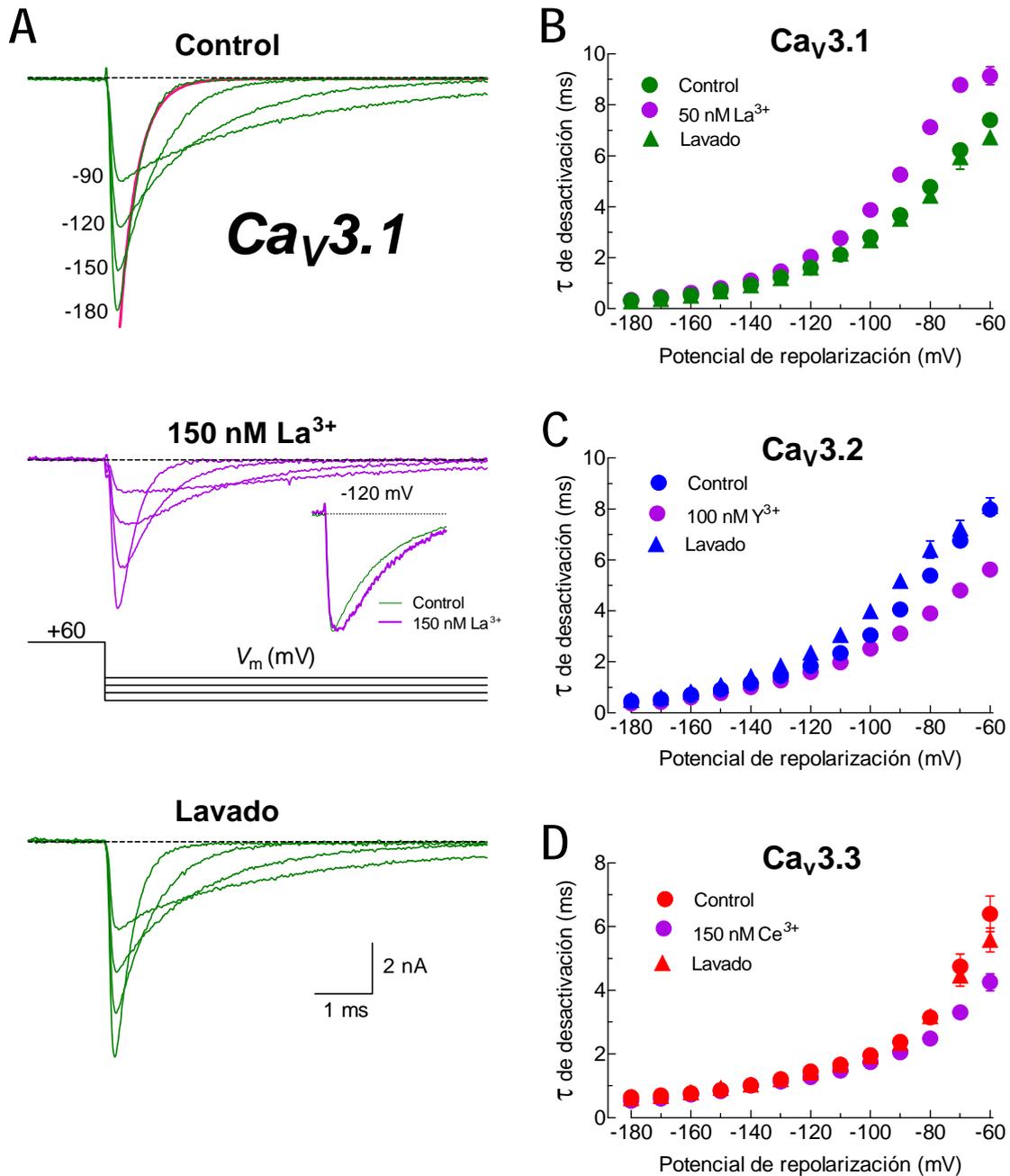


Figura 17. Alteraciones en el cierre de los canales Ca_v3 inducidos por los iones trivalentes. A) Colas de corriente representativas de los canales Ca_v3.1 en ausencia (**Control**), presencia (**150 nM La³⁺**) y después de retirar el lantánido de la cámara de registro (**Lavado**), generadas al aplicar el protocolo iiv+60-180 (ilustrado al pie del panel de en medio). Para mayor claridad solo se muestran 4 trazos obtenidos a los potenciales de repolarización indicados. El ajuste con funciones exponenciales de cada una de las colas de corriente se ilustra en el trazo a -180 mV en la condición Control con una línea continua color rosa sobre el trazo de corriente en verde. En el inserto del panel de en medio se compara las colas de corriente normalizadas a -120 mV para ilustrar el efecto del La³⁺ sobre la cinética del cierre de los canales (ver explicación en texto). La relación entre las constantes de tiempo y el voltaje de repolarización en las condiciones indicadas para los canales Ca_v3.1 se muestra en (B), para Ca_v3.2 en (C) y para Ca_v3.3 en (D). Los puntos experimentales son el promedio ± ESM ($n = 4-7$).

Tabla 5. Constantes de tiempo de la cinética de cierre de los canales Ca_v3 en ausencia y presencia de los iones lantánidos.

		Ca _v 3.1			Ca _v 3.2			Ca _v 3.3		
		Control	Bloqueo	Lavado	Control	Bloqueo	Lavado	Control	Bloqueo	Lavado
La³⁺	-80 mV	4.8 ± 0.4	7.1 ± 0.5*	4.4 ± 0.1	5.5 ± 0.6	4.7 ± 0.6	4.8 ± 0.7	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.5
	-60 mV	7.4 ± 0.4	9.1 ± 0.9	6.7 ± 0.1	8.8 ± 1.3	7.6 ± 2.0	7.4 ± 1.4	3.4 ± 0.4	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.3
Ce³⁺	-80 mV	4.9 ± 0.6	5.6 ± 0.7	4.8 ± 0.6	5.4 ± 0.4	4.5 ± 0.3	4.7 ± 0.4	3.3 ± 0.5	2.2 ± 0.4	3.0 ± 0.5
	-60 mV	8.6 ± 1.4	8.5 ± 1.4	8.8 ± 1.5	8.5 ± 0.5	6.1 ± 0.6*	7.5 ± 0.7	5.7 ± 1.9	3.6 ± 1.4	5.3 ± 1.5
Y³⁺	-80 mV	5.4 ± 0.4	3.9 ± 0.1*	5.3 ± 0.6	5.4 ± 0.5	3.9 ± 0.3*	6.4 ± 0.7	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.4
	-60 mV	8.2 ± 0.6	6.1 ± 0.3*	8.2 ± 0.8	8.0 ± 0.5	5.6 ± 0.4*	8.1 ± 0.7	3.3 ± 0.5	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.6

Todos los datos están dados en ms y representan el promedio ± ESM. El número de células estudiadas en cada caso varió de 5 a 7.

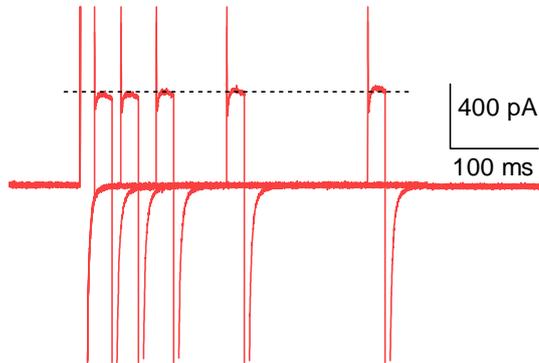
*Significancia estadística con *t* de Student (P < 0.05).

5.9. El bloqueo por Ce^{3+} incluye una interacción con el estado cerrado de los canales $Ca_v3.3$

Como último aspecto a investigar en el presente trabajo de tesis, se estudió el posible efecto del Ce^{3+} en el estado cerrado de los canales $Ca_v3.3$. Para tal propósito se utilizó un protocolo de voltaje descrito inicialmente por el grupo del Dr. Stephen W. Jones [70], en dicho trabajo se demuestra que el ion Y^{3+} se une a la conformación cerrada del canal $Ca_v3.1$. En la **Fig. 18** se presenta una versión modificada de dicho protocolo, el cual se aplicó en los canales $Ca_v3.3$ para obtener los resultados que se muestran en la misma figura. La información relevante en este tipo de trazos se obtiene de la corriente saliente (iones Cs^+ a través de los canales $Ca_v3.3$) en respuesta al pulso despolarizante a +80 mV. Éste se aplica a diferentes intervalos de tiempo después de que los canales han sido activados a +200 mV (5 ms) para promover su desbloqueo por Ce^{3+} y cerrados rápidamente a -200 mV para evitar el rebloqueo durante la cola de corriente que se genera. Así al regresar a -100 mV, se presume que el canal se encuentra cerrado sin el Ce^{3+} unido al canal. Un dato que soporta tal conjetura se desprende de la **Fig. 15B** al mostrar que el bloqueo por Ce^{3+} de los canales $Ca_v3.3$ a +120 mV es de solo un $29 \pm 4\%$. Además la comparación directa entre la amplitud del 1^{er} pulso a +80 mV antes y después de añadir Ce^{3+} a la cámara de registro indica una disminución del $25 \pm 4\%$ ($n = 6$; **Fig. 18**). Por lo tanto, la aplicación del protocolo de la **Fig. 18**, promueve un desbloqueo de los canales, de tal manera que solo 25% de ellos permanece con el ion Ce^{3+} unido (bloqueándolo). Así, la reducción gradual de la corriente que se observa con la aplicación de pulsos subsecuentes a +80 mV en presencia del trivalente sucede porque éste se une al canal en el estado cerrado y conforme aumenta el tiempo que el canal permanece cerrado (a -100 mV) aumenta el número de canales bloqueados y por ende se presenta una mayor reducción en la corriente saliente (**Fig. 18**, trazos 150 nM Ce^{3+}). El porcentaje de disminución promedio en la amplitud de la corriente entre el 1^{er} y 5^o pulso a +80 fue de $18.7 \pm 1.5\%$ ($n = 6$), indicando que el bloqueo por Ce^{3+} incluye un componente de bloqueo en el estado cerrado del canal $Ca_v3.3$. Esta misma serie de experimentos se realizó para las subunidades $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, en presencia de Ce^{3+} (datos no mostrados), sin embargo, los efectos no fueron tan evidentes como los observados en los canales $Ca_v3.3$.

Ca_v3.3

Control



150 nM Ce³⁺

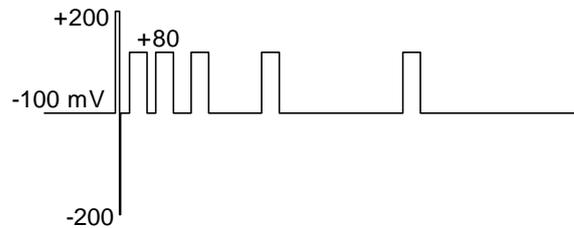
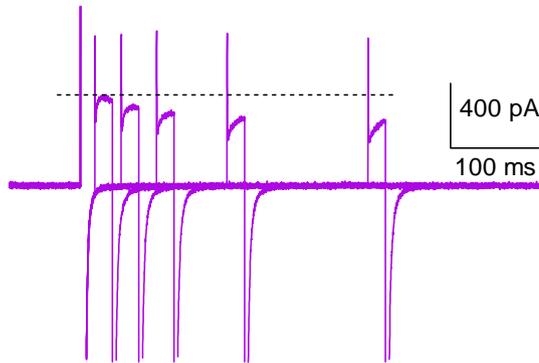


Figura 18. El ion Ce³⁺ interacciona con el estado cerrado de los canales Ca_v3.3. Trazos de corriente generados al aplicar el protocolo BCS (esquematizado abajo), que permite explorar el estado cerrado del canal, y el cual se aplicó en la condición Control y en presencia de 150 nM de Ce³⁺. La información relevante en este tipo de trazos radica en la corriente saliente en respuesta al pulso a +80 mV, el cual se aplica a diferentes intervalos de tiempo después de que los canales han sido activados a +200 mV (5 ms) para liberarlos del bloqueo por Ce³⁺ y cerrados a -200 mV (1 ms) sin permitir un rebloqueo durante la cola de corriente que se genera. Así al regresar a -100 mV el canal se encuentra cerrado sin el Ce³⁺ unido al canal, de tal manera que la reducción gradual en la corriente en presencia del trivalente sucede porque éste se une al canal en el estado cerrado y conforme aumenta el tiempo que el canal permanece cerrado (a -100 mV) aumenta el número de canales bloqueados y por ende mayor reducción en la corriente saliente. El porcentaje de disminución promedio en la amplitud de la corriente entre el 1^{er} y 5^o pulso a +80 fue de $18.7 \pm 1.5\%$ ($n = 6$).

VI. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis muestra las propiedades del bloqueo de los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} sobre los canales Ca_v3 clonados de humano expresados establemente en células HEK-293. Los resultados muestran que los tres iones bloquean los canales $\text{Ca}_v3.3$ potentemente (en el rango nM), aunque ninguno de ellos manifiesta una selectividad diferencial por alguno de los canales Ca_v3 , ya que los valores de IC_{50} no difieren en más de tres veces entre ellos. Sin embargo, las características del bloqueo y desbloqueo sí presentan características distintivas. A continuación se discuten los resultados y se plantea la relevancia de los mismos.

6.1. Los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} bloquean potentemente los canales Ca_v3

A partir del ajuste de las curvas concentración-respuesta (**Fig. 9**), se encontraron coeficientes de Hill muy cercanos a la unidad, lo que sugiere que existe una relación estequiométrica 1:1 entre el ion bloqueador y su sitio de unión en el canal, es decir que existe solo un sitio de unión en el canal para cada ion bloqueador inorgánico. Por otra parte, los valores de IC_{50} en el orden nM obtenidos para los trivalentes indican la elevada potencia de estos iones en el bloqueo de los canales Ca_v3 , las cuales son concentraciones de 2-3 órdenes de magnitud menores que los valores de IC_{50} reportados para cationes divalentes (como Ni^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} , por ejemplo), para los que se reportan valores del orden de μM [63, 86]. Asimismo, los resultados presentados en el presente trabajo son consistentes con los valores de IC_{50} reportados previamente para los iones inorgánicos trivalentes en canales $\text{Ca}_v3.1$ recombinantes y en canales Ca_v3 nativos [64, 84, 87]. Por lo tanto, la serie de los lantánidos representan los bloqueadores inorgánicos más potentes de los canales Ca_v3 , aunque existan diferencias sutiles en los valores de IC_{50} obtenidos en el presente trabajo y lo reportado previamente por otros grupos de investigación [64, 70, 84, 88]. En uno de estos estudios en el que se utilizaron varios iones trivalentes (incluidos La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+}) como bloqueadores de corrientes nativas de calcio tipo T de células de tiroides tipo C, se encontró que la IC_{50} de Y^{3+} fue casi 10 veces más pequeña que la de La^{3+} , en consecuencia los autores reportaron una relación entre la potencia de algunos iones lantánidos y su radio iónico, siendo bloqueadores más potentes los de menor radio iónico [84]; sin embargo, en el presente trabajo de tesis no se encontraron grandes diferencias entre las IC_{50} de cada lantánido estudiado para bloquear los canales Ca_v3 , siendo todas las concentraciones utilizadas del mismo orden. Por consiguiente

no se puede proponer una relación entre estas concentraciones y su radio iónico. Tales discrepancias pueden ser atribuidas a las diferencias entre los canales clonados y los nativos, de hecho, en otro estudio en el que se utilizó el canal $\text{Ca}_v3.1$ clonado de humano y transfectado en células tsA-201 [64], se reportan valores de IC_{50} para La^{3+} y Ce^{3+} muy similares a los reportados en el presente trabajo, por el contrario, el valor reportado para Y^{3+} es casi 6 veces menor que el obtenido en nuestras condiciones experimentales. Lo anterior puede deberse a una competencia entre el Y^{3+} y el ion permeante por el mismo sitio de unión en el canal. La evidencia que apoya esta conjetura se reportó en ese mismo estudio, en el que al comparar el bloqueo de Y^{3+} en presencia de Ba^{2+} con el obtenido cuando el Ca^{2+} fue el acarreador de carga, la potencia del Y^{3+} disminuyó aproximadamente 3 veces, lo cual se explica porque los canales de calcio, incluyendo el $\text{Ca}_v3.1$, tienen una mayor afinidad por el Ca^{2+} que por el ion Ba^{2+} [89-90]. Estos resultados son consistentes con diversos trabajos en los que se sugiere que los bloqueadores inorgánicos de canales de calcio compiten con los iones permeantes (Ca^{2+} , Ba^{2+} o Sr^{2+}) por un sitio de unión de alta afinidad en el poro del canal [64, 70, 84, 88, 91-92].

En el caso de los canales $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$ no se tienen valores de IC_{50} reportados con los cuales comparar nuestros resultados, por lo que este es el primer trabajo en el que se estudia el efecto de tres iones sobre las corrientes de estos canales clonados de humano. Los resultados demuestran que la potencia de bloqueo de La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} es similar en los tres canales Ca_v3 (**Tabla 3**). Ciertamente el canal $\text{Ca}_v3.3$ muestra valores de IC_{50} ligeramente menores que los otros dos miembros de la subfamilia, concretamente para el La^{3+} , cuya concentración para bloquear el 50% de los canales es 3 veces más baja que la de $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$.

6.2. Efectos del bloqueo de los canales Ca_v3 por La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} en la relación I-V

La mayoría de los trabajos en los que se analiza el bloqueo de los canales de calcio HVA por iones inorgánicos divalentes indican que el efecto es dependiente del voltaje [93-96], con variaciones cuantitativas y cualitativas dependiendo del subtipo del canal HVA [95]. En el caso de los canales LVA diversos estudios han demostrado que el bloqueo por iones divalentes presenta un componente importante dependiente de voltaje, principalmente en los canales $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.3$, mientras que $\text{Ca}_v3.2$ es menos sensible a tal efecto [63, 84, 86]. Por el contrario, el bloqueo por cationes trivalentes [64, 70, 84] es básicamente independiente de voltaje en el rango fisiológico (-50 a +30 mV). El presente trabajo de tesis aporta evidencia

adicional de que el bloqueo de los canales Ca_v3 por los iones La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} , es prácticamente independiente del voltaje, ya que no se observaron diferencias importantes en el porcentaje de bloqueo de la corriente de calcio tipo T a causa de los lantánidos en el intervalo de voltajes explorados (**Fig. 11**). La única excepción se observó en los canales $\text{Ca}_v3.3$ en presencia de La^{3+} (**Fig. 11A**), cuyo bloqueo disminuyó $\sim 20\%$ en dicho intervalo de voltajes. Coincidentemente, datos recientes del laboratorio del Dr. Gómora indican que el canal $\text{Ca}_v3.3$ exclusivamente, experimenta un marcado bloqueo dependiente de voltaje en presencia de amilorida (un diurético ahorrador de potasio), que no se observa en los canales $\text{Ca}_v3.1$ ni los $\text{Ca}_v3.2$ [61]. Además, estudios de modelado de proteínas y *docking*, sugieren una arquitectura estructural significativamente diferente entre el canal $\text{Ca}_v3.3$ y los otros dos miembros de la subfamilia [61, 97]. Por lo anterior, es probable que dichas diferencias estructurales del canal $\text{Ca}_v3.3$ contribuyan a explicar las diferencias en el bloqueo dependiente de voltaje observadas en este trabajo en los canales Ca_v3 .

Por otro lado, el análisis cuantitativo de las relaciones I - V mostraron modificaciones significativas en el potencial de inversión de la corriente (V_{rev}) como resultado de la presencia de iones trivalentes, principalmente cuando los canales $\text{Ca}_v3.1$ son bloqueados por Y^{3+} , ya que el valor de V_{rev} se desplaza aproximadamente 6 mV hacia voltajes menos positivos (**Tabla 4**). Por otra parte, el bloqueo por La^{3+} y Ce^{3+} de los canales $\text{Ca}_v3.1$ modificó de manera más discreta el V_{rev} . La modificación de este parámetro sugiere que el ion Y^{3+} podría estar compitiendo con el ion permeante (Ca^{2+}) por un mismo sitio de unión en el poro del canal, alterando la selectividad de éste al Ca^{2+} , de tal manera que en presencia de Y^{3+} , la fuerza impulsora requerida para generar una corriente saliente es menor, que cuando no se encuentra el catión trivalente. Estos resultados indican que el sitio de unión para el ion Y^{3+} en los canales $\text{Ca}_v3.1$ podría ser de mayor afinidad comparado con los sitios de unión para La^{3+} y Ce^{3+} . Por otra parte, en la subunidad $\text{Ca}_v3.3$ también se observó una modificación significativa en el V_{rev} en presencia de Y^{3+} , aunque el cambio fue únicamente de 3.8 mV (**Tabla 4**). De igual manera, los efectos de La^{3+} y Ce^{3+} sobre el V_{rev} de los tres canales Ca_v3 fueron menos perceptibles.

6.3. Desbloqueo inducido a potenciales extremos negativos y positivos

En diferentes trabajos de investigación se ha demostrado que la aplicación de potenciales negativos extremos libera a los canales de calcio [69, 80-84] del bloqueo inducido por

diferentes inhibidores de estos canales. Sin embargo, este fenómeno ha sido poco estudiado en los canales LVA en presencia de cationes trivalentes

Un estudio realizado en células parafaliculares (células C) de rata y de humano mostró que no existe desbloqueo de los canales de calcio tipo T a potenciales muy despolarizados en presencia de Y^{3+} y La^{3+} [84]. Otro trabajo, exploró los canales $Ca_v3.1$ clonados de rata e Y^{3+} como antagonista, encontrando un desbloqueo de estos canales en respuesta a las despolarizaciones a potenciales positivos extremos [70]. Un estudio más reciente reportó el desbloqueo de los canales Ca_v3 clonados de humano a potenciales positivos extremos cuando los agentes antagonistas son Cd^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} [86]. En el presente trabajo se analizó por primera vez el efecto de potenciales extremos en el bloqueo por La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} de las corrientes generadas por los canales Ca_v3 clonados de humano. Los resultados obtenidos sugieren que el perfil de bloqueo por los iones trivalentes aquí estudiados está estrechamente relacionado con su radio iónico y las diferencias estructurales entre las subunidades de los canales Ca_v3 .

En primer lugar, el bloqueo por Y^{3+} sobre los tres canales Ca_v3 fue completamente independiente del voltaje en el rango de voltajes estudiados (**Fig. 13C** y **15C**). Contrario a estos resultados, un estudio realizado por el grupo del Dr. Stephen W. Jones en 2004 determinó que existe una disminución del bloqueo por Y^{3+} a voltajes positivos extremos [70]. Cabe señalar que en dicho estudio se exploraron voltajes mucho más positivos (+200 mV) que los analizados en el presente trabajo de tesis (+120 mV), por lo que es probable que el desbloqueo de los canales Ca_v3 en presencia del ion Y^{3+} se observe a potenciales más positivos de los que aquí se exploraron. Interesantemente, en dicho trabajo queda claro que el sitio de unión del Y^{3+} en el canal $Ca_v3.1$ se ubica en algún lugar de la vía de permeación de éste [70].

En segundo lugar, el bloqueo del canal $Ca_v3.2$ por los iones trivalentes presentó los porcentajes más bajos de desbloqueo inducido por potenciales extremos (negativos y positivos), solo con La^{3+} a voltajes extremos negativos y con Ce^{3+} a voltajes muy positivos se observó un desbloqueo discreto (**Fig. 13A** y **15B**). Nuevamente, estos datos son consistentes con trabajos previos mostrando la poca dependencia al voltaje del bloqueo del canal $Ca_v3.2$ por antagonistas inorgánicos y orgánicos, a pesar de ser el canal Ca_v3 más sensible al bloqueo por éstos [61, 63, 86]. En tercer lugar, los efectos observados con La^{3+} y Ce^{3+} sobre las colas

de corriente generadas a voltajes extremos positivos y negativos fueron muy similares; por ejemplo, en la **Fig. 13A y B** se muestra el bloqueo por La^{3+} y Ce^{3+} dependiente de voltaje, caracterizado por un desbloqueo (menor bloqueo de la I_{Ca}) a los voltajes más negativos explorados aquí (-180 mV), esta dependencia al voltaje se restringe a los canales $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.3$, aunque también se presentó un ligero efecto en los canales $\text{Ca}_v3.2$ bajo la presencia de La^{3+} (**Fig. 13A**). En la **Fig. 15A y B** se presentan resultados similares a voltajes extremos positivos para los mismos trivalentes. No obstante la misma tendencia en el efecto de La^{3+} y Ce^{3+} sobre el desbloqueo a potenciales extremos, los resultados permiten diferenciar entre los canales Ca_v3 . Por un lado, en presencia de La^{3+} el desbloqueo es claramente preponderante en los canales $\text{Ca}_v3.1$ a voltajes negativos (**Fig. 13A**), mientras que el mayor desbloqueo se observó en los canales $\text{Ca}_v3.3$ a voltajes extremos positivos tanto con La^{3+} como con Ce^{3+} (**Fig. 15A y B**).

El desbloqueo de los canales a potenciales extremos positivos y negativos puede explicarse en términos del modelo de Woodhull descrito en 1973 [98], el cual, permite suponer que el sitio de unión de los iones La^{3+} y Ce^{3+} se encuentra en el interior del poro del canal, de tal manera que obstruye el flujo de iones de Ca^{2+} al interior de la célula, y cuando el potencial de membrana es fijado a valores muy positivos (p. ej. +120 mV), la carga positiva generada al interior de la célula provoca la repulsión del ion bloqueador, separándolo de su sitio de unión e induciendo el desbloqueo. De manera similar, a potenciales negativos extremos los iones lantánidos trivalentes La^{3+} y Ce^{3+} son atraídos hacia el interior de la célula, muy probablemente pasando a través del canal al interior de la célula [86, 94], permitiendo así el flujo de iones de Ca^{2+} a través del canal. Existen datos en la literatura que apoyan esta interpretación, concretamente se ha reportado que cationes monovalentes como Li^+ y Na^+ pueden atravesar los canales de calcio en ausencia de cationes divalentes [99]. Por el contrario, también se ha demostrado que iones trivalentes como el Sc^{3+} no permean estos canales [64]. El radio iónico del Sc^{3+} (~ 0.7 Å) es menor que el radio iónico del Na^+ (~ 1 Å) y que el de los iones La^{3+} y Ce^{3+} por lo tanto, esto indica que aún y cuando el radio iónico de los antagonistas es un factor importante para comprender el mecanismo de bloqueo, existen también otros factores que afectan este proceso. En este sentido el sitio de unión para el ion Y^{3+} en los canales Ca_v3 podría ser sustancialmente diferente (distintos aminoácidos en la vía de permeación del canal) al sitio para La^{3+} y Ce^{3+} de tal forma que se requieran potenciales más positivos para desprender al Y^{3+} de su sitio de unión. Explicaciones alternativas como el tamaño del radio iónico más pequeño del Y^{3+} asociado a una mayor penetración en el poro del

canal, no es aplicable, ya que en tal situación se debería de observar un bloqueo dependiente de voltaje, el cual no se observó en los experimentos del presente trabajo (**Fig. 11C, 13C y 15C**).

Por otra parte, en varios trabajos se ha establecido que los bloqueadores inorgánicos de canales de calcio compiten con los iones permeantes (Ca^{2+} o Ba^{2+}) por un sitio de unión de alta afinidad en el poro del canal [68, 91-92, 100-102], lo cual sugiere, que el desbloqueo dependiente de voltaje a valores extremos positivos en presencia de bloqueadores inorgánicos podría ser en realidad, un desbloqueo dependiente de la corriente que se genera a estos potenciales, ya que la fuerza impulsora que promueve el flujo de iones al exterior de la célula durante una despolarización extrema, podría eliminar la interacción entre el agente antagonista y el sitio de unión en el canal. El análisis anterior extrapolado a los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis sugiere que los iones trivalentes La^{3+} y Ce^{3+} pueden alcanzar fácilmente su sitio de unión desde la cara extracelular de los canales Ca_v3 , lo cual se traduce como un bloqueo de la corriente, mismo que es revertido cuando se aplican potenciales extremos tanto positivos como negativos. Sin embargo, en el caso del Y^{3+} este no parece ser el mecanismo de bloqueo.

6.4. El ion La^{3+} introduce un “gancho” en las colas de corriente de los canales $\text{Ca}_v3.1$

En el presente trabajo se reporta por primera vez la existencia de un *hook* o “gancho” (en las colas de corriente de los canales $\text{Ca}_v3.1$ en presencia únicamente de La^{3+} (**Fig. 17A**). Dicho gancho se observa como un incremento transitorio en la amplitud de la cola de corriente, antes de que los canales se cierren propiamente y que el valor de la corriente tienda a cero (Inserto, **Fig. 17A**). Las colas de corriente “enganchadas” se generan por la desocupación del sitio de unión por el bloqueador, de tal manera que el canal conduce corriente brevemente antes de cerrarse. Este no es un fenómeno muy generalizado dentro de los canales activados por voltaje, aunque previamente se ha reportado para el bloqueo de los canales K_v por derivados de amonio cuaternario [103], de los canales Na_v por pancuronium (relajante muscular) [104] y N-methyl estriquina [105]; y de los canales de calcio HVA por Cd^{2+} [81, 92]. Una característica importante de este fenómeno es que las colas de corriente en presencia de La^{3+} no cruzan sobre las colas control, de hecho, el curso temporal posterior es prácticamente idéntico en ambas colas de corriente registradas a -120 mV (Inserto, **Fig. 17A**). Esta observación indica que el La^{3+} no disminuye significativamente el cierre del canal en el

intervalo de voltajes entre -180 y -110 mV (**Fig. 17B**). Aunque a voltajes más positivos (entre -100 y -60 mV) si provoca un enlentecimiento de la cola de corriente, sugiriendo que a tales voltajes el canal no se puede cerrar mientras que el La^{3+} se encuentre dentro del poro del canal. Interesantemente, los “ganchos” solo se observaron en el canal $\text{Ca}_v3.1$ y únicamente con La^{3+} como bloqueador, lo cual puede ser utilizado como una herramienta adicional para discriminar entre los canales Ca_v3 .

6.5. Interacción del ion Ce^{3+} con el estado cerrado de los canales $\text{Ca}_v3.3$

En un trabajo previo se demostró que el bloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.1$ por el ion trivalente Y^{3+} incluye la interacción de éste con el estado cerrado de los canales [70], un estudio más reciente del mismo laboratorio de donde surge el presente trabajo de tesis, estudió la interacción del Y^{3+} con el estado cerrado de los canales Ca_v3 , encontrando que dicho ion también presenta interacción con la conformación cerrada de los canales $\text{Ca}_v3.3$ [106]. En el presente trabajo se exploró la posibilidad de que el ion Ce^{3+} interaccione con el estado cerrado de los canales $\text{Ca}_v3.3$. Los resultados obtenidos permiten extender la observación de que los iones lantánidos interaccionan con el estado cerrado del canal, al menos para el caso de Ce^{3+} e Y^{3+} (**Fig. 18B**). Estos resultados demuestran que el ion Ce^{3+} ejerce su acción antagonista sobre los canales $\text{Ca}_v3.3$ no solo en el estado abierto, sino también en el estado cerrado del canal. Es importante mencionar que estos experimentos se realizaron únicamente en los canales $\text{Ca}_v3.3$, ya que las corrientes salientes a través de dichos canales son bastante prominentes, premisa necesaria para estudiar el efecto del ion sobre el estado cerrado de los canales con el protocolo empleado (**Fig. 18**). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de la existencia de un sitio de afinidad para los iones lantánidos dentro del poro del canal, y agregan evidencias sobre la localización de la “compuerta” del canal, misma que pudiera estar ubicada hacía la parte intracelular del filtro de selectividad, permitiendo de esta manera la intromisión de los iones lantánidos en el canal cuando éste se encuentra en su configuración cerrada, de tal manera que continúan bloqueando la corriente generada cuando estos son activados.

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta que el bloqueo de los canales Ca_v3 clonados de humano por los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} se caracteriza por modificar diferencialmente las propiedades biofísicas de los tres miembros de esta subfamilia de canales de calcio, aportando nueva información para el estudio del funcionamiento de estos canales y del mecanismo de bloqueo de estos iones inorgánicos. Las observaciones más importantes permiten concluir lo siguiente:

1. Los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} son potentes bloqueadores de los canales Ca_v3 , con valores de IC_{50} del orden nano molar, sin embargo, ninguno de ellos bloquea de manera específica alguno de los canales Ca_v3 .
2. El bloqueo de la corriente a potenciales fisiológicos fue independiente del voltaje en los tres canales Ca_v3 .
3. El desbloqueo de los canales Ca_v3 a potenciales extremos (positivos y negativos) involucra una dependencia al voltaje en presencia de La^{3+} y Ce^{3+} siendo el bloqueo de los canales $Ca_v3.2$ el menos afectado, por el contrario, en presencia de Y^{3+} no existió desbloqueo en ninguno de los canales Ca_v3 sugiriendo que el Y^{3+} podría unirse a un sitio diferente al de los iones La^{3+} y Ce^{3+} en los canales Ca_v3 .
4. El bloqueo por los iones trivalentes La^{3+} , Ce^{3+} e Y^{3+} no afecta mayormente el cierre de los canales Ca_v3 ; con la excepción del ión La^{3+} en los canales $Ca_v3.1$, en los que induce el desbloqueo de canales durante la repolarización de la membrana, generando colas de corriente “enganchadas”, y enlenteciendo el cierre de los canales a voltajes más positivos que -100 mV.
5. El efecto inducido por el ion Ce^{3+} presenta un componente de bloqueo del estado cerrado del canal $Ca_v3.3$.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Fanjul, M.L., M. Hiriart, and F. Fernández de Miguel, *Biología Funcional de los Animales*. 1998, México: Siglo XXI.
2. Lipscombe, D., *Ion Channels*. Encyclopedia of Life Sciences, 2001: p. 1-9.
3. Hille, B., *Ion Channels of Excitable Membranes*. Third Edition ed. 2001, Washington: Sinauer Associates.
4. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 473-96.
5. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 449-72.
6. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
7. Hodgkin, A.L., A.F. Huxley, and B. Katz, *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 424-48.
8. Conti-Tronconi, B.M. and M.A. Raftery, *The nicotinic cholinergic receptor: correlation of molecular structure with functional properties*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 491-530.
9. Noda, M., et al., *Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor*. Nature, 1983. **305**(5937): p. 818-23.
10. Noda, M., et al., *Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 121-7.
11. Tanabe, T., et al., *Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 313-8.
12. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
13. Sather, W.A. and E.W. McCleskey, *Permeation and selectivity in calcium channels*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 133-59.
14. Ertel, E.A., et al., *Nomenclature of voltage-gated calcium channels*. Neuron, 2000. **25**(3): p. 533-5.
15. Uhlen, P. and N. Fritz, *Biochemistry of calcium oscillations*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 28-32.
16. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
17. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 521-55.
18. Darszon, A., et al., *Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1305-55.
19. Mitterdorfer, J., et al., *Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels*. J Bioenerg Biomembr, 1998. **30**(4): p. 319-34.
20. Todorovic, S.M., et al., *Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors*. Neuron, 2001. **31**(1): p. 75-85.
21. Todorovic, S.M., et al., *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, 2001. **60**(3): p. 603-10.
22. Gomora, J.C., et al., *Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(5): p. 1121-32.

23. Kim, D., et al., *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*, 2001. **31**(1): p. 35-45.
24. Tyagarajan, S., et al., *A potent and selective indole N-type calcium channel (Ca(v)2.2) blocker for the treatment of pain*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. **21**(2): p. 869-73.
25. Perez-Reyes, E., *Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **56**(7-8): p. 660-9.
26. Nilius, B., et al., *A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells*. *Nature*, 1985. **316**(6027): p. 443-6.
27. Nowycky, M.C., A.P. Fox, and R.W. Tsien, *Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity*. *Nature*, 1985. **316**(6027): p. 440-3.
28. Armstrong, C.M. and D.R. Matteson, *Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells*. *Science*, 1985. **227**(4682): p. 65-7.
29. Bean, B.P., *Classes of calcium channels in vertebrate cells*. *Annu Rev Physiol*, 1989. **51**: p. 367-84.
30. Arikath, J. and K.P. Campbell, *Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex*. *Curr Opin Neurobiol*, 2003. **13**(3): p. 298-307.
31. Bauer, C.S., et al., *A new look at calcium channel alpha2delta subunits*. *Curr Opin Neurobiol*, 2010. **20**(5): p. 563-71.
32. Davies, A., et al., *Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(5): p. 220-8.
33. Kang, M.G. and K.P. Campbell, *Gamma subunit of voltage-activated calcium channels*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21315-8.
34. Zamponi, G., *Voltage-Gated Calcium Channels*. Molecular Biology Intelligency Unit. 2005, Georgetown, Texas. USA: Klumer Academic / Plenum Publishers.
35. Randall, A. and C.D. Benham, *Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels*. *Mol Cell Neurosci*, 1999. **14**(4-5): p. 255-72.
36. Higueldo, J.F., *Efecto de las subunidades beta de los canales HVA sobre el canal Cav3.3 in Facultad de Ciencias Biológicas*. 2007, UAEM: México.
37. Dubel, S.J., et al., *Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 29263-9.
38. Dolphin, A.C., et al., *The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G*. *J Physiol*, 1999. **519 Pt 1**: p. 35-45.
39. Hansen, J.P., et al., *Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(6): p. 1147-58.
40. 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*, in *Facultad de Ciencias*. 2007, UNAM: México.
41. Jiang, Y., et al., *The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel*. *Nature*, 2003. **423**(6935): p. 42-8.
42. Jiang, Y., et al., *X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel*. *Nature*, 2003. **423**(6935): p. 33-41.
43. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
44. Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff, *How far will you go to sense voltage?* *Neuron*, 2005. **48**(5): p. 719-25.

45. Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff, *How does voltage open an ion channel?* Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 23-52.
46. George, A.L., Jr., *Inherited disorders of voltage-gated sodium channels.* J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 1990-9.
47. Serrano, J.R., E. Perez-Reyes, and S.W. Jones, *State-dependent inactivation of the alpha1G T-type calcium channel.* J Gen Physiol, 1999. **114**(2): p. 185-201.
48. Raman, I.M. and B.P. Bean, *Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons.* J Neurosci, 1997. **17**(12): p. 4517-26.
49. Elmslie, K.S., *Calcium channel blockers in the treatment of disease.* J Neurosci Res, 2004. **75**(6): p. 733-41.
50. Abernethy, D.R. and N.M. Soldatov, *Structure-functional diversity of human L-type Ca²⁺ channel: perspectives for new pharmacological targets.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): p. 724-8.
51. Lacinova, L., *Pharmacology of recombinant low-voltage activated calcium channels.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004. **3**(2): p. 105-11.
52. Heady, T.N., et al., *Molecular pharmacology of T-type Ca²⁺ channels.* Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(4): p. 339-50.
53. Huguenard, J.R., *T-Channel Defects in Patients with Childhood Absence Epilepsy.* Epilepsy Curr, 2004. **4**(1): p. 7-8.
54. Krayenbuhl, J.C., et al., *Drug-drug interactions of new active substances: mibefradil example.* Eur J Clin Pharmacol, 1999. **55**(8): p. 559-65.
55. Todorovic, S.M. and V. Jevtovic-Todorovic, *Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway.* Channels (Austin), 2007. **1**(4): p. 238-45.
56. Todorovic, S.M., E. Perez-Reyes, and C.J. Lingle, *Anticonvulsants but not general anesthetics have differential blocking effects on different T-type current variants.* Mol Pharmacol, 2000. **58**(1): p. 98-108.
57. Lacinova, L., N. Klugbauer, and F. Hofmann, *Regulation of the calcium channel alpha(1G) subunit by divalent cations and organic blockers.* Neuropharmacology, 2000. **39**(7): p. 1254-66.
58. Williams, M.E., et al., *Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel.* J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 791-9.
59. McNaughton, N.C., et al., *Inhibition of recombinant low-voltage-activated Ca(2+) channels by the neuroprotective agent BW619C89 (Sipatrigine).* Neuropharmacology, 2000. **39**(7): p. 1247-53.
60. Enyeart, J.J., B.A. Biagi, and B. Mlinar, *Preferential block of T-type calcium channels by neuroleptics in neural crest-derived rat and human C cell lines.* Mol Pharmacol, 1992. **42**(2): p. 364-72.
61. Lopez-Charcas, O.R.M.G.J., *Block of human CaV3 channels by the diuretic amiloride.* Mol Pharmacol, 2012. **En prensa**.
62. Tsien, R.W., et al., *Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation.* Trends Neurosci, 1988. **11**(10): p. 431-8.
63. Lee, J.H., et al., *Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H.* Biophys J, 1999. **77**(6): p. 3034-42.
64. Beedle, A.M., J. Hamid, and G.W. Zamponi, *Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations.* J Membr Biol, 2002. **187**(3): p. 225-38.
65. Elinder, F. and P. Arhem, *Metal ion effects on ion channel gating.* Q Rev Biophys, 2003. **36**(4): p. 373-427.
66. Nieboer, E., *The lanthanide ions as probes in biological systems.* Structure and Bonding 1975. **22**(1).

67. Evans, C.H., *Biochemistry of the Lanthanides*, ed. P. Press. 1990, New York.
68. Mlinar, B., B.A. Biagi, and J.J. Enyeart, *Voltage-gated transient currents in bovine adrenal fasciculata cells. I. T-type Ca²⁺ current*. *J Gen Physiol*, 1993. **102**(2): p. 217-37.
69. Lansman, J.B., *Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit*. *J Gen Physiol*, 1990. **95**(4): p. 679-96.
70. Obejero-Paz, C.A., I.P. Gray, and S.W. Jones, *Y³⁺ block demonstrates an intracellular activation gate for the alpha1G T-type Ca²⁺ channel*. *J Gen Physiol*, 2004. **124**(6): p. 631-40.
71. Jahnsen, H. and R. Llinas, *Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study*. *J Physiol*, 1984. **349**: p. 205-26.
72. Raman, I.M. and B.P. Bean, *Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons*. *J Neurosci*, 1999. **19**(5): p. 1663-74.
73. Kehl, S.J. and R.N. McBurney, *The firing patterns of rat melanotrophs recorded using the patch clamp technique*. *Neuroscience*, 1989. **33**(3): p. 579-86.
74. Cribbs, L.L., et al., *Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1c, a T-type calcium channel from human brain*. *FEBS Lett*, 2000. **466**(1): p. 54-8.
75. Cribbs, L.L., et al., *Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family*. *Circ Res*, 1998. **83**(1): p. 103-9.
76. Gomora, J.C., et al., *Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation*. *Biophys J*, 2002. **83**(1): p. 229-41.
77. Brooks, S.P. and K.B. Storey, *Bound and determined: a computer program for making buffers of defined ion concentrations*. *Anal Biochem*, 1992. **201**(1): p. 119-26.
78. Triggle, D.J., *Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets*, ed. M. R., K. H., and F. G. Vol. 29. 2006: Wiley-Vch.
79. Perez-Reyes, E., *Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(1): p. 117-61.
80. Brown, A.M., Y. Tsuda, and D.L. Wilson, *A description of activation and conduction in calcium channels based on tail and turn-on current measurements in the snail*. *J Physiol*, 1983. **344**: p. 549-83.
81. Swandulla, D. and C.M. Armstrong, *Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(5): p. 1736-40.
82. Lux, H.D., E. Carbone, and H. Zucker, *Na⁺ currents through low-voltage-activated Ca²⁺ channels of chick sensory neurones: block by external Ca²⁺ and Mg²⁺*. *J Physiol*, 1990. **430**: p. 159-88.
83. Kuo, C.C. and P. Hess, *Ion permeation through the L-type Ca²⁺ channel in rat phaeochromocytoma cells: two sets of ion binding sites in the pore*. *J Physiol*, 1993. **466**: p. 629-55.
84. Mlinar, B. and J.J. Enyeart, *Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells*. *J Physiol*, 1993. **469**: p. 639-52.
85. Jones, S.W. and T.N. Marks, *Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. Activation kinetics and pharmacology*. *J Gen Physiol*, 1989. **94**(1): p. 151-67.
86. Diaz, D., et al., *Contrasting effects of Cd²⁺ and Co²⁺ on the blocking/unblocking of human Cav3 channels*. *J Membr Biol*, 2005. **207**(2): p. 91-105.
87. Biagi, B.A. and J.J. Enyeart, *Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(3 Pt 1): p. C515-20.
88. Enyeart, J.J., et al., *Modulation of IA potassium current in adrenal cortical cells by a series of ten lanthanide elements*. *J Membr Biol*, 1998. **164**(2): p. 139-53.

89. Lansman, J.B., P. Hess, and R.W. Tsien, *Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore.* J Gen Physiol, 1986. **88**(3): p. 321-47.
90. Serrano, J.R., et al., *Mg(2+) block unmasks Ca(2+)/Ba(2+) selectivity of alpha1G T-type calcium channels.* Biophys J, 2000. **79**(6): p. 3052-62.
91. Hagiwara, S., J. Fukuda, and D.C. Eaton, *Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp.* J Gen Physiol, 1974. **63**(5): p. 564-78.
92. Chow, R.H., *Cadmium block of squid calcium currents. Macroscopic data and a kinetic model.* J Gen Physiol, 1991. **98**(4): p. 751-70.
93. Hagiwara, S. and L. Byerly, *Calcium channel.* Annu Rev Neurosci, 1981. **4**: p. 69-125.
94. Thevenod, F. and S.W. Jones, *Cadmium block of calcium current in frog sympathetic neurons.* Biophys J, 1992. **63**(1): p. 162-8.
95. Zamponi, G.W., E. Bourinet, and T.P. Snutch, *Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites.* J Membr Biol, 1996. **151**(1): p. 77-90.
96. McFarlane, M.B. and W.F. Gilly, *State-dependent nickel block of a high-voltage-activated neuronal calcium channel.* J Neurophysiol, 1998. **80**(4): p. 1678-85.
97. Balderas, E., et al., *Niflumic acid blocks native and recombinant T-type channels.* J Cell Physiol, 2012. **227**(6): p. 2542-55.
98. Woodhull, A.M., *Ionic blockage of sodium channels in nerve.* J Gen Physiol, 1973. **61**(6): p. 687-708.
99. Hess, P., J.B. Lansman, and R.W. Tsien, *Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells.* J Gen Physiol, 1986. **88**(3): p. 293-319.
100. Kim, M.S., et al., *Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel.* FEBS Lett, 1993. **318**(2): p. 145-8.
101. Tang, S., et al., *Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel.* J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13026-9.
102. Yang, J., et al., *Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels.* Nature, 1993. **366**(6451): p. 158-61.
103. Armstrong, C.M., *Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons.* J Gen Physiol, 1971. **59**: p. 413-437.
104. Yeh, J.Z. and T. Narahashi, *Kinetic analysis of pancuronium interaction with sodium channels in squid axon membranes.* J Gen Physiol, 1977. **69**(3): p. 293-323.
105. Cahalan, M.D. and W. Almers, *Block of sodium conductance and gating current in squid giant axons poisoned with quaternary strychnine.* Biophys J, 1979. **27**(1): p. 57-73.
106. López-Charcas, O., *Efecto del fármaco amilorida sobre las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo T clonados de humano,* in Facultad de Química. 2011, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 86.